

Desarrollo neural de la rana *Colostethus machalilla* (ANURA: DENDROBATIDAE)

Vanessa Noboa y Eugenia M. del Pino

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas,
Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador.

RESUMEN. Se analizó el desarrollo neural de la rana dendrobátida *Colostethus machalilla*, que es endémica a la costa ecuatoriana y deposita sus huevos en la hojarasca. Se realizaron inmunotinciones en montaje entero con anticuerpos neurales específicos. Se encontró retardo en el desarrollo neural de *C. machalilla* en comparación con la rana acuática *Xenopus laevis*.

PALABRAS CLAVE. Néurula, tubo neural, *Colostethus machalilla*, *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae*.

ABSTRACT. This work studies the neural development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla* that is endemic to the Ecuadorian coast. It has a terrestrial way of life and it deposits its eggs directly on the ground. Immunostaining in whole embryos was done to study the pattern of neural molecular markers. The neural development of *C. machalilla* is retarded in comparison with the aquatic frog *Xenopus laevis*.

KEYWORDS. Neurula, neural tube, *Colostethus machalilla*, *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae*.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se estudia el desarrollo neural de la rana *Colostethus machalilla* desde el estadio 13, cuando se hace evidente la placa neural, hasta el estadio 18, que representa a la néurula tardía. Con este estudio se pretende documentar, en parte, las diferencias en el desarrollo neural que existen entre *C. machalilla* y la rana acuática *Xenopus laevis*. Se han determinado los patrones de expresión de las proteínas neurales NCAM y el antígeno 2G9 mediante inmuno reacción específica en montaje entero de los embriones para identificar al tubo neural y a las células de la cresta neural.

Las ranas venenosas (Dendrobatidae) son un grupo monofilético distribuidos en los trópicos de Sudamérica y Centroamérica (1). El género *Colostethus* presenta una coloración críptica y no posee toxinas en la piel (1). *Colostethus machalilla* es una especie endémica de la costa ecuatoriana, con huevos terrestres. Los machos presentan cuidado parental del nido te-

rrestre y transportan los renacuajos en su espalda hasta depositarlos en el agua (2). Esta rana requiere aproximadamente 5 días desde la fecundación hasta la presencia de la placa neural y 21 días para la eclosión de los renacuajos (3). En contraste, los embriones de *X. laevis* eclosionan a los cuatro días (4). El desarrollo de *C. machalilla* en el nido terrestre ha sido caracterizado en 25 estadios (3).

La molécula de adhesión celular neural, N-CAM, fue la primera molécula de adhesión celular aislada de tejido neural (5). Se la identificó como una molécula de adhesión célula-célula independiente de calcio y estructuralmente se la clasifica en la superfamilia de las inmunoglobulinas (5). Estudios realizados en el pollo y en el ratón demostraron que las tres isoformas principales de NCAM son el resultado del empalme (splicing) alternativo de un solo gen, que se encuentra en el cromosoma 9 de las dos especies (6, 7). En el desarrollo neural, NCAM tiene un papel indispensable por sus numerosas funciones, que incluyen mediar la adhesión en-

tre células neurales, estimular el crecimiento axonal y regular la plasticidad sináptica en procesos como la memoria y el aprendizaje (8). Por su importancia en el desarrollo, los genes que codifican para moléculas de adhesión celular son altamente conservados a lo largo de la evolución (6). Comparaciones entre las secuencias de NCAM entre el pollo y el ratón han determinado que hay un 85% de semejanza, además estudios inmunológicos y ensayos de adhesión celular mostraron que la estructura y función de NCAM se ha preservado entre vertebrados por más de 600 millones de años (6).

En *X. laevis*, Balak *et al.* (9) describieron la expresión espacio temporal de NCAM mediante la utilización de anticuerpos policlonales. Las inmuno detecciones mostraron que NCAM se expresa en la placa neural, el sistema nervioso central en desarrollo, los nervios craneales y algunos ganglios. En cambio, la cresta neural resultó negativa. Se concluyó que, en esta especie, NCAM se expresa después de la inducción neural, de forma transitoria, y tiene como función la regulación de la morfogénesis de la placa y tubo neural y del desarrollo de fibras nerviosas.

Durante la neurulación, ocurre la migración de las células de la cresta neural. Estas células tienen un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso periférico y otros derivados. Son células progenitoras multipotentes y presentan un carácter prominente y conservado entre los embriones de vertebrados (10). Existen 4 poblaciones de cresta neural: la cresta neural craneal, del tronco, vago y sacral. La cresta neural se origina en la zona limítrofe entre la placa neural y la futura epidermis, en los pliegues neurales (11).

El cerebro posterior o rombencéfalo se divide en 8 compartimentos más pequeños conocidos como rombómeros (12). Estos rombómeros representan territorios diferenciados. Todos los rombómeros producen células de la cresta neural craneal (13). La cresta neural craneal está involucrada en el desarrollo de la cabeza y migra en tres ramas discretas: mandibular, hioidea y branquial (14). En el ratón y en el

pollo, se ha observado que las células de la cresta neural migran a los tres primeros arcos branquiales en ramas separadas por espacios vacantes de migración, adyacentes a los rombómeros 3 y 5 (15).

En este trabajo se ha utilizado el anticuerpo anti-NCAM para reconocer su expresión en embriones tempranos de *C. machalilla* y el anticuerpo contra el antígeno neural 2G9 para identificar su expresión en la cresta neural de esta rana. El anticuerpo 2G9 reconoce regiones de la cresta neural craneal y del tronco en la rana *Gastrotheca riobambae* (16). En *Xenopus laevis*, el anticuerpo 2G9 reconoce regiones del sistema nervioso central en algunas ramas de la cresta neural craneal, en la cresta neural del tronco y en nervios craneales (17).

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron inmuno detecciones en montaje entero de los embriones de *Colostethus machalilla* utilizando dos anticuerpos monoclonales, el anticuerpo 4D, que es específico para la proteína neural NCAM, y el anticuerpo 2G9, que marca la cresta neural. Se estudió la expresión de estas proteínas en embriones de los estadios de la neurulación temprana, desde la finalización de la gástrula, hasta el estadio de formación de arcos branquiales, que corresponde a los estadios 13 al 18 de *C. machalilla* (3). Para cada estadio del desarrollo se realizó la inmuno detección en tres o más embriones por estadio. Se utilizaron las metodologías estándar para la inmuno detección en montaje entero en embriones de anfibios (16). Los embriones fueron fotografiados en montaje entero. Algunos embriones fueron seccionados.

RESULTADOS

El marcador neural NCAM en *C. machalilla*

La néurula temprana (estadios 13 y 14) se caracteriza morfológicamente por la aparición de la placa neural. Embriones del estadio 13 fueron negativos para NCAM (no se muestra).

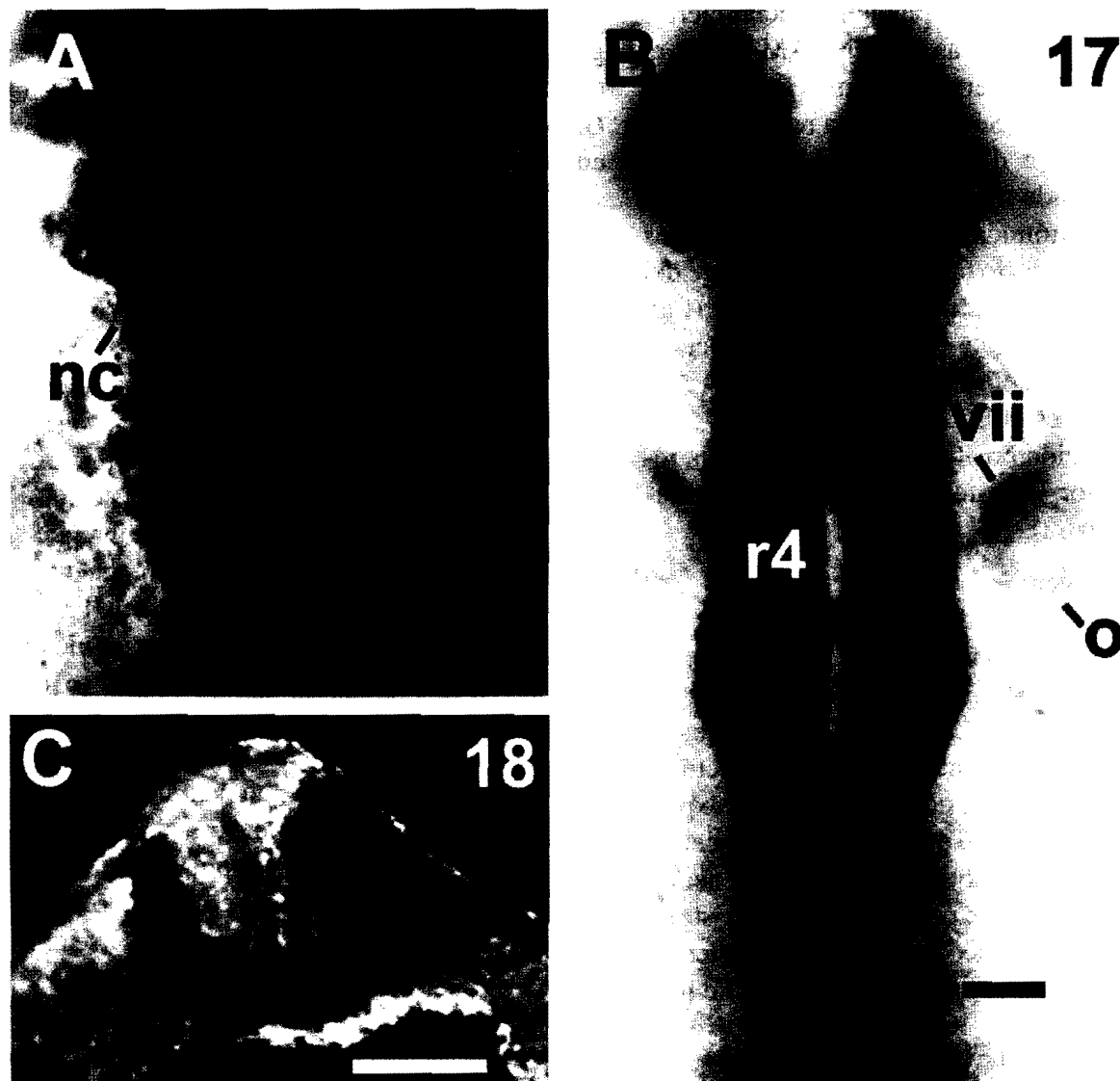


Fig 1. Expresión del antígeno 2G9 y de la molécula de adhesión celular neural NCAM en embriones *C. machalilla*. El estado de los embriones se indica en la parte superior derecha de cada microfotografía. (A) Inmuno detección de un embrión de estadio 16 con el anticuerpo 2G9. Se detecta la cresta neural craneal (nc) a los lados del tubo neural. (B) Inmuno detección de un embrión de estadio 17 con anti-NCAM para destacar el tubo neural. Los nervios faciales (VII) recorren paralelos al límite rostral de los otocistos (o). Los límites de los rombómeros son ligeramente visibles. Los otocistos se encuentran localizados frente al rombómero 4 (r4), como ocurre en *X. laevis*. (C) Inmuno detección de un embrión de estadio 18 con el anticuerpo 2G9. La localización profunda de la cresta neural (nc) a los lados del tubo neural (nt), se observa en esta sección transversa del cerebro posterior. Las barras representan 100 μm en A y B y 200 μm en C.

La expresión de NCAM se pudo detectar por primera vez en embriones del estadio 14 de *C. machalilla*. En cambio, embriones de *X. laevis* en el estadio de la placa neural son NCAM positivos (no se muestra).

La néurula media se caracteriza por el acercamiento de los pliegues neurales y por el cerramiento del tubo neural (estadios 15-16).

El estadio 16 se destaca porque durante éste se cierra el tubo neural (Fig. 1A). El patrón de expresión de NCAM en este estadio se restringe al tubo neural (no se muestra). Los estadios 17 y 18 representan la néurula tardía. En las inmuno detecciones para NCAM del estadio 17, se observó la especificidad de expresión de esta molécula, que estuvo restringida al tu-

bo neural (Fig. 1B). Se pueden apreciar ciertas estructuras específicas para NCAM como el tubo neural, los nervios espinales, el nervio craneofacial VII. Se detectó una reacción diferencial entre los diferentes rombómeros, y se han identificado tres de ellos, r1, r2 y r4 por su posición anatómica respecto a los otocistos (Fig. 1B). El nervio craneofacial VII surge del rombómero 4, rostral a cada otocisto (Fig. 1B). La expresión de NCAM se desvanece en la región de la cola (no se muestra). En la región de las vesículas ópticas, se puede detectar una reacción positiva para NCAM en la región exterior y posterior de estas estructuras (no se muestra).

El antígeno 2G9 como marcador de la cresta neural en *C. machalilla*

La primera detección de la cresta neural por la expresión del antígeno 2G9 se detectó en embriones avanzados del estadio 14. La expresión del antígeno 2G9 en el estadio 15 se detecta en las ramas branquiales de la cresta neural cefálica y también se puede notar que existe una reacción específica en el cerebro posterior. En esta región se puede observar que entre bloques celulares con reacción positiva existen secciones donde la inmuno detección resultó negativa. Se puede sugerir que estas regiones, con diferente expresión del antígeno 2G9, son los rombómeros del cerebro posterior. Una sección transversa de un embrión inmunoteñido contra el antígeno 2G9 en el estadio 18 muestra intensa marcación de la cresta neural (Fig. 1C). La misma tiene una localización profunda, a los lados del tubo neural.

DISCUSIÓN

En *C. machalilla*, la expresión de NCAM se encuentra a lo largo de todo el tubo neural del embrión, perdiéndose en la yema de la cola, al igual que en *X. laevis* (9). En la región del tronco se detectan los nervios espinales tal como se reporta en los nervios periféri-

cos de *X. laevis* (9). En la región cefálica, el ganglio del nervio facial (VII) y las vesículas ópticas fueron NCAM positivas al igual que en *G. riobambae* (16). La única diferencia es que en *C. machalilla*, al igual que *X. laevis*, las vesículas ópticas son más conspicuas que en *G. riobambae*.

El antígeno 2G9 es un antígeno neural extracelular que ha sido detectado en el sistema nervioso central en *X. laevis*, también ha sido detectado en ratones y en salamandras, lo cual sugiere que se ha conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados (17). El primer estadio donde se reporta la expresión de este antígeno en *G. riobambae* corresponde a una névula tardía. La marcación positiva se encuentra en las ramas de la cresta neural hioidea, branquio-posterior y vago (16). El sistema nervioso central y las células de la cresta neural de las ramas branquio-anterior y mandibular son negativos (16). En estadios más avanzados, las ramas de migración de la cresta neural craneal se hacen más prominentes, y la expresión de 2G9 continúa en las ramas mandibular, hioidea y branquio-posterior (16). En el embrión de estadio 14 de *G. riobambae*, el antígeno 2G9 se expresa en todos los rombómeros, excepto en r3 y r5. Se expresa también en los nervios: trigeminal, facial y vago (16).

En *C. machalilla*, las ramas de migración de la cresta neural craneal no son tan prominentes como las que se encuentran en *G. riobambae*. El antígeno 2G9 se expresa en la cresta neural craneal y del tronco como en *G. riobambae*. Las ramas de migración de los arcos branquiales, hioideo y mandibular en *C. machalilla* fueron determinadas en un trabajo anterior (16). Sin embargo, como no se han logrado distinguir las dos ramas branquiales, anterior y posterior claramente a lo largo de todo el desarrollo neural, se sugiere que en *C. machalilla* las dos ramas no se dividen totalmente como ocurre en *G. riobambae*. Por lo tanto, las ramas posteriores a la rama hioidea en *C. machalilla* corresponden a una única rama branquial, no específicamente anterior o posterior.

El desarrollo neural aparece como una característica altamente conservada a lo largo de la evolución. Esto se ha determinado gracias a estudios morfológicos y a los patrones de expresión génica de marcadores neurales como NCAM y el antígeno 2G9. Algunas moléculas, como NCAM, son independientes de las estrategias reproductivas, ya que se presenta en patrones similares entre anfibios y en comparación con otros vertebrados. Las observaciones realizadas en la neurulación de *C. machalilla* brindan una base de comparación con otras especies.

Este estudio demuestra que la expresión de la molécula NCAM, tiene retardo en el inicio de su expresión en los embriones de *C. machalilla* en comparación con *X. laevis*. Este es el aporte principal de este trabajo, que se correlaciona positivamente con los eventos de retardo en el desarrollo del notocordio y somitas de *C. machalilla* (18, 19). En efecto, el notocordio de *C. machalilla* inicia su alargamiento una vez que se ha cerrado el blastoporo, en tanto que en *X. laevis* el notocordio se alarga mucho antes, en el estadio de la gástrula media (18). De modo similar, los somitas de *X. laevis* se pueden detectar y expresan marcadores moleculares específicos en la neurula media (19). Estos eventos de retardo morfológico y molecular que se han detectado en el desarrollo temprano de *C. machalilla* son indicadores de diferencias en los mecanismos de control del desarrollo embrionario. Por tal motivo, esta rana es un organismo de interés para los estudios comparativos de la embriogénesis.

Agradecimientos

Agradecemos a F. Brown, F. Sáenz, O. Pérez y S. Benítez por su ayuda, profesional y apoyo. Igualmente se reconoce la colaboración de D. Donoso, I. Alarcón e I. Moya.

Este trabajo recibió el apoyo de las becas de investigación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y del proyecto FUNDACYT PFN 034.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- SANTOS, J.C.; COLOMA, L.A. & CANNATELLA D.C. Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2003; **100**: 12792-12797.
- 2.- QUIGUANGO-UBILLÚS, A. Bruptflege bei Pfgiftfroschen. **DRACO**, 2000; **3**: 16-23.
- 3.- DEL PINO, E.M.; ÁVILA, M.E.; PÉREZ, O.D.; BENÍTEZ, M.S.; ALARCÓN, I.; NOBOA, V. & MOYA, I.M. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. **International Journal of Developmental Biology**, 2004; **48**: 663-670.
- 4.- NIEUWKOOP, P.D. & FABER, J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, New York, London, 1994.
- 5.- WOLPERT, L.; BEDDINGTON, J.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P. & MEYEROWITZ, E. Principles of Development. Current Biology Ltd. USA, 1998.
- 6.- RUTISHAUSER, U. & JESSELL, T.M. Cell Adhesion Molecules in Vertebrate Neural Development. **Physiological Reviews**, 1983; **68**: 819-859.
- 7.- WATANABE, M.; FRELINGER, A.L. & RUTISHAUSER, U. Topography of N-CAM structural and functional determinants. I. Classification of monoclonal antibody epitopes. **Journal of Cell Biology**, 1986; **103**:1721-1727.
- 8.- KISELYOV, V.V.; SKLADCHIKOVA, G.; HINSBY, A.M.; HOLME JENSEN, P.; KULAHIN, N.; VLADISLAV, S.; PEDERSEN, N.; TSETLIN, V.; POULSEN, F.M.; BEREZIN, V. & BOCK, E. Structural Basis for a Direct Interaction between FGFR1 and NCAM and Evidence for a Regulatory Role of ATP. **Structure**, 2003; **11**: 691-701.
- 9.- BALAK, K.; JACOBSON, M.; SUNSHINE, J. & RUTISHAUSER, U. Neural cell adhesion molecule expression in *Xenopus* embryos. **Developmental Biology**, 1987; **119**: 540-550.
- 10.- BELLMEYER, A.; KRASE, J.; LINDGREN, J. & LABONNE, C. The Protooncogene c-Myc Is an Essential Regulator of Neural Crest Formation in *Xenopus*. **Developmental Cell**, 2003; **4**: 827-839.
- 11.- MAYOR, R. & AYBAR, M.J. Induction and development of neural crest in *Xenopus laevis*. **Cell & Tissue Research**, 2001; **305**:203-209.
- 12.- GILBERT, S. F. Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA, 2000.
- 13.- BIRGBAUER, E.; SECHRIST, J.; BRONNER-FRASER, M. & FRASER, S. Rhombomeric origin and rostrocaudal assortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. **Development**, 1995; **121**:935-945.
- 14.- CARL, T.F.; DUFTON, C.; HANKEN, J. & KLYMKOWSKY, M.W. Inhibition of Neural Crest Migration in *Xenopus* Using Antisense Slug RNA. **Developmental Biology**, 1999; **213**: 101-115.
- 15.- CHRISTIANSEN, J.H.; COLES, E.G. & WILKINSON, D.G. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, 2000; **12**:719-724.

-
- 16.- DEL PINO, E.M. & MEDINA, A. Neural development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. **International Journal of Developmental Biology**, 1998; **42**:723-731.
- 17.- JONES, E.A. & WOODLAND, H.R. Spatial aspects of neural induction in *Xenopus laevis*. **Development**, 1989; **107**:785-791.
- 18.- BENÍTEZ, M.S. & DEL PINO, E.M. Expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. **Developmental Dynamics**, 2002; **225**:592-596.
- 19.- MOYA, I.M. & DEL PINO, E.M. Somitogénesis de *Colostethus machalilla* (Anura: Dendrobatidae). Memorias del 1er Congreso Nacional de Investigación, Tecnología e Innovación. FUNDACYT, Quito, 2005; (en prensa).