

Desarrollo embrionario y retención intrauterina en colúbridos del nordeste de Argentina

María Teresa Sandoval, José Augusto Ruiz García & Blanca Beatriz Álvarez

Cátedra de Embriología Animal. Laboratorio de Herpetología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Libertad, 5470. 3400 Corrientes. Argentina. C.e.: mtsandoval@exa.unne.edu.ar

Fecha de aceptación: 16 de noviembre de 2012.

Key words: Ophidia, egg retention, embryonic stage, oviposition.

En los reptiles escamosos se reconocen dos modelos de desarrollo: oviparidad y viviparidad. Estos se consideran parte de un continuo y se ha planteado en numerosos trabajos que el patrón vivíparo habría evolucionado desde la oviparidad a través de pasos progresivos que incluyeron la retención uterina de huevos, el adelgazamiento de la cáscara y modificaciones en los anexos extraembrionarios y en la pared oviductal para la formación de estructuras placentarias (Tinkle & Gibbons, 1977; Blackburn, 1981; Andrews & Rose, 1994; Blackburn, 1998; Andrews & Mathies, 2000; Blackburn, 2000; Andrews, 2002; Heulin *et al.*, 2002; Stewart & Thompson, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Blackburn & Flemming, 2009). El conocimiento del grado de desarrollo ontogenético en el momento de la puesta de huevos es fundamental para estimar el tiempo de retención embrionaria intrauterina (Demarco, 1992), cuestión que resulta esencial para interpretar la diversidad de historias de vida dentro de los escamosos (Radder *et al.*, 2008).

Entre los escamosos ovíparos se pueden reconocer diversas situaciones, desde hembras que ponen los huevos prontamente después de la ovulación y fecundación, hasta casos en los que se prolonga el tiempo de retención uterina, de modo que al momento de la puesta los embriones se encuentran en un estado avanzado del desarrollo (Blackburn, 1995). Los trabajos de Shine (1983) y Blackburn (1995) compilan una serie de datos acerca del estado embrionario

en el momento de la oviposición de 62 especies de lagartos y 13 de serpientes, pertenecientes a las familias Agamidae, Anguidae, Chamaleontidae, Gekkonidae, Iguanidae, Lacertidae, Pygopodidae, Scincidae, Teiidae, Boidae, Colubridae, Elapidae y Typhlopidae. Braña *et al.* (1991) presentan dicha información para siete especies de lacértidos del norte de España y discuten las posibles relaciones entre el grado de retención embrionaria y el tamaño corporal de la hembra, el tamaño de la camada, la masa relativa de la puesta y la distribución geográfica (principalmente altitudinal) de las diferentes poblaciones analizadas. Demarco (1992, 1993) analiza el estado embrionario en el momento de la puesta de diferentes especies pertenecientes al género *Sceloporus* y destaca su utilidad para estimar el tiempo total del desarrollo ontogenético. Telemeco *et al.* (2010) reportan datos acerca de los aspectos reproductivos de una lagartija alpina, *Bassiana duperreyi*, y analizan experimentalmente el grado de retención embrionaria de hembras sometidas a diferentes temperaturas. Para *Cnemidophorus uniparens* (Billy, 1988), *Agama impalearis* (El Mouden *et al.*, 2000), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002), *Python sebae* (Boughner *et al.*, 2007), el género *Anolis* (Sanger *et al.*, 2008), *Paroedura pictus* (Noro *et al.*, 2009) y *Eublepharis macularius* (Wise *et al.*, 2009) se han propuesto tablas de desarrollo embrionario que cuentan con descripciones de los primeros estadios post-oviposición. Dichos

trabajos ponen de manifiesto la variabilidad de estados embrionarios al momento de la oviposición entre los diversos taxones, los cuales corresponden en su mayoría a lagartos del Hemisferio Norte. Para escamosos sudamericanos, particularmente las serpientes, la información disponible acerca del grado de desarrollo embrionario en el momento de la puesta, y en consecuencia sobre el grado de retención embrionaria, es prácticamente nula.

La familia Colubridae, de distribución cosmopolita, representa el grupo de serpientes de mayor riqueza específica (Burbrink & Crother, 2011). Han colonizado todos los hábitats y climas posibles, desde los trópicos hasta zonas desérticas. La mayoría de los representantes de la familia son ovíparos, con unas pocas especies vivíparas. En Argentina se han citado alrededor de 100 especies, pudiendo presentar hábitos fosoriales, arborícolas, terrestres o acuáticos (Scrocchi *et al.*, 2006). Su gran diversidad y particularidades ecológicas hacen de los colúbridos un excelente grupo para abordar estudios de biología reproductiva y de desarrollo. En el presente trabajo analizamos el estado embrionario en huevos oviductales y huevos recién puestos de nueve especies del nordeste de Argentina, con el fin de evaluar el grado de retención embrionaria y aportar información que contribuya al estudio de los patrones de desarrollo dentro del clado.

Se analizaron huevos oviductales (HO) de ejemplares de *Mastigodryas bifossatus* (n = 9 HO), *Leptophis ahaetulla* (n = 9 HO), *Sibynomorphus turgidus* (n = 3 HO) y *Philodryas olfersii* (n = 10 HO) depositados en la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste - Corrientes (UNNEC: 9514, 11312, 8502, 10321, respectivamente). Para ello se practicó la disección de las hembras grávidas y se removieron los oviductos con los huevos.

Por otra parte, se analizaron huevos recién puestos (Ov), obtenidos en laboratorio, de *Mussurana bicolor* (n = 2 Ov), *Erythrolamprus poecilogyrus* (n = 7 Ov), *Erythrolamprus alma-densis* (n = 4 Ov), *Erythrolamprus semiaureus* (n = 17 Ov) y *Lygophis anomalus* (n = 4 Ov). Para este caso se realizó la fijación, en formol 10%, de un huevo de cada camada, dentro de las 16 - 48 h post-oviposición, previa inyección de 0,1 ml de pentobarbital sódico como anestésico (American Veterinary Medical Association, 2007).

Para el análisis de los embriones se retiró la cáscara del huevo y se procedió al aislamiento de los mismos de la masa de vitelo. Los ejemplares fueron posteriormente coloreados con azul de metileno, observados y fotografiados bajo lupa estereoscópica Leica ES2. Los embriones fueron caracterizados sobre la base de las principales estructuras anatómicas, y los estadios del desarrollo se asignaron siguiendo como referencia la tabla propuesta por Zehr (1962) (Z), quien propone un total de 37 estadios embrionarios para *Thamnophis sirtalis sirtalis*. Asimismo, a fin de poder establecer comparaciones con otras especies estudiadas, dichos estadios se equipararon con los propuestos por Dufaure & Hubert (1961) (D&H), quienes describen para *Zootoca vivipara* una serie de 40 estadios de desarrollo.

En la Tabla 1 se resumen los datos de los estadios embrionarios observados para cada especie estudiada. En los huevos oviductales se observaron embriones en estadios 15, 16, 18 y 23 Z, diferencias que se interpretan en relación al tiempo de gestación de las hembras en el momento de su captura y fijación. El grado de desarrollo ontogenético en el momento de la oviposición también fue variable, observándose embriones en estadio 18, 21, 22 y 24 Z.

Las principales características anatómicas de cada estadio embrionario examinado se describen a continuación.

Estadio 15 Z: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo bien delimitados, placodas ópticas y óticas invaginadas, arco faríngeo I bien delimitado, corazón tubular, estomodeo invaginado, somitos organizados en la región anterior y media del tronco y esbozo caudal incipiente.

Estadio 16 Z: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y rombencéfalo bien diferenciados, vesícula del cristalino completamente invaginada, vesícula ótica con abertura externa aún visible, arco faríngeo I y primera abertura faríngea bien definidos, corazón en S, somitos organizados en la región posterior de tronco, región caudal sin somitos visibles, cola con giro de 180°, mesénquima pronefro-génico visible, alantoides con islotes sanguíneos, saco vitelino bien vascularizado y amnios completo (Figura 1a).

Estadio 18 Z: mesencéfalo prominente, cúpula óptica con fisura coroidea amplia, cristalino bien definido y blanquecino, vesícula ótica completamente invaginada, arcos faríngeos I y II bien definidos, II y IV distinguibles, primera y segunda aberturas faríngeas presentes, corazón con cámara ventricular desplazada ventral y posteriormente y cámara auricular en posición dorsal anterior, somitos organizados en la porción anterior de la cola, cola con giro de 360°, alantoides vascularizado (Figura 1b).

Estadio 21 Z: telencéfalo prominente dividido en dos lóbulos, curvatura mesencefálica bien definida, placodas nasales engrosadas levemente invaginadas, vesícula ótica redondeada, arco faríngeo I prominente dividido en proceso mandibular y maxilar, arcos II a IV aún visibles, pronefros con túbulos nefríticos organizados, cola con 2,25 vueltas (Figura 1c).

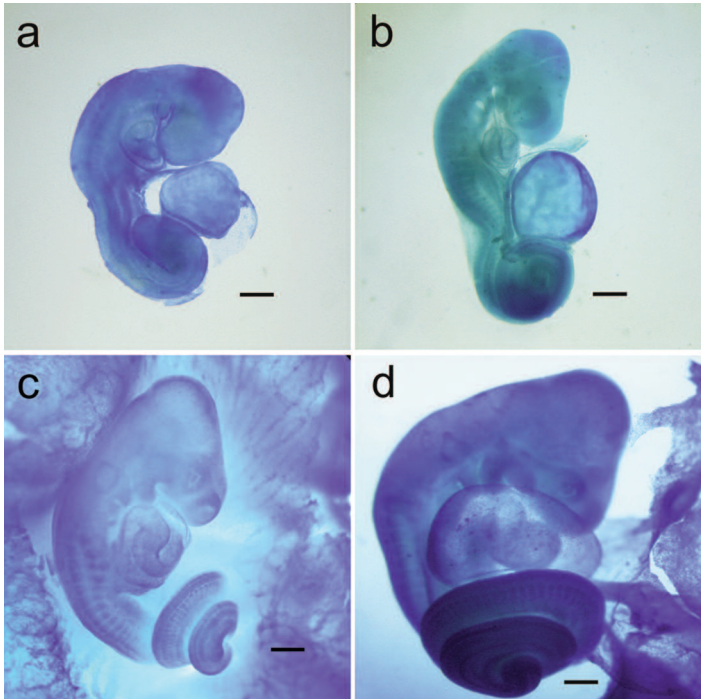


Figura 1. Fotografías de embriones de cinco especies pertenecientes a la familia Colubridae en diferentes estadios del desarrollo embrionario (E.).

(a) *L. abaetulla*, E.16Z (29D&H).

(b) *M. bifossatus*, E.18Z (27D&H).

(c) *E. poecilogyrus*, E.21Z (29D&H).

(d) *L. anomalus*, E.22Z (29D&H).

(e) *M. bicolor*, E.24Z (31D&H).

Escala: 1mm.

Fotos J.A. Ruiz García

Estadio 22 Z: telencéfalo expandido en la región nasal, epífisis incipiente, cúpula óptica con fisura corioidea estrecha, cristalino en posición central, vesícula ótica con conducto endolinfático incipiente, placoda nasal en invaginación, proceso mandibular más prominente que el proceso maxilar, arcos II y III y segunda y tercera aberturas faríngeas aún visibles, cámara ventricular del corazón con crestas endocárdicas incipientes, pronefros bien organizado y mesénquima mesonefrogénico visible en la región lateral-posterior del tronco, cola con 2,5 vueltas (Figura 1d).

Estadio 23 Z: telencéfalo expandido lateralmente, ojo y vesícula ótica igual que en el estadio anterior, órgano vomeronasal incipiente, proceso mandibular más prominente que el estadio anterior, arcos II a IV no visibles, segunda y tercera aberturas faríngeas aún visibles, corazón y cola igual que en el estadio anterior.

Estadio 24 Z: mesencéfalo prominente formado por un sólo lóbulo, ojo con incipiente pigmentación de la retina, cristalino blanqueci-

no con posición central, vesícula ótica globosa con conducto endolinfático desarrollado, digitiforme y dirigido hacia la región dorsal del rombencéfalo, proceso maxilar alcanza la región anterior del ojo, procesos mandibulares derecho e izquierdo más desarrollados que en el estadio anterior y dirigidos hacia medial, segunda y tercera aberturas faríngeas aún visibles, túbulos pronéfricos bien desarrollados y túbulos mesonéfricos incipientes de contorno más o menos lineal, cola con 3,5 vueltas, ejemplares machos con esbozos de hemipenes (Figura 1e).

Blackburn (1995) analiza los modelos de desarrollo en los escamosos y concluye que, excepto raras excepciones, las especies ovíparas tienen retención embrionaria hasta la etapa de "faríngula" (estadios 18 - 27 D&H) o hasta el período donde se esbozan los miembros (estadios 28 - 35 D&H). En su trabajo el autor lista seis especies pertenecientes a la familia Colubridae que presentan retención embrionaria, al menos hasta el estadio 21 D&H (Tabla 1).

Tabla 1. Estadio del desarrollo embrionario en huevos oviductales (HO) y en el momento de la oviposición (Ov) de 15 especies pertenecientes a la familia Colubridae. ¹Citado por Shine (1983), ²Citado por Blackburn (1995). Estadio Z = Estadio del desarrollo (Zehr, 1962); Estadio D&H = Estadio del desarrollo (Defaure & Hubert, 1961).

Especie	Tipo de muestra	Estadio Z	Estadio D&H	Autoría
<i>Amphisma vibakai</i>	Ov	--	28	Fukada (1956) ^{1,2}
<i>Dendrelaphis tristis</i>	Ov	--	30	Wall (1921) ^{1,2}
<i>Elaphe guttata</i>	Ov	--	31	Shine (1983)
<i>Elaphe obsoleta</i>	Ov	--	30	Ditmars (1942) ^{1,2}
<i>Erythrolamprus almadensis</i>	Ov	18	27	Presente estudio
<i>Erythrolamprus semiaureus</i>	Ov	18	27	Presente estudio
<i>Erythrolamprus poecilogyrus</i>	Ov	21	29	Presente estudio
<i>Lampropeltis triangulum</i>	Ov	--	27	Ditmars (1942) ^{1,2}
<i>Leptophis ahaetulla</i>	HO	16	25	Presente estudio
<i>Lygophis anomalus</i>	Ov	22	29	Presente estudio
<i>Mastigodryas bifossatus</i>	HO	18	27	Presente estudio
<i>Mussurana bicolor</i>	Ov	24	31	Presente estudio
<i>Opheodrys aestivus</i>	Ov	--	21-27 (25)	Plummer (1984)
<i>Philodryas olfersii</i>	HO	23	30	Presente estudio
<i>Sibynomorphus turgidus</i>	HO	15 y 16	25-26	Presente estudio

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que los nueve colúbridos analizados en este trabajo retienen los embriones en el oviducto al menos hasta el estadio 15 - 16 Z (25-26 D&H). Según esto, *M. bifossatus*, *L. ahaetulla*, *S. turgidus*, *P. olfersii*, *M. bicolor*, *E. poecilogyrus*, *E. almadensis*, *E. semiaureus* y *L. anomalus* conservan el modelo de desarrollo embrionario propuesto por Blackburn (1995) para escamosos ovíparos.

Se ha sugerido que la retención de huevos entre los escamosos sería una respuesta adaptativa a condiciones climáticas adversas, principalmente las bajas temperaturas, la sequía o la ausencia de sitios aptos para la oviposición (Blackburn, 1982; Shine, 1995). Braña *et al.* (1991) observaron que el grado de retención uterina es significativamente diferente entre ciertas poblaciones de *Zootoca vivipara*, *Iberolacerta monticola*, *Lacerta bilineata*, *Lacerta schreiberi*, *Podarcis bocagei*, *Podarcis muralis* y *Podarcis hispanica* estudiadas, variando el desarrollo embrionario entre el estadio 22 y 34 D&H en el momento de depositar la puesta. Según estos autores, las poblaciones que muestran mayor grado de retención de huevos son aquéllas que se encuentran a mayor altitud. Demarco (1992) describe que *Sceloporus woodi*, *S. virgatus* y *S. scalaris* exhiben retención embrionaria breve, intermedia y prolongada respectivamente, condición que se relacionaría con su distribución a baja, media o elevada altitud. Telemeco *et al.* (2010) observaron variación en el grado de retención embrionaria en poblaciones de *B. duperreyi* residentes a diferentes altitudes. Asimismo, en base a sus experimentaciones corroboran que las bajas temperaturas retrasan la oviposición, cuestión que para estos autores refuerza la hipótesis del origen de la viviparidad asociado al clima frío. En el presente trabajo observamos marcada disimilitud en el estado de desarrollo embrionario en el momen-

to de la oviposición entre *M. bicolor* y *E. poecilogyrus*, *E. almadensis*, *E. semiaureus* y *L. anomalus*. En contraposición a las especies estudiadas en los trabajos antes citados, las aquí analizadas se distribuyen a la altura del nivel del mar, en una zona de clima subtropical, por lo que para estos colúbridos la temperatura no sería el factor condicionante del grado de retención embrionaria.

Los trabajos de Shine (1995) y Radder *et al.* (2008) plantean que la retención embrionaria influye en el fenotipo de la cría y directamente aumenta el éxito reproductivo de una especie. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, previamente a la puesta, en el embrión se esbozan y organizan los principales sistemas de órganos como el sistema nervioso central, órganos de los sentidos, corazón y sistema circulatorio embrionario y extraembrionario, sistema urinario y membranas extraembrionarias. Durante la etapa organogenética del desarrollo ocurren complejos procesos morfogenéticos altamente susceptibles de sufrir alteraciones por efecto de diversos factores ambientales, siendo los estadios ontogenéticos tempranos los más vulnerables. En este sentido, complementariamente a lo propuesto por los autores antes citados, la retención embrionaria prolongada permitiría a la hembra proteger a la cría durante el periodo crítico de la organogénesis y así aumentar la viabilidad y supervivencia de las camadas.

AGRADECIMIENTOS: A C. Falcione y M. Aquino por la cesión de puestas de huevos de *L. anomalus* y *M. bicolor*, respectivamente. El presente trabajo contó con el financiamiento del Proyecto F019 / 08 "Biodiversidad de anfibios y reptiles de Corrientes, Chaco y Formosa, Argentina." de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste.

REFERENCIAS

- American Veterinary Medical Association. 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf [Consulta: 17 junio 2010].
- Andrews, R.M. 2002. Low oxygen: a constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75: 145-154.
- Andrews, R.M. & Rose, B.R. 1994. Evolution of viviparity: constraint on egg retention. *Physiological Zoology*, 67: 1006-1024.
- Andrews, R.M. & Mathies, T. 2000. Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *BioScience*, 50: 227-238.
- Billy, A.J. 1988. Observations on the embryology of the unisexual lizard *Cnemidophorus uniparens* (Teiidae). *Journal of Zoology*, 215: 55-81.
- Blackburn, D.G. 1981. An evolutionary analysis on vertebrate viviparity. *American Zoologist*, 21: 120.
- Blackburn, D.G. 1982. Evolutionary origins of viviparity in the reptilia. I. Sauria. *Amphibia-Reptilia*, 3: 185-205.
- Blackburn, D.G. 1995. Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology*, 174: 199-216.
- Blackburn, D.G. 1998. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *Journal of Experimental Zoology*, 282: 560-617.
- Blackburn, D.G. 2000. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 127: 391-409.
- Blackburn, D.G. & Flemming, A.F. 2009. Morphology, development, and evolution of fetal membranes and placentation in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, 312B: 579-589.
- Boughner, J.C., Buchtová, M., Fu K., Diewert, V., Hallgrímsson, B. & Richman, J.M. 2007. Embryonic development of *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology*, 110: 212-230.
- Braña, F., Bea, A. & Arrayago, J. 1991. Egg retention in lizard lizards: Relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica*, 47: 218-226.
- Burbrink, F.T. & Crother B.I., 2011. Evolución and taxonomy of snakes. 19-53. In: Aldridge, R.D. & Sever, D.M. (eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. Science Publishers. USA.
- Defaure, J.P. & Hubert, J. 1961. Table de developpement du lezard vivipare: *Lacerta* (Zootoca) vivipara Jacquin. *Archives D'Anatomie Microscopique et Morphologie Experimentale*, 50: 309-327.
- Demarco, V. 1992. Embryonic development times and egg retention in four species of Sceloporine lizards. *Functional Ecology*, 6: 436-444.
- Demarco, V. 1993. Estimating Egg Retention Times in Sceloporine Lizards. *Journal of Herpetology*, 27: 453-458.
- Ditmars, R.L., 1942. *The reptiles of North America*. Doubleday, Doran & Company. Garden City, New York.
- El Mouden, E., Bons J., Pieau, C., Renous, S., Znari, M. & Boumezzough, A. 2000. Developmental table of an agamid lizard, *Agama impalearis* Boettger, 1874. *Annales des Sciences Naturelles*, 21: 93-115.
- Fukada, H. 1956. Biological studies on the snakes. III. Observations of hatching of *Elaphe climacophora* (Boie), *E. conspicillata* (Boie), and *Natrix v. vibakari* (Boie). *Bulletin Kyoto Gakugei University. B. Math. Nat. Sci.*, 9: 21-29.
- Heulin, B., Ghielmi, S., Vogrin, N., Surget-Groba, Y. & Guillaume, C.P. 2002. Variation in eggshell characteristics and in intrauterine egg retention between two oviparous clades of the lizard *Lacerta vivipara*: insight into the oviparity-viviparity continuum in squamates. *Journal of Morphology*, 252: 255-262.
- Jackson, K., 2002. Post-ovipositional development of the monocled cobra, *Naja kaouthia* (Serpentes: Elapidae). *Zoology*, 105: 203-214.
- Noro, M., Uejima, A., Abe G., Manabe, M. & Tamura, K. 2009. Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 238: 100-109.
- Plummer, M. 1984. Female reproduction in an Arkansas population of rough green snakes *Ophedrys aestivus*. 1015-113. In: Siegel, R.A., Hunt, L.E., Knight, J.L., Malaret L. & Zuschlag, N.J. (eds.), *Vertebrate Ecology and Systematics- A tribute to Henry S. Fitch*. University of Kansas Museum of Natural History. Lawrence, Kansas.
- Radder, R.S., Elphick, M.J., Warner, D.A., Pike D.A. & Shine R. 2008. Reproductive modes in lizards: measuring fitness consequences of the duration of uterine retention of eggs. *Functional Ecology*, 22: 332-339.
- Sanger, T.J., Losos, J.B., & Gibson-Brown J.J. 2008. A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: A new system for the integration of evolution, development, and ecology. *Journal of Morphology*, 269:129-137.
- Scrocchi, G. J., Moreta, J. C. & S. Kretzschmar. 2006. *Serpientes del Noroeste Argentino*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina.
- Shine, R. 1983. Reptilian reproductive modes: The oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*, 39: 1-8.
- Shine, R. 1995. A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *The American Naturalist*, 145: 809-823.
- Stewart, J.R. & Thompson M.B. 2003. Evolutionary transformations of the fetal membranes of viviparous reptiles: A case study of two lineages. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 299A: 13-32.
- Telemeco, R.S., Radder, R.S., Baird, T.A. & Shine, R. 2010. Thermal effects on reptile reproduction: adaptation and phenotypic plasticity in a montane lizard. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 642-655.
- Thompson, M.B., Adams, S.M., Herbert, J.F., Biazik, J.M. & Murphy, C.R. 2004. Placental function in lizards. *International Congress Series*, 1275: 218-225.
- Tinkle, D. & Gibbons, J.W. 1977. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous publications*,

-
- Museum of Zoology, University of Michigan, 154:1-55.
- Wall F. 1921. Snakes of Ceylon. HR Cottle, Government Printer. Ceylon.
- Wise, P.A.D., Vickaryous, M. K. & Russell A.P. 2009. An embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. The Anatomical Record, 292: 1198–1212.
- Zehr, D.R. 1962. Stages in the normal development of the common Garter Snake *Thamnophis sirtalis sirtalis*. Copeia, 1962: 322-329.