

Comparación Morfométrica de Esqueletos Transparentados de Cuatro Especies de Roedores Myomorfos

Morphometric Comparison of Transparent Skeletons of Four Species of Myomorphic Rodents

Loya Zurita, Romeo Eduardo; Gersenowies Rodríguez, Jorge Ricardo;
Olvera Ramos, José Ariel & Pérez Bautista, Danny Shari

LOYA ZURITA, R. E.; GERSENOWIES RODRÍGUEZ, J. R.; OLVERA RAMOS, J. A. & PÉREZ BAUTISTA, D. S. Comparación morfométrica de esqueletos transparentados de cuatro especies de roedores myomorfos. *Int. J. Morphol.*, 42(1):107-110, 2024.

RESUMEN: Las técnicas de doble tinción y transparentación se han usado desde 1897, pero su utilidad ha sido poco explorada en los estudios anatómicos de micromamíferos adultos. No obstante, la combinación de estas técnicas con el análisis alométrico multivariado posibilita el estudio de esqueletos poscraneales articulados de tales grupos de micromamíferos como los roedores, los cuales son muy limitados ya que casi siempre se enfocan en los cráneos. En este estudio, analizamos y comparamos la morfometría del esqueleto de *Neotomodon alstoni* con la de *Meriones unguiculatus*, *Phodopus campbelli* y *Rattus norvegicus*. Usamos la técnica de doble tinción y transparentación para analizar las relaciones morfométricas entre estos roedores utilizando sesenta caracteres esqueléticos. Se encontró que tres especies comparten dos correlaciones comunes y compartieron el mismo tipo de crecimiento isométrico en una de ellas; además se encontraron similitudes aparentes entre los patrones de la morfometría de *P campbelli* con el patrón de osificación descrito para la especie relacionada *Mesocricetus auratus*. Las diferencias en el crecimiento alométrico pueden representar también diferencias en el ritmo de desarrollo de acuerdo con el tipo de historia de vida de cada especie. Aquí demostramos que tanto la técnica de preparación como el método de análisis morfométricos son herramientas poderosas pero simples, para realizar estudios anatómicos y morfológicos en el laboratorio. Nuestros resultados reflejan las condiciones del desarrollo ontogenético derivados del propio patrón de heterocronía para cada especie, y además representan la historia evolutiva de este grupo analizado. Sin embargo, consideramos que es deseable más investigación.

PALABRAS CLAVE: *Neotomodon*; Roedores; Morfología; Técnica de transparentación y tinción; Alometría.

INTRODUCCIÓN

El estudio del esqueleto involucra el análisis de la forma y su desarrollo en los vertebrados por lo que su importancia es capital en taxonomía, sistemática y zoología. Con el uso de técnicas como la de transparentación, no sólo es posible estudiar el esqueleto completamente articulado, sino también observar detalles esqueléticos no reportados anteriormente (Bailey & Heidt, 1984; Ortega-Ortiz *et al.*, 2000). Esto último, es especialmente importante en grupos morfológicamente muy diversos, pero semejantes y taxonómicamente complicados; entre los mamíferos ninguno reúne estas características como los roedores. Se han realizado trabajos sobre la anatomía de diversos linajes y especies individuales por varios investigadores (Lyon, 1901; Villa, 1944; Thorington Jr., 1972; Thorington Jr. & Santana, 2007). Sin embargo, las investigaciones que implican el análisis alométrico multivariado de esqueleto poscranial han sido pocas y en general se circunscriben a partes concretas

del mismo (Thorington Jr., 1972; Siegel & Van Meter, 1973; van de Graaff, 1974; Thorington Jr. *et al.*, 1998).

El orden Rodentia tradicionalmente se clasifica en varios subórdenes, de los cuales el más abundante y diverso en especies es Myomorpha (Carleton & Musser, 2005a,b); este comprende una parte importante de las especies de mamíferos que conocemos como “ratas” y “ratones”; en México están representados por 22 géneros y 127 especies (Ceballos & Oliva, 2005) y que incluye al género monoespecífico *Neotomodon*.

Neotomodon alstoni o ratón de los volcanes, especie endémica de México, fue descrita por Merriam (1898), sobre la base de ejemplares colectados por Goldman en Nahuatzin, Michoacán. Su distribución geográfica se restringe al Eje Neovolcánico Transversal, desde la región central de

Michoacán hasta la zona central de Veracruz, limitado al rango de altitud de 2400 a 4960 msnm, en zonas de pradera boreal de zacatón y bosque abierto de pino (Merriam, 1898; Williams *et al.*, 1985). Esta especie se utiliza actualmente como modelo de laboratorio, sin embargo, la literatura resultante de su uso en investigación se ha limitado a facetas específicas de su comportamiento, fisiología y ecología, no existiendo estudios relativos a su morfometría.

En este estudio, analizamos y comparamos el esqueleto del ratón de los volcanes con el del gerbo de Mongolia *Meriones unguiculatus*, el hámster enano chino *Phodopus campbelli* y la rata parda *Rattus norvegicus* mediante el uso de la técnica de transparentación y doble tinción

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron doce ejemplares de *Neotomodon alstoni*, veinte ejemplares de *Meriones unguiculatus* y veinte de *Phodopus cambelli*, todos en etapa reproductiva, asimismo se utilizaron cuatro ejemplares juveniles de *Rattus norvegicus* de tipo silvestre. Excepto los ejemplares de *R. norvegicus* todos los animales fueron donados por el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la FES Iztacala UNAM (Proyecto PAPIIT IA204823 UNAM).

Se utilizó la técnica de doble tinción diferencial con azul de alciano y rojo de alizarina S de acuerdo con las modificaciones realizadas en el Laboratorio de Anatomía Animal Comparada de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, consistente en la fijación del organismo previamente sacrificado en formol al 4 % neutralizado con borato de sodio (10 g/Lt); lavado del espécimen en agua corriente; deshidratado en tren de alcohol de 40, 60, 80, 90 y 100 %; tinción en la solución de alcian; rehidratado en el tren de alcohol, en sentido inverso y tinción en la solución de rojo de alizarina S. Cada uno de los pasos por las soluciones tomó un mínimo de 24 h. Al terminar la tinción con el rojo de alizarina, el organismo se sometió a maceración en una solución al 4 % de KOH, con un tiempo variable de 7 a 20 días. Al alcanzarse el grado de transparentación aceptable se sometió el organismo a lavado intenso de agua y finalmente diafanización en un tren de solución de glicerina a 40, 60, 80 y 90 %, durante 24 h en cada concentración hasta que, finalmente, se depositó en glicerina al 100 % para su estudio y almacenamiento final. Se midieron 60 caracteres esqueléticos seleccionados según las mediciones sugeridas y/o usadas en otros trabajos similares con roedores (Thorington Jr., 1972; Kuncová & Frynta, 2009). Las mediciones se realizaron con un vernier Truper analógico de 6' modelo 14394. El análisis morfométrico se realizó

utilizando el programa Statistica ver. 10.0 y generándose una matriz de 1740 combinaciones posibles para cada especie con los coeficientes y porcentajes de correlación, aplicando a los que arrojaron un coeficiente de determinación de $r > .50$ la técnica de mínimos cuadrados, donde las condiciones de determinación fueron $a = 1$ es isométrico, $\alpha > 1$ es alometría positiva, $\alpha < 1$ equivale a alometría negativa, y al valor negativo $\alpha > 0$ un crecimiento de tipo recíproco de acuerdo con el método descrito por Gersnowies (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de correlaciones que se generaron para cada especie fueron 174 para *M. unguiculatus*, 133 para *P. campbelli*, 87 para *N. alstoni*, y 74 para *R. norvegicus*. De acuerdo con los resultados, el mayor porcentaje de isometría se observa en *R. norvegicus*, con 100 %, este último resultado puede ser por el uso de una muestra muy pequeña, sólo cuatro especímenes. El mayor porcentaje de alometría negativa fue 43,67 % en *N. alstoni*; el porcentaje más elevado de alometría positiva se observó en *M. unguiculatus* con 10,73 %; y finalmente *N. alstoni* presentó el mayor valor de alometría recíproca, 20,68 %. Los porcentajes de alometría obtenidos en cada especie se muestran en la Tabla I.

La mayor parte de las correlaciones se encontraron en las cinturas pectoral y pélvica. Cada una de las especies estudiadas compartió correlaciones con las otras tres siendo *Neotomodon* la que tiene el porcentaje más alto, con 22,99 %, *Meriones* con 16,78 %, *Rattus* con 16 % y *Phodopus* con 14,92 %. Esto se muestra de manera esquemática en la Figura 1.

Encontramos que *N. alstoni*, *R. norvegicus* y *P. campbelli* mostraron dos correlaciones comunes a las tres especies: atcr-laveca (Altura total del cráneo vs longitud de las vértebras caudales) y anzg-lavece (ancho zigomático vs longitud de las vértebras cervicales), siendo la primera isométrica para las tres especies y la segunda isométrica para *R. norvegicus* y *P. campbelli*, mientras que en *N. alstoni* se presentó como alométrica negativa. Esto en contraste con lo reportado por Samuels & Van Valkenburgh (2002), que en un exhaustivo análisis de los huesos involucrados en la locomoción de un conjunto de 67 especies existentes y diez especies extintas encontraron ausencia de alometría interespecífica.

Tabla I. porcentajes de los diferentes tipos de crecimiento alométrico por especie.

	<i>M.</i> <i>ungiculatus</i>	<i>N.</i> <i>alstoni</i> ,	<i>P.</i> <i>campbelli</i>	<i>R.</i> <i>norvegicus</i>
Isometría	33.55 %	31.03 %	48.12 %	100 %
Alometría negativa	41.61 %	43.67 %	33.83 %	N.a.
Alometría positiva	10.73 %	4.60 %	1.50 %	N.a.
Alometría recíproca	14.03 %	20.68 %	16.54 %	N.a.

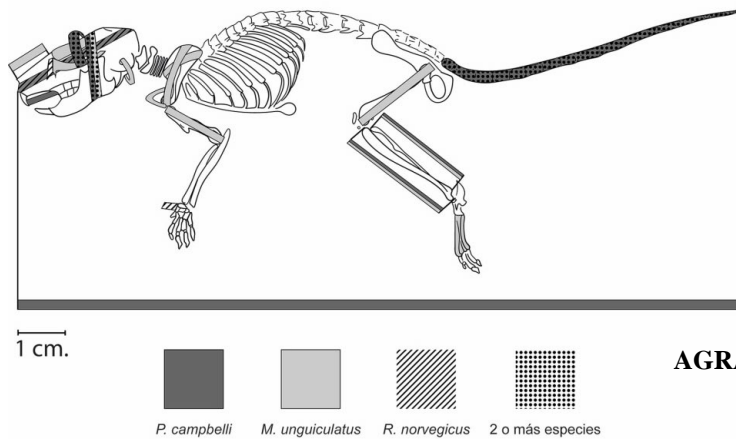


Fig. 1. Esqueleto esquematizado de *N. alstoni* mostrando las zonas donde se presentaron correlación de estructuras compartidas con las otras especies.

Asimismo, encontramos aparentes similitudes entre los patrones correspondientes a *R. norvegicus* y *P. campbelli* y el patrón de osificación descrito para *R. norvegicus* por Strong (1925), y el hámster dorado *Mesocricetus auratus* por Beatty & Hillemann (1950). En cuanto a los resultados obtenidos para *M. unguiculatus*, y comparando los resultados obtenidos con los hallazgos de Rolian (2008) que comparó el desarrollo de los miembros de esta especie con *Mus musculus* y encontró evidencia de "división del trabajo" en la osificación y alargamiento de los mismos, parece cumplirse la misma condición que en las otras dos especies, y esto nos puede dar la clave no sólo por qué la presencia de correlaciones entre partes relativamente distantes entre sí, sino también el porqué de sus tasas de crecimiento alométrico: episodios y diferentes tasas de desarrollo de acuerdo con el tipo de vida de la especie. Con respecto a *N. alstoni*, no se encontró en la literatura con que comparar.

Es tentador pensar que esta serie de correlaciones en las mediciones del esqueleto refleja las condiciones de desarrollo ontogenético derivados del propio patrón de heterocronía para cada especie y representa la historia evolutiva de este grupo de especies analizadas. En lo que respecta a la literatura disponible para roedores y mamíferos en general, este enfoque aún no está plenamente desarrollado; debido a la diferencia en las técnicas utilizadas, especies investigadas, limitándose a regiones específicas del cuerpo (Smith, 1997; Nunn & Smith, 1998; Bininda-Emonds *et al.*, 2003; Sánchez Villagra *et al.*, 2008) llevan a conclusiones contradictorias, por lo que es deseable más investigación.

Una reflexión final: las técnicas que implican la transparentación de los músculos y la tinción de los huesos y el cartílago ha sido desarrolladas desde 1897, pero su

utilidad poco explorada en los estudios anatómicos de micromamíferos adultos. Cortés *et al.* (2009) demostraron que la preparación de especímenes por transparentación y doble tinción se puede utilizar en roedores, aquí hemos demostrado que la técnica de preparación, en conjunto con el método de análisis morfométrico demostraron ser herramientas poderosas pero simples, para estudios anatómicos y morfológicos en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Juana Alba Luis Díaz y al Dr. Luis Romero Morales del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la UMF de la FES Iztacala de la UNAM y el M. en C. Agustín Carmona Castro del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la donación de los ejemplares de roedores que se usaron para este trabajo. Agradecemos también a Josué Gracida Hernández por ayuda en la modificación de la Figura 1 del presente artículo.

LOYA ZURITA, R. E.; GERSENOWIES RODRÍGUEZ, J. R.; OLVERA RAMOS, J. A. & PÉREZ BAUTISTA, D. S. Morphometric comparison of transparent skeletons of four species of myomorphic rodents. *Int. J. Morphol.*, 42(1):107-110, 2024.

SUMMARY: Clearing and staining techniques have been present since 1897. However, their use in anatomical studies of adult micromammals has been limited. When using such techniques in combination with allometric method, it is possible to study articulated skeletons of micromammals, instead of relying only on the skulls, which is important in morphologically complicated groups as the rodents. Research involving multivariate allometric analysis of postcranial skeleton of rodents has been limited and confined to specific items. In this study, we analyzed and compared the morphometry of the skeleton of *Neotomodon alstoni* with that of *Meriones unguiculatus*, *Phodopus campbelli* and *Rattus norvegicus*. We applied the double staining and clearing technique in order to determine the morphometric relation between these rodents using sixty skeletal characters. We found that three species share two common correlations and one isometric, with apparent similarities between the morphometry patterns of *P. campbelli* with the ossification pattern described for the related species *Mesocricetus auratus*. The differences in allometric growth could represent differences in the development stages according to the type of life history for each species. In this analysis we confirmed that both the preparation technique and morphometric analysis method, are simple yet verifiable tools for anatomical and morphological studies. Our results reflect the conditions of ontogenetic development derived from the heterochrony pattern for each species, representing the evolutionary history for this group. Therefore, as this approach continues to be discussed, ongoing research is warranted.

KEY WORDS: *Neotomodon*; Rodents; Morphology; Staining and clearing technique; Allometry.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey, J. W. & Heidt, G. A. Postnatal osteology of the northern grasshopper mouse, *Onychomys leucogaster*. *Ark. Acad. Sci. Proc.*, 37:13-6, 1984.
- Beatty, M. D. & Hillemann, H. H. Osteogenesis of the golden hamster. *J. Mammal.*, 31(2):121-34, 1950.
- Bininda-Emonds, O. R. P.; Jeffrey, J. E. & Richardson, M. K. Is sequence heterochrony an important evolutionary mechanism in mammals? *J. Mammal. Evol.*, 10 (4):335-61, 2003.
- Carleton, M. D. & Musser, G. G. *Order Rodentia*. In: Wilson, D. E. & Reeder, D. M (Eds.). *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. Baltimore, John Hopkins University Press, 2005a. pp.745-51.
- Carleton, M. D. & Musser, G. G. *Superfamily Muroidea*. In: Wilson, D. E. & Reeder, D. M (Eds.). *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. Baltimore, John Hopkins University Press, 2005b. pp.894-904.
- Ceballos, G. & Oliva, G. (Eds.). *Los Mamíferos Silvestres de México*. Ciudad de México, CONABIO/Fondo de Cultura Económica, 2005. pp.657.
- Cortés, N.; Perez, J. & Hoyos, J. M. Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents. *Int. J. Morphol.*, 27(4):1163-7, 2009.
- Gersenowies, J. R. *Alometría*. Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, 2007.
- Kuncová, P. & Frynta, D. Interspecific morphometric variation in the postcranial skeleton in the genus *Apodemus*. *Belg. J. Zool.*, 139(2):133-46, 2009.
- Lyon, M. W. A comparison of the osteology of the jerboas and jumping mouse. *Proc. U. S. Natl. Mus.*, 23(1228):659-68, 1901.
- Merriam, C. H. A new genus (*Neotomodon*) and three new species of murine rodents from the mountains of southern Mexico. *Biol. Soc. Wash.*, 12:127-9, 1898.
- Nunn, C. L & Smith, K. K. Statistical analyses of developmental sequences: the craniofacial region in marsupial and placental mammals. *Am. Nat.*, 152(1):82-101, 1998.
- Ortega-Ortiz, J. G.; Villa-Ramírez, B. & Gersenowies, J. R. Polydactyly and other features of the manus of the vaquita *Phocaena sinus*. *Mar. Mamm. Sci.*, 16(2):277-86, 2000.
- Rolian, C. Developmental basis of limb length in rodents: evidence for multiple divisions of labor in mechanisms of endochondral bone growth. *Evol. Dev.*, 10(1):15-28, 2008.
- Samuels, J. X. & Van Valkenburgh, B. Skeletal indicators of locomotor adaptations in living and extinct rodents. *J. Morphol.*, 269 (11):1387-411, 2002.
- Sánchez Villagra, M. R.; Goswami, A.; Weisbecker, V.; Mock, O. & Kuratani, S. Conserved relative timing of cranial ossification pattern in early mammalian evolution. *Evol. Dev.*, 10 (5):519-30, 2008.
- Siegel, M. I. & Van Meter, R. Skeletal correlates of ecological adaptation in two species of *Peromyscus*. *J. Mammal.*, 54(1):275-8, 1973.
- Smith, K. K. Comparative patterns of craniofacial development in eutherian and metatherian mammals. *Evolution*, 51 (5):1663-78, 1997.
- Strong, R. M. The order, time, and rate of ossification of the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) skeleton. *Am. J. Anat.*, 36(2):313-55, 1925.
- Thorington Jr., R. W. & Santana, E. M. How to make a flying squirrel: *Glaucomys* anatomy in phylogenetic perspective. *J. Mammal.*, 88(4):882-96, 2007.
- Thorington Jr., R. W. *Proportions and Allometry in the Gray Squirrel, Sciurus carolinensis*. Delaware, Delaware Museum of Natural History, 1972. pp.2-17.
- Thorington Jr., R. W.; Miller, A. M. L. & Anderson, C. G. *Arboreality in Tree Squirrels*. In: Steele, M. A.; Merritt, J. F. & Zegers, D. A. (Eds.). *Ecology and Evolutionary Biology of Tree Squirrels*. Special Publication 6. Martinsville, Virginia Museum of Natural History, 1998. pp.119-30.
- van de Graaff, K. M. Comparative development osteology in three species of desert rodents, *Peromyscus eremicus*, *Perognathus intermedius* and *Dipodomys merriami*. *J. Mammal.*, 54 (3):729-41, 1974.
- Villa, B. *Contribución al Conocimiento Morfológico y Osteológico de Citellus adocetus arceliae Villa R.* Tesis de Maestría. Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, 1944.
- Williams, S. L.; Ramírez, J. & Baker, R. J. *Peromyscus alstoni*. *Mammal. Species*, (242):1-4, 1985.

Dirección para correspondencia:

Gersenowies Rodríguez

UNAM

Avenida de los Barrios número 1

Colonia Los Reyes Ixtacala

Tlalnepantla

Estado de México 54090

MÉXICO

E-mail: jr.gersenowies@gmail.com