

CUADERNOS DE HERPETOLOGIA

VOLUMEN 4 - NUMERO 2 - 1989

MICROANATOMIA E HISTOGENESIS DEL APARATO BUCAL EN LAS LARVAS DE
Bufo arenarum (ANURA, BUFONIDAE)

Luisa Eleonora FIORITO de LOPEZ y Dinorah Diana ECHEVERRIA

ASOCIACION HERPETOLOGICA ARGENTINA

Editores: Jorge D. Williams y Dinorah D. Echeverría

Diciembre 1989.

MICROANATOMIA E HISTOGENESIS DEL APARATO BUCAL EN LAS LARVAS DE *Bufo arenarum* (ANURA, BUFONIDAE)¹

Luisa Eleonora FIORITO de LOPEZ² y Dinorah Diana ECHEVERRIA²

¹Comunicado en la VII Jornadas Argentinas de Zoología (Mar del Plata, 21 al 26 de octubre, 1984).
Subsidiado por CONICET (Nº de legajo: 10.734/83).

²Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UBA), Depto. de Cs. Biológicas. 1428 Buenos Aires, Argentina.

ABSTRACT

Microanatomy and histogenesis of the oral apparatus of *Bufo arenarum* tadpoles (Anura, Bufonidae).

During the larval period of *Bufo arenarum*, the horny teeth of the oral apparatus are developed from *column of cells*. Each column of cells is composed of a few number of epithelial cells carefully arranged and placed perpendicularly either to the edge of the beak or to the labial ridge.

The beak column shows: 3 to 4 discoidal cells; 2 to 3 preconic cells; a variable number of conic cells in different stages of the keratinization process; a variable number of keratinized cells (beak tooth).

The labial ridge column shows: 1 spherical basal cell; 1 ovoidal cell; 1 odontoid (or dental) cell; 1 or 2 cells in different stages of keratinization process; keratinized cells (labial tooth).

There is another cell (attendant cell) that is placed beside each odontoid cells up to whole keratinization. This attendant cell gives stability to the tooth base (or *horny sheath*), before the tooth appears to the tip of the labial ridge.

The columns are supported by the surrounding epithelial cells.

The horny sheath gives protection to the first group of labial teeth; allow the change of the old tooth to the next one without affecting it; it also lodges the attendant cell.

The histogenesis process begins in the beak at stage 21 and in the labial ridge at stage 22. The keratinization process begins in stage 23 in both structures of the oral apparatus.

INTRODUCCION

La histogénesis de los elementos córneos del aparato bucal de las larvas de anuros (dientes, según Fiorito de López y Echeverría, 1984; keratodontos y rostrodontos, según van Dijk, 1966) ha sido estudiada en un escaso número de especies. Ejemplos de esto son los trabajos de Beaumont y Deunff (1959) en *Alytes obstetricans*; Deunff y Beaumont (1959) en *Discoglossus pictus*; Luckenbill (1965) y Kaung (1975) en *Rana pipiens*; Tachibana (1978) en *Rana japonica*. En esencia cada diente proviene de la transformación de una célula basal del epitelio estratificado que forma parte de la región oral (Luckenbill, 1965; Kaung, 1975).

La mayoría de los autores describen la variación de los caracteres morfológicos del desarrollo del pico córneo y, en menor grado, al proceso de queratización del mismo (Luckenbill, 1965; Cheng, 1964, fide de Luckenbill, 1965; Kaung, 1975).

El procedimiento por el cual cada diente irrumpe o emerge al exterior ha sido poco estudiado y generalmente no

se ha prestado atención a la primera camada de dientes funcionales (Echeverría *et al.*, 1987). Deunff y Beaumont (1959) sostienen que los primeros dientes del pico (rostrodontos, según van Dijk, 1966) asoman al exterior desgarrando el epitelio. Faier (1972, fide Altig y Pace, 1974) comenta que el diente labial (keratodonto, según van Dijk, 1966) de reemplazo atraviesa la vaina del diente funcional para poder iniciar su actividad.

Los objetivos de este trabajo son poner en evidencia la anatomía microscópica y el desarrollo del aparato bucal, y contribuir al conocimiento de la formación y reemplazo de los dientes córneos.

MATERIALES Y METODOS

Los renacuajos de *Bufo arenarum* fueron obtenidos por fecundación artificial, utilizándose los ejemplares en los estadios del 20 al 29 (según Echeverría y Fiorito de López, 1981). Estos ejemplares fueron fijados en los siguientes líquidos fijadores: formol al 100/o; líquido de Regaud y líquido de Bouin.

La inclusión se llevó a cabo en parafina 54-56°C. En los casos en que la presencia de vitelo hacía friable el material se utilizó acetato de butilo como líquido intermediario, en lugar de benzol.

Se efectuaron cortes seriados, transversales, longitudinales y parasagiales entre 5 y 7 μm de espesor.

Las coloraciones utilizadas fueron: hematoxilina-eosina; hematoxilina de Carazzi-fucsina Ponceau de xilidina-azul de anilina; hematoxilina de Carazzi-rojo Congo; APS; Mowry (1963) (APS-azul alcian a pH 2,5).

En los casos que el pigmento impedía una buena visualización se procedió a despigmentar los cortes con agua oxigenada 20v o con permanganato de potasio al 0,25% (según Martoja y Martoja-Pierson, 1970).

Por otra parte, se efectuaron observaciones "in toto" de la región bucal. Esta fue separada del cuerpo de cada renacuajo, luego se coloreó con hematoxilina de Carazzi-floxina al 0,25% y se transparentó en glicerina.

Algunos ejemplares fueron procesados para microscopía electrónica de barrido (según Fiorito de López y Echeverría, 1984).

Las microfotografías se tomaron con película blanco y negro Kodak Panatomic 32 ASA y Agfapan 25 ASA.

La nomenclatura de los pliegues labiales y del pico córneo se ajusta esencialmente a la propuesta por Altig (1970), (fig. 1).

RESULTADOS

Pico córneo

Cada pieza (PS y PI, fig. 1) presenta un borde oral interno, un borde labial externo y entre ambos se hallan las *columnas formadoras* de dientes (fig. 2).

El *borde oral* consta de un epitelio estratificado constituido por:

a) una capa de células basales cilíndricas de núcleo ovoide central, cuya cromatina se dispone periféricamente en grupos finos y con un nucléolo conspicuo;

b) dos o tres capas de células poliédricas espinosas, cuyo núcleo esférico presenta características semejantes a las descritas en a);

c) un número variable (2 a 5) de capas de células lenticulares (o *fusiformes*, de Luckenbill, 1965) en proceso de cornificación que comienza cuando el citoplasma de dichas células presenta aspecto fibrilar;

d) un número variable de células cornificadas que conservan un resto nuclear.

El *borde labial* presenta un epitelio estratificado plano, formado por un número reducido de capas, a saber:

a) una capa de células basales cilíndricas;

b) una capa de células poliédricas espinosas;

c) una a dos capas de células planas en proceso de cornificación;

d) una capa de células córneas.

Cada *columna formadora* (fig. 2) consta de una hilera de células epidérmicas ordenadas y modificadas a partir de la capa generatriz:

a) tres a cuatro células discoidales de núcleo central;

b) dos a tres células precónicas de citoplasma basófilo con el núcleo lateral, desplazado hacia el borde externo del pico;

c) un número variable de células cónicas de núcleo basal en proceso de queratinización progresiva;

d) diente: la célula cónica totalmente queratinizada, sin rastros del núcleo celular.

Pliegues labiales

Se presentan en número de cinco. En el caso de la fig. 1 se observan cuatro debido a que el plano de corte es sagital y pasa por la brecha del segundo pliegue labial anterior.

Cada pliegue labial está formado por un epitelio estratificado que forma el revestimiento (externo e interno) y columnas formadoras de dientes de posición central (fig. 3).

El epitelio estratificado presenta dos a cinco capas y está constituido por:

a) una capa de células basales cilíndricas de núcleo ovoide con cromatina granulosa y uno o dos nucléolos;

b) número variable de células poliédricas espinosas con el núcleo de forma esférica o fusiforme, cromatina periférica y un nucléolo;

c) células superficiales cúbicas bajas o planas, con núcleo de forma esférica o fusiforme, con un nucléolo.

Cada columna (figs. 3 y 4) se encuentra formada por cinco a siete células con distinta morfología, a saber:

a) una célula basal esférica de núcleo central con uno o dos nucléolos;

b) una célula ovoide de citoplasma basófilo con membrana apical marcada; APS positiva (fig. 9);

c) una célula odontoidea: célula cilíndrica con dentículos incipientes y comienzo de cornificación apical (fig. 4);

d) una a dos células en distintas etapas de cornificación;

e) una célula cornificada con restos de citoplasma y núcleo;

f) diente completamente formado (figs. 3 y 7).

Deseamos destacar la presencia de una célula asociada con cada una de las células integrantes de la columna formadora, a la cual hemos denominado *célula acompañante*. Esta célula presenta una forma semilunar, con un núcleo central de cromatina escasa y un nucléolo conspicuo (figs. 3 y 6).

Entre las columnas formadoras se hallan *células columnares* de citoplasma claro y núcleo ovoide excéntrico y con la cromatina dispuesta en pequeños grumos. Estas células se encuentran ubicadas con su eje mayor perpendicular a las columnas formadoras (fig. 4).

En la zona de inflexión entre el pico superior e inferior y entre los pliegues labiales existe un epitelio de revestimiento estratificado que consta de dos a cuatro capas de células. Este epitelio es de tipo polimorfo (figs. 1 y 3).

La dermis de los pliegues está constituida por un tejido conectivo laxo, con escasa fibras colágenas y las células propias de dicho tejido. Cabe acotar que, en los niveles de inflexión arriba mencionados, la dermis presenta una gran capilarización (fig. 3).

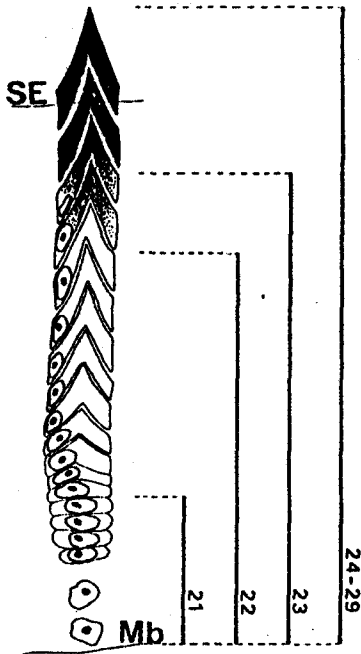


Fig. 11. Esquema del desarrollo de la columna formadora de dientes del pico. 21 al 29: estadio larval. Mb: lámina basal; SE: superficie externa.

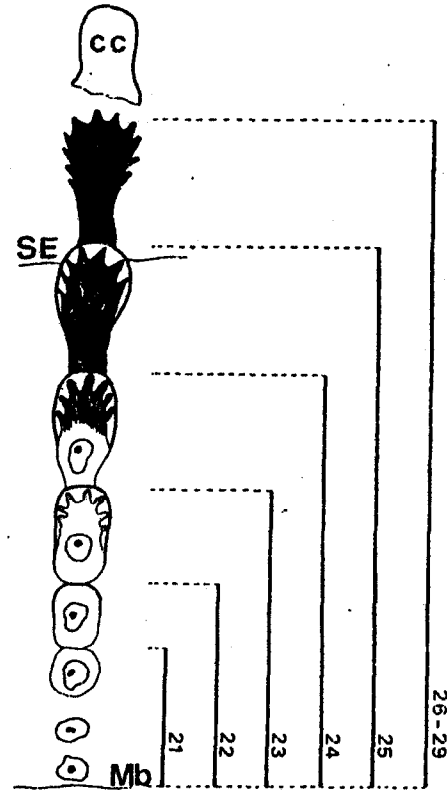


Fig. 12. Esquema del desarrollo de la columna formadora de dientes del pliegue. 21 al 29: estadio larval. Mb: lámina basal; SE: superficie externa.

La histogénesis de los dientes se resume en las figuras 11 y 12.

El estadio 20 puede señalarse como punto de partida del desarrollo del aparato bucal.

A nivel de la hendidura bucal, la epidermis se torna estratificada debido al aumento de las capas intermedias. Se observan figuras mitóticas en las células basales y en las intermedias. Así se constituye el esbozo interno del pico córneo.

Estadio 21. Comienzan a formarse los esbozos de las columnas formadoras de dientes del pico que pueden identificarse por el ordenamiento de las células precónicas que los constituyen (fig. 8).

Se establecen los engrosamientos epiteliales correspondientes a los pliegues labiales, comenzando con la aparición de las células esféricas.

Estadio 22. En los esbozos del pico aparecen, en las columnas formadoras, las células cónicas con el núcleo desplazado lateralmente.

En los esbozos de los pliegues labiales se observan las columnas formadoras hasta el estado de célula ovoide y cilíndrica (fig. 9).

Estadio 23. En el pico aparecen las células precónicas y cónicas en proceso de queratización.

En los pliegues se observan columnas con células odon-

toideas y el comienzo de la cornificación (fig. 10).

Estadio 24. En el pico se observan células cónicas cornificadas totalmente que hacen saliencia al exterior, constituyendo los dientes del pico.

En los pliegues existen células odontoideas con el extremo apical y con dentículos queratinizados. Se hallan pocos dientes completamente formados, sin emerger.

Estadio 25. Aparece la primera camada de dientes labiales. Cada diente presenta una cubierta córnea que lo acompaña cuando aflora que le facilitó el camino a través del tejido del pliegue (fig. 3). Esta cubierta se desprende una vez que el primer diente haya aflorado completamente.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El desarrollo de los dientes larvales en *Bufo arenarum* se lleva a cabo a través de una serie de transformaciones que experimentan las células de la epidermis que rodea la región oral cuyo resultado final es la formación de piezas cornificadas que Fiorito de López y Echeverría (1984) denominaron dientes. Estos se diferencian a partir de una columna formadora. Entendemos por columna formadora al ordenamiento celular en el epitelio de los pliegues labiales y del pico que se

halla dispuesto en un eje perpendicular a la superficie de los mismos. Las células epiteliales basales corresponderían a la capa generatriz que se apoya en la lámina basal que daría origen a las columnas y a las células de los bordes.

Las células del epitelio que circunda a las columnas formadoras, no experimenta el proceso de cornificación, esto coincide con las observaciones de Luckenbill (1965), Bourges y Bachelerie (1974) y Kaung (1975).

Bourges y Bachelerie (1974) estudiaron, en *Alytes obstetricans*, las células epiteliales adyacentes a las columnas dentarias, a las que denominan *célula anexa* al odontóide córneo (o diente) y las consideran responsables de la forma compleja de los dientes labiales y de su desplazamiento perpendicular a la superficie.

En parte coincidimos con Bourges y Bachelerie (op. cit.) puesto que hemos hallado en *Bufo arenarum* la *célula acompañante*, equivalente a la *célula anexa* en *Alytes obstetricans*. Consideramos que, por lo menos en *Bufo arenarum*, la célula acompañante no es la única responsable del ordenamiento de las columnas.

Las células poliédricas espinosas contribuirán al ordenamiento de las columnas en sentido perpendicular al eje de la superficie del pico o del pliegue. Estas mantendrían la cohesión celular por medio de interdigitaciones de las membranas celulares adyacentes o espinas. Es decir, la cohesión de las células de las *columnas formadoras* se iniciaría a nivel de las células espinosas (en el pico y pliegues) y de las células acompañantes (en los pliegues). Esta cohesión se mantendría a lo largo de cada columna durante el período que comprende el desarrollo de los dientes del renacuajo.

En el pico y en los pliegues la cornificación comienza en el estadio 23. La basofilia es máxima en la primera célula de la columna formadora de dientes, lo que podría indicar la presencia de queratohialina.

Las células cornificadas de cada columna conforman las hileras de dientes. El pico se observa de borde aserrado debido a la disposición en empalizada de las columnas formadoras. El pico presenta una queratinización superficial. En el bor-

de labial las células planas están cornificadas totalmente. En el borde oral existe mayor espesor debido a que las células son lenticulares, con una cornificación "fibrilar". Esta disposición podría reforzar o proteger a la columna y/o al mismo borde oral del que forma parte.

Bougers y Bachelerie (1974) expresan que cada diente labial consta de tres porciones: cono de la raíz, cuello y espátula. Consideramos que el *cono de la raíz* presenta varias funciones, a saber:

- 1º) da protección al diente inmediato posterior; por ello la denominamos *cubierta córnea*;
- 2º) es el punto de apoyo de la espátula, que es la parte principal del diente funcional;
- 3º) aloja a la célula acompañante y permite estabilizar al diente desde su base;
- 4º) permitirá el desprendimiento del diente funcional sin afectar al de reemplazo.

El desarrollo de los dientes es continuo, desde el estadio 21 al 29. El diente de reemplazo emerge debido al empuje que recibe desde su parte basal. La primera camada de dientes labiales se desarrollan protegidos por la *cubierta córnea* que se abre paso entre las células no cornificadas de la epidermis del pliegue.

El hallazgo de un tejido epitelial polimorfo y de una dermis muy capilarizada, en las zonas de inflexión entre el pico superior e inferior y en los pliegues, podría indicar que el movimiento de las partes bucales sería efectuado, por lo menos, debido a una variación del flujo sanguíneo.

Desde el punto de vista histoquímico queremos mencionar que: a) tanto los dientes del pico ("rostrodontes") como los de los pliegues ("keratodontes") están constituidos por queratina, y que cuando se llevó a cabo la despigmentación parcial de las partes córneas se observaron algunos gránulos oscuros similares a los de melanina; y b) no se hallaron células APS positivo que pudieran indicar la presencia de las células de Merkel (Tachibana, 1978) o similares. Estos últimos aspectos serán motivo de próximas investigaciones a nivel submicroscópico.

BIBLIOGRAFIA

- ALTIG, R., 1970. A key to the tadpoles of Continental United States and Canada. *Herpetológica* 26: 108-207.
- ALTIG, R. y PACE, W.L., 1974. Scanning electron photomicrographs of tadpoles labial teeth. *J. Herp.* 8 (3): 247-251.
- BEAUMONT, A. y DEUNFF, J., 1959. La keratinisation des dents et du bec larvaires chez *Alytes obstetricans*. *L. Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 48: 307-324.
- BOURGÉS, M. y BACHELERIE, Ch., 1974. Rôle des cellules épithéliales adjacentes aux colonnes dentaires dans la dynamique des odontoides cornés chez le têtard d'*Alytes obstetricans* Laurenti. *C.R. Soc. Biol.* 168 (10-12): 1335-1339.
- CHENG, H., 1964. The development of the horny beak in *Rana pipiens* tadpoles. Tesis. M.S., Universidad de Iowa.
- DEUNFF, J. y BEAUMONT, A., 1959. Histogénèse des dents et du bec cornés chez les larves de *Discoglossus pictus* Otth. *C.R. Soc. Biol.* 153: 1162-1164.

- ECHEVERRIA, D.D. y FIORITO de LOPEZ, L.E., 1981. Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura). *Physis* (Buenos Aires) 40 (98 B): 15-23.
- ECHEVERRIA, D.D., FIORITO de LOPEZ, L.E., VACCARO, O.B. y FILIPELLO, A.M., 1987. Consideraciones acerca de las fórmulas dentarias de las larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología A.H.A.* 3 (3): 33-39.
- FAIER, J.M., 1972. Larval anuran teeth and some ecological implications. Tesis. M.S. Univ. Nebraska, Lincoln.
- FIORITO DE LOPEZ, L.E. y ECHEVERRIA, D.D., 1984. Morfogénesis de los dientes larvales y pico córneo de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. Bernardino Rivadavia. Zool.* 13 (60): 573-578.
- KAUNG, H.C., 1975. Development of the horny jaws of *Rana pipiens* larvae. *Dev. Biol.* 11: 25-49.
- LUCKENBILL, L.M., 1965. Morphogenesis of the horny jaws of *Rana pipiens* larvae. *Dev. Biol.* 11: 25-49.
- MARTOJA, R. y MARTOJA-PIERSON, M., 1970. *Técnicas de Histología Animal*. 1a. Edición. Ed. Toray S.A. Barcelona, España.
- TACHIBANA, T., 1978. The Merkel cell in the labial ridge epidermis of Anuran tadpole. I. Fine structure, distribution and cytochemical studies. *Anat. Rec.* 191: 487-501.
- VAN DIJK, D.E., 1966. Systematic and field keys to the families, genera and described species of the Southern African anuran tadpoles. *Ann. Natal. Mus.* 18 (2): 231-286.

AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Gladys Pellerano por la lectura crítica del manuscrito.

A los miembros de las empresas Agfa-Gevaert y Kodak (Buenos Aires) por el donativo de papel y película fotográfica.

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Estadio 25 (corte sagital). A-1: primera hilera anterior; CB: cavidad bucal; P-1: primera hilera posterior; P-2: segunda hilera posterior; P-3: tercera hilera posterior; PI: pico córneo inferior; PS: pico córneo superior. Escala 220 μm .

Fig. 2. Pico inferior (corte sagital). B: capa de células basales; c: cornificación superficial; CL: capa de células lenticulares; CP: capa de células poliédricas; D: dermis; L: borde labial; Mb: lámina basal; O: borde oral; PL: capa de células planas. Escala: 22 μm .

Fig. 3. Pliegue labial (A-1) (corte sagital). A: célula acompañante; B: capa de células basales; cc: cubierta córnea; CP: capa de células poliédricas; CS: células superficiales; d: diente córneo; D: dermis; E: epitelio polimorfo; Mb: lámina basal. Escala: 40 μm .

Fig. 4. Pliegue labial (corte longitudinal). Columnas formadoras de dientes. Células cilíndricas con dentículos incipientes (\longrightarrow) y comienzo de la cornificación. cc: cubierta córnea; Mb: lámina basal. Escala: 15 μm .

Fig. 5. Vista sagital de un diente labial en desarrollo. CO: célula odontoidea; cc: cubierta córnea. Escala: 2 μm .

Fig. 6. Corte transversal de un pliegue labial. A: célula acompañante; CO: célula odontoidea; C: célula columnar. Escala: 10 μm .

Fig. 7. Estadio 27. A-1 en etapa de recambio de dientes. cc: cubierta córnea; d: diente córneo; 1: diente por desprenderse; 2: diente emergiendo o de reemplazo. Escala: 10 μm .

Fig. 8. Esbozo de la columna formadora en el pico inferior (PI). CB: cavidad bucal; PS: pico superior. Escala: 30 μm .

Fig. 9. Célula ovoide en el pliegue labial. Comienzo de cornificación apical: basofilia acentuada en el extremo apical (\longrightarrow). Coloración: APS. Escala: 2 μm .

Fig. 10. Célula odontoidea, con citoplasma fibrilar previo a la cornificación (\longrightarrow). Escala: 2 μm .

