



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

Placentación en la serpiente Mexicana
Conopsis lineata

T E S I S
que para obtener el Título de
B I Ó L O G A
presenta

Cecilia de Dios Arcos

Directora de tesis: Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Asesor interno: Dr. David N. Espinosa Organista

México, D.F.

[- 2011-]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por albergarme y formarme durante tantos años.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por darme la oportunidad de conocer excelentes profesores, compañeros y amigos.

Al Dr. David N. Espinosa y a la Dra. Maricela Villagrán quiero expresarles mi admiración, cariño y agradecimiento por todo su apoyo, su paciencia y sus consejos, que además de ser excelentes académicos e investigadores son grandes seres humanos.

Al Dr. Adrián Nieto curador y al M. en C. Edmundo Pérez técnico de la Colección Herpetológica del Museo Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias, y al Dr. Victor Hugo Reynoso curador y al Sr. Armando Borgonio técnico de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología, ambas instituciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, por facilitarme los ejemplares fijados para la realización de ésta investigación.

Al Dr. Manuel Feria por sus comentarios para el mejoramiento de este trabajo, y junto con sus alumnos del Museo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, especialmente al Biól. Al Yibb M. Vázquez, por su apoyo para la obtención de los ejemplares de campo.

A los integrantes del Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal: la M. en C. Eva Mendoza y la Dra. Marcela E. Aguilar del por su apoyo en la técnica histológica. Al M. en C. Juan Carlos Campuzano y al M. en C. Gabino de la Rosa por su asesoría para la edición de las imágenes. A la M. en C. Iris Camacho por su amistad y apoyo en el laboratorio.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

A la Dra. Patricia Rosas y al Biól. Cristóbal Galindo por sus observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Fausto Méndez del Instituto de Biología y al M. en C. Genaro Montaña de la FES Zaragoza por sus comentarios y asesorías.

Y especialmente a mi prima Ady y a mis amigas Ana, Alma y Rosy por estar conmigo en las buenas, en las malas y sobretodo en las peores.

DEDICATORIA

Este trabajo es por y para mi familia que me dio más de lo que yo podía pedir, por todo su amor y su apoyo incondicional, que nunca terminaré de agradecer y recompensar.

Para mi mamá Antonia y mi papá Raymundo, los seres con mayor fortaleza y valentía que jamás haya conocido.

Para mis hermanos: a Juan por mostrarme el coraje para salir adelante y a Alex por ese gran corazón que me recuerda no perder la parte humana y sensible.

Y por supuesto para mi chiquito hermoso, mi Angelito, que con su inocencia alegra nuestros días.

Por todo esto y mucho pero mucho más...

...LOS AMO,

Cecilia.

“... Imposible ganar sin saber perder,

Imposible andar sin saber caer,

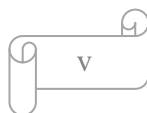
Imposible acertar sin saber errar,

Imposible vivir sin saber revivir.

La gloria no consiste en no caer nunca,

Sino mas bien en levantarse todas las veces que sea necesario.”

Mario Benedetti



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Antecedentes.....	4
Patrones reproductores (Oviparidad - Viviparidad).....	5
Evolución de la viviparidad y placentación.....	6
Reptiles escamosos como modelo de estudio.....	8
Membranas extraembrionarias.....	9
Placentación.....	11
Útero materno y membrana de la cáscara.....	13
Especie de estudio.....	17
Panorama general en México.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	19
MÉTODO.....	20
Obtención de ejemplares.....	20
Procesamiento histológico.....	21
Evolución.....	21
RESULTADOS.....	22
Datos generales de las hembras.....	22
Datos numéricos.....	25
Características generales de las cámaras embrionarias.....	27
Gestación temprana.....	28
Gestación media.....	32
Gestación tardía.....	40
Evolución.....	52
DISCUSIÓN.....	54

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Generalidades.....	54
Segmentación.....	56
Corioplacenta.....	57
Placenta coriovitelina.....	59
Onfaloplacenta.....	60
Onfaloalantoplacenta.....	61
Corioalantoplacenta.....	63
Evolución.....	64
CONCLUSIONES.....	67
REFERENCIAS.....	68
ANEXO I. Estadios de desarrollo embrionario para <i>Thamnophis sirtalis</i> (Zerh, 1962).....	78
ANEXO II. Técnica histológica.....	82

RESUMEN

La viviparidad en reptiles es conocida desde tiempos remotos. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre viviparidad, placentación y membranas extraembrionarias se han realizado en los últimos dos siglos de nuestra era, principalmente con lacertilios. Este es el primer trabajo llevado a cabo en una serpiente en México. La aposición de las membranas extraembrionarias con el epitelio uterino da lugar a la formación de las diferentes placentas en las especies vivíparas. La viviparidad evolucionó paralelamente con la placentación, siendo los reptiles escamosos el modelo ideal para el estudio de estos eventos. Se reconocen tres categorías generales de placentación en reptiles escamosos: 1) Corioplacenta, 2) Placentas del saco vitelino - placenta coriovitelina, onfaloplacenta y onfaloalantoplacenta -, y 3) Alantoplacenta (Corioalantoplacenta). Este trabajo se realizó con ejemplares de la serpiente mexicana *Conopsis lineata*, la mayoría de ellos de colecciones científicas. El estudio se llevó a cabo con microscopia de luz. Se encontraron embriones en tres etapas de desarrollo. La hembra capturada en noviembre presentó embriones en gestación temprana (etapa de segmentación), en la cual aún no se ha formado ningún tipo placentario. Dos hembras, del mes de enero, presentaron embriones en gestación media (estadios 16 y 18), etapa de transición donde se observan la corioplacenta, la placenta coriovitelina, la onfaloplacenta y la corioalantoplacenta incipiente. Ocho hembras, capturadas entre abril y mayo, presentaron embriones en gestación tardía (estadios 35, 36 y 37), aquí se pudo observar las placentas definitivas, la corioalantoplacenta y la onfaloalantoplacenta. Todas las categorías de placentación fueron observadas, con características similares a las descritas en otros reptiles escamosos. Ésta es la primera descripción que se hace de la corioplacenta en una serpiente. Con base en su histología, la corioplacenta posiblemente cumpla la función de protección, la placenta coriovitelina y la corioalantoplacenta de intercambio gaseoso y la onfaloplacenta y onfaloalantoplacenta de secreción y absorción. Una delgada membrana de la

cáscara estuvo presente en todos los estadios de desarrollo. Por las similitudes con otras especies de serpientes, *C. lineata* podría mostrar un alto grado de homoplasia.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La viviparidad en reptiles es conocida desde tiempos remotos. En el año 715 a.C. el profeta Isaías describió una víbora emergiendo de otra. Así mismo, la literatura Hebrea antigua menciona una leyenda de cierto filósofo que tomó una serpiente y la colocó dentro de un barril hasta que parió. En tiempos más modernos, la morfología general del saco vitelino y del útero grávido de la lagartija Australiana *Trachydosaurus rugosus* fue descrita por Haacke en 1885. Giacomini, en 1891, hizo la primera descripción de la anatomía de la placenta alantoidea y vitelina en *Chalcides chalcides* y en 1906 publicó una descripción más detallada de la histología del oviducto y la placenta en *Chalcides ocellatus* (Yaron, 1985).

En 1910, Gadow estudió los reptiles mexicanos e indicó que la mayoría de las especies vivíparas vivían a una elevación por arriba de los 3,000 m (Tinkle y Gibbons, 1977). Por alrededor de una década, entre 1927 y 1935, los trabajos de Weekes contribuyeron fuertemente al conocimiento de la viviparidad y la placentación de los escamosos, siendo sus trabajos la base de los estudios morfológicos, pasados y actuales, acerca de la placentación en reptiles (Blackburn, 2006; Thompson y Speake, 2006). En 1929, Mell notó en sus estudios de reptiles Chinos que la viviparidad es particularmente común entre especies en latitudes y altitudes altas. En 1940, Sergeev realizó un estudio sobre la distribución de la viviparidad en reptiles, principalmente en Eurasia, mostrando claramente que el porcentaje de especies vivíparas es mayor en latitudes y elevaciones altas; también aportó una clara explicación para las presiones selectivas, las cuales consideró como evidencia de la evolución de la viviparidad. Packard presentó esencialmente la misma idea en 1966, pero con explicaciones más detalladas de las

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

etapas intermedias en la evolución de la viviparidad a partir de la oviparidad (Tinkle y Gibbons, 1977).

La mayoría de los estudios recientes que abordan temas sobre viviparidad, placentación y/o membranas extraembrionarias de reptiles se han realizado principalmente con lacertilios de las regiones de Australia (Stewart y Thompson, 1994, 1996, 2009a,b; Shine, 2006; Stewart *et al* 2009), África (Flemming y Brach, 2001), Sudamérica (Blackburn *et al.*, 1984; Flemming y Blackburn, 2003; Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003; Ramírez-Pinilla, 2006; Crocco *et al.*, 2008; Leal y Ramírez-Pinilla, 2008; Wooding *et al.*, 2010), Estados Unidos (Andrews, 2000; Mathies y Andrews, 2000; Parker y Andrews, 2006; Blackburn *et al.*, 2010) y México (Guillete y Jones, 1985; Villagrán-Santa Cruz, 1989; Méndez de la Cruz y Villagrán-Santa Cruz, 1993; Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 1994, 2005; Méndez de la Cruz *et al.*, 1998; Calderón-Espinosa *et al.*, 2006; Martínez-Torres *et al.*, 2006; Castaños *et al.*, 2009); pocos son los estudios que se han realizado en serpientes (Tabla 1). Gran parte de estas investigaciones se han basado casi exclusivamente en microscopía de luz (Blackburn *et al.*, 2002). No obstante, recientemente se están utilizando nuevas técnicas como la microscopia electrónica de barrido y de transmisión, representando herramientas muy valiosas en los estudios de la morfología de la placenta (e.g. Blackburn *et al.*, 2002, 2003, 2009; Blackburn y Lorenz, 2003a, b; Stewart y Brasch, 2003; Knight y Blackburn, 2008).

Patrones reproductores (Oviparidad-Viviparidad)

La oviparidad es definida como la puesta de huevos con embriones, estos huevos requieren un período de desarrollo embrionario fuera del aparato reproductor de la hembra, que generalmente ocurre en algún tipo de nido (Guillete, 1993). Aunado a esto, el término grávido se refiere a las hembras ovíparas que mantienen los huevos en el oviducto hasta antes de la oviposición (Girling, 2002).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

La viviparidad es el patrón reproductor en el cual las hembras gestantes retienen a los embriones dentro del útero hasta completar su desarrollo. La madre provee un ambiente uterino adecuado para el intercambio gaseoso y de agua requerido para el soporte del desarrollo embrionario (Guillete, 1993). La gestación es el período de tiempo que permanecen los embriones dentro del oviducto de las hembras vivíparas hasta antes del nacimiento (Girling, 2002).

La ovoviviparidad fue definida como el patrón reproductor en el cual las crías nacen completamente desarrolladas pero no reciben nutrientes por parte de la madre, excepto el vitelo inicial que fue provisto al huevo antes de la ovulación y/o fertilización (Guillete, 1987). Sin embargo, este término se volvió obsoleto, ya que ha sido visto como un estadio intermedio en la evolución de la ovoviviparidad a la viviparidad (Guillete, 1987, 1991; Shine y Guillete, 1988); además de que representa un término impreciso y confuso (Smith, 1986; Blackburn, 1999).

Evolución de la viviparidad y placentación

Los orígenes de la viviparidad están distribuidos en todas las principales zonas biogeográficas y ocupan diferentes niveles taxonómicos, desde la familia y superfamilia hasta la subespecie (Blackburn, 2000). Las aproximaciones tradicionales han asumido implícitamente que las especies vivíparas son encontradas en los hábitats donde su viviparidad ha sido originada, hábitats que han provisto presiones selectivas propiciando este patrón reproductor. Sin embargo, las distribuciones actuales de las especies vivíparas no necesariamente indican el lugar donde el patrón reproductor evolucionó (Blackburn, 2000). La distribución de cada especie está determinada por su adaptación al medio, pero también por su historia evolutiva (Espinosa y Ocegueda, 2008).

La selección natural presumiblemente opera en todas las etapas de los ciclos de vida de un animal, y se puede esperar que sus embriones, además de los adultos, presenten adaptaciones al

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Tabla 1. Revisión de la literatura sobre membranas extraembrionarias y placentación en serpientes (tomada de Yaron, 1985 y modificada)

Taxa	Tema	Referencias
<i>Austrelaps superbus</i>	Histología y desarrollo	Weekes, 1929
<i>Pituophis guttatus</i> (<i>Elaphe gutata</i>)	Desarrollo e histología; microscopia electrónica de barrido, histología y ultraestructura.	Blackburn <i>et al.</i> , 2003; Knight y Blackburn, 2008
<i>Enhydris dussumieri</i>	Histología y desarrollo	Parameswaran, 1962
<i>Enhydrina schistosa</i>	Histología y desarrollo	Kasturirangan, 1951a
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	Histología y desarrollo	Kasturirangan, 1951b
<i>Natrix natrix</i> <i>Nerodia sipedon</i>	Estructura y función de la placenta	Conaway y Fleming, 1960
<i>Storeria dekayi</i>	Histología y ultraestructura de la placenta	Blackburn <i>et al.</i> , 2009
<i>Suta suta</i>	Histología y desarrollo	Weekes, 1929
<i>Thamnophis</i> spp.	Breve descripción histológica	Rahn, 1939
<i>Thamnophis sirtalis</i>	Desarrollo, histología, histoquímica, electromicroscopia y función de la placenta	Hoffman, 1968,1970 Blackburn <i>et al.</i> , 2002 Blackburn y Lorenz, 2003a,b
<i>Thamnophis ordinoides</i>	Descripción, histología, microscopia electrónica de barrido de la placenta	Blackburn <i>et al.</i> , 2002
<i>T. radix</i>	Descripción, histología, microscopia electrónica de transmisión de la placenta, desarrollo y función en la transmisión de esteroides	Gerrard, 1974 Blackburn y Lorenz, 2003a,b
<i>Vipera berus</i>	Corta descripción Revisión completa sobre placentación	Bellaris <i>et al.</i> , 1955 Weekes, 1935 Panigel, 1956 Bauchot, 1965
<i>Virginia</i> spp.	Breve descripción histológica	Rahn, 1939
<i>Virginia striatula</i>	Descripción, desarrollo e histología	Stewart y Brach, 2003

ambiente en el que se encuentran. El modelo más simple de la evolución de la viviparidad a partir de la oviparidad involucra un incremento gradual del tiempo de retención del huevo en los oviductos maternos hasta su oviposición y la reducción en el grosor de la membrana de la cáscara (Packard *et al.*, 1977), evolucionando paralelamente con la placentación para facilitar el intercambio de agua y gases (Stewart y Thompson, 2003).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Las placentas de los amniotas son similares debido a que las membranas extraembrionarias que las conforman son homologas, de manera que se observa una limitada posibilidad de variación estructural y funcional entre los tejidos maternos y fetales; estos anexos han evolucionado independientemente en múltiples oportunidades siguiendo trayectorias convergentes o paralelas (Blackburn, 1992; Stewart y Thompson, 2003; Ramírez-Pinilla, 2010).

Reptiles escamosos como modelo de estudio

Los reptiles son un grupo de especial interés en el estudio de la reproducción, no sólo por ser los primeros vertebrados colonizadores del ambiente terrestre que no dependen del agua para la puesta de huevos, sino también por las adaptaciones evolutivas en las que se vieron implicados en el desarrollo de esta función. Los estudios de viviparidad en reptiles son de particular importancia para entender la evolución de la reproducción en mamíferos, incluidos los humanos. Los reptiles, entre ellos los escamosos (lacertilios, serpientes y anfisbénidos), las aves y los mamíferos son amniotas, lo que significa que sus embriones desarrollan las mismas membranas extraembrionarias, estructuras altamente conservadas en este grupo (Thompson y Speake, 2006; Ferner y Mess, 2011).

Los reptiles escamosos representan animales extremadamente prometedores por muchas razones, ya que pueden ser estudiadas tanto especies ovíparas como vivíparas y dar pistas acerca de la evolución de su biología reproductora. La viviparidad ocurre en alrededor del 20% de las especies de escamosos existentes, representando un total de 1500 especies. Las membranas extraembrionarias (corion, alantoides, amnios y saco vitelino) pueden decirnos mucho sobre la evolución del huevo amniota, pues llevan a cabo las funciones básicas mismas que fueron demandadas por los ancestros de los amniotas. Los análisis filogenéticos han demostrado que este patrón ha evolucionado forma convergente (alrededor de 108 ocasiones), representando 76% de los 141 orígenes en vertebrados actualmente reconocidos, más frecuente que en todos los

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

demás vertebrados en conjunto (Blackburn, 1999). Muchos de estos orígenes han sido relativamente recientes (en tiempo geológico) y en bajos niveles taxonómicos, permitiéndonos potencialmente reconstruir la transición evolutiva hacia este patrón (Qualls *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 2004). Además, este taxón presenta características que han sido encontradas en otros vertebrados vivíparos no reptiles, por lo que también ofrecen información acerca de su evolución (Blackburn, 2006).

Dos avances conceptuales contribuyeron de manera importante al crecimiento del modelo de los escamosos para la viviparidad. El primero fue el desarrollo de la teoría de la historia de vida, bajo las cuales la viviparidad fue vista como una estrategia reproductora que pudo evolucionar sólo cuando los beneficios excedieron los costos. El segundo se basa en la aplicación de análisis filogenéticos para cuestiones evolutivas (Blackburn, 2006).

Membranas Extraembrionarias

A pesar de que la información sobre las membranas extraembrionarias en mamíferos es vasta, nuestro conocimiento de estas estructuras en reptiles es escaso. Sólo recientemente, a través del uso de diversas técnicas, se han podido reconstruir los patrones de estructura, función y evolución de éstas membranas en reptiles (Stewart, 1997; Blackburn y Fleming, 2009). El uso de herramientas anatómicas, incluyendo la microscopía de luz y electrónica, la aplicación de aproximaciones cuantitativas y experimentales a las cuestiones funcionales y la adopción de una aproximación cladista/filogenética, han contribuido significativamente para dirigir investigaciones e interpretar datos acumulados (Blackburn y Flemming, 2009).

La historia evolutiva de los vertebrados ha sido de gran interés en una variedad de campos de investigación. Las membranas extraembrionarias han jugado un papel muy importante en la historia de los vertebrados. El amnios, el corion y el alantoides hicieron posible el desarrollo del huevo terrestre, lo que permite la reproducción en tierra de los amniotas. Estas membranas han

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

contribuido a la sorprendente diversidad de amniotas desde el Paleozoico temprano, ayudándoles a ser el grupo más exitoso de tetrápodos (Mess *et al.*, 2003; Blackburn y Flemming, 2009).

El término “membranas extraembrionarias” se utiliza como sinónimo de “membranas fetales”, otros términos que se han utilizado para referirse a estas estructuras son: “estructuras auxiliares”, “apéndices fetales” y “anexos del desarrollo” (Mess *et al.*, 2003); los cuales se refieren a los tejidos que se desarrollan fuera del embrión y llevan a cabo funciones como protección del embrión, intercambio fisiológico y placentación. Éstas membranas son: amnios, corion, saco vitelino y alantoides (Fig. 1A) (Blackburn, 1999)

La formación de las membranas extraembrionarias es uno de los eventos más importantes que ocurren durante el desarrollo embrionario de los amniotas (Luckett, 1977; Stewart, 1997; Villagrán-Santa Cruz y Méndez de la Cruz, 2009). Filogenéticamente la primera membrana en aparecer fue el saco vitelino, el cual se encarga de la alimentación del embrión durante todo su desarrollo intrauterino, además de aportar algunos iones y minerales. El amnios, del cual deriva el nombre del huevo amniota, da protección al embrión contra las adhesiones y choques mecánicos, mantiene a flote al embrión cuando carece de esqueleto y proporciona un ambiente húmedo. El corion protege al huevo contra el ambiente externo. El alantoides surge como una evaginación de la parte posterior del intestino embrionario, cuya función es de órgano respiratorio para el embrión; en adición, su cavidad central retiene los desechos nitrogenados producidos por el metabolismo celular embrionario (Villagrán-Santa Cruz y Méndez de la Cruz, 2009).

Conforme avanza el desarrollo, el alantoides se extiende por el celoma extraembrionario, mientras esto sucede entra en contacto con el corion antes formado, el cual cubre al embrión con su amnios y el alantoides, para formar la membrana corioalantoica la cual se encarga del intercambio gaseoso (Villagrán-Santa Cruz y Méndez de la Cruz, 2009).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

El desarrollo y acomodo de todas y cada una de las membranas extraembrionarias dan lugar a la formación de los diferentes tipos placentarios, mediante la aposición con el epitelio uterino, permitiéndole al embrión llevar a cabo intercambio fisiológico (Mossman, 1937; Yaron, 1985).

Placentación

El patrón nutricional del embrión incluye formas lecitotróficas, donde la totalidad de la nutrición depende de la provisión vitelina del huevo; y formas matrotróficas, en las cuales dependen en gran medida del aporte materno extra-vitelino. Este aporte en amniotas es posible sólo por la vía placentaria, por tanto matrotrofia en escamosos es equivalente a placentotrofia (Ramírez-Pinilla, 2010). Sin embargo, especies relativamente lecitotróficas pueden tener placentotrofia incipiente, aportando sodio, calcio, potasio y fósforo. No obstante, la provisión placentaria de nutrientes inorgánicos tienen componente obligado y facultativo en varias especies (Stewart, 1989; Stewart *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1999; Swain y Jones, 2000).

Los reptiles escamosos son el único grupo de amniotas existentes apropiado para un análisis comparativo de la evolución de la placentotrofia, porque son el único taxón con numerosas transformaciones evolutivas y transiciones estructurales-funcionales paralelas (Stewart y Thompson, 2000). Además, la evidencia sugiere que la placentotrofia evolucionó simultáneamente con la viviparidad en escamosos (Blackburn, 2005). Un punto central a destacar es que el saco vitelino y las placentas de los escamosos son únicos, siendo que no se encuentran en ningún otro vertebrado (Stewart, 1997). Los estudios en lagartijas y serpientes han ofrecido las bases conceptuales para la morfología y evolución placentaria, que pueden revelar las bases estructurales para el intercambio materno-fetal y encabezar la formación de hipótesis funcionales razonables, así como ayudar a reconstruir la evolución de la placenta (Blackburn, 2000).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Stewart y Thompson (1994, 2000) reconocen y plantean tres categorías generales de placentación entre los reptiles escamosos, designadas por la contribución embrionaria: 1) Corioplacentación; 2) Placentación del saco vitelino, que comprende la Placenta Coriovitelina, la Onfaloplacenta y la Onfaloalantoplacenta; y 3) Alantoplacentación o Corioalantoplacentación (Tabla 2) (Fig. 1 A-D). Las funciones que se le atribuyen al tejido placentario son diversas, destacando: a) intercambio gaseoso, b) transporte de agua, c) transporte de nutrientes (ya sea provenientes del vitelo o de la madre), d) síntesis de hormonas (fundamentalmente esteroides) (Guarino *et al.*, 1998) y e) síntesis de factores inmunorreguladores (Paulesu *et al.*, 1995).

La corioplacenta es un órgano temprano y transitorio, es una cercana asociación del corion y del epitelio uterino que aparece transitoriamente durante las primeras etapas en la embriogénesis (Fig. 1) (Thompson y Speake, 2006). Es altamente especializada, formando estructuras de absorción en ambos polos (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003).

Dentro de las placentas del saco vitelino, inicialmente una capa de endodermo y otra de ectodermo extraembrionarios se extienden alrededor de toda la masa de vitelo, esta asociación recibe el nombre de onfalopleura biláminar (Fig. 1A), que junto con el epitelio uterino forma la onfaloplacenta; ambas son estructuras transitorias ya que posteriormente el mesodermo extraembrionario avanza entre el ectodermo y endodermo convirtiéndose así en una onfalopleura trilaminar (Fig. 1A). La membrana coriovitelina es formada cuando los vasos se extienden dentro del mesodermo de la onfalopleura trilaminar determinando la formación de la placenta coriovitelina (Fig. 1B). A pesar de que la membrana coriovitelina es restringida a un corto período en el desarrollo, provee el único soporte circulatorio para el embrión en la periferia del huevo anterior al establecimiento de la membrana corioalantoica. Por ello, probablemente la membrana coriovitelina sea el sitio de intercambio materno-fetal durante las primeras etapas embrionarias (Stewart, 1993).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

A medida que se va extendiendo el mesodermo, éste penetra al vitelo separando así una masa aislada de vitelo del resto de la masa vitelina. En el polo abembrional se conserva la onfaloplacenta que junto con el alantoides expandido ocupa todo el exoceloma convirtiéndose en la onfaloalantoplacenta (Fig. 1C y D) (Ramírez-Pinilla, 2010). Estas placentas presentan un perfil estructural de apariencia histotrófica (Stewart, 1993).

Tabla 2. Terminología placentaria de los escamosos (Stewart, 1993; Stewart y Thompson, 1994, 2000)

Nomeclatura	Componentes embrionarios	Referencia
Corioplacenta	Somatopleura (ectodermo-mesodermo)	Mossman, 1937
Placenta Coriovitelina	Onfalopleura trilaminar vascularizada (ectodermo-mesodermo-endodermo)	Mossman, 1937
Onfaloplacenta	Ectodermo, endodermo de la masa aislada de vitelo, mesodermo intravitelino, esplacnopleura (mesodermo-endodermo)	Stewart, 1985
Placenta Onfaloalantoica u Onfaloalantoplacenta	Ectodermo, endodermo de la masa aislada de vitelo, mesodermo intravitelino, membrana externa del alantoides (mesodermo, endodermo)	Blackburn, 1988
Corioalantoplacenta o Alantoplacenta	Somatopleura (ectodermo, mesodermo), membrana externa del alantoides (mesodermo, endodermo)	Harrison y Weekes, 1925

El término alantoplacenta o corioalantoplacenta es usado para las estructuras placentarias en las cuales la contribución fetal consiste de corion, alantoides y algunas veces amnios, pero no incluye ninguna parte del endodermo del saco vitelino (Fig. 1C y D) (Yaron, 1985). En reptiles la alantoplacenta fue categorizada en tres tipos por Weekes (1935); posteriormente, Blackburn (1993a) agregó una cuarta categoría (Tabla 3). Esta placenta es ampliamente considerada para llevar a cabo la función de intercambio gaseoso, su apariencia histológica ofrece un fuerte apoyo para su inferencia funcional (Yaron, 1985; Blackburn, 1993b).

Útero materno y Membrana de la cáscara

El oviducto actúa como un conducto para los huevos entre la ovulación y la oviposición o el parto, actúa como un sitio de fertilización y en algunas especies retiene esperma. Así mismo,

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

puede proveer a un ovocito con albumen y una multicapa de cáscara. Alternativamente, el oviducto puede funcionar con las membranas extraembrionarias para formar interacciones proporcionando un intercambio de agua y gases y en algunos casos transferencia de nutrientes, entre la madre y los embriones (Girling, 2002).

El oviducto en reptiles puede ser dividido en varias regiones que difieren en su estructura y función. Las regiones incluyen el infundíbulo, el tubo uterino (también conocido como la tuba, región glandular, porción de secreción de albumen, mágnium), el istmo (segmento aglandular, región intermedia), el útero (región formadora de la cáscara), y la vagina (cervix). Las diferentes regiones no son reconocidas en todas las especies de reptiles, y regiones adicionales también pueden ser incluidas. En descripciones de varias especies de escamosos, el infundíbulo y tubo uterino no están diferenciados, y el útero es dividido en dos regiones anterior y posterior (Guillette y Jones, 1985; Gillette *et al.*, 1989).

Una de las funciones más importantes del útero es la formación de la membrana de la cáscara (cubierta externa del huevo), que contiene componentes tanto orgánicos como inorgánicos. A pesar de que los huevos de especies vivíparas carecen de una membrana de la cáscara completa, ésta ha sido observada en varias especies (Girling, 2002).

La estructura de la membrana de la cáscara varía ampliamente entre especies, esta diferencia puede estar relacionada con la organización estructural de las glándulas de la cáscara uterinas (Girling, 2002). Generalmente, consiste de una membrana interna de fibras de la cáscara y una capa externa calcárea, o solo la membrana de fibras de la cáscara (Stewart, 1993). Además, es una de las diferencias más consistentes entre escamosos ovíparas y vivíparas, la membrana de la cáscara de especies vivíparas carece de capa externa de carbonato de calcio y típicamente consiste de una capa orgánica considerablemente delgada comparada con la de especies ovíparas.

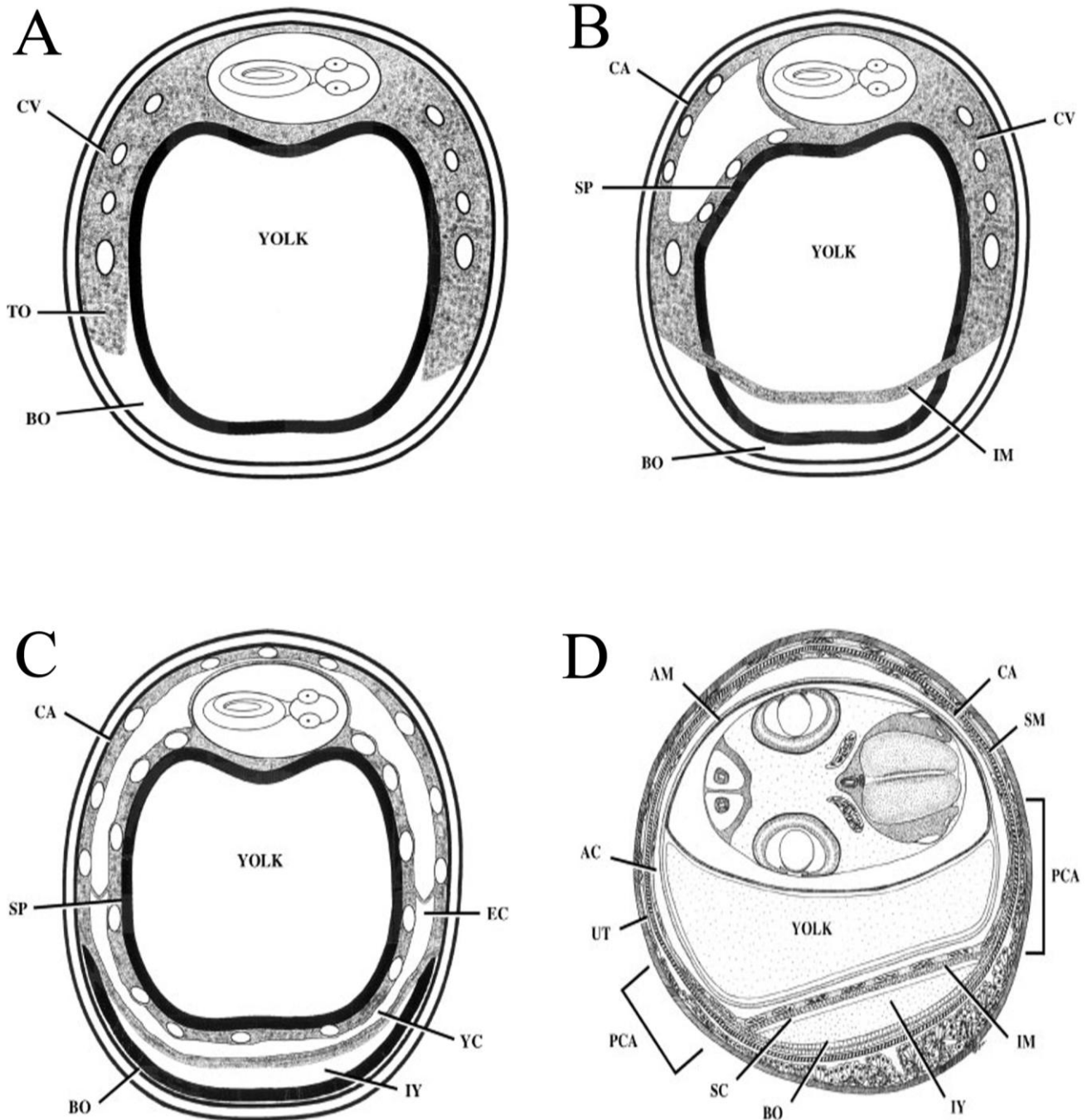


Fig. 1. Membranas extraembrionarias y placentación en serpientes (Stewart y Thompson, 2003)

A. Desarrollo de la onfalopleura. B. Crecimiento del mesodermo intravitelino. C. Corioalantoplacenta y Onfaloplacenta. D. Etapa final de placentación en *Virginia striatula*. (CV) membrana coriovitelina, (TO) onfaloplaura trilaminar, (BO) onfalopleura bilaminar, (YOLK) vitelo, (CA) corioalantoides, (SP) esplacnopleura, (IM) mesodermo intravitelino, (IY) masa aislada de vitelo, (YC) hendidura vitelina, (EC) celoma extraembrionario, (AM) amnios, (AC) cavidad alantoidea, (UT) útero, (PCA) corioalantoplacenta, (SC) hendidura vitelina y (SM) membrana de la cáscara.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

La pérdida de la membrana de la cáscara calcárea gruesa y un incremento gradual en el tiempo de retención del huevo en el útero son característicos de la evolución de la viviparidad y es requisito para la evolución de la placentación. En ausencia de la membrana de la cáscara calcárea los embriones de especies vivíparas obtienen el calcio mediante la transferencia placentaria (Heulin *et al.*, 2005; Hebert *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2010).

Tabla 3. Alantoplacentación (ver Ramírez-Pinilla, 2010)

Tipo	Características	Referencia
I	Células coriónicas y uterinas escamosas, la superficie de ambas fases es lisa aunque puede haber algo de interdigitación, y los capilares alantoicos y uterinos están muy cerca.	Weekes, 1929, 1930, 1935; Stewart y Thompson, 1994; Hoffman, 1970; Blackburn, 1993a.
II	Se distingue por pliegues pequeños del epitelio escamoso uterino con un capilar materno muy cercano a la superficie, en aposición a un corioalantoides cuyo epitelio varía entre columnar bajo a cuboidal con capilares y grandes vasos alantoicos subyacentes.	Weekes, 1929, 1930, 1935; Stewart y Thompson, 1994.
III	Formación de un área elíptica mesometrial de interdigitación uterina y coriónica (placentoma) que varía en complejidad y una zona extraelíptica (paraplacentoma) ubicada entre el placentoma y la omphaloplacenta donde no hay plegamiento de los tejidos, ni especializaciones celulares uterinas o coriónicas, con una morfología similar a la de la alantoplacenta I. Los pliegues uterinos en el placentoma son bien vascularizados y el epitelio es cuboidal con microvellosidades en la superficie apical, mientras que el epitelio del corioalantoides se compone de células columnares ciliadas.	Blackburn, 1993a, b; Stewart y Thompson, 1996; Weekes, 1930, 1935; Ghiara <i>et al.</i> , 1987; Blackburn y Callard, 1997.
IV	Una extensión completa del alantoides dentro del exoceloma embrionario de manera que se asimila al patrón conocido para reptiles no escamosos, un placentoma bien desarrollado con una fuerte interdigitación de los tejidos maternos y fetales, especialmente en el último estado de la gestación en donde se destaca un arreglo sincitial del epitelio uterino frente a un epitelio biestratificado formado por células gigantes binucleadas, y células intersticiales delgadas, una zona adicional de transferencia de nutrientes en el área mesometrial y periférico al placentoma, denominado paraplacentoma delimitado por un pliegue coriónico, areolas coriónicas que se observan en el estado pre-parto y que reciben materiales nutritivos del epitelio uterino y especialmente de las glándulas endometriales, la existencia en el polo abembrionario de una alantoplacenta mixta funcionalmente especializada en el intercambio gaseoso (segmentos de aposición de epitelios escamosos uterino y coriónico, similares a la alantoplacenta tipo I) y en la transferencia de nutrientes (áreas redondeadas y pequeñas formadas por células coriónicas hipertrofiadas en aposición a células epiteliales columnares secretoras, denominadas placas de absorción.	Vitt y Blackburn, 1983, 1991; Blackburn <i>et al.</i> , 1984; Blackburn y Vitt, 1992, 2002; Blackburn, 1993a; Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Especie de estudio

Esta investigación se llevó a cabo con serpientes del género *Conopsis*, el cual se describió en 1858 por Günther, desde entonces el género ha tenido problemas nomenclaturales porque ha sido sinonimia con *Toluca* y se ha confundido con otros géneros (Goyenechea, 2009). Sin embargo, las evidencias encontradas no aportaron gran soporte para la diferenciación entre ambos géneros, por ello se le dio prioridad al género *Conopsis* sobre *Toluca*; es decir, todas las especies y subespecies de *Toluca* quedaron dentro del género *Conopsis* (Goyenechea y Flores-Villela, 2002).

De manera particular, *Conopsis lineata* es una serpiente vivípara, de color café oliva oscuro, generalmente con cinco líneas longitudinales oscuras; la más visible es la línea lateral. Muchos ejemplares tienen puntos claros pequeños en el vientre y algunos de ellos son rosas o rojos. El tamaño de la cola varía con la edad y con el sexo. La longitud hocico-cloaca de los machos es de 18 a 19.8 cm y la de las hembras es de 15 a 20.5 cm. Es una especie endémica de elevaciones altas en México en los estados de Puebla, Hidalgo, Michoacán, Querétaro, Distrito Federal y Estado de México (Taylor y Smith, 1942).

Clasificación taxonómica: *Conopsis lineata* (Kennicott, 1858) (tomada de Catalogue of life, 2011).

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Squamata

Familia: Colubridae

Género: *Conopsis*

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Especie: *Conopsis lineata*

En cuanto a sus ciclos reproductores, se ha registrado que, en las hembras la previtelogénesis se lleva a cabo a fines de la primavera, el verano y principios del otoño. La vitelogénesis ocurre durante el otoño y principios del invierno, y la gestación a lo largo del invierno tardío y la primavera (Uribe *et al.*, 1998). En los machos el testículo presenta una elevada actividad espermatogénica y espermiogénica durante la primavera y principios del verano, en donde se observan abundantes espermátidas y espermatozoides en la luz de los tubos seminíferos. Esta condición decrece paulatinamente hasta observar un período de regresión testicular en otoño. La recrudescencia testicular se presenta durante el invierno y principios de la primavera (Bernal, 1994).

Panorama general en México

En México son pocos los estudios acerca del desarrollo de las membranas extraembrionarias, la viviparidad y la placentación en reptiles, a pesar de contar con gran riqueza de especies de este grupo. En nuestro país existen 804 especies de reptiles descritas y se considera el segundo país con mayor diversidad de este grupo. De las 381 especies de serpientes registradas en México, la gran mayoría son culebras (*Colubridae*) (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). La diversidad biológica Mexicana está relacionada con la gran heterogeneidad del medio físico, que a su vez es producto de una historia geológica y climática muy compleja (Espinosa y Ocegueda, 2008).

La mayoría, sino es que la totalidad, de estos estudios los han realizado con lagartijas, siendo desconocido alguno en esta materia con serpientes. La importancia de estas investigaciones no sólo lo amerita la gran riqueza de especies, sino también la gran historia geológica con la que cuenta México y que además retomando la idea de que las distribuciones actuales de las especies vivíparas no necesariamente indican el lugar donde el patrón reproductor evolucionó, podemos

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

considerar a México un sitio clave para el estudio de sus especies, pudiendo representar un punto de divergencia o convergencia de la viviparidad y la placentación.

HIPÓTESIS

A pesar de que *Conopsis lineata* forma parte de los escamosos, los cuales presentan una nutrición embrionaria lecitotrófica, las membranas extraembrionarias –amnios, corion, alantoides y saco vitelino- establecerán un estrecho contacto con el tejido materno para formar diferentes tipos placentarios, del tal forma que cubran las necesidades del embrión a lo largo de la gestación; similares a las descritas en otras serpientes vivíparas.

OBJETIVOS

General

- Contribuir al conocimiento de la biología de la reproducción en reptiles, especialmente en serpientes vivíparas, desde el punto de vista de la relación materno-fetal.

Particulares

- Analizar el desarrollo de las membranas extraembrionarias en *Conopsis lineata* a lo largo de la gestación.
- Determinar la relación materno-fetal (placentación) que se establece a lo largo de la gestación.

JUSTIFICACIÓN

Los reptiles representan un excelente modelo para el estudio de la evolución de la viviparidad y la placentación. México, aunque importante en riqueza de estas especies, no ha tenido muchos estudios sobre el origen de la viviparidad y la placentación, pues solamente cuenta con estudios realizados en lacertilios. Éste es el primer estudio en una serpiente realizado en México,

destacando la relevancia de esta investigación para el avance en el conocimiento sobre membranas extraembrionarias, placentación y viviparidad de escamosos, específicamente serpientes.

MÉTODO

Obtención de ejemplares

Actualmente la biodiversidad de todo el mundo está sufriendo fuertes amenazas perdiéndose gran cantidad de especies a grandes velocidades. Por esta razón, para llevar a cabo esta investigación utilizamos ejemplares de colección, dándoles una utilidad mayor a la que ya tienen, y de esta forma contribuir a su conservación.

La mayoría de los ejemplares de *Conopsis lineata* de esta investigación se obtuvieron de la colección herpetológica del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera (MZALH) de la Facultad de Ciencias y de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR) del Instituto de Biología, ambas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se seleccionaron ejemplares hembras adultas posiblemente preñadas con fecha de captura entre los meses de noviembre y mayo.

Algunos ejemplares fueron capturados vivos directamente en campo, en la localidad de San Juan del Valle, Chilchotla, Puebla y posteriormente sacrificados.

A cada uno de los ejemplares se les tomó la longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud total (LT) con cinta métrica convencional. La disección se llevo a cabo haciendo un corte medio-ventral para corroborar que estuvieran preñadas. Cuando este fue el caso, se extrajeron las cámaras embrionarias. Cada una de las cámaras fue medida a lo largo y ancho con vernier y se obtuvo el volumen con la siguiente fórmula: $V=4/3\pi a^2 b$, donde: V = volumen, $\pi = 3.141592$; a = radio longitudinal, y b = radio transversal.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Procesamiento histológico

Se determinó el estadio de desarrollo embrionario (EDE) en el que se encontraba cada embrión, con base en las características fenotípicas, de acuerdo con la tabla de desarrollo para la serpiente colubridae *Thamnophis sirtalis* propuesta por Zerh (1962) (Anexo I).

Posteriormente, cada una de las cámaras embrionarias se procesó con la técnica histológica convencional (deshidratación en alcoholes graduales, aclarado en xilol e inclusión en parafina). Se realizaron cortes seriados de 5 μm de grosor y se montaron para su análisis con microscopia óptica. Los cortes se tiñeron alternadamente con Hematoxilina-Eosina (HE), Azul Rojo Núcleo Resistente (ARNR), Azul Alciano Rojo Clorantino 5B (AARRC5B) y Tricrómica de Mallory (TM) (ver técnicas detalladas en Anexo II).

Una vez obtenidas las preparaciones histológicas, las observaciones y análisis de las estructuras se realizaron en el microscopio (modelo Olympus CX31) y se obtuvieron fotomicrografías con cámara digital (Olympus C-5050). Las diferentes estructuras y tipos placentarios se determinaron de acuerdo con la clasificación propuesta por Stewart y Thompson (1994, 2000).

Los ejemplares utilizados fueron devueltos y reintegrados a su respectiva colección. En el caso de los ejemplares de la CNAR también fueron devueltos algunos cortes histológicos y embriones no procesados para integrarse a las colecciones accesorias de cortes histológicos y órganos, respectivamente. Los ejemplares capturados en campo fueron integrados a la Colección Herpetológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, también perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Evolución

Para ubicar los resultados obtenidos dentro de un contexto evolutivo-filogenético, se construyó una matriz de datos, tomando como base los datos para serpientes de la matriz que Stewart y

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Thompson (2000) proponen para especies de las cuales hay estudios sobre membranas extraembrionarias y placentación. La matriz se amplió con la información obtenida de *Conopsis lineata* y estudios recientes que no fueron tomados, tanto de especies vivíparas como ovíparas [*Pituophis guttatus* (Blackburn *et al.*, 2003; Knight y Blackburn, 2008), *Thamnophis sirtalis* (Hoffman, 1970; Blackburn *et al.*, 2002; Blackburn y Lorenz, 2003a, b), *T. radix* (Blackburn y Lorenz, 2003a, b), *T. ordinoides* (Blackburn *et al.*, 2002), *Virginia striatula* (Stewart, 1990; Stewart y Brasch, 2003) y *Storeria dekayi* (Blackburn *et al.*, 2009)].

RESULTADOS

Datos generales de las hembras

Se obtuvieron dos hembras gestantes del MZALH.

- El ejemplar con número de catálogo 06881, fue capturada el 29 de enero de 1995 en Pinal de Amoles, Rancho Nuevo, Querétaro. Su LHC fue de 176 mm, presentó tres huevos fecundados, uno en el oviducto derecho localizado más anteriormente a los otros dos en el oviducto izquierdo. El estadio de desarrollo de los embriones fue el 18.

- El ejemplar con número de catálogo 13797, fue capturada el 23 de Abril del 2000 en La Presa Atlangatepec, Lomas de San José, Apizaco, Tlaxcala. Su LHC fue de 190 mm, presentó tres embriones a término, en estadio de desarrollo 37, acomodados en forma similar a la anterior (Fig. 2 E).

Se obtuvieron ocho hembras gestantes de la CNAR:

- El ejemplar con número de catálogo 13160 fue capturada el 24 de noviembre de 1997 en El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Su LHC fue de 180 mm, presentó tres embriones en fase de segmentación (entre los estadios 1 y 2), dos en oviducto izquierdo y uno en oviducto derecho (Fig. 2 A).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- El ejemplar con número de catálogo 4420 fue capturada el 27 de abril de 1983 en la Región Norte de Citlaltepec, al Sureste de Francisco I. Madero, Puebla. Su LHC fue de 213 mm, presentó cuatro embriones en estadio de desarrollo 35, tres en el oviducto derecho y uno posterior en el oviducto izquierdo.

- El ejemplar con número de catálogo 4454 fue capturada el 9 de mayo de 1983 en la Región Sureste de la Presa Omiltepec, Hidalgo. Su LHC fue de 229 mm, presentó tres huevos, dos con embrión en estadio de desarrollo 35 en el oviducto derecho y uno en reabsorción en el oviducto izquierdo (Fig. 2 C).

- El ejemplar con número de catálogo 5025 fue capturada el 19 de mayo de 1984, a 50 km Este-Noreste de San Luis de la Paz, en Victoria, Guanajuato. Su LHC fue de 137 mm, presentó cinco embriones en estadio de desarrollo 36, tres anteriores en el oviducto derecho y dos posteriores en el oviducto izquierdo (Fig. 2 D).

- El ejemplar con número de catálogo 4421 fue capturada el 28 de abril de 1981 en Santa Cruz Xochitepec, Xochimilco, Distrito Federal. Su LHC fue de 232 mm, presentó un embrión en estadio de desarrollo 37.

- Los ejemplares 03823-12 y 03823-13 fueron capturadas el 14 de mayo de 1982 a 9 km al Oeste de Chiapa de Mota, en Presa La Concepción, Estado de México. La primera midió 181 mm de LHC, presentó tres embriones en estadio de desarrollo 37, dos anteriores en el oviducto derecho y uno posterior en el oviducto izquierdo. La segunda midió 187 mm de LHC, presentó tres embriones en estadio de desarrollo 37 acomodados en forma similar.

- El ejemplar con número de catálogo 5024 fue capturada el 19 de mayo de 1984 a 50 km al Este-Noreste de San Luis de la Paz, Victoria, Guanajuato. Su LHC fue de 214 mm, presentó cinco embriones en estadio de desarrollo 37.

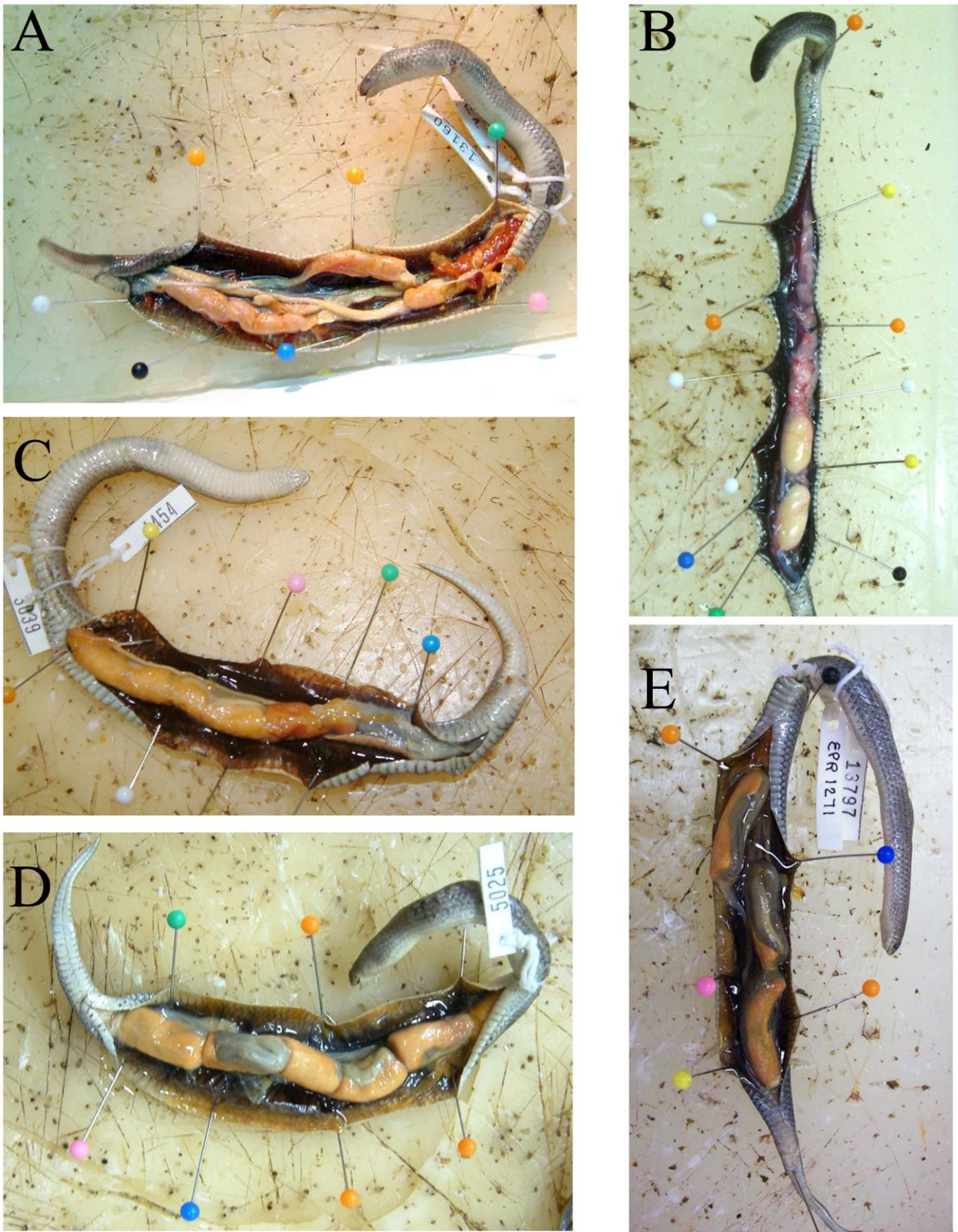


Fig. 2. Hembras gestantes de *Conopsis lineata*.

A. Embriones en fase de segmentación. B. Embriones en estadio 16. C. Embriones en estadio 35. D. Embriones en estadio 36. E. Embriones en estadio 37.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Ejemplar de campo:

- El ejemplar 01camp fue capturado el 5 de diciembre de 2010 en la localidad de San Juan del Valle, Chilchotla, Puebla, mantenida en cautiverio junto con un macho y sacrificada el 14 de enero de 2011. Su LHC fue de 190 mm, presentó dos embriones en el oviducto izquierdo, en estadio de desarrollo 16 (Fig. 2 B).

En la Tabla 4 se resumen las medidas de las hembras, el número total de huevos (fecundados como no fecundados), ordenados por estadio de desarrollo embrionario (EDE), y sus fechas de colecta. La Tabla 5 resume las medidas de las cámaras embrionarias, sus medidas individuales así como por estadio de desarrollo embrionario.

En la Tabla 4 podemos observar que la hembra 5025 fue la más pequeña (137 mm) y una de las hembras que con mayor número de crías (5). En contraste, la hembra 4421 fue la más grande (232 mm) y la única que gestaba una sola cría.

Datos numéricos

Tabla 4. Relación del tamaño de las madres con el número de huevos

# de ejemplar	LHC (mm)	No. de huevos/embriones	EDE	Fecha de colecta
13160	180	3	Entre 1 y 2 (segmentación)	24 Noviembre 1997
01camp	190	2	16	Capturada 5-Diciembre-2010 sacrificada 14-Enero-2011
06881	176	3	18	28-Enero-1995
4420	213	4	35	27-Abril-1983
4454	192	3	35	9- Mayo-1983
5025	137	5	36	19-Mayo-1984
13797	190	3	37	23-Abril-2000

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

4421	232	1	37	28-Abril-1981
03823-12	181	3	37	14-Mayo-1982
03823-13	187	3	37	14-Mayo-1982
5024	214	5	37	19-Mayo-1984

Tabla 5. Medidas de las cámaras embrionarias

# de ejemplar	EDE	Medida de cada cámara embrionaria			Volumen promedio (mm ³) por estadio
		Largo (mm)	Ancho (mm)	Volumen (mm ³)	
13160	Entre 1 y 2 (segmentación)	22.2	5.5	1419.27	\bar{x} =1202.44; SD=306.64
		18.5	5.5	985.60	
01camp	16	16.3	8.1	1126.83	\bar{x} =1221.74 ; SD=134.23
		17.2	8.5	1316.66	
06881	18	15.5	7.0	880.56	\bar{x} =1120.12 ; SD=207.47
		18.8	6.7	1239.90	
		18.8	6.7	1239.90	
4420	35	22.1	8.0	2045.84	\bar{x} =2148.11 ; SD=581.88
		20.5	7.8	1716.33	
		18.5	8.7	1559.05	
		22.5	7.0	1855.50	
4454	35	26.9	8.0	3031.05	
		24.4	8.6	2680.87	
5025	36	17.6	9.6	1557.02	\bar{x} =1546.28 ; SD=365.51
		20.9	8.9	2035.54	
		15.7	9.0	1161.55	
		18.6	7.9	1431.03	
13797	37	27	7.3	2786.43	\bar{x} =2671.67 ;
		23.4	8.2	2350.95	

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

		27.8	8.3	3358.66	SD=742.61
4421	37	33.2	7.5	4328.48	
03823-12	37	27.3	5.0	1951.16	
		24.5	6.7	2105.74	
03823-13	37	25.9	6.7	2353.27	
		30.9	5.9	2949.63	
		27.2	7.3	2827.86	
5024	37	20.6	8.2	1821.99	
		19.9	9.5	1969.82	
		20.8	9.9	2242.64	
		23.1	9.0	2514.57	
		33.6	6.5	3842.29	

Características generales de las cámaras embrionarias

Los embriones en todos los estadios de desarrollo, excepto segmentación, se encontraron cubiertos por su amnios, el huevo entero rodeado por el corion y externamente por una delgada membrana de la cáscara. Un gran vaso sanguíneo y ramificaciones se observaron a lo largo de la cámara pasando por encima de la porción anterior del embrión dentro del útero materno. Todas estas son membranas delgadas y transparentes que permiten ver al embrión a través de ellas macroscópicamente.

La posición del embrión sobre el vitelo definió dos regiones morfológicamente distintas: polo embrionario (donde se ubica el embrión, por lo cual deriva su nombre) y polo abembrional (región opuesta al embrión). En cada uno de estos polos, los diferentes tipos placentarios son el resultado de la presencia y arreglo de todas y cada una de las membranas extraembrionarias en aposición con la pared interna del útero en los diferentes estadios de desarrollo, al mismo tiempo separadas por una delgada membrana de la cáscara.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Se encontraron diferentes etapas de desarrollo embrionario: temprana (segmentación), media (estadios 16 y 18) y tardía (estadios 35, 36 y 37).

Gestación temprana

Segmentación

Los embriones dentro de los oviductos del ejemplar 13160, se encontraban en etapa de segmentación, entre los estadios 1 y 2 (entre 1 y 2 células) (Fig. 3 A-B). Histológicamente se distinguen dos regiones estructuralmente distintas, el polo embrionario que a diferencia de las otras etapas se caracteriza por el disco embrionario y el polo abembrional donde sólo se observa el vitelo (Fig. 3C-D).

En esta etapa de división celular aún no ha iniciado el desarrollo de ningún anexo extraembrionario y por lo tanto de ningún tipo placentario. En el polo embrionario se observan minúsculas gotas de vitelo aglomeradas en el sitio de formación del embrión, en las inmediaciones del disco embrionario (Fig. 3C, 4A). La masa vitelina está formada por gotas esféricas de vitelo de diferentes tamaños, dispersas por todo el huevo y limitado por la membrana vitelina (Fig. 4C), cubiertas externamente por la membrana de la cáscara y la pared del útero (Fig. 4B, D).

El huevo se encuentra rodeado por una delgada membrana de la cáscara estructurada por el límite interno, el cual es una capa acelular homogénea, sobre la cual se observan fibras de diferente grosor, algunas afines al colorante rojo núcleo resistente dando un color rojo. La pared interna del útero y la membrana de la cáscara se encuentran estrechamente cercanas. Las células epiteliales uterinas son cúbicas altas. En algunas zonas el grosor del epitelio aumenta a cilíndrico, donde existen células ciliadas y no ciliadas.

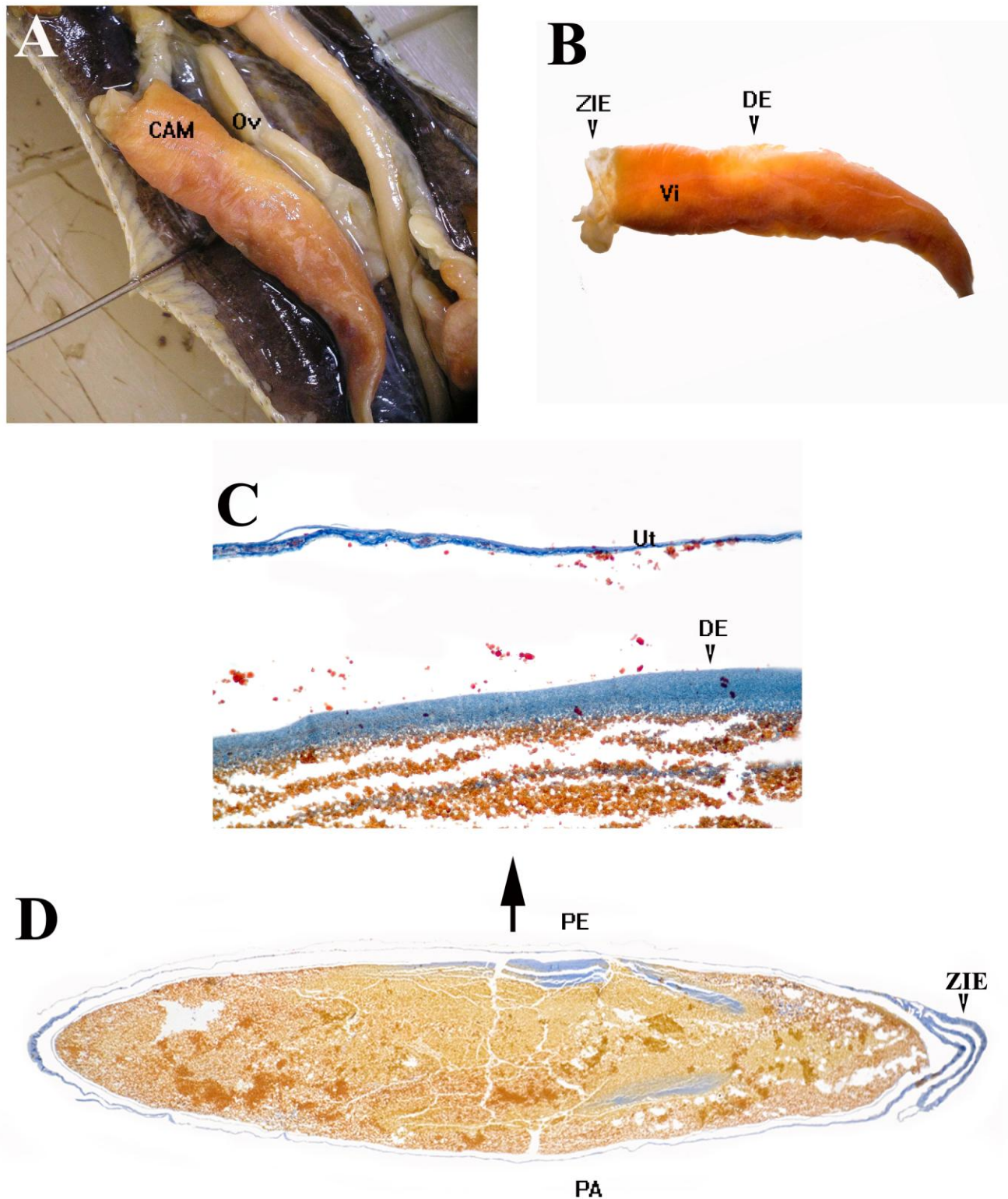


Fig. 3. Cámara embrionaria en la etapa de segmentación

A. Cámara embrionaria dentro de la madre. B. Estructura de la cámara embrionaria. C. Microfotografía de la región del disco embrionario (Técnica TM, 100x). D. Microfotografía de la cámara embrionaria (Técnica TM, 15x). (CAM) cámara embrionaria, (Ov) oviducto, (ZIE) zona inter-embryonaria, (DE) disco embrionario, (Vi) vitelo, (Ut) útero, (PE) polo embrionario y (PA) polo abembrional.

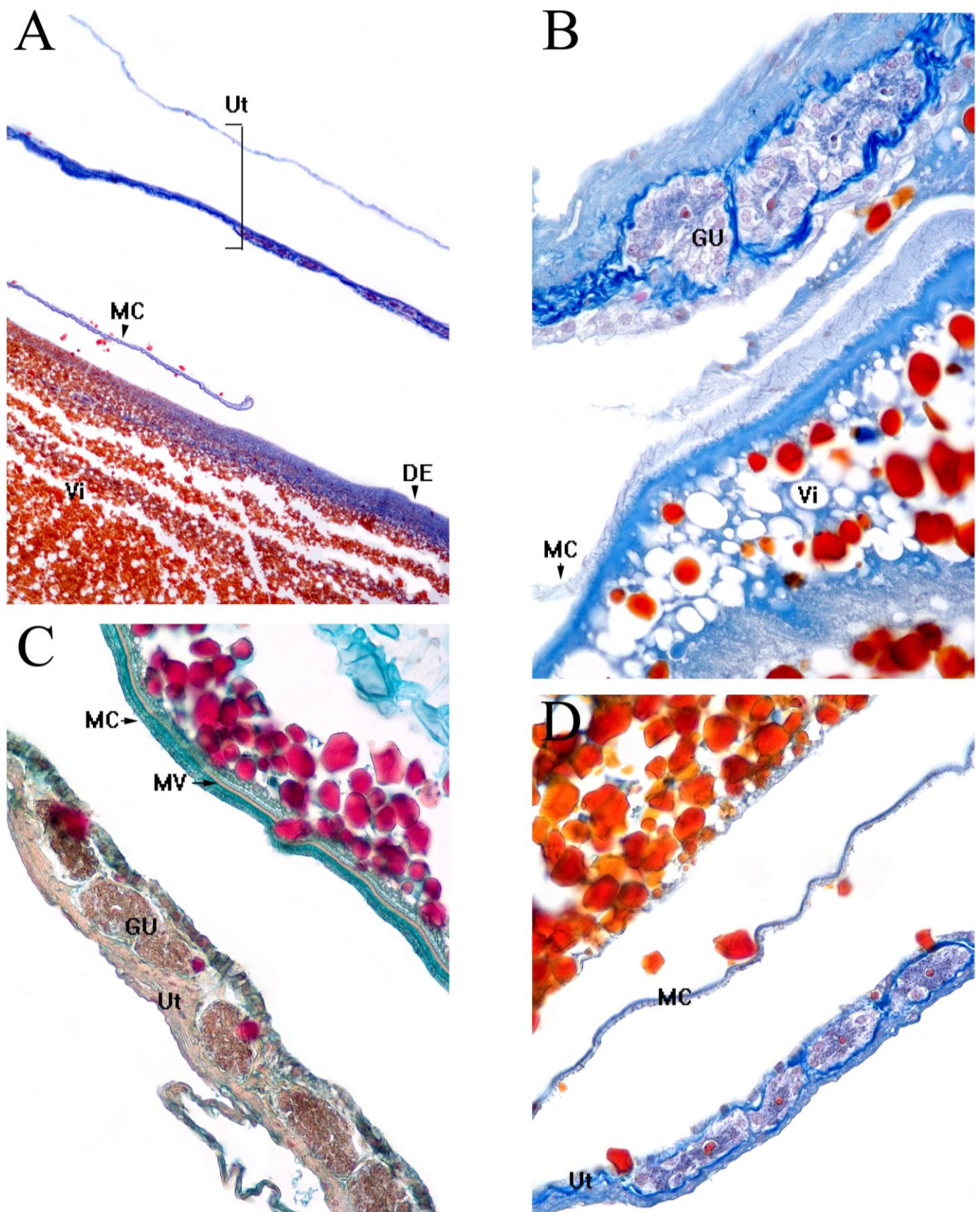


Fig. 4. Membranas de la cámara embrionaria en etapa de segmentación

A. Región del disco embrionario (Técnica TM, 100x). B. Contacto entre las membranas de la cámara embrionaria (Técnica TM, 400x). C. Aposición entre la membrana vitelina y la membrana de la cáscara (Técnica AARRC5B, 400x). D. Secreción de las glándulas del útero (Técnica TM, 400x). (Ut) útero, (MC) membrana de la cáscara, (DE) disco embrionario, (Vi) vitelo, (MV) membrana vitelina y (GU) glándulas del útero.

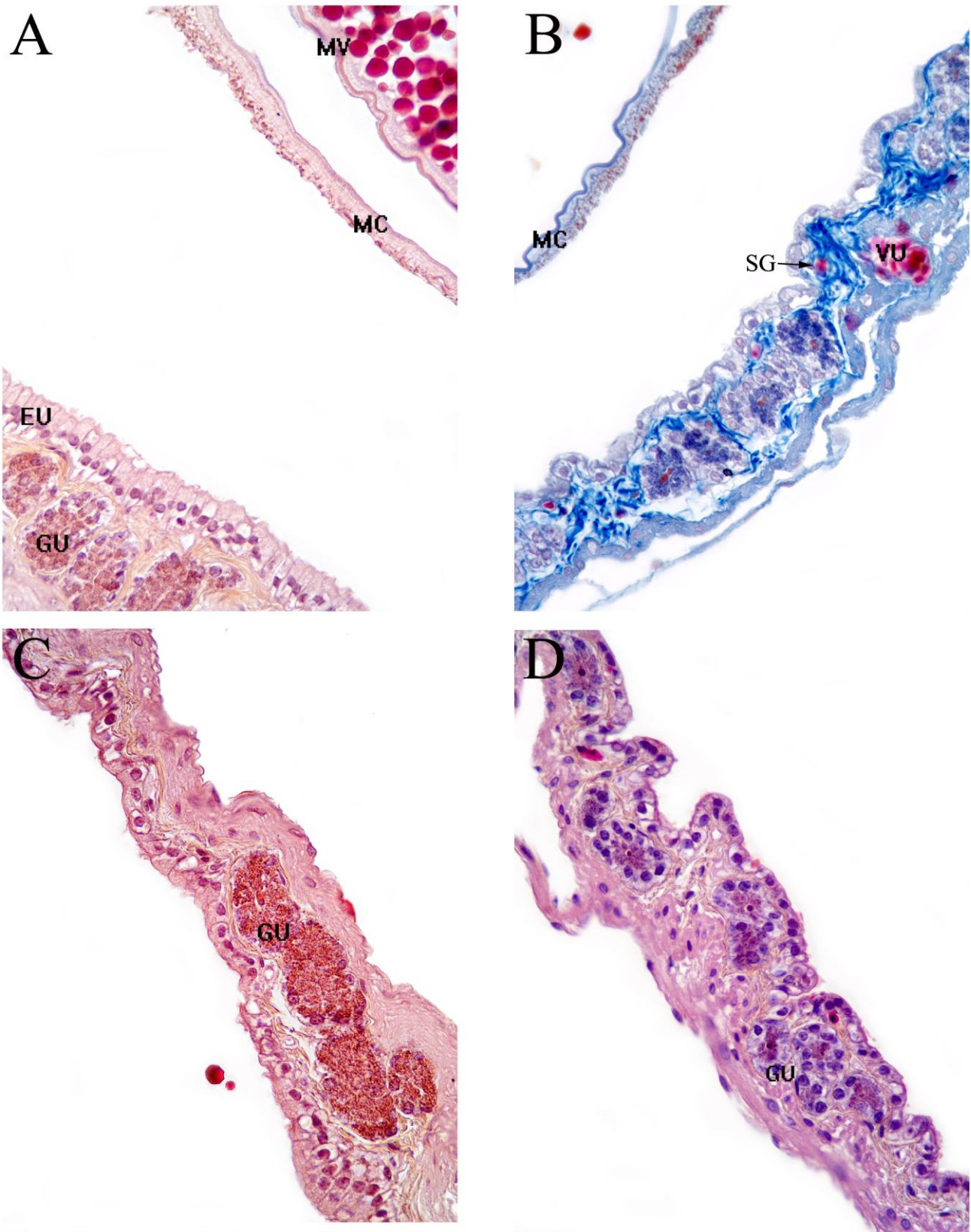


Fig. 5. Estructura del útero en la etapa de segmentación

A. Epitelio uterino alto y glándulas del útero (Técnica HE, 400x). B. Vaso uterino y secreción de las glándulas del útero (Técnica TM, 400x). C-D. Glándulas del útero en la zona inter-embriónica. (Técnica HE, 400x). (MV) membrana vitelina, (MC) membrana de la cáscara, (EU) epitelio uterino, (GU) glándulas del útero, (VU) vaso del útero y (SG) secreción de la glándula.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

En la lámina propia de tejido conjuntivo son evidentes las glándulas, las cuales presentan glóbulos de secreción en las células, así como en la luz glandular. Cabe señalar que la secreción es afín al mismo colorante que las fibras. Los vasos sanguíneos son pocos y de bajo calibre (Fig. 5A-B). En la zona inter-embriónica la mucosa es plegada, las células del epitelio son más grandes y las fibras musculares se encuentran plegadas (Fig. 5C-D).

Gestación media

Estadio 16

Los embriones en este estadio se caracterizan macroscópicamente por presentar los segmentos mandibulares y los orificios auditivos visibles, el tronco curvado 180°, el alantoides ha comenzado a expandirse y en la región anterior los pliegues neurales aún permanecen abiertos (Fig. 6A-D).

Los cortes realizados en estas cámaras embriónicas (embrión + vitelo + membranas extraembriónicas + útero) nos permiten tener una vista transversal del embrión y distinguir fácilmente el polo embriónico y el abembrional, se pueden observar las membranas extraembriónicas (saco vitelino, amnios, corión y alantoides) en desarrollo emergiendo del propio embrión, cubriéndolo a él y al vitelo (Fig. 7A-B).

En esta etapa, los pliegues amnióticos han cerrado por completo y sus capas extraembriónicas se han fusionado. Las capas de ectodermo y mesodermo somático extraembriónicos (somatopleura) se distinguen fácilmente, las células ectodérmicas cercanas al embrión son cúbicas, conforme se alejan tienden a ser escamosas; las células mesodérmicas aunque de mayor tamaño siguen el mismo patrón. La porción más externa se encuentra en estrecho contacto con el corion (Fig. 7A-C).

El alantoides se aprecia como un pequeño saco en la región media-posterior del embrión. La pared externa está constituida por células mesodérmicas cúbicas y vasos sanguíneos muy

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

pequeños. A su vez, la pared interna se constituye de la capa endodérmica del intestino posterior del embrión, de células cúbicas. Ambas capas extraembrionarias se encuentran plegadas. La pequeña porción ocupada por el alantoides incipiente en contacto con el corion forma la membrana corioalantoica, en aposición con el útero materno representan la Corioalantoplacenta, que ha iniciado su formación (Fig. 7B-C).

El corion ha rodeado por completo al huevo, consiste de una membrana de células escamosas en la región por encima del embrión. Conforme se alejan de esta región, éstas células tienden a ser cúbicas hacia el polo abembrional. El resto de la región dorsal del huevo que no contacta con el alantoides junto con el útero materno forma la Corioplacenta (Fig. 7A-D), un órgano transitorio de breve presencia debido a la expansión del alantoides. Una delgada membrana de la cáscara se interpone entre corion y útero impidiendo el contacto directo entre estas membranas, y sólo en la región por encima del embrión y su amnios muestra una ruptura (Fig. 7C-D).

La masa vitelina se encuentra rodeada en una pequeña región del polo embrionario por esplacnopleura (endodermo y mesodermo esplácnico) proveniente del embrión, las células tanto del endodermo como del mesodermo extraembrionarios son escamosas. Conforme se alejan, ambos tipos celulares tienden a ser cúbicas. Al igual que el corion, el endodermo extraembrionario rodea a la masa vitelina por completo conformando la onfalopleura biláminar. En la periferia del embrión, el mesodermo extraembrionario comienza a proliferar entre las capas de la onfalopleura biláminar desarrollando la onfalopleura trilaminar no vascularizada (Fig. 8A-B). Esta proliferación es limitada por un cúmulo de células mesodérmicas, esto es, el *sinus terminalis*. Posteriormente, una red de vasos sanguíneos se forma de las células del mesodermo extraembrionario, creciendo central y periféricamente para formar el primordio de la circulación vitelina. El crecimiento concéntrico de este sitio da lugar a una segunda fase en la formación de la onfalopleura trilaminar, esto es, el saco vitelino, membrana coriovitelina u onfalopleura trilaminar vascularizada. Ésta eventualmente se extiende alrededor de la masa vitelina sobre el

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

polo embrionario. La membrana coriovitelina y el útero materno en conjunto forman la Placenta Coriovitelina (Fig. 8C-D).

Las células mesodérmicas intravitelinas aparecen a partir del *sinus terminalis* que proliferan y se extienden dentro del vitelo hacía la región opuesta al embrión, iniciando así la separación de una delgada capa periférica de vitelo del resto de la masa vitelina llamada masa aislada de vitelo, y con ello la formación de la hendidura vitelina que posteriormente será la continuación del celoma extraembrionario (Fig. 9A, C y D). Así mismo, las células endodérmicas y ectodérmicas (onfalopleura bilaminar) siguen su trayectoria alrededor de la masa vitelina cubriendo el polo abembrional, que en contacto con el útero materno forman la Onfaloplacenta. Las células ectodérmicas y endodérmicas son cúbicas bajas y en algunos sitios escamosas (Fig. 9B).

En el polo abembrional del saco vitelino se observa el ombligo del vitelo (o “yolk navel” en inglés) cubierto por citoplasma y ectodermo extraembrionario invaginando hacía la gran masa vitelina, donde es visible una depresión en esta zona (Fig. 9E).

La membrana de la cáscara es una capa biláminar continua alrededor de todo el huevo, se aprecian fibras de diferente grosor, afines al azul y al rojo (Fig. 9C).

La pared interna del útero está formada por el endometrio limitado por epitelio cúbico con células ciliadas y no ciliadas, una capa de tejido conectivo, donde pequeños vasos sanguíneos son evidentes además de pocas glándulas colapsadas. Externamente, el útero está compuesto por dos capas musculares, una interna de fibras longitudinales y otra externa de fibras circulares. En esta etapa el grosor del útero ha disminuido en comparación con la etapa inicial (Fig. 8C-D, 9C).

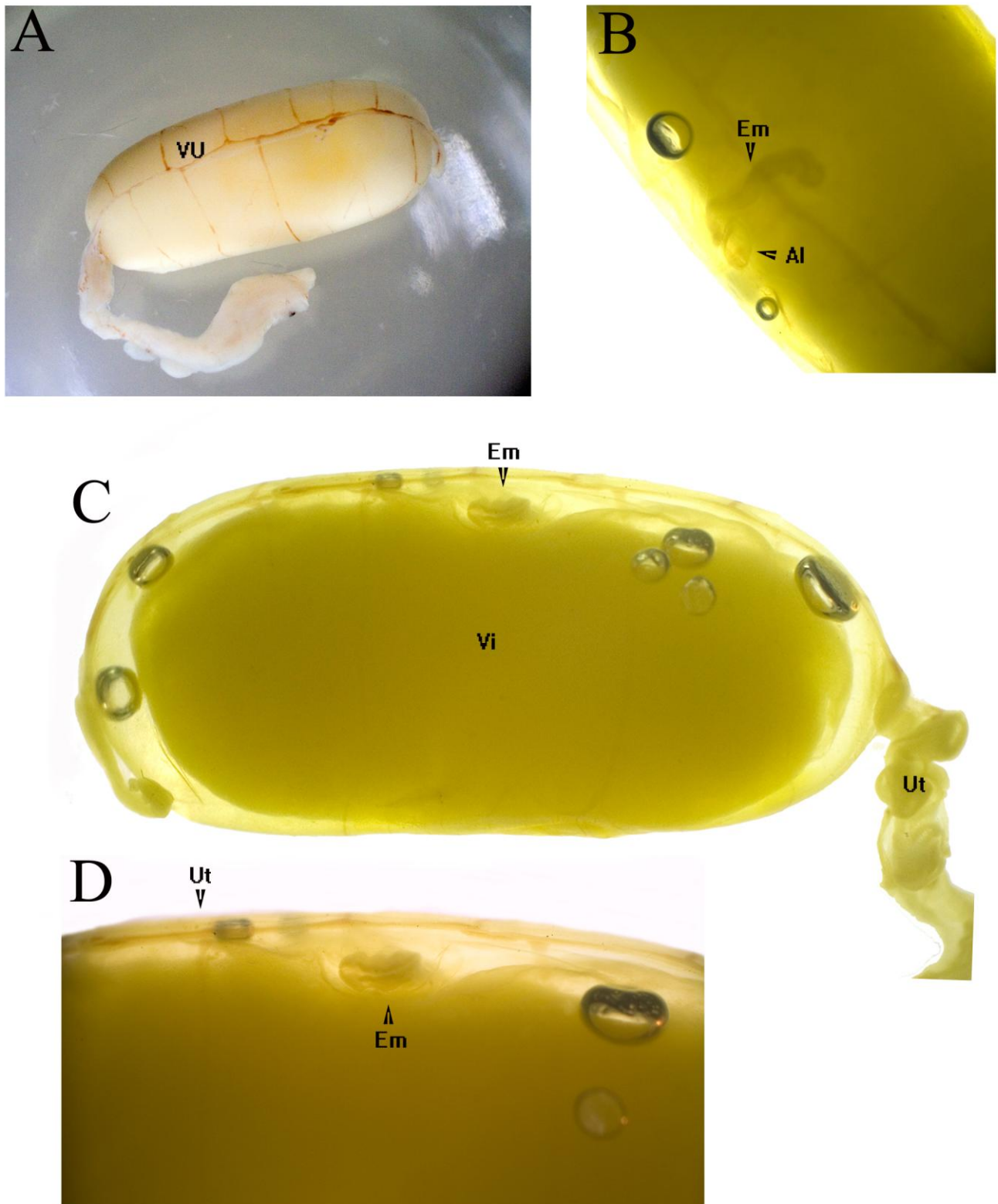


Fig. 6. Cámara embrionaria en el estado de desarrollo 16

A. Sistema vascular de la cámara embrionaria. B. Vista lateral del embrión. C. Cámara embrionaria fijada en bouin. D. Vista dorsal del embrión. (VU) vasos del útero, (Em) embrión, (Al) alantoides, (Vi) vitelo y (Ut) útero.

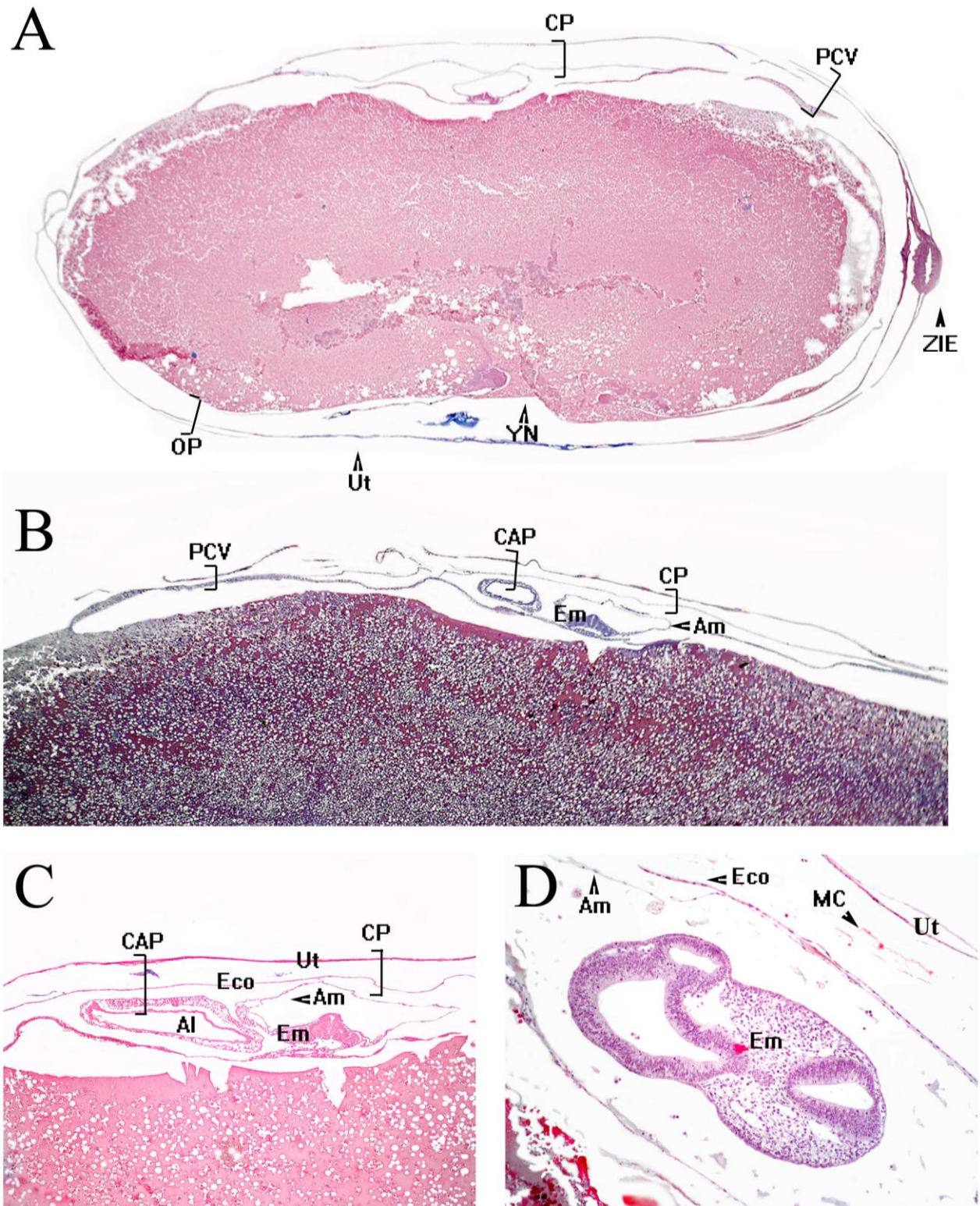


Fig. 7. Cámara embrionaria y polo embrionario en el estadio 16.

A. Ubicación de las placentas (Técnica ARNR, 15x). B. Polo embrionario (Técnica HE, 25x).

C. Corioplacenta y formación de la corioalantoplasenta (Técnica ARNR, 400x). D. Corioplacenta (Técnica HE, 400x). (CP) corioplacenta, (PCV) placenta coriovitelina, (ZIE) zona inte-embriónica, (OP) onfaloplasenta, (Ut) útero, (YN) ombligo del vitelo, (CAP) corioalantoplasenta, (Em) embrión, (Am) amnios, (Eco) ectodermo coriónico, (Al) alantoides y (MC) membrana de la cáscara.

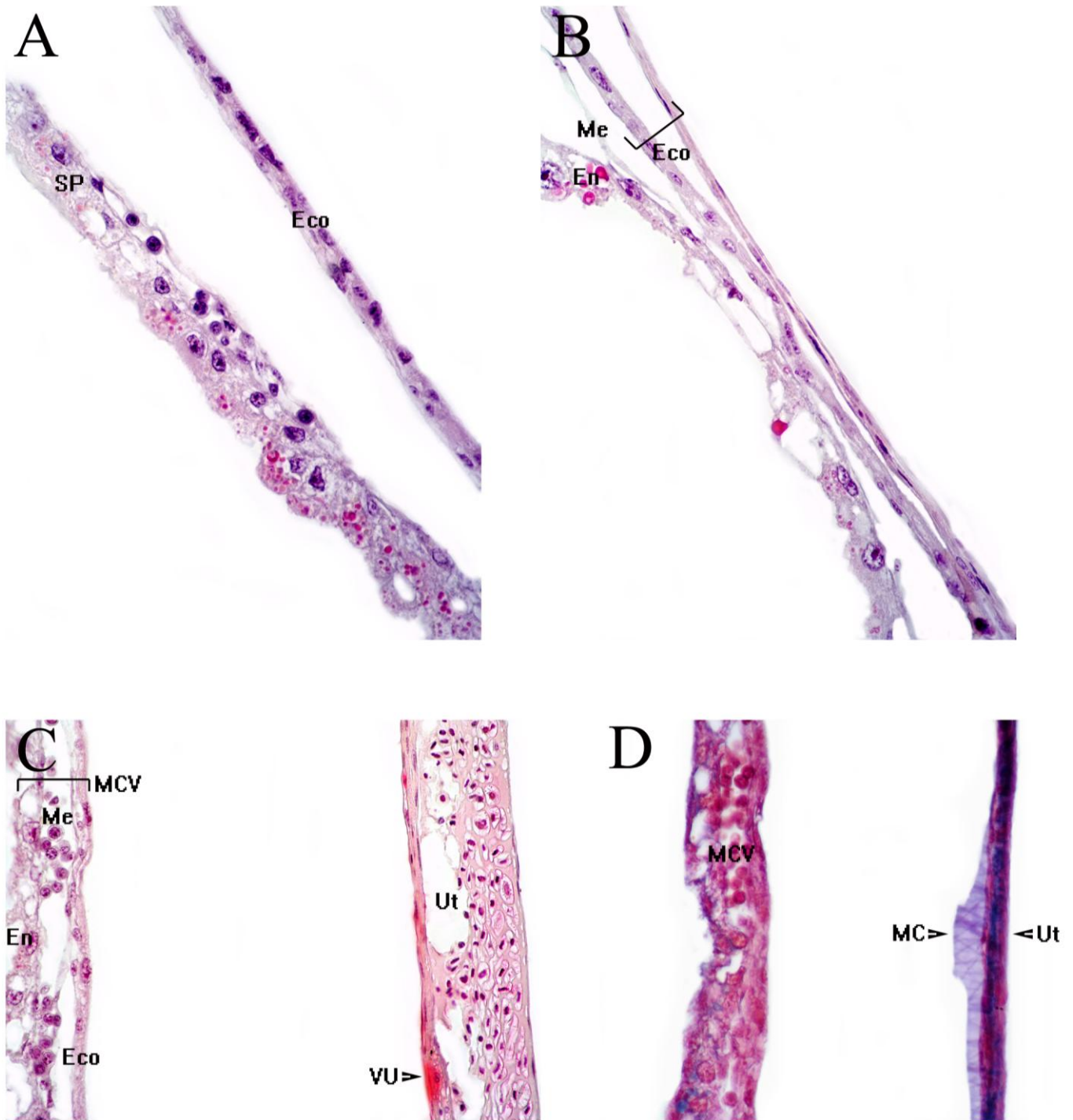


Fig. 8. Formación de la placenta coriovitelina en el estadio 16.

A. Acercamiento del ectodermo coriónico a la esplacnopleura (Técnica HE, 400x). B. Formación de la onfaloplaura trilaminar (Técnica HE, 400x). C. Placenta coriovitelina (Técnica HE, 400x). D. Membrana de la cáscara entre la placenta coriovitelina (Técnica ARNR, 400x). (SP) esplacnopleura, (Eco) ectodermo coriónico, (En) endodermo, (Me) mesodermo, (MCV) membrana coriovitelina, (VU) vasos del útero, (Ut) útero y (MC) membrana de la cáscara.

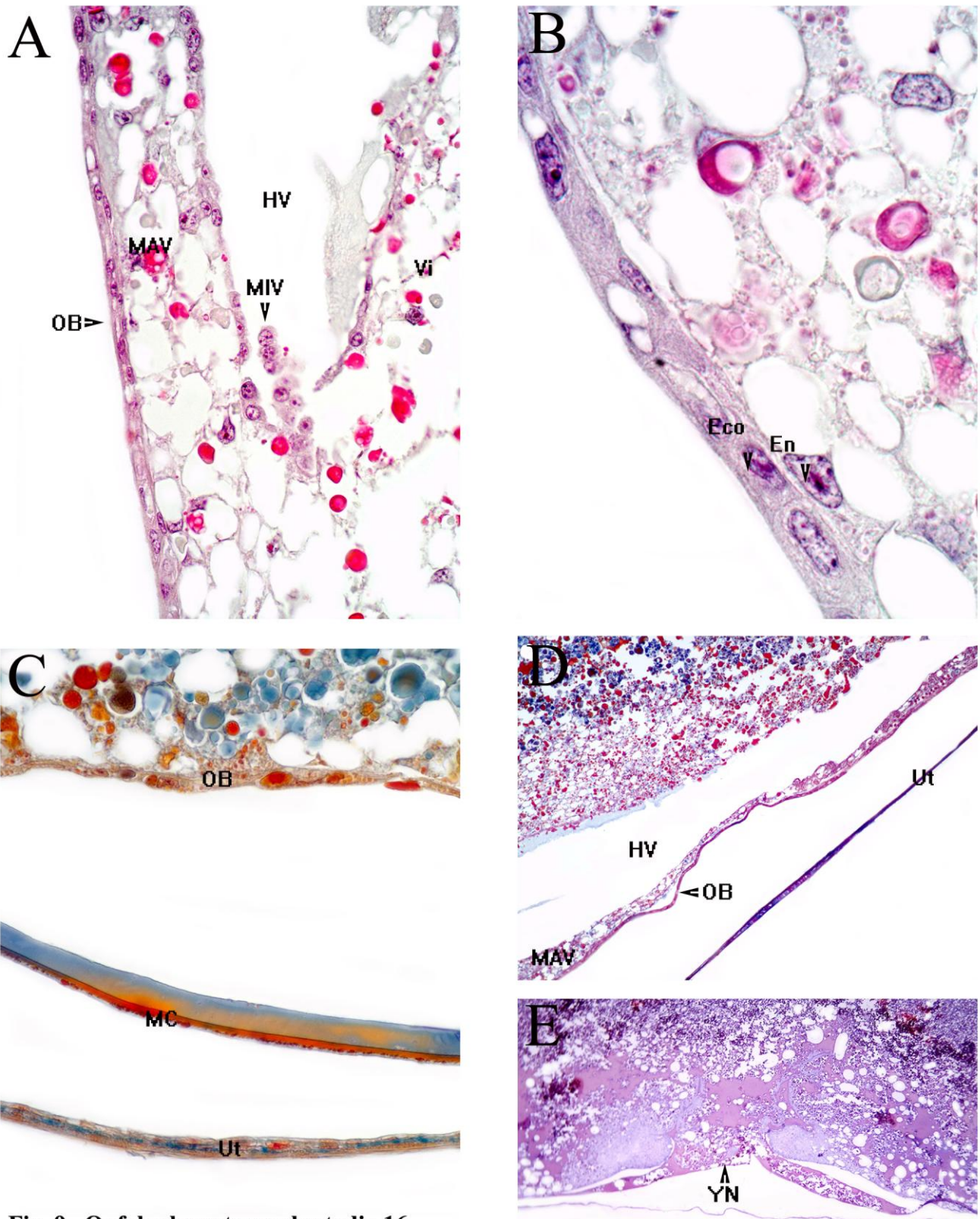


Fig. 9. Onfaloplacenta en el estadio 16.

A. Separación de la masa aislada de vitelo (Técnica HE, 400x). B. Onfaloplacenta bilaminar (Técnica HE, 400x). C. Membrana de la cáscara entre la onfaloplacenta (Técnica TM, 400x). D. Masa aislada de vitelo separada (Técnica ARNR, 100x). E. Ombligo del vitelo (Técnica HE, 45x). (OB) onfaloplacenta bilaminar, (MAV) masa aislada de vitelo, (HV) hendidura vitelina, (MIV) mesodermo intra-vitelino, (Vi) vitelo, (Eco) ectodermo coriónico, (En) endodermo, (MC) membrana de la cáscara, (Ut) útero y (YN) ombligo del vitelo.

Estadio 18

Los embriones de este estadio presentan las placas de la vista invaginando, el orificio auditivo aún presenta una pequeña abertura; el alantoides ha incrementado su volumen apreciándose un poco más grande que la cabeza (Fig. 10A-B).

Las cámaras embrionarias en este estadio fueron cortadas a lo largo del eje transversal del embrión lo que permite tener un panorama del origen y acomodo de las membranas extraembrionarias a partir del mismo (Fig. 10C). Debido a la cercanía de estos con el estadio 16 no hay grandes diferencias entre ambos.

En este estadio las células del alantoides son escamosas, el crecimiento del saco corresponde a casi la mitad del tamaño del embrión aproximadamente ampliando la superficie de contacto con el corion. Por lo tanto, la región del corion que no está en contacto con ninguna otra membrana extraembrionaria disminuye (Fig. 11A). Con ello, el corioalantoides y a su vez la Corioalantoplacenta aumentan su extensión reemplazando parte de la Corioplacenta y de la Placenta Coriovitelina.

Las células endodérmicas y mesodérmicas de la esplacnopleura del saco vitelino y las células mesodérmicas y ectodérmicas del corion cercanas al embrión son escamosas, conforme se alejan forman la membrana coriovitelina en donde las células endodérmicas se observan esféricas o redondeadas, las mesodérmicas en grupos o islotes y las ectodérmicas son cúbicas bajas (Fig. 11B).

Se aprecia el *sinus terminalis* a nivel del ecuador donde las células intravitelinas comienzan a penetrar hacia el vitelo (Fig. 11C-D). En el polo abembrional las células mesodérmicas intravitelinas son escamosas (Fig. 12A), para entonces han proliferado en gran medida haciendo más evidente la hendidura vitelina, sin aún separar por completo la masa aislada de vitelo de la

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

gran masa vitelina (12C-D). El epitelio de la onfalopleura bilaminar es cúbico, la aposición con el epitelio uterino persiste (Fig. 12B).

Se aprecian las fibras formando el límite interno de la membrana de la cáscara rodeando al huevo por completo, interponiéndose entre los tejidos maternos y fetales. La mucosa uterina es plegada y está limitada por el epitelio uterino cúbico bajo. En la lámina propia se incrementa la vascularización en cantidad y tamaño (Fig. 12B-D).

Gestación tardía

En esta etapa los estadios comparten varias cualidades morfológicas respecto a la estructura de las cámaras embrionarias. Éstas son más voluminosas comparadas con la etapa intermedia, el embrión ocupa más de tres cuartas partes del huevo, la masa aislada de vitelo se ha reducido casi por completo y solo quedan pequeñas porciones de lo que antes fue la gran masa vitelina (13 A-F).

Estadio 35

Los embriones en este estadio han completado la organogénesis, el cuerpo entero se encuentra cubierto por escamas mostrando una tenue pigmentación (Fig. 13A-B). Histológicamente, se puede observar la presencia de la corioalantoplacenta cubriendo el polo embrionario y la onfaloalantoplacenta en el abembriona, con la casi completa absorción de la masa aislada de vitelo (Fig. 14A).

Las células del amnios son escamosas a lo largo de toda la membrana. Los vasos sanguíneos son más evidentes a lo largo del alantoides. Para esta etapa el celoma extraembrionario es continuo y ocupado por el alantoides expandido. El crecimiento y desarrollo del alantoides es considerable, haciendo contacto y fusionándose ambas membranas, interna y externa, en el polo abembrional encerrando al embrión y las pequeñas porciones de vitelo que aún permanecen. La

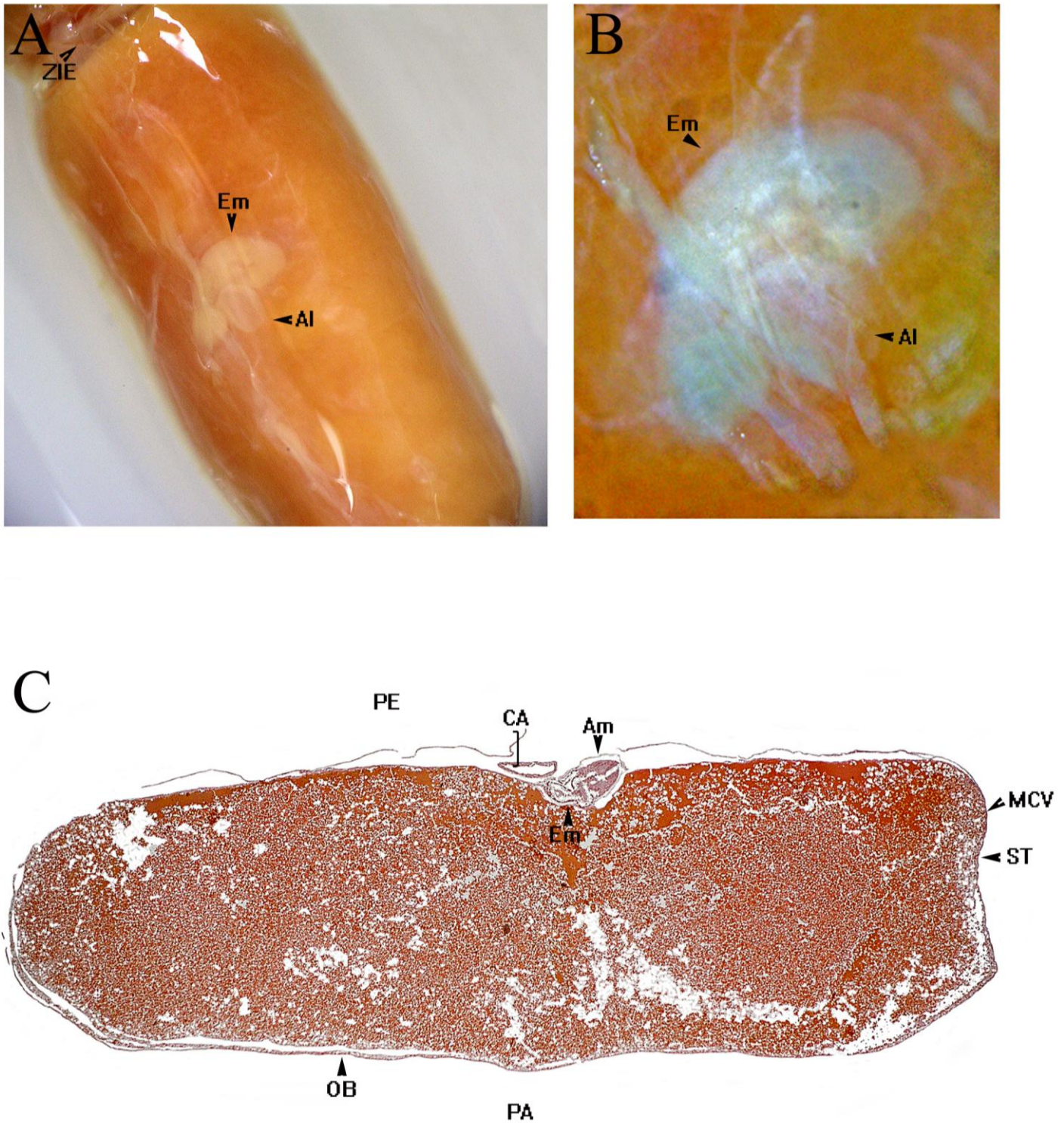


Fig. 10. Cámara embrionaria en el estadio de desarrollo 18.

A. Vista del polo embrionario. B. Embrión con su alantoides. C. Vista panorámica del corte histológico. (ZIE) zona interembrionaria, (Em) embrión, (Al) alantoides, (PE) polo embrionario, (CA) corioalantoides, (Am) amnios, (MCV) membrana coriovitelina, (ST) sinus terminalis, (OB) onfaloplaura bilaminar, (PA) polo abembrional.

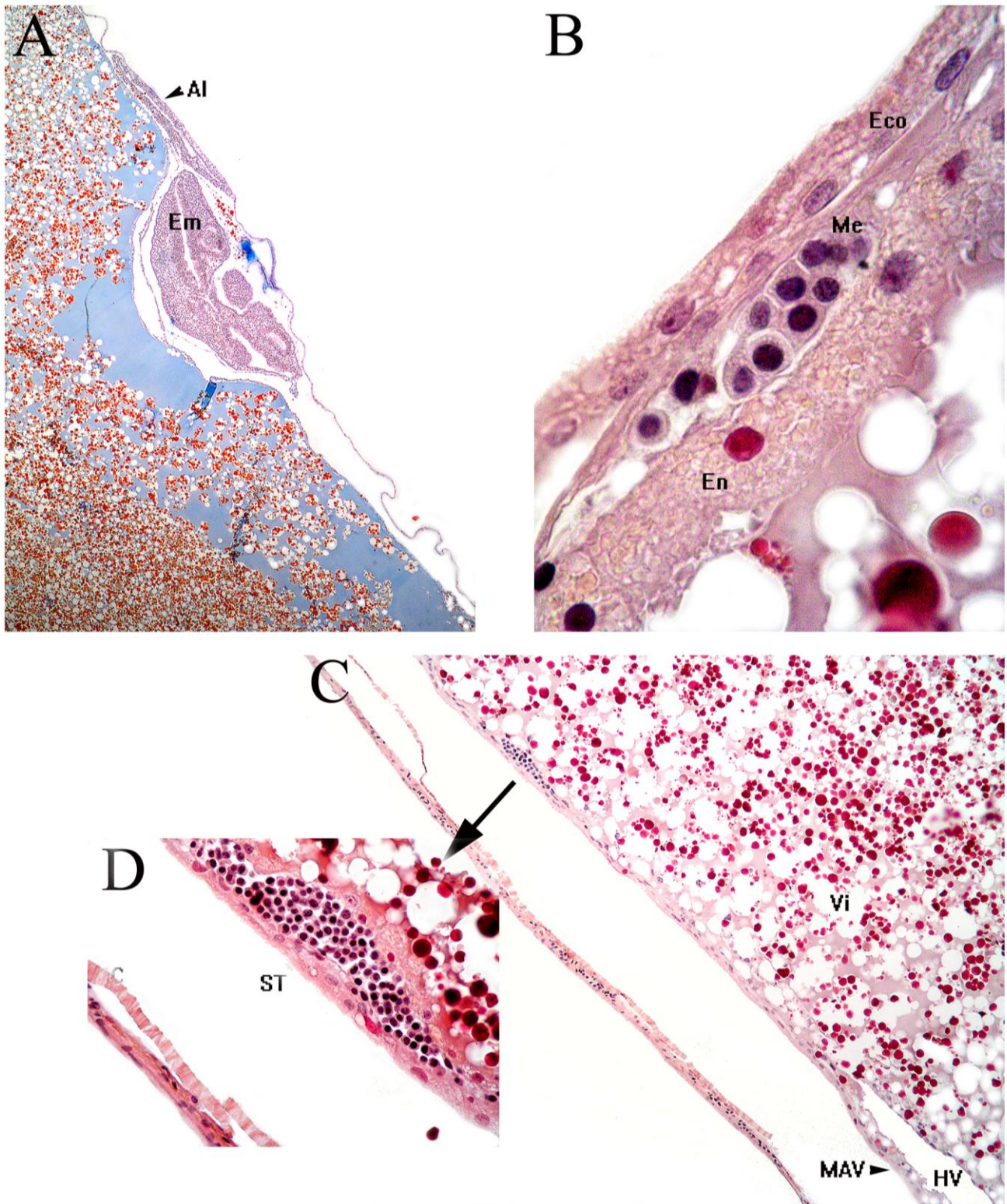


Fig. 11. Polo embrionario en el estadio de desarrollo 18.

A. Embrión con su alantoides (Técnica TM, 400x). B. Membrana coriovitelina (Técnica HE, 400x). C. Placenta coriovitelina y formación de la onfaloplacenta (Técnica HE, 100x). D. Placenta coriovitelina (Técnica HE, 400x). (Al) alantoides, (Em) embrión, (Eco) ectodermo coriónico, (Me) mesodermo, (En) endodermo, (MC) membrana de la cáscara, (Ut) útero, (ST) sinus terminalis, (MAV) masa aislada de vitelo, (HV) hendidura vitelina y (Vi) vitelo.

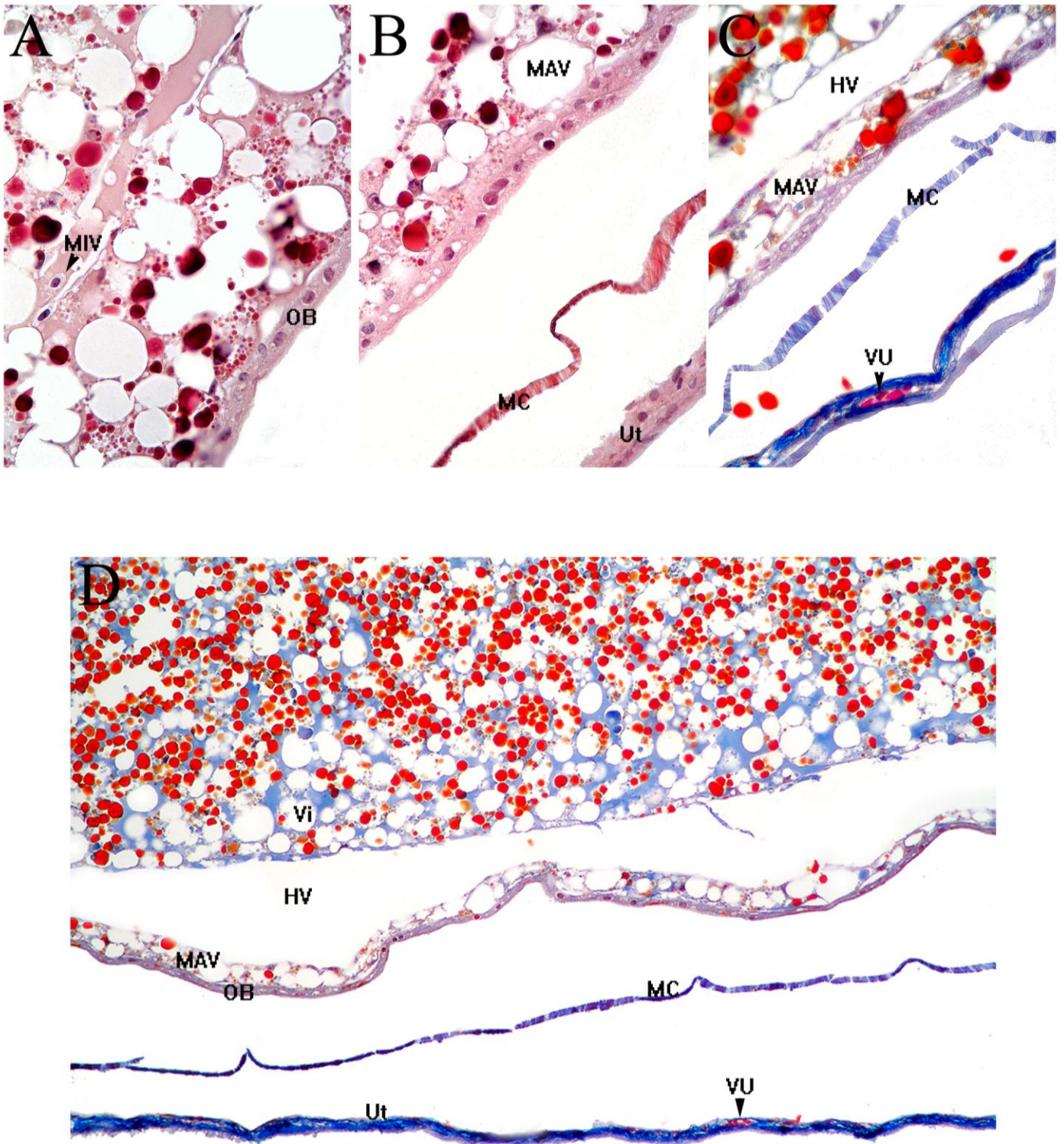


Fig. 12. Onfaloplacenta en el estadio de desarrollo 18.

A. Penetración del mesodermo intravitelino (Técnica HE, 400x). B. Estructura de la placenta (Técnica HE, 400x). C. Útero vascularizado (Técnica TM, 400x). D. Separación de la masa aislada de vitelo (Técnica TM, 400x). (MIV) mesodermo intravitelino, (OB) onfaloopleura bilaminar, (MAV) masa aislada de vitelo, (MC) membrana de la cáscara, (Ut) útero, (HV) hendidura vitelina, (VU) vasos del útero y (Vi) vitelo.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

mayor región del alantoides se encuentra fusionada al corion formando el corioalantoides, que en aposición con el epitelio uterino forma la corioalantoplacenta, cubriendo el polo embrionario y parte del abembrional (Fig. 14B-C). De esta manera, el corioalantoides reemplaza las membranas coriónica y coriovitelina, y con ello la corioplacenta y la placenta coriovitelina por completo. Las paredes externa e interna del alantoides son de epitelio escamoso, presentan grandes vasos sanguíneos a lo largo de las membranas. Especialmente en la pared interna se encuentra un gran vaso entre las porciones de vitelo remanentes. La pared externa del alantoides se encuentra en su mayoría fusionada con el corion. La corioalantoplacenta está limitada por la penetración del alantoides a la parte dorsal de la masa aislada de vitelo a través de la hendidura vitelina haciendo contacto con la previa Onfaloplacenta.

La onfaloplacenta presente desde los primeros estadios hace contacto con el alantoides resultando la onfaloalantoplacenta. Esta placenta se encuentra muy vascularizada gracias a los componentes del alantoides por parte del embrión y a los grandes vasos del útero por parte de la madre. El epitelio del alantoides es cúbico bajo, el de la onfalopleura bilaminar cúbico alto, con algunas células binucleas, y el epitelio uterino escamoso. En esta etapa, la masa aislada de vitelo ha sido consumida casi por completo, permaneciendo pequeñas gotitas de vitelo entre las numerosas vacuolas vacías que quedan (Fig. 14D y E).

El útero se encuentra sumamente vascularizado. Las glándulas uterinas ya no son evidentes. El epitelio es muy delgado, especialmente el que se encuentra en contacto con los vasos sanguíneos del útero, los cuales parecieran estar en el límite del epitelio.

La membrana de la cáscara persiste sin cambio aparente, interpuesta entre los tejidos embrionarios – corioalantoides y onfaloalantoides- y el epitelio uterino. Se observa el límite interno y las fibras rodeando al embrión junto con sus membranas extraembrionarias.

Estadio 36 y 37

Los embriones prácticamente han concluido su desarrollo intrauterino, muestran escamas de color definido típico de la especie, las características histológicas son semejantes (Fig. 13 C-F). Los embriones ocupan la mayor porción de las cámaras embrionarias, están cubiertos por el corioalantoides en la parte dorsal y el onfaloalantoides en la parte ventral (Fig. 15A-B). El amnios es escamoso, se encuentra cercano a las pequeñas porciones de vitelo que aún permanecen, presenta pequeños vasos a lo largo de toda la membrana. El epitelio coriónico de la corioalantoplacenta es muy delgado, en algunos sitios las células son escamosas y cercanas a los vasos sanguíneos, las membranas de esta placenta se encuentran plegadas y junto con el útero es la placenta más vascularizada (Fig. 16A-E).

La Onfaloalantoplacenta en cambio se encuentra vascularizada en menor cantidad. La masa aislada de vitelo se ha reducido, permitiendo una relación más cercana entre las membranas del alantoides y el epitelio uterino, y con ello un mayor acercamiento entre los vasos maternos y fetales (Fig. 17 A-C). El epitelio de la onfalopleura es de cúbico alto en los laterales del huevo a cúbico bajo en la parte más ventral, algunas células son binucleadas (Fig. 17A). En esta placenta el alantoides también presenta grades vasos sanguíneos. La masa aislada de vitelo se ha reducido casi por completo, sólo en algunos sitios se observan pequeñas vacuolas vacías (Fig. 17 B-D).

La membrana de la cáscara aún es visible alrededor de todo el huevo, se pueden distinguir las dos capas por las que se constituye, las cuales son afines a diferentes colorantes, el límite interno y las fibras. Aparentemente, esta membrana no ha sufrido algún cambio, ni regresión (Fig. 16 B, C y E, 17 B-C).

El epitelio de la pared uterina es escamoso, casi imperceptible; los vasos sanguíneos del tejido conectivo son mayores en tamaño y cantidad, y se encuentran en cercana proximidad a la pared uterina propiciando un camino donde los sistemas vasculares fetal y materno son muy cercanos,

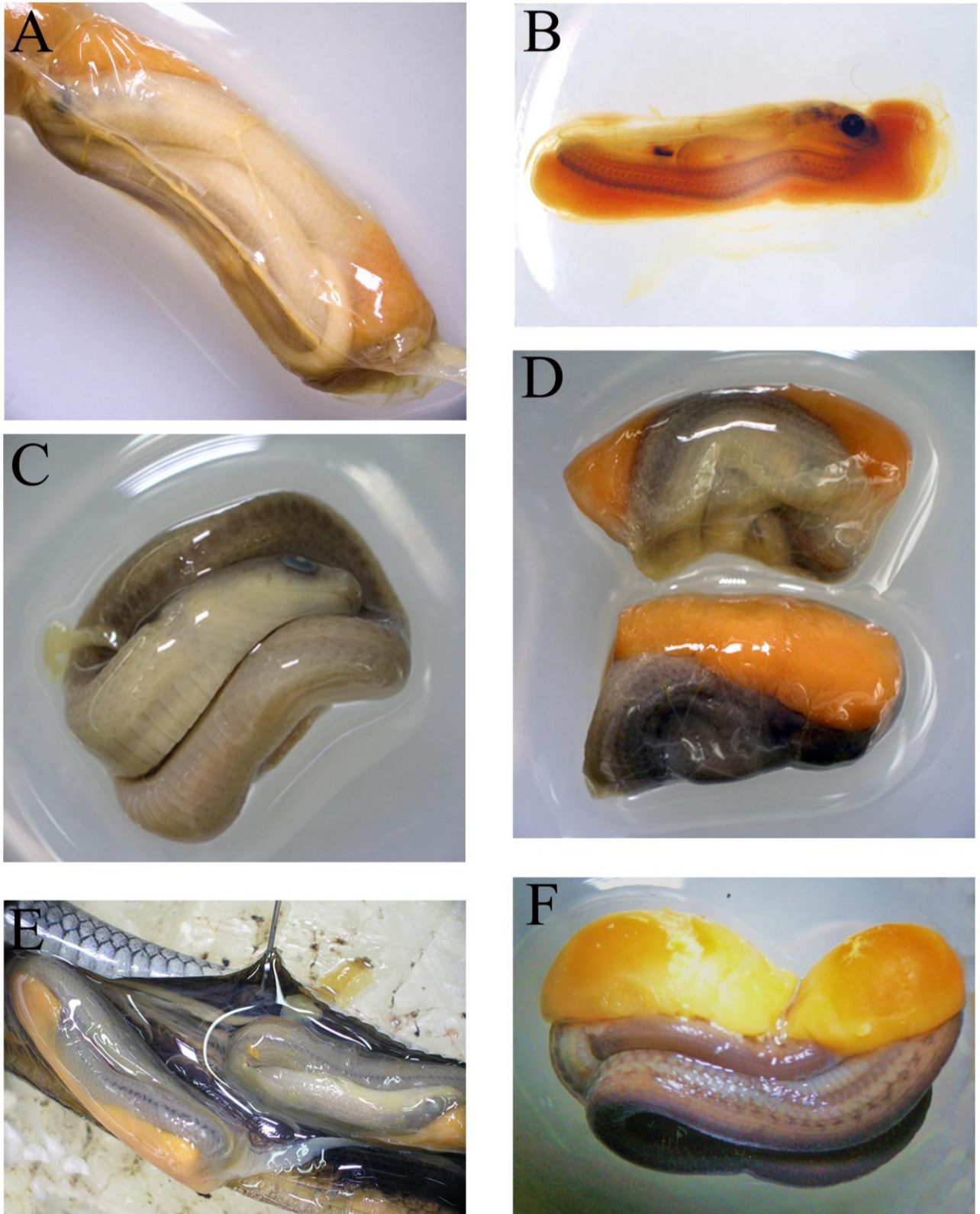


Fig. 13. Embriones en la etapa final del desarrollo.
A-B. Estadio 35. C-D. Estadio 36. E-F. Estadio 37.

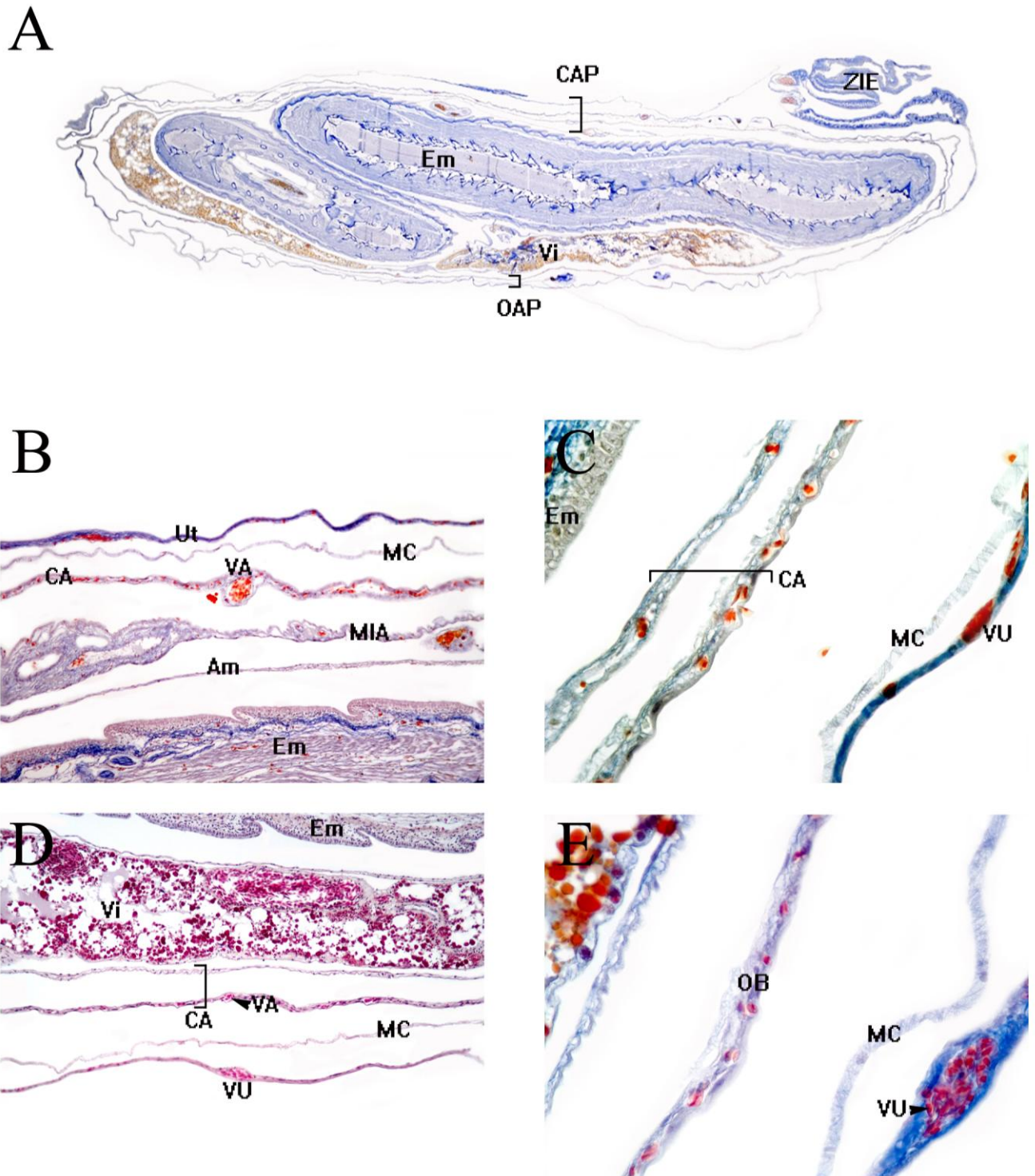


Fig. 14. Placentas en el estadio de desarrollo 18.

A. Vista panorámica de la cámara embrionaria (Técnica TM, 12x). B-C. Corioalantoplacenta (Técnica B-ARNR, C-TM; B 100x, C 400x). D-E. Onfaloalantoplacenta (Técnica D-ARNR, E-TM; D 100x, E 400x). (CAP) corioalantoplacenta, (Em) embrión, (Vi) vitelo, (OAP) onfaloalantoplacenta, (ZIE) zona inter-embrionaria, (Ut) útero, (MC) membrana de la cáscara, (CA) corioalantoides, (VA) vasos del alantoides, (MIA) membrana interna del alantoides, (Am) amnios, (VU) vasos del útero y (OB) onfalo-pleura bilaminar.

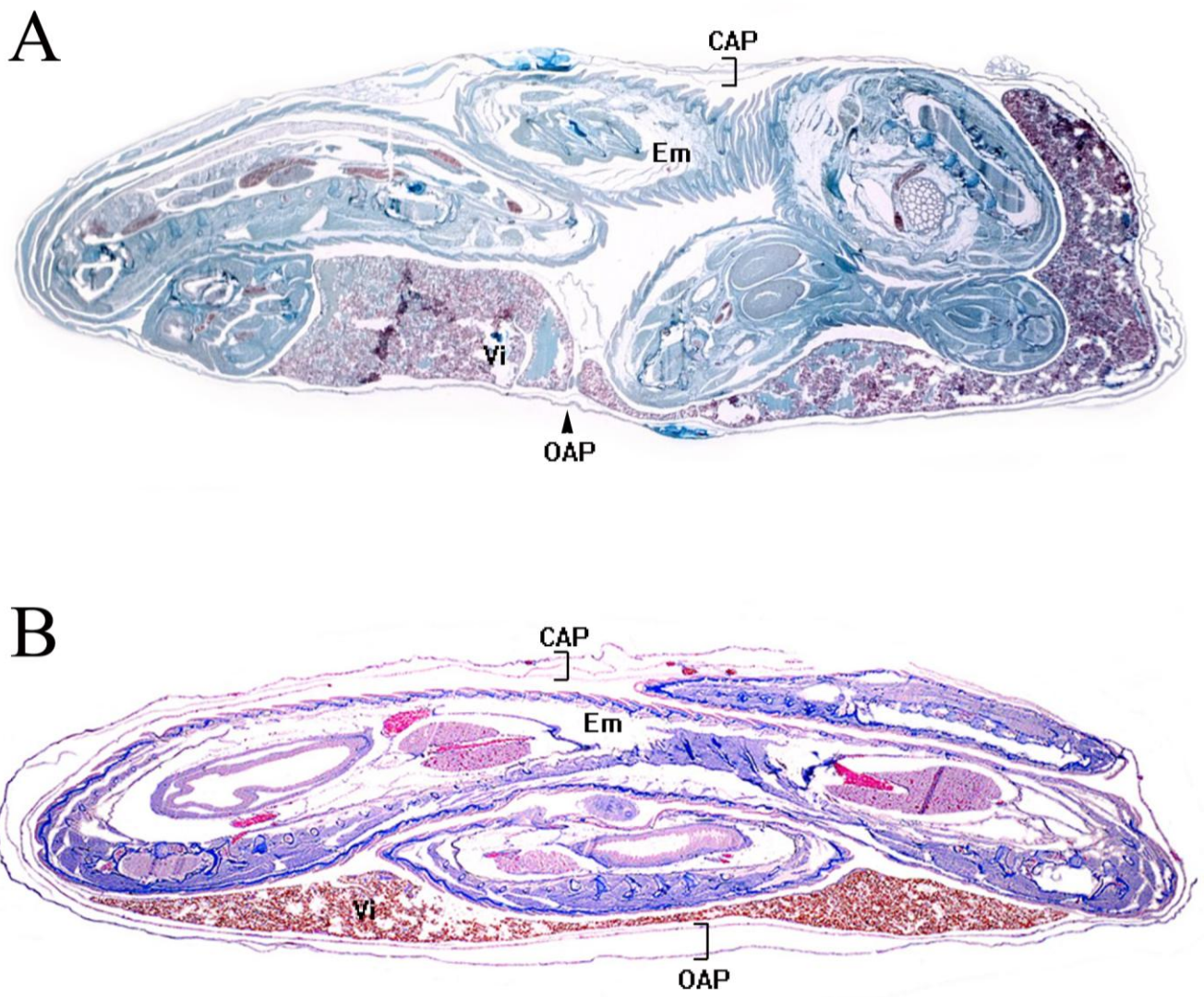


Fig. 15. Vista panorámica de las cámaras embrionarias en la etapa final del desarrollo.
A. Estadio 36 (Técnica AARRC5B, 12x). B. Estadio de desarrollo 37 (Técnica TM, 12x).
(CAP) corioalantoplacenta, (Em) embrión y (OAP) onfaloalantoplacenta.

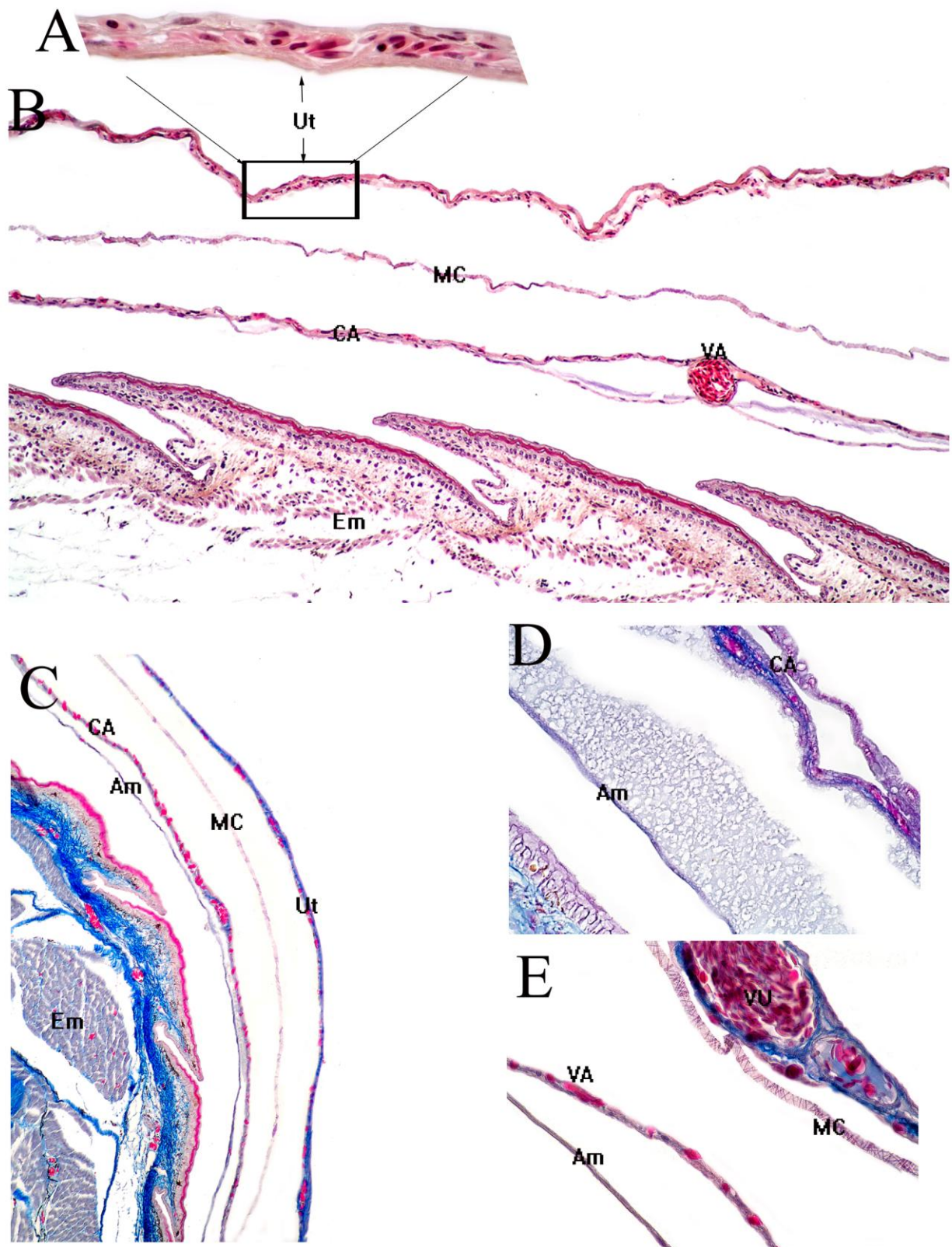


Fig. 16. Corioalantoplacenta en la etapa final de desarrollo.

A. Estructura del útero (Técnica HE, 400x). B. Estructura de la placenta (Técnica HE, 100x).

C. Estructura de la placenta, corioalantoides muy vascularizado (Técnica ARNR, 100x).

D. Membranas del corioalantoides (Técnica ARNR, 400x). E. Útero vascularizado (Técnica

(ARNR, 400x). (Ut) útero, (MC) membrana de la cáscara, (CA) corioalantoides, (VA) vasos del alantoides, (Em) embrión, (Am) amnios y (VU) vasos del útero.

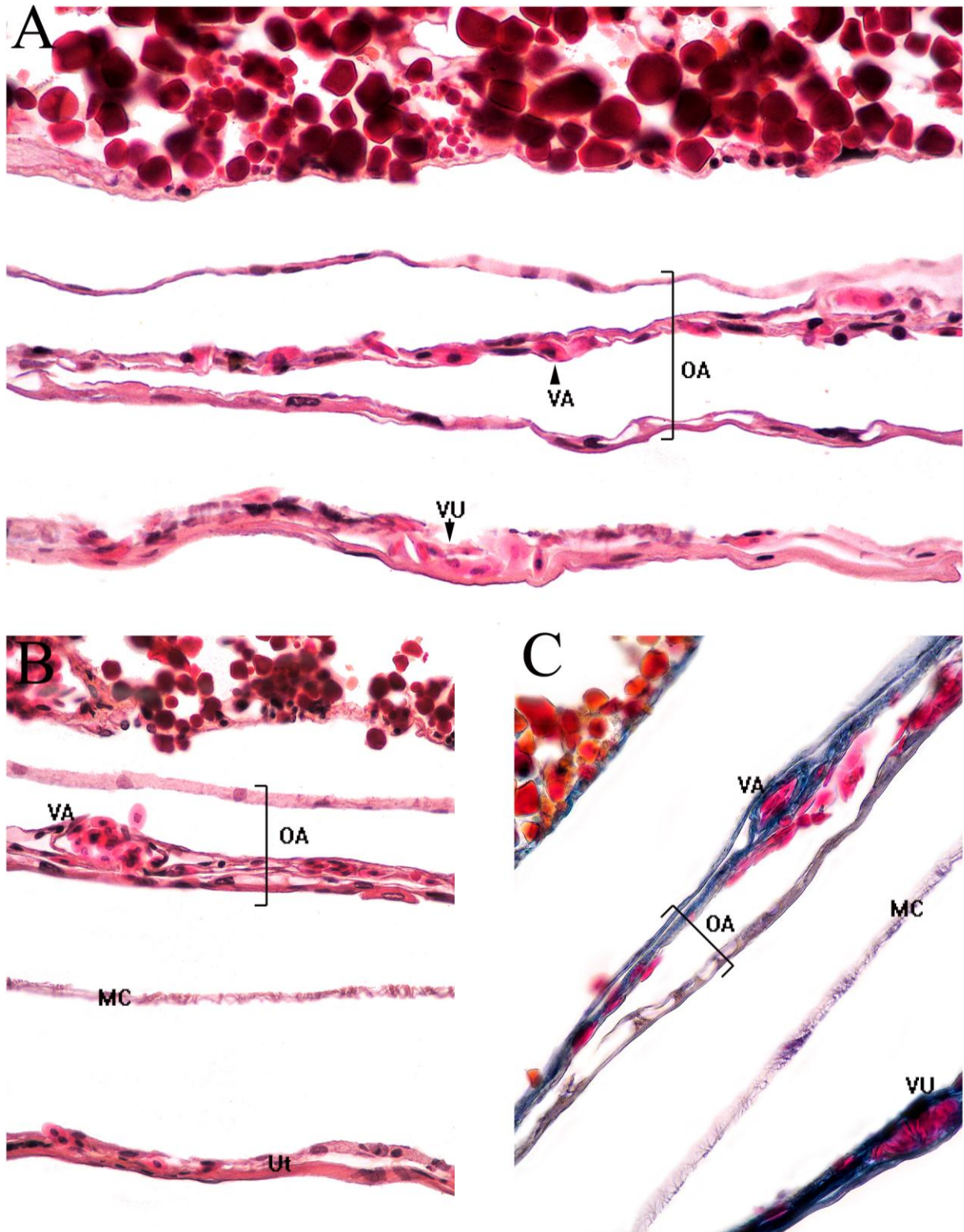


Fig. 17. Onfaloplacenta en la etapa final del desarrollo.

A. Membranas de la placenta (Técnica HE, 400x). B. Membranas interna y externa del alantoides separadas (Técnica HE, 400x). C. Reducción de la masa aislada de vitelo (Técnica TM, 400x). (OA) onfaloplacenta, (VA) vasos del alantoides, (VU) vasos del útero, (MC) membrana de la cáscara y (Ut) útero.

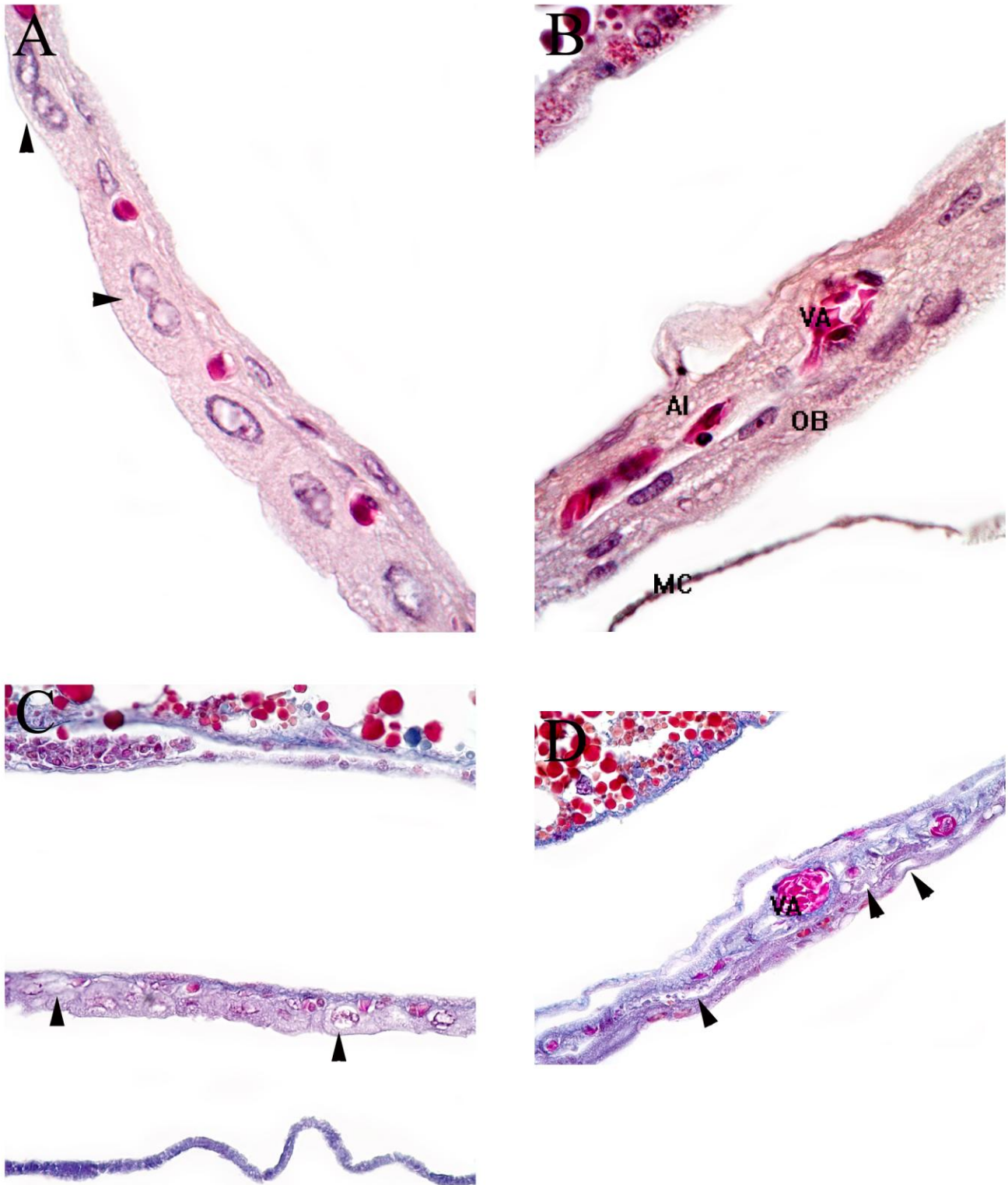


Fig. 18. Onfaloalantoides en la etapa final del desarrollo

A. Células binucleadas de la onfalopleura bilaminar (Técnica HE, 1000x). B. Alantoides vascularizado (Técnica HE, 1000x). C-D. Las flechas señalan vacuolas vacías de la masa aislada de vitelo (Técnica ARNR, C-D 400x). (Al) alantoides, (VA) vasos del alantoides, (OB) onfalopleura bilaminar y (MC) membrana de la cáscara.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

tanto en la corioalantoplacenta (Fig. 16 A-C y E) como en la onfaloalantoplacenta (Fig. 17 A-C). Externamente el útero está limitado por una pared muscular muy delgada.

Evolución

Se obtuvo una matriz con 12 grupos de serpientes, uno de ellos ovíparo. La información disponible fue insuficiente para obtener una matriz completa, con los diferentes estados para todas las especies, por lo que existen espacios vacíos en donde no hay información disponible o no aplica el carácter para la especie. En general existen pocas diferencias entre las especies comparadas, especialmente en las vivíparas.

Conopsis lineata muestra en general las mismas características que las demás serpientes vivíparas, pero solo algunas con *Pituophis guttatus*, el único grupo ovíparo del cual hay información disponible de las membranas extraembrionarias (Tabla 6). Las diferencias de *C. lineata* con el resto de las serpientes vivíparas son el carácter 8, casi todas incluida *C. lineata*, presentan una membrana corioalantoica uniforme, sólo *V. striatula* presenta diferenciación de esta membrana en la región ecuatorial.

En el carácter 9, *C. lineata* como la mayoría de las serpientes poseen la onfalopleura bilaminar de la masa aislada de vitelo no plegada, en *E. schistosa* y *E. dussumieri* está plegada. En el carácter 11, *C. lineata* difiere con *E. schistosa*, *E. dussumieri* y *V. striatula*, el útero en contacto con la onfalopleura bilaminar de la masa aislada de vitelo de *C. lineata* es no plegado, en las otras es plegado. En *C. lineata* el grosor del útero disminuye, así como en *T. sirtalis*, *T. radix* y *T. ordinoides*, mientras que en *V. striatula* se mantiene. Otra diferencia importante es que en *C. lineata* como *V. striatula*, la membrana de la cáscara se mantiene continua rodeando al huevo por completo hasta el final de la gestación, mientras que en las otras serpientes vivíparas (para las cuales hay información disponible) ésta membrana no es continua, ya que hay sitios en los que desaparece acercándose al final de la gestación.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Las principales diferencias de *C. lineata* con *P. guttatus* son relacionadas a la viviparidad y la placentación. Otros caracteres en los que difieren es la presencia de la membrana onfaloalantoica (carácter 6) en *C. lineata* y su ausencia en *P. guttatus*. Y la distribución de la membrana corioalantoica (carácter 7) desde el polo embrionario hasta cercana al polo abembrional en *C. lineata* y su distribución completa por toda la periferia del huevo en *P. guttatus*. En base a esta información se puede esperar que *C. lineata* comparta un alto grado de homoplasia con todas las serpientes.

Tabla 6. Matriz de datos con información disponible de las membranas extraembrionarias y la placentación para serpientes (tomada de Stewart y Thompson, 2000 y modificada).

Carácter	Estados		
	0	1	2
1 - Modo reproductor	Ovíparo	Vivíparo	
2 - Membrana de la cáscara	Calcárea	No calcárea	
3 - Retención del huevo	Desarrollo medio	Desarrollo tardío	
4 - Relaciones placentarias	Ausentes	Presentes	
5 - Hendidura vitelina	Ausente	Presente	
6 - Membrana onfaloalantoica	Ausente	Presente	
7 - Distribución de la membrana corioalantoica	Rodeando todo el contenido del huevo	No lo rodea	
8 - Complejidad de la membrana corioalantoica	Uniforme	Diferenciación en la región ecuatorial	Diferenciación en la región mesometrial (=placentoma)
9 - Complejidad de la onfalopleura bilaminar de la masa aislada de vitelo	No plegada	Plegada	
10 - Relación de la onfalopleura bilaminar de la masa aislada de vitelo con la esplacnopleura del saco vitelino	No apegado	Apegado	
11 - Complejidad del epitelio uterino apegado a la onfalopleura bilaminar de la masa aislada de vitelo	No plegado	Plegado	
12 - Complejidad del epitelio uterino apegado a la membrana coriovitelina	No plegado	Plegado	
13 - Grosor del útero	Se mantiene	Disminuye	Aumenta
14 - Distribución de la membrana de la cáscara al final del desarrollo	Continua	Discontinua	

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Enhydrina schistosa</i>	1	1		1	1	1	1	0	1	0	1			
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	1	1		1	1	1	1	0	0	0	0			
<i>Australaps superba</i>	1	1		1	1	1	1		0	0	0			
<i>Enhydria dussumieri</i>	1	1		1	1	1	1	0	1	0	1			
<i>Thamnophis sirtalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0		1	1
<i>T. lineatum</i>	1	1		1	1	1	1	0	0	0	0			
<i>Virginia striatula</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>T. radix</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0		1	1
<i>T. ordinoides</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0		1	1
<i>Storeria dekayi</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0			1
<i>Conopsis lineata</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Pituophis guttatus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0				

DISCUSIÓN

Generalidades

La viviparidad en reptiles es conocida desde tiempos remotos, siendo tomada como un carácter para la clasificación de estos animales por Aristóteles (Yaron, 1985; Stewart, 1993). A pesar de ello, los estudios en este tema son muy escasos, la mayoría de ellos realizados en los últimos dos siglos de nuestra era, siendo los estudios de microscopía óptica la base de estas investigaciones. Estos estudios nos ayudan a reconstruir la evolución de este patrón reproductor simultáneamente con la evolución de la placentación (Blackburn *et al.*, 2002; Blackburn y Flemming, 2009).

México, aunque importante en riqueza de estas especies, no ha tenido muchos estudios sobre el origen de la viviparidad y la placentación, pues solamente cuenta con estudios realizados en lacertilios, destacando así la relevancia de esta investigación para el avance en el conocimiento sobre membranas extraembrionarias, placentación y viviparidad de escamosos, específicamente serpientes.

Otro punto importante a destacar es que la presente investigación es el primer estudio en el que se describe la corioplacenta en serpientes, siendo que ésta ha sido descrita solo en lagartijas; tam bién es la primera especie en la que se describen todos los tipos placentarios. Cabe resaltar

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

además la importancia de la utilización de ejemplares de colecciones científicas, herramientas de gran ayuda que nos permitieron llevar a cabo el estudio sin afectar a sus poblaciones.

Los estudios sobre viviparidad indican que esta se originó en altitudes y latitudes altas (Tinkle y Gibbons, 1977), correspondiendo la distribución de *Conopsis lineata* a esta hipótesis, ya que habita en altas altitudes del Sistema Volcánico Transversal de México.

Aunque se ha registrado que el período de gestación en *C. lineata* inicia a fines del invierno (Uribe *et al.*, 1998), encontramos las primeras etapas de desarrollo embrionario aún antes del inicio de esta estación, siendo que el estadio de desarrollo más temprano se halló en la hembra capturada el 24 de noviembre de 1997, con embriones en etapa de segmentación. Por los datos de colecta de los ejemplares de las colecciones científicas, se puede inferir que el período de gestación es de cinco meses aproximadamente, encontrando las primeras etapas de desarrollo embrionario (segmentación) en el mes de noviembre y el último estadio (37) en el mes de mayo, pues el desarrollo ya se había completado y las crías estaban a punto de nacer.

En esta investigación encontramos diferentes estadios de desarrollo embrionario, desde la fase de segmentación hasta antes del nacimiento; los cuales consideramos: segmentación (entre los estadios 1-4) como gestación temprana, estadios 16 y 18 como gestación media y estadios 35, 36 y 37 como gestación tardía. Zehr (1962) en sus descripciones identificó 37 estadios y aunque otros autores se han basado en este mismo trabajo para sus investigaciones, su definición en el avance del desarrollo es diferente y hasta cierto punto impreciso, ya que consideran la etapa temprana a partir del estadio 20, la media a partir del 30 y la etapa tardía algunos autores la consideran a partir del estadio 29 y otros a partir del 35 (Blackburn y Lorenz, 2003a, b; Blackburn *et al.*, 2003; Stewart y Brasch, 2003; Knight y Blackburn, 2008; Blackburn *et al.*, 2009). Esta clasificación o división parece incongruente si dividimos los 37 estadios descritos en tres etapas (temprana, media y tardía). Los estadios más tempranos que se han descrito previamente en serpientes son a partir del 15 para *Thamnophis sirtalis* (Hoffman, 1970).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Por otro lado, en los vertebrados conforme avanza el desarrollo del embrión sus necesidades van cambiando, al inicio de la gestación los requerimientos de oxígeno y nutrientes son mínimos (Guillete, 1982) y no es tan indispensable la presencia de estructuras encargadas de su aporte ya que los obtiene del vitelo, por lo que el útero materno se aprecia pobremente vascularizado. En esta etapa el embrión de *C. lineata* está iniciando su desarrollo y aún no se han formado sus membranas extraembrionarias.

La gestación media representa una etapa clave, ya que en ella se puede observar el paso de las placentas transitorias que aparecen durante la gestación temprana y el inicio de la formación de las placentas definitivas que perdurarán hasta el final del desarrollo.

Contrario a lo que sucede durante la etapa temprana, donde las necesidades de oxígeno y nutrientes son mínimas, en la gestación media y tardía estas se incrementan exponencialmente con el crecimiento del embrión (Stewart y Thompson, 2003), por lo que es indispensable la presencia de estructuras especializadas para cubrir estas necesidades. i.e. en *Sceloporus aeneus* la vascularización se incrementa en las últimas etapas del desarrollo embrionario (Guillete, 1982). La Corioalantoplacenta ricamente vascularizada, la Onfaloalantoplacenta y por su parte el alantoides encargado de almacenar los desechos metabólicos son las estructuras apropiadas para estas funciones.

Segmentación

En esta etapa no es factible observar la presencia del embrión, debido a que éste sólo consiste de algunas células, las cuales pudieron haberse perdido durante el desarrollo de la técnica histológica. Sin embargo, la distribución y estructura del vitelo indican su presencia. Este es el primer estudio donde se reporta una etapa tan temprana, por lo que no se puede comparar con alguna otra especie; no obstante, una estructura similar ha sido observada en estadios embrionarios tempranos de lagartijas (comunicación personal de Maricela Villagrán).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

La estructura de la pared del útero con la presencia de grandes y activas glándulas en la lámina propia del endometrio indican la participación en la formación de la delgada membrana de la cáscara. Lo cual es posible observar por la secreción evidente en la glándulas, de color similar al que presentan las fibras de esta membrana, lo que coincide con estudios histoquímicos de la estructura de la membrana de la cáscara realizados en *Thamnophis sirtalis* (Hoffman, 1970). Conforme avanza el desarrollo embrionario el tamaño y número de las glándulas van disminuyendo, junto con la reducción de las membranas extraembrionarias y de la membrana de la cáscara permiten un mayor acercamiento entre los vasos materno y fetales, para una mejor dotación de oxígeno hacía el embrión (Guillete, 1982).

Corioplacenta

La Corioplacenta ha sido descrita en pocas especies de lagartijas -*Chalcides chalcides* (Blackburn y Callard, 1997), Género *Niveoscincus* (Stewart y Thompson, 1998, 2009b) y *Mabuya mabouya* (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003); siendo la presente investigación la primera descripción en una serpiente, *Conopsis lineata*. La dificultad para describir esta placenta es su breve presencia, ya que es un órgano transitorio que se exhibe durante las primeras etapas en el desarrollo embrionario. Aunado a esto, la gran escasez de información sobre biología del desarrollo en escamosos, específicamente serpientes, hace más difícil hallar las primeras etapas embrionarias donde se presenta.

Existen semejanzas entre la corioplacenta de *C. lineata* y los lacertilios descritos, pero también existen diferencias. En ambos grupos esta placenta es observada en la gestación temprana y carece de vascularización. En *C. chalcides* (Blackburn y Callard, 1997) y el género *Niveoscincus* (Stewart y Thompson, 1998, 2009a, b) describen una corioplacenta donde el corion se encuentra en íntima cercanía al epitelio uterino y la membrana de la cáscara está ausente. En *M. mabouya* la membrana de la cáscara esta presente pero muestra una ruptura en la parte más

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

dorsal. En *C. lineata* la membrana de la cáscara se encuentra interpuesta entre corion y útero y aunque muestra una ruptura en la parte más dorsal, como la que se menciona para *M. mabouya*, ésta pudo haber sido ocasionada como artefacto de la técnica, ya que en el resto de los estadios se muestra la membrana de la cáscara continua al contorno de todo el huevo.

C. lineata no presenta estructuras de absorción como las que se encuentran en *M. mabouya*, la placa de absorción en el polo embrionario y la placa lateral de absorción, las concavidades coriónicas y los sacos coriónicos en el polo abembrional. Esta diferencia posiblemente se deba a que los huevos de *M. mabouya* son pequeños y con poca cantidad de vitelo, por lo que el embrión desarrolla estructuras para obtener su alimento de la madre, presentando un alto grado de placentotrofia (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003). El huevo de *C. lineata* contiene suficiente cantidad de vitelo para cubrir la nutrición del embrión durante todo el desarrollo, representando una nutrición lecitotrófica, por lo que posiblemente no desarrolla estas estructuras.

Como mencionan Thompson y Speake (2006) especies con una placenta simple, como sucede con *C. lineata*, retienen huevos con una cáscara más o menos delgada en el útero, aportando pocos nutrientes a través de la placenta y manteniendo los embriones completa o predominantemente por los nutrientes del vitelo (nutrición lecitotrófica). En contraste, especies con placentas complejas -como *M. mabouya*, *C. chalcides* y el género *Niveoscincus*-, ovulan pequeños huevos y transportan nutrientes a los embriones en desarrollo a través de la placenta (nutrición placentotrófica).

El epitelio coriónico en *C. chalcides* es de células cúbicas y columnares pseudoestratificadas, en *Niveoscincus* de células cúbicas bajas y escamosas, y en *M. mabouya* de células esféricas a cúbicas, por lo que han sugerido que esta placenta tiene el potencial de transferencia histotrófica; sin embargo, en *C. lineata* el epitelio es escamoso, por lo que podríamos sugerir que su función es de protección.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

La similitud entre estos grupos se debe a que ambos, *C. lineata* (serpiente) y lacertilios, son reptiles escamosos y sus membranas extraembrionarias son homologas, lo que hace que sigan un patrón de morfogénesis similar (Ramírez-Pinilla, 2010; Ferner y Mess, 2011).

Placenta Coriovitelina

La placenta coriovitelina forma parte de las placentas del saco vitelino. Es restringida a un corto período en el desarrollo embrionario. Esta placenta se observa durante la etapa media del desarrollo en *C. lineata*, como en otras especies de lagartijas (*Chalcides chalcides*, Luckett, 1977; Blackburn y Callard, 1997; *Sceloporus grammicus*, *S. mucronatus*, Villagrán-Santa Cruz, 1989; *Mabuya* sp., Jerez y Ramírez Pinilla, 2003; *Lacerta vivipara*, Stewart *et al*, 2004; *S. mucronatus*, Villagrán *et al.*, 2005) y serpientes (*Virginia striatula*, Stewart, 1990; *Thambophis sirtalis*, Hoffman, 1970) en las que ha sido descrita, siendo muy similar entre ellas. Es una estructura transitoria que es reemplazada por la corioalantoplacenta conforme avanza el desarrollo. La placenta coriovitelina se ubica en el polo embrionario, es limitada en la parte dorsal por la separación de esplacnopleura y somatopleura, y en la parte ventral por el *sinus terminalis* donde se continúa la onfaloplacenta. Es la primera estructura en presentar vasos sanguíneos, por lo que se ha sugerido como la encargada del intercambio gaseoso hasta antes del establecimiento de la corioalantoplacenta (Stewart, 1993). Al igual que en escamosos, la placenta coriovitelina se presenta en mamíferos euterios y marsupiales, donde también cumple una función respiratoria (Stewart, 1993; Ferner y Mess, 2011).

En *C. lineata* la membrana de la cáscara esta presente entre los tejidos maternos y fetales en toda la periferia como en los otros escamosos en la que ha sido descrita. El útero aunque presenta vasos sanguíneos, estos son pequeños y en poca cantidad; el epitelio es escamoso.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Onfaloplacenta

La onfaloplacenta es otro de los órganos que forma parte de las placentas del saco vitelino. A diferencia de las demás placentas, que se presentan en otros vertebrados amniotas, ésta es única para reptiles escamosos (Stewart, 1993; Ferner y Mess, 2011).

En *C. lineata* esta relación materno-fetal se da temprano en el desarrollo, cuando la masa vitelina es cubierta por la onfalopleura biláminar y las células mesodérmicas intravitelinas penetran el vitelo formando la hendidura vitelina y separando la masa aislada de vitelo de la gran masa vitelina, dejando el polo abembrional cubierto por la onfalopleura bilaminar, patrón que siguen la mayoría de los escamosos (Stewart, 1993; Stewart y Thompson, 2000; Ramírez-Pinilla, 2010).

La parte más ventral no ha sido cubierta por la onfalopleura bilaminar, debido a la presencia del ombligo del vitelo (o “yolk navel” en inglés), característica que se ha alcanzado a observar en pocos estudios por su breve y temprana presencia (Stewart y Thompson, 2009b). El ombligo del vitelo ha sido observado en *Sceloporus mucronatus*, con una estructura similar a la se presenta en *C. lineata*, consiste de una agregación de células ectodérmicas y endodérmicas hipertrofiadas que se extienden hacía el interior del vitelo (Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 2005). En *Thamnophis sirtalis* realizaron estudios histoquímicos, el ombligo del vitelo es aparentemente la principal zona de provisión de hierro y representa el último sito de unión de la onfaloplacenta a la gran masa vitelina, antes de su completa separación (Hoffman, 1970).

En *C. lineata* la masa aislada de vitelo no ha sido separada completamente de la gran masa vitelina en esta etapa, las células intravitelinas se observan penetrando el vitelo comenzando la separación en las partes más externas. La estructura de la masa aislada de vitelo sigue teniendo la misma composición que la gran masa vitelina.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

En serpientes ha sido descrita en *Virginia striatula* (Stewart, 1990), *Thamnophis ordinoides* y *T. sirtalis* (Blackburn *et al.*, 2002) y *Storeria dekayi* (Blackburn *et al.*, 2009). El epitelio de la onfalopleura en *C. lineata* es similar al que se observa en estas especies, una capa externa de células cúbicas y una interna de células escamosas. Por su estructura, se ha sugerido que esta placenta tiene potencial histotrófico (Stewart, 1993, Blackburn y Flemming, 2009). En escamosos ovíparos, como *Pituophis guttatus*, la estructura de la onfalopleura es similar a la que se presenta en escamosos vivíparos (Knight y Blackburn, 2008), en estas especies ovíparas han sugerido que por su morfología la onfalopleura es la encargada de la absorción del agua del sustrato, además de aportar algunos minerales como sodio y calcio; pudiendo representar un carácter plesiomórfico que se ha conservado entre los escamosos vivíparos.

En *C. lineata* la onfaloplacenta es un órgano transitorio, conforme avanza el desarrollo el alantoides se expande ocupando el celoma extraembrionario, que ha sido ampliado por la separación de la masa aislada de vitelo, entrando en contacto en la parte ventral del huevo con la previa onfaloplacenta, transformándose de esta forma en la definitiva onfaloalantoplacenta que perdurará hasta el final del desarrollo.

Onfaloalantoplacenta

La onfaloalantoplacenta es la tercera placenta que forma parte de las saco-vitelinas. Es un órgano definitivo que se establece en la etapa tardía del desarrollo embrionario. En *C. lineata* se observó durante los tres últimos estadios (35, 36 y 37).

Aunque es característica de los reptiles escamosos, esta placenta se ha observado en todas las serpientes en etapa tardía; sin embargo, solo en algunas lagartijas se ha presentado (Stewart, 1993, Knight y Blackburn, 2008), i.e. *Sceloporus grammicus* (Villagrán-Santa Cruz, 1989) y *S. mucronatus* (Villagrán-Santa Cruz *et al.*, 2005). En serpientes ha sido observada en *Thamnophis ordinoides* (Blackburn *et al.*, 2002), *T. sirtalis* (Hoffman, 1970; Blackburn *et al.*, 2002), *T. radix*

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

(Blackburn y Lorenz, 2003a, b), *Virginia striatula* (Stewart, 1990; Stewart y Brasch, 2003) y *Storeria dekayi* (Blackburn *et al.*, 2009). En *C. lineata* y en todas estas especies la masa aislada de vitelo se ha reducido considerablemente.

En *C. lineata* al igual que en *V. striatula* (Stewart, 1990; Stewart y Brasch, 2003) el epitelio uterino es cúbico bajo a escamoso, para *C. lineata* es casi imperceptible; contrario a lo que se observa en *T. sirtalis*, *T. ordinoides* (Blackburn *et al.*, 2002) y *S. dekayi* (Blackburn *et al.*, 2009) donde es de cúbico alto a columnar. La reducción de la masa aislada de vitelo y del grosor del epitelio uterino permite una relación más estrecha entre los sistemas vasculares materno y fetal.

La onfalopleura bilaminar de *C. lineata* es de células cúbicas, algunas de ellas binucleadas como se ha observado en otros colubridos, como *S. dekayi*. Los estudios realizados con microscopía electrónica en el género *Thamnophis* y en *S. dekayi*, han revelado que se constituye por dos tipos celulares: células con microvellosidades y células granulares (Blackburn *et al.*, 2002, 2009; Blackburn y Lorenz, 2003a, b).

En *C. lineata* observamos estadios de desarrollo embrionario intermedios, donde se aprecia el inicio de la formación de las estructuras placentarias definitivas y finales donde se ven ya establecidas. Estos estadios nos ayudan a inferir que las membranas extraembrionarias siguen el mismo patrón de desarrollo de los escamosos en general; por ejemplo, en *T. sirtalis* se ha descrito que el alantoides se expande a lo largo de todo el celoma extraembrionario hasta la parte dorsal de la masa aislada de vitelo, donde sus membranas se fusionan, propiciando la formación de la onfaloalantoplacenta (Hoffman, 1970). Esta misma descripción aplica a lo que sucede en *C. lineata*, coincidiendo con el tercer patrón de crecimiento del alantoides que se da a lo largo del celoma extraembrionario (Stewart, 1993; Stewart y Thompson, 2000).

En *C. lineata* la onfaloalantoplacenta, a diferencia de la onfaloplacenta, se encuentra vascularizada gracias a los vasos del alantoides, los cuales se encuentran cercanos a los vasos

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

maternos por la reducción de la masa aislada de vitelo. La membrana de la cáscara se encuentra interpuesta entre los tejidos maternos y fetales. No muestra cambio aparente desde la fase de onfaloplacenta.

La nutrición de *C. lineata* es lecitotrófica; sin embargo, se ha sugerido que por su morfología -epitelio cúbico alto a columnar de la onfalopleura bilaminar-, la onfaloalantoplacenta lleva a cabo funciones de secreción y absorción. Al igual que la onfaloplacenta, probablemente de sodio, calcio y agua (Blackburn *et al.*, 2009), pudiendo así presentar placentotrofía incipiente.

Corioalantoplacenta

La membrana corioalantoica se aprecia desde la etapa media (estadio 16) en *C. lineata* ocupando la pequeña porción del saco del alantoides en contacto con el corion en la parte dorsal del embrión, siguiendo un patrón de crecimiento similar de los reptiles escamosos en general (Blackburn, 1993a, 1998; Blackburn y Flemming, 2009; Ramírez- Pinilla, 2010; Ferner y Mess, 2011). Esta membrana en aposición con la pared interna del útero constituye la corioalantoplacenta que reemplaza inicialmente a la corioplacenta y posteriormente a la placenta coriovitelina conforme se va extendiendo a lo largo del contorno del huevo hasta el polo abembrional, tomando su papel en el intercambio gaseoso. La corioalantoplacenta persiste hasta el final de la gestación, siendo la placenta que más tiempo permanece a lo largo del desarrollo embrionario, correspondiendo a las descripciones previas en otras especies (Blackburn, 1993a; Blackburn y Lorenz, 2003a; Blackburn *et al.*, 2003).

En la etapa final la corioalantoplacenta consiste de la membrana interna del alantoides pobremente vascularizada, la membrana externa del alantoides ricamente vascularizada fusionada con el corion y el útero materno igual altamente vascularizado. El adelgazamiento de los epitelios, coriónico y uterino, permite un mayor acercamiento de los vasos sanguíneos maternos y fetales.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

La estructura de la Corioalantoplacenta madura corresponde al morfotipo Tipo I (Weekes, 1935, Blackburn, 1993a), donde permanecen intactos el epitelio fetal y materno, similar a lo que ha descrito en *T. ordinoides* (Blackburn *et al.*, 2002), *T. sirtalis* (Blackburn *et al.*, 2002; Blackburn y Lorenz, 2003a, b), *T. radix* (Blackburn y Lorenz, 2003a, b), *V. striatula* (Stewart y Brasch, 2003) y *S. dekayi* (Blackburn *et al.*, 2009).

La membrana de la cáscara interpuesta entre ambos tejidos está presente a lo largo de todo el contorno del huevo. Difiriendo de lo que sucede en las otras serpientes donde sólo permanece en algunas regiones o desaparece completamente como ha sucedido en el género *Thamnophis* y *S. dekayi*.

La membrana corioalantoica (en especies ovíparas) y la corioalantoplacenta (en especies vivíparas) han sido designadas como las principales estructuras para llevar a cabo la función de intercambio gaseoso en amniotas tetrápodos, especialmente en sauropsidos y mamíferos euterios (Ferner y Mess, 2011). Esta función ha sido inferida para reptiles escamosos con base en estudios morfológicos (Yaron, 1985; Blackburn, 1993a; Blackburn y Flemming, 2009).

Evolución

El estudio de las membranas extraembrionarias contribuye al conocimiento de la transición evolutiva de la vida acuática hacia la vida terrestre, siendo los reptiles los primeros organismos en ser independientes del agua para la puesta del huevo, y el grupo de los amniotas tetrápodos más exitosos (Mess *et al.*, 2003; Blackburn y Flemming, 2009). El aumento de la retención del huevo en el oviducto y la reducción de la membrana de la cáscara se han asumido como los principales precursores para el desarrollo de la viviparidad en reptiles (Packard *et al.*, 1977), siendo este un evento que ha evolucionado convergentemente en escamosos 108 ocasiones aproximadamente (Blackburn, 1992; Stewart y Thompson, 2003; Ramírez-Pinilla, 2010) y

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

paralelamente con la viviparidad en mamíferos (Blackburn, 2006). Los análisis filogenéticos representan una gran herramienta que aporta evidencias sobre su trayectoria evolutiva.

En general, los diversos estudios han asumido que la viviparidad ha evolucionado simultáneamente con la placentación y no esta última de forma subsecuente (Blackburn, 2005). Los reptiles escamosos representan el modelo ideal para estudiar la transición de estos eventos a lo largo de la evolución, ya que aportan evidencias de la evolución no sólo para los reptiles escamosos, sino también para los amniotas tetrápodos en general (reptiles, aves y mamíferos) que desarrollan el mismo conjunto de membranas extraembrionarias y estructuras placentarias (Thompson y Speake, 2006; Ferner y Mess, 2011).

Por las múltiples ocasiones en las que la viviparidad y la placentación han evolucionado, la falta de ontogenias completas de las membranas extraembrionarias y de las placentas de las muchas especies existentes actualmente y la gran escasez de información, no es posible realizar comparaciones filogenéticas. La mayor información disponible está basada en estudios histológicos y morfológicos, hace falta llevar a cabo estudios fisiológicos (Stewart y Thompson, 2000).

La similitud de las membranas extraembrionarias entre los reptiles escamosos, tanto ovíparos como vivíparos, no solo revelan similitudes estructurales indicativas de homología, sino también características funcionales que han sido retenidas durante la evolución del modo reproductor (Knight y Blackburn, 2008). Por ejemplo, la onfalopleura bilaminar de las especies ovíparas se encarga de obtener el agua necesaria del sustrato en el que se encuentran. Su morfología es muy similar en escamosos tanto ovíparos como vivíparos, pudiendo representar un carácter que ha sido retenido en las especies vivíparas. La ontogenia de la placentación del saco vitelino esta determinado porque aparenta ser una secuencia de desarrollo plesiomórfica para la onfalopleura (Stewart y Thompson, 2000).

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Aunque se ha especulado el papel que representan algunos caracteres en la evolución (como sinapomorfía, plesiomorfía u homoplasia), no se pueden realizar comparaciones filogenéticas porque se corre el riesgo de sobreestimar el valor de algunos caracteres y dar relaciones cercanas equivocadas. La sistemática filogenética frecuentemente ha sobregirado las clasificaciones tradicionales, en las cuales taxa definidos comúnmente no consisten de grupos de especies relacionadas cercanamente (Mess *et al.*, 2003). A pesar de ello, por la información disponible se espera que haya un alto grado de homoplasia entre las serpientes, así como con las lagartijas (Stewart y Thompson, 2000) debido a que también son reptiles escamosos.

La viviparidad y la placentación representan un paralelismo entre reptiles y mamíferos; un ejemplo de ello es la corioalantoplacenta que representa la principal estructura para llevar a cabo el intercambio gaseoso en ambos grupos, principalmente en reptiles escamosos y mamíferos euterios (Ferner y Mess, 2011). Estructura que se pudo desarrollar tal vez gracias a que ambos grupos se encontraron en condiciones ambientales similares, respondiendo de forma similar a estas condiciones.

Las relaciones filogenéticas tienen diversos beneficios: 1) pueden probarse explícitamente hipótesis acerca de la direccionalidad de los cambios evolutivos, 2) pueden usarse como un escenario para reconstruir detalles de la evolución de las membranas extraembrionarias y las placentas, 3) permiten formular nuevas hipótesis que pueden ser objeto de pruebas empíricas y 4) permiten reconstruir morfo-tipos de taxa seleccionados y detectar transformaciones evolutivas entre nodos sucesivos dentro de un cladograma (Mess *et al.*, 2003). Todo esto se puede realizar siempre y cuando exista la información suficiente, para no obtener información errónea.

Stewart (1989) reconoció dos tipos de placentotrofía: 1) placentotrofía obligada definida como un requerimiento necesario para la producción de un neonato viable, y 2) placentotrofía facultativa, la cual es un suplemento a otros recursos nutricionales. Por ello, las etapas iniciales en la evolución de la placentotrofía pueden involucrar placentotrofía facultativa y esta

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

característica funcional le permite a las hembras completar la provisión nutricional de sus crías (Stewart y Thompson, 2000), como podría ser el caso de *C. lineata*, quien presenta la corioalantoplacenta y la onfaloalantoplacenta sumamente vascularizadas.

Consideramos a las especies de reptiles mexicanos importantes objetos de estudio para especular sobre posibles caminos que hayan tomado la viviparidad y la placentación en su evolución. México cuenta con una gran historia geológica-evolutiva (Espinosa y Ocegueda, 2008) la cual pudo haber influenciado la distribución de las especies. Además existen 804 especies de reptiles descritas en nuestro país, 301 de las cuales son serpientes, representado el segundo lugar mundial de riqueza de este grupo, riqueza que podría ser explotada para la obtención de mayor información, la cual no sólo puede ser basada en organismos vivos sino también en aquellos que se encuentran en las diversas colecciones científicas en todo el mundo.

CONCLUSIONES

- En *Conopsis lineata* cada placenta presenta características que le permiten cubrir las necesidades del embrión. Por lo que, cada una de ellas se presenta en tiempos y por periodos diferentes a lo largo de la gestación.
 - La corioplacenta, presente en los primeros estadios de desarrollo cuando las necesidades de nutrición y respiración son mínimas, posiblemente cumpla la función de proteger al embrión, ya que carece de vasos sanguíneos y es una placenta muy delgada.
 - La placenta coriovitelina (presente en la etapa temprana) y la coriolantoplacenta (en la etapa final), posiblemente se encarguen del intercambio gaseoso, por la presencia de numerosos vasos sanguíneos, tanto del embrión como de la madre, y la estrecha cercanía entre estos.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- La onfaloplacenta (en la etapa temprana y media) y posteriormente la onfaloalantoplacenta (en la etapa final, al reemplazar a la onfaloplacenta) por su epitelio alto y sus células binucleadas, posiblemente sean sitios de transferencia de nutrientes.
- A pesar de que *C. lineata* presenta nutrición embrionaria lecitotrófica, la posible transferencia de nutrientes a través de la onfaloplacenta y la onfaloalantoplacenta representen matrotrofia incipiente.
- La gran similitud entre las membranas extraembrionarias y las placentas de *C. lineata* con otras serpientes, tanto ovíparas como vivíparas, proponen un alto grado de homoplasia.
- Los ejemplares de colección representaron un material confiable para llevar a cabo el estudio, ya que los cortes obtenidos fueron tan de alta calidad como los del material de campo.

REFERENCIAS

- Andrews R (2000). Evolution of viviparity in squamate reptiles (*Sceloporus* spp.): a variant of the cold-climate model. *Journal of Zoology*, London 250:243-253.
- Bernal CY (1994). Cambios histológicos estacionales en el testículo, epidídimo y conducto deferente de la serpiente vivípara *Toluca lineata*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 54.
- Blackburn DG (1992). Convergent evolution of viviparity, matrotrophy, and specializations for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates. *American Zoologist* 32:313–321.
- Blackburn DG (1993a). Chorioallantoic placentation in squamate reptiles: structure, function, development, and evolution. *Journal of Experimental Zoology* 266:414–430.
- Blackburn DG (1993b). Histology of the late-stage placentae of the matrotrophic skink *Chalcides chalcides* (Lacertilia: Scincidae). *Journal of Morphology* 216:179–195.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Blackburn DG (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 DG (1999). Viviparity and oviparity: evolution and reproductive strategies. In: Knobil, T.E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4. Academic Press, London, pp. 994–1003.
- Blackburn DG (2000). Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127A:391–409.
- Blackburn DG (2005). Amniote perspectives on the evolutionary origins of viviparity and placentation. En: *Viviparous fishes*. Grier HJ y Uribe MC editores. New Life Publications, Homestead, Florida, 2005. p 301-322.
- Blackburn DG (2006). Squamata reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs* 20:131-146.
- Blackburn DG y Callard IP (1997). Morphogenesis of placental membranes in the viviparous, placentotrophic lizard *Chalcides chalcides* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology* 232:35-55.
- Blackburn DG y Lorenz RL (2003a). Placentation in the garter snakes. II. Transmission EM of the Chorioallantoic Placenta of *Thamnophis radix* and *T. sirtalis*. *Journal of Morphology* 256:171-186.
- Blackburn DG y Lorenz RL (2003b). Placentation in the garter snakes. III. Transmission EM of the Omphalallantoic Placenta of *Thamnophis radix* and *T. sirtalis*. *Journal of Morphology* 256:187-204.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Blackburn DG y Flemming AF (2009). Morphology, development, and evolution of fetal membranes and placentation in Squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 312B:579-589.
- Blackburn DG, Vitt LJ y Beuchat CA (1984). Eutherian-like reproductive specializations in a viviparous reptile. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:4860-4863
- Blackburn DG, Stewart JR, Baxter DC y Hoffman LH (2002). Placentation in the garter snakes: Scanning EM of the Placental Membranes of *Thamnophis ordinoides* and *T. sirtalis*. *Journal of Morphology* 252:263-275.
- Blackburn DG, Johnson AR y Petzold JL (2003). Histology of the extraembryonic membranes of an oviparous snake: towards a reconstruction of basal squamate patterns. *Journal of Experimental Zoology* 299A:48-58.
- Blackburn DG, Anderson KE, Johnson AR, Knight SR y Gavelis GS (2009). Histology and ultrastructure of the placental membranes of the viviparous brown snake, *Storeria dekayi* (Colubridae: Natricine). *Journal of Morphology* 270:1137-1154.
- Blackburn DG, Gavelis GS, Anderson KE, Johnson AR y Dunlap KD (2010). Placental specializations of the mountain spiny lizard *Sceloporus jarrovi*. *Journal of Morphology* 271:1153-1175.
- Calderón-Espinosa ML, Andrews RM y Méndez de la Cruz FR (2006). Evolution of egg retention in the *Sceloporus spinous* group: Exploring the role of physiological, environmental, and phylogenetic factors. *Herpetological Monographs* 20:147-158.
- Castaños M, Villagrán-Santa Cruz M y Rodríguez F (2009). Histología de las membranas extraembrionarias durante la retención intrauterina en *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* 25:303-314.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

Catalogue of life: <http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/4466031>. Fecha de actualización: 26 de julio de 2011.

Crocco M, Ibarquengoytía NR y Cussac V (2008). Contributions of the study of oviparity-viviparity transitions: Placental structures of *Liolaemus elongatus* (Squamata: Liolaemidae). *Journal of Morphology* 269:865-874.

Espinosa D y Ocegueda S (2008). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, pp. 33-65.

Ferner K y Mess A (2011). Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniotes vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. In Press.

Flemming AF y Brach WR (2001). Extraordinary case of matrotrophy in the African Skink *Eumecia anchietae*. *Journal of Morphology* 247:264-287.

Flemming AF y Blackburn DG (2003). Evolution of placental specializations in viviparous African and South American lizards. *Journal of Experimental Zoology* 299A:33-47.

Girling JE (2002). The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology* 293:141-170.

Goyenechea I (2009). Relaciones filogenéticas de las serpientes del género *Conopsis* con base en la morfología. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80:721-725.

Goyenechea I y Flores-Villela O (2002). Taxonomic status of the snake genera *Conopsis* and *Toluca* (Colubridae). *Journal of Herpetology* 36:92-95.

Guarino FM, Paulesu L, Cardone A, Bellini L, Ghiara G y Angelini F (1998). Endocrine activity of the corpus luteum and placenta during pregnancy in *Chalcides chalcides* (Reptilia, Squamata). *General and Comparative Endocrinology* 111: 261-270.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Guillete LJ (1982). The evolution of viviparity and placentación in the high elevation, Mexican lizard *Sceloporus aeneus*. *Herpetologica* 38(1): 94-103.
- Guillete LJ (1987). The evolution of viviparity in fishes, amphibians and reptiles: An endocrine approach. En: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*. Norris DO y Jones RE editores. Plentium Publishing, Corporation, pp. 523-562.
- Guillete LJ (1991). The evolution of viviparity in amniote vertebrates: new insights, new question. *Journal of Zoology, London* 223:521-526.
- Guillete LJ (1993). The evolution of viviparity in lizards. *BioScience* 43(11): 742-751.
- Guillete LJ y Jones RE (1985). Ovarian, oviductal, and placental morphology of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aeneus*. *Journal of Morphology* 184: 85-98.
- Guillete LJ, Fox SL y Palmer BD (1989). Oviductal morphology and egg shelling in the oviparous lizard *Crotaphytus collaris* y *Eumeces obsoletus*. *Journal of Morphology* 201:145-159.
- Hebert JF, Lindsay LA, Murphy CR, Thompson MB (2006). Calcium transport across the uterine epithelium of pregnant lizards. *Herpetology monographs* 20:205-211.
- Heulin B, Stewart JR, Surget-Groba Y, Ballaud P, Jouan F, Lacien G y Deunff J (2005). Development of the uterine shell glands during the preovulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. *Journal of Morphology* 266:80-93.
- Hoffman LH (1970). Placentation in the garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Journal of Morphology* 131:57-88.
- Jerez A y Ramírez-Pinilla MP (2003). Morphogenesis of extraembryonic membranas and placentation in *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology* 258:158-178.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Knight SM y Blackburn DG (2008). Scanning electron microscopy of the fetal membranes of an oviparous Squamate, the Corn Snake *Pituophis guttatus* (Colubridae). *Journal of Morphology* 269:922-934.
- Leal F y Ramírez-Pinilla MP (2008). Morphological variation in the allantoplacenta within the genus *Mabuia* (Squamata: Scincidae). *The Anatomical Record* 291:1124-1139.
- Llorente-Bousquets J y Ocegueda S (2008). Estado del conocimiento de la biota. En *Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 283-322.
- Luckett WP (1977). Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny in Major Patterns. En *Vertebrate Evolution*. Hecht MK, Goody PC & Hecht BM editores. Plenum Press, New York, pp. 439-516.
- Martínez-Torres M, Álvarez-Rodríguez C y Andrade-Terrazas J (2006). Características de las membranas extraembrionarias desalojadas por los críos de *Barisia imbricata* (Reptilia: Anguillidae) después del nacimiento. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 14:38-42.
- Mathies T y Andrews RM (2000). Does reduction of the eggshell occur concurrently with or subsequent to the evolution of viviparity of phrynosomatid lizards? *Biological Journal of the Linnean Society* 71:719-736.
- Méndez de la Cruz FR y Villagrán-Santa Cruz M (1993). *Sceloporus grammicus* ¿especie lecitotrófica estricta? *Revista de zoología* 4:1-6.
- Méndez de la Cruz FR, Villagrán-Santa Cruz M y Andrews RM (1998). Evolution of viviparity in the genus *Sceloporus*. *Herpetologica* 54:521-532.
- Mess A, Blackburn DG y Zeller U (2003). Evolutionary transformations of fetal membranes and reproductive strategies. *Journal of Experimental Zoology* 299A:3-12.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Mossman HW (1937). Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Carnegie Inst Contrib Embryol* 26:129–246.
- Packard GC, Tracy CR y Roth JJ (1977). The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class reptilian. *Biological Review* 52:71-105.
- Parker SL y Andrews RM (2006). Evolution of viviparity in sceloporine lizards: In utero Po₂ as a developmental constraint during egg retention. *Physiological and Biochemical Zoology* 79(3): 581-591.
- Paulesu L, Romagnoli R, Marchetti M, Cintonino M, Ghiara P, Guarino FM y Ghiara G (1995). Cytokines in the viviparous reproduction of squamate reptiles: interleukin 1-a (IL-1a and IL-1b) in placental structures of a skink. *Placenta* 16:193–205.
- Qualls CP, Shine R, Donnellan S y Hutchinson M (1995). The evolution of viviparity in the Australian scincid lizard, *Lerista bougainvilli*. *Journal of Zoology (Lond)* 237:13–26.
- Ramírez-Pinilla MP (2006). Placental transfer of nutrients during gestation in an Andean population of the highly matrotrophic lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Herpetological Monographs* 20:194-204.
- Ramírez-Pinilla MP (2010). Matrotrofia en reptiles escamosos. En: Reproducción en reptiles: morfología, ecología y evolución. Hernández O, Méndez de la Cruz FR y Méndez F compiladores. Universidad Autónoma del Estado de México, México, pp.
- Shine R (2006). Is increased maternal basking an adaptation or pre-adaptation to viviparity in lizards? *Journal of Experimental Zoology* 305A:1-12.
- Shine R y Guillete LJ (1988). The evolution of viviparity in reptiles: A physiological model and its ecological consequences. *Journal of Theoretical Biology* 132: 43-50.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Smith HM (1986). Terminology of reproductive parities. Bulletin Maryland Herpetological Society 22:19-20.
- Stewart JR (1989). Facultative placentotrophy and the evolution of squamate placentation: quality of eggs and neonates in *Virginia striatula*. American Naturalist 133:111–137.
- Stewart JR (1990). Development of the extraembryonic membranes and histology of the placentae in *Virginia striatula* (Squamata: Serpentes). Journal of Morphology 205:1–11.
- Stewart JR (1993). Yolk sac placentation in reptiles: structural innovation in a fundamental vertebrate fetal nutritional system. The Journal of Experimental Zoology 266:431-449.
- Stewart JR (1997). Morphology and evolution of the egg of oviparous amniotes. En: Amniote origins. Sumida SS y Martin KLM, editores. San Diego: Academic Press. p 291–326.
- Stewart JR y Brasch KR (2003). Ultraestructure of the placentae of the Natricine snake, *Virginia striatula* (Reptilia: Squamata). Journal of Morphology 255:177-201.
- Stewart JR y Thompson MB (1994). Placental structure of the Australian lizard, *Niveoscincus metallicus* (Squamata: Scincidae). Journal of Morphology 220:223-236.
- Stewart JR y Thompson MB (1996). Evolution of reptilian placentation: development of the extraembryonic membranes of the Australian Scincid lizards, *Bassiana duperreyi* (oviparous) and *Pseudemoia entrecasteauxii* (viviparous). Journal of Morphology 227:349-370.
- Stewart JR y Thompson MB (1998). Placental ontogeny of the Australian Scincid Lizards *Niveoscincus coventryi* and *Pseudemoia spenceri*. The Journal of Experimental Zoology 282:535–559.
- Stewart JR y Thompson MB (2000). Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. Comparative Biochemistry and Physiology 127A:411-421.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Stewart JR y Thompson MB (2003). Evolutionary transformations of the fetal membranes of viviparous reptiles: a case study in two lineages. *Journal of Experimental Zoology* 299A:13–32.
- Stewart JR y Thompson MB (2009a). Parallel evolution of placentation in Australian Scincid lizards. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 312B:590-602.
- Stewart JR y Thompson MB (2009b). Placental ontogeny in Tasmanian Snow Skinks (Genus *Niveoscincus*) (Lacertilia: Scincidae). *Journal of Morphology* 270:485-516.
- Stewart JR, Blackburn DG, Baxter DC y Hoffman LH (1990). Nutritional provision to the embryos in *Thamnophis ordinoides* (Squamata: Colubridae), a predominantly lecithotrophic placental reptile. *Physiological Zoology* 63:722–734.
- Stewart JR, Heulin B y Surget-Groba Y (2004). Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology* 107:289–314.
- Stewart JR, Ecy TW, Garland CP, Fregoso SP, Price EK, Herbert JF y Thompson MB (2009). Maternal provision and embryonic uptake of calcium in an oviparous and a placentotrophic viviparous Australian lizard (Lacertilia: Scincidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 153A:202-208.
- Stewart JR, Mathieson AN, Ecy TW, Hebert JF, Parker SL y Thompson MB (2010). Uterine and eggshell structure and histochemistry in a lizard with prolonged uterine egg retention (Lacertilia, Scincidae, Saiphos). *Journal of Morphology* 271:1342-1351.
- Swain R y Jones SM (2000). Facultative placentotrophy: halfway house or strategic solution? *Comparative Biochemistry and Physiology A: Mol Integr Physiol* 127:441–451.
- Taylor EH y Smith H (1942). The snake genera *Conopsis* y *Toluca*. *Universidad de Kansas Sci. Bull. Vol. XXVIII* 13:325-363.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Thompson MB y Speake BK (2006). A review of the evolution of viviparity in lizards: structure, function and physiology of the placenta. *Journal of Comparative Physiology B* 176:179-189.
- Thompson MB, Stewart JR, Speake BK, Russell KJ y McCartney RJ (1999). Placental transfer of nutrition during gestation in a viviparous lizard, *Pseudemoia spenceri*. *Journal of Comparative Physiology B* 169:319–328.
- Tinkle DW y Gibbons JW (1977). The distribution and evolution of viviparity in reptiles. Ed. Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan. Carolina del Sur, 64 pp.
- Uribe MC, González-Porter G, Palmer BD y Guillette LJ (1998). Cyclic histological changes of the oviductal-cloacal junction in the viviparous snake *Toluca lineata*. *Journal of Morphology* 237:91-100.
- Villagrán-Santa Cruz M (1989). Desarrollo embrionario, placentación y su relación con el cuerpo lúteo y la atresia folicular en *Sceloporus mucronatus* y *Sceloporus grammicus*, (Sauria: Iguanidae). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Villagrán-Santa Cruz M y Méndez de la Cruz FR (2009). El huevo amniota y la evolución de los vertebrados. En: Evolución biológica. Monrrone JJ y Magaña P editores. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp 479-500.
- Villagrán-Santa Cruz M, Guillette LJ y Méndez de la Cruz FR (1994). Placentación el Scincido *Mabuza*. Resúmenes de la III Reunión Nacional de Herpetología. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Villagrán-Santa Cruz M, Méndez de la Cruz FR y Stewart JR (2005). Placentation in the Mexican lizard *Sceloporus mucronatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Journal of Morphology* 264:286-297.
- Weekes CH (1935). A review of placentation among reptiles, with particular regard to the function and evolution of the placenta. *Proceeding Zoology Society of London* 2:625–645.
- Wooding FBP, Ramírez-Pinilla MP y Forhead AS (2010). Funtional studies of the placenta of the lizard *Mabuya* sp. (Scincidae) using immunocytochemistry. *Placenta* 31: 675-685.
- Yaron Z (1985). Reptile placentation and gestation: structure, function, and endocrine control. En: C. Gans and F. Billet (Eds.), *Biology of the Reptilia*, vol. 15. John Wiley & Sons, New York, New York, U.S.A. Pp. 527–603
- Zehr DR (1962). Stages in the normal development of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis*. *Copeia* 1962:322–329.

ANEXO I

Estadios de desarrollo embrionario para *thamnophis sirtalis* (Zerh, 1962).

- 1.- Una célula
- 2.- Dos células
- 3.- Cuatro células
- 4.- Ocho células
- 5.- Pequeños cúmulos de células
- 6.- Blastodisco
- 7.- Gástrula
- 8.- Néurula temprana: la placa neural originada se pliega más

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- 9.- Néurula media: pliegues del cerebro notorios
- 10.- Néurula tardía: el pliegue amniótico se origina abruptamente anterior a la cabeza
- 11.- El amnios cubre la porción anterior de los pliegues neurales
- 12.- El amnios cubre la mitad del embrión. La torsión de la región de la cabeza comienza.
- 13.- El amnios encierra más de la mitad de embrión; el pliegue amniótico posterior comienza a cubrir el brote de la cola, la cabeza reposa sobre su costado izquierdo
- 14.- El amnios encierra todo excepto una pequeña área circular
- 15.- Cierre del amnios; ningún segmento faríngeo ni auditivo son visibles, pequeña protuberancia del alantoides, no inflado.
- 16.- Segmentos mandibulares visibles; orificios auditivos visibles; tronco curvado 180°; el alantoides comienza a inflarse; la posición anterior de los pliegues neurales aún abiertos
- 17.- Cuarto ventrículo inflado, todavía no son visibles los ojos
- 18.- Las vesículas ópticas se encuentran invaginando, orificio auditivo todavía abierto del tamaño de la punta de un alfiler; alantoides inflado del tamaño de la cabeza
- 19.- Orificio auditivo cerrado; proceso maxilar no visible; tronco torcido $1\frac{1}{2}$
- 20.- Proceso maxilar visible como un montón de tejido posterior al polo ventral del ojo; el orificio nasal aún no es visible, vesícula auditiva formada pero aun carece del ducto endolinfático; fisura toroide prominente en el globo ocular; la vesícula de la vista ha cerrado
- 21.- Orificio nasal visible; conducto endolinfático no visible; cuarto ventrículo inflado se extiende posterior al oído; tronco torcido $3\frac{1}{2} - 3\frac{3}{4}$
- 22.- Conducto endolinfático visible; órgano vomeronasal puede ser visto en el orificio nasal ; no hay depresión internasal; tronco torcido $3\frac{1}{2} - 3\frac{3}{4}$

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- 23.- Hemisferios cerebrales expandidos hasta que se presenta la depresión internasal; los ojos carecen de pigmentación; el montículo cloacal puede ser visto en el tronco girado a nivel de $3\frac{1}{2}$ o 3 del largo del ejemplar; tronco torcido de 3-4
- 24.- (Excepto para la pigmentación del ojo, parecido al 23) El ojo esta iluminadamente pigmentado; el proceso maxilar se extiende bajo el ojo hasta el centro; montículo cloacal visible al final de la torsión 3; tronco torcido $3\frac{1}{2}$ -4
- 25.- La punta del proceso maxilar es continuo con el borde lateral de la depresión nasal; el ojo aún no está rodeado por la protuberancia de mesénquima; tronco torcido $3\frac{1}{2}$ -5
- 26.- Los márgenes del globo ocular sobresalen claramente del tejido circundante; la protuberancia del mesénquima rodea al ojo; la nariz externa aún no se forma; la vista lateral del órgano vomeronasal obscurece por el cierre del pliegue nasal; un segmento de la faríngrula permanece abierto como una ligera superficie de surcos; montículo cloacal muy distintivo; anlagen de los hemipenes visible; tronco girado de $5\frac{1}{2}$ a $6\frac{1}{4}$.
- 27.- Proceso nasal medio y lateral fusionados excepto anteriormente donde un poro permanece como nariz externa; depresión internasal presente; montículos laterales de los hemipenes distintos en la torsión $3\frac{1}{4}$ -3 del tronco; tronco torcido de $5\frac{1}{2}$ - $6\frac{1}{2}$
- 28.- Depresión internasal sustituida; los pliegues de los párpados comienzan a formarse; el conducto endolinfático es fácilmente distinguido, aunque la masa central de la vesícula es confusa; los hemipenes son proyecciones localizadas en el tronco entre la torsión $2\frac{1}{2}$ a 3; la lengua aún no es visible cuando la boca está poco abierta; tronco girado de 5 a 6.
- 29.- Lengua visible; flexo cervical prominente; los hemipenes son proyecciones contundentes sobre la torsión $2-2\frac{1}{2}$ del tronco; tronco torcido 4- 5, libremente girado.
- 30.- Flexo cervical no muy prominente; las escamas aún no son visibles; los hemipenes están localizados en la torsión 2 del tronco; torsión del tronco 4 o más, torsión libre.

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

31.- Escamas visibles sobre el tronco pero no sobre la cabeza; los pliegues del párpado han cubierto al ojo, pero no han cerrado por completo; músculos del costado lateral del tronco son distintamente separados de la fina y transparente pared ventral del cuerpo; los hemipenes se encuentran invertidos en algunos especímenes.

32.- Los pliegues de los párpados han cubierto a los ojos completamente; el corazón aún es visible en la vista lateral a través de la delgada pared ventral del cuerpo.

33.- En la vista lateral, el corazón no es muy visible, pero los flancos laterales no se han juntado a lo largo de la línea media ventral en la región del corazón.

34.- Las capas musculares laterales del tronco se han juntado a lo largo de la línea media ventral al final de la región del corazón; pigmentación del cuerpo ausente.

35.- Es visible la pigmentación corporal, pero los patrones aún no están bien desarrollados; escamas visibles alrededor de la boca y ojos; excepto para una pequeña longitud cerca del cordón umbilical, los músculos del tronco han fusionado completamente en la línea media ventral

36.- Las escamas cubren la cabeza entera; las líneas externas del cerebro aún son visibles; los hemipenes aún están evertidos en algunos especímenes; los patrones de pigmentación están bien desarrollados.

37.- El cerebro no puede ser visto a través de las escamas craneales debido a la densa pigmentación; patrones de pigmentación desarrollados completamente; hemipenes invertidos en todos los especímenes.

ANEXO II

Técnica histológica:

- Deshidratación en alcoholes graduales y aclarado en xilol. Se colocaron por 90 minutos en cada uno de los siguientes:

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Alcohol al 70%
- Alcohol al 80%
- Alcohol al 90%
- Alcohol absoluto
- Alcohol-xilol
- Xilol
- Inclusión en paraplast. Se colocaron durante 90 minutos en:
 - Parafina-xilol
 - Parafina I
 - Parafina II
 - Inclusión en parafina
- Se realizaron cortes histológicos seriados de 5 μm de grosor con microtomo de rotación
- Los cortes histológicos se montaron

TINCIÓN

Deshidratación

- 15 minutos en la estufa,
- 10 minutos en xilol absoluto,
- 5 minutos en xilol absoluto,
- 5 minutos en alcohol absoluto-xilol,
- 5 minutos en alcohol absoluto,
- 5 minutos en alcohol de 96°,
- 5 minutos en alcohol de 70°,

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- 5 minutos en agua destilada.
- Tinción
 - Azul Rojo Núcleo Resistente (ARNR)
 - Se colocan en Ácido acético al 3% durante 3 minutos,
 - Azul-alciano durante 40 minutos,
 - Se lavan con agua corriente,
 - Se lavan en agua destilada,
 - Se colocan en Rojo Núcleo Resistente por 2.5 minutos,
 - Se lavan con agua corriente para quitar el exceso de colorante.
 - Tricrómica de Mallory (TM)
 - Se colocan en tiosulfato de sodio al 2.5% durante 5 minutos,
 - Se lavan en agua corriente durante 15 minutos,
 - Se tiñen con Fucsina ácida al 1% durante 4 minutos,
 - Se lavan rápido con agua destilada,
 - Se colocan en ácido fosfomolibdico al 1% durante 5 minutos,
 - Se tiñen en una solución compuesta durante 4 minutos,
 - Se lavan en agua destilada.
 - Azul Alciano Rojo Rápido Clorantino 5B (AARRC5B)
 - Se colocan en Hematoxilina de Ehrlich durante 30 minutos,
 - Se lavan con agua destilada,
 - Se colocan en Azul-alciano durante 30 minutos,

Placentación en la serpiente Mexicana *Conopsis lineata*

- Se lavan con agua destilada,
- Se colocan en Azul fosfomolibdico al 1% durante 10 minutos,
- Se lavan con agua destilada,
- Se colocan en RRC5B durante 30 minutos,
- Se lavan con agua destilada.
- Hematoxilina Eosina (HE)
 - Se colocan 10-15 minutos en hematoxilina,
 - Se lavan en agua corriente,
 - Se colocan en Carbonato de litio hasta obtener color azul ultramar,
 - Se lavan con agua corriente,
 - Se colocan en Eosina alcohólica por 30 segundos.
- Hidratación
 - Alcohol de 96° entrada por salida,
 - Alcohol absoluto entrada por salida,
 - Alcohol absoluto-xilol entrada por salida,
 - Xilol entrada por salida.
- Montaje
 - Poner dos gotas de sudán,
 - Colocar el cubre objetos sobre los cortes, y
 - Dejar secar.