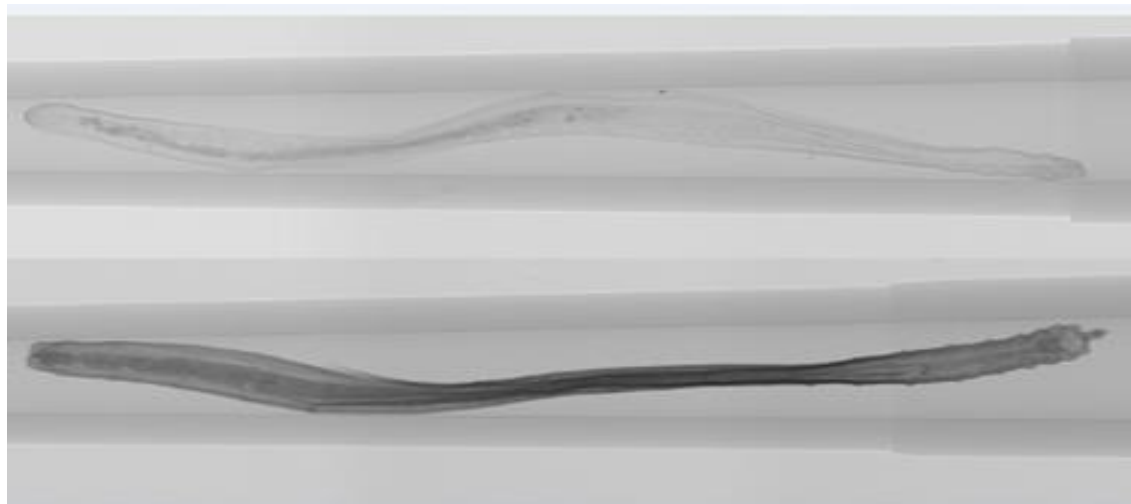


## Grado en Biología

### Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la anatomía interna del género *Laubieriopsis* Petersen, 2000 (Polychaeta; Fauveliopsidae) mediante de la utilización del Micro-CT.



**Iria Permuy Novo**

Julio, 2016

Julio Parapar Vegas  
Dep. Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Universidade da Coruña  
María Candás Romero  
Estación de Biología Mariña da Graña, Universidade de Santiago de Compostela



## ÍNDICE

Resumen.....	1
Palabras clave .....	1
1. Introducción. ....	1
2. Objetivo.....	2
3. Material y métodos.....	2
4. Resultados.....	4
4.1.- Anatomía externa.....	4
4.2.- Anatomía interna.....	4
4.2.1.- Cavity corporal general.....	5
4.2.2.- Sistema muscular.....	5
4.2.3.- Sistema digestivo.....	5
4.2.4.- Sistema circulatorio.....	6
4.2.5.- Sistema nervioso.....	6
4.2.6.- Sistema reproductor.....	7
5. Discusión.....	16
6. Conclusiones.....	21
7. Bibliografía.....	22



## Resumen

La microtomografía computarizada (micro-CT) es una técnica no destructiva que nos permite estudiar la anatomía interna y externa de una muestra, sea biológica o no, y realizar una reconstrucción de ella a través de un modelo virtual en tres dimensiones. En los últimos años esta técnica está aportando avances significativos en el estudio de los invertebrados marinos. Con este estudio se pretende realizar una valoración de su aportación a través de una comparativa entre los métodos histológicos clásicos y el micro-CT. Para ello se han empleado una serie de ejemplares del Anélido Poliqueto *Laubieriopsis cabiochi* (Amoreux, 1982) obtenidos en las campañas BIOICE alrededor de Islandia. Estos ejemplares han sido estudiados tanto sin tinción como sometidos a tratamientos diferentes para comprobar la afinidad de éstos por los tejidos y poder valorar la resolución y diferenciación resultante.

**Palabras clave:** Polychaeta, anatomía interna, *Laubieriopsis*, Micro-CT, BIOICE.

## 1.- Introducción

La denominada “Microtomografía Computarizada (micro-CT) de Rayos X” se basa en la formación de imágenes de rayos X mediante el mismo método utilizado en exploraciones de tomografía computarizada hospitalaria, aunque a pequeña escala y con una resolución muy superior de la muestra (BRUKER, METHOD NOTE, 2016). Los materiales densos que componen las muestras se pueden observar mediante la técnica del micro-CT sin necesidad de preparaciones adicionales. Sin embargo, con objeto de mejorar el contraste, en muchas ocasiones los tejidos blandos requieren un tratamiento adicional con tinciones de alto peso molecular (GOLDING Y JONES, 2007). En los últimos años, su empleo en estudios anatómicos en zoología se está incrementando, particularmente en moluscos y artrópodos, aunque también existen antecedentes de su empleo con poliquetos. Por ejemplo, DINLEY *et al.* (2009) mostró que este método puede ser usado en estudios anatómicos funcionales, mientras que FAULWETTER *et al.* (2013) han demostrado cómo las imágenes obtenidas por micro-CT pueden llegar a desvelar resultados anatómicos detallados (PATERSON *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Equipo de micro-CT empleado.

Fauveliopsidae Hartman, 1971 es una pequeña familia de Anélidos Poliquetos poco conocida que se encuentra habitualmente en fondos marinos profundos, hasta 6000 metros, si bien algunas especies han sido localizadas por encima de los 100 metros (ZHADAN Y ATROSHCHENKO, 2012). Su tamaño varía desde 1.3 a 20 mm de longitud y su número de segmentos corporales es habitualmente bajo, ya que ninguna especie parece tener más de 90 segmentos y la mayoría posee menos de 30 (ROUSE, 2001). Esta familia comprende cerca de 20 especies que se incluyen en los géneros *Fauveliopsis* McIntosh, 1922 y *Laubieriopsis* Petersen, 2000 (LÓPEZ, 2011). Las especies son de hábitos sedentarios y aquellas pertenecientes al género *Fauveliopsis* habitan normalmente en el interior de conchas de moluscos gasterópodos y escafópodos (LÓPEZ, 2011).

Los ejemplares empleados en este estudio fueron recogidos con ocasión de las campañas BIOICE (Benthic Invertebrates of Icelandic Waters) las cuales han sido parte de un programa internacional de colaboración que comenzó en 1992, finalizando en 2004, y se designó para llevar a cabo un conocimiento exhaustivo de la fauna bentónica marina presente en aguas pertenecientes al área económica exclusiva de Islandia, que comprende desde la línea costera de este país hasta las 200 millas. El área de muestreo de estas campañas cubrió un rango de profundidad desde los 200 a los 3500 metros a ambos lados del llamado GIF Ridge, es decir, la cresta submarina existente entre Groenlandia, Islandia y las Islas Feroe, la cual eleva el nivel del fondo marino hasta los aproximadamente 500 metros de profundidad en su cúspide, y marcando así el límite entre las aguas frías del Océano Ártico al norte y las aguas más templadas del Océano Atlántico Norte al sur (THIEL, *et al.*, 2011).

## **2.- Objetivo.**

El objetivo principal de este trabajo ha sido validar la efectividad de la técnica de Microtomografía Computerizada (micro-CT) en el estudio de la anatomía interna de invertebrados particularmente en los Poliquetos y así valorar sus fortalezas y debilidades frente a los estudios histológicos clásicos.

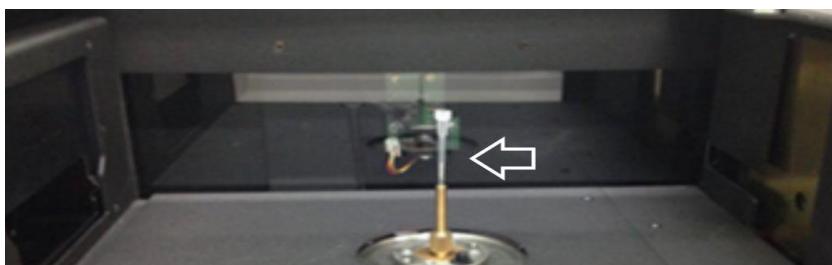
## **3.- Material y métodos.**

El material empleado en este estudio consistió en tres ejemplares del Poliqueto perteneciente al género *Laubieriopsis* Petersen, 2000, *L. cabiochi* (Amoureux, 1982) recogidos con ocasión de las anteriormente mencionadas campañas BIOICE.

Los tres ejemplares provienen de la muestra 2717 de BIOICE de la costa occidental de Islandia frente a la península de Snaefellsnes (64°30'30"N; 25°43'60"W), en la estación 734 de la campaña B-13-94. El muestreo se realizó el 7 de septiembre de 1994. La draga empleada fue "RP dredge" a 256 metros de profundidad y a una temperatura de fondo de 5.6°C.

Inicialmente se sometieron los tres ejemplares a un mismo proceso de deshidratación a través de diferentes baños consecutivos de etanol a 80°, 90° y 96°, cada uno durante 24 horas. A continuación, cada ejemplar se trató de manera diferente: El primero, de 8.18 mm de longitud, no se sometió a ningún proceso de tinción, el segundo, de 6.46 mm de longitud, se tiñó con Iodina al 1% en metanol durante una semana; y el tercero de 8.58 mm de longitud se tiñó en Ácido Fosfotúngstico (PTA) al 1% en metanol durante tres días.

Por último cada ejemplar se deshidrató en Hexametildisilazano (HMDS) durante 24 horas y se dejó secar durante toda la noche. El HMDS elimina el agua de los tejidos y aumenta la claridad y el contraste de las imágenes cuando se escanea la muestra en el micro-CT (PATERSON *et al.*, 2014). El montaje de las muestras se debe hacer de tal manera que queden rodeadas de un recipiente de baja densidad; por lo que a menudo se introducen en puntas de micropipeta (Figura 2) (BRUKER METHOD NOTE, 2016).



**Figura 2.** Interior del micro-CT con la muestra, en este caso un ejemplar de *Laubieriopsis cabiochi*, en el interior de una punta de pipeta (flecha).

Las muestras se escanearon utilizando un microtomógrafo SkyScan 1172 (Figura 1; Figura 3A), a un voltaje de 55 kV, con una corriente de 165  $\mu$ A, sin filtro, un tamaño de píxel de 1.5  $\mu$ m y con una rotación de 180°.

Las proyecciones de rayos X (radiografías) del escaneo se reconstruyeron con el Software NRecon, en el que se obtuvieron los "cortes histológicos" (Figura 3B).

Las secciones fueron procesadas mediante los programas CtAn y DataView (Figura 3C), que nos permitieron obtener cortes frontales y sagitales a partir de los cortes transversales. Las representaciones en 3D fueron obtenidas con el programa CTVox (Figura 3D) en el que podemos observar la anatomía externa e interna de la muestra.



**Figura 3.** Imágenes de pantalla de los programas SkyScan 1172 (A); NRecon (B); Data Viewer (C) y CTVox (D).

#### **4.- Resultados.**

Los resultados obtenidos que se muestran a continuación corresponden fundamentalmente al ejemplar que no sufrió ningún tipo de proceso previo de tinción, si bien ha habido detalles que se observaron mucho mejor en los ejemplares teñidos. Estos resultados se compararán con estudios publicados con anterioridad que abordaron el conocimiento de la anatomía externa e interna de este grupo de poliquetos mediante técnicas histológicas clásicas empleando el microscopio electrónico de transición.

##### **4.1.- Anatomía externa (Figura 4).**

En lo correspondiente a la anatomía externa de los ejemplares, se observó que presentan un cuerpo delgado con una superficie corporal lisa sin aparentemente ningún tipo de diferenciación cuticular especial aparte de la presencia de los parápodos y poro genital que se comenta a continuación (Figuras 4A, 10A, 11A).

Los 4 primeros segmentos setíferos son un poco más anchos que el resto, formando una región corporal de forma ovalada bastante bien diferenciada del resto del cuerpo. El prostomio es pequeño y cónico y, junto al peristomio, aparece retraído en dos de los ejemplares (Figuras 4A, 4B, 5D, 7A). El resto de segmentos setíferos son algo más estrechos y largos (Figuras 4A, 4B, 4C, 10A, 11A).

Todos los segmentos setíferos presentan parápodos típicamente birrámeos con ramas dorsales (notópodos) y ventrales (neurópodos) poco desarrollados y provistos de una pequeña papila sensorial interramal (Figura 8) y con un número relativamente bajo de sedas de tipo simple con diferente grado de desarrollo, algunas de ellas de tipo acicular. En el extremo posterior del cuerpo se encuentra un pigidio invaginado en el interior del último segmento setífero corporal.



Un último elemento destacable de la anatomía externa es la presencia de una papila genital a la derecha del octavo segmento setífero en posición latero-posterior, muy cerca del parápodo correspondiente al noveno setífero (Figuras 4B, 4C).

#### **4.2.- Anatomía interna (Figuras 5–11).**

En relación a la anatomía interna de los ejemplares, el micro-CT ha mostrado en general una imagen aparentemente muy fiel de la forma y disposición de los distintos órganos internos.

##### **4.2.1.– Cavity corporal general.**

Se ha observado una amplia cavidad corporal general de naturaleza celomática que, siguiendo la típica metamerización anelidiana, se encuentra dividida en cavidades más o menos individualizadas por septos o diseptos (Figuras 5A, 5B, 11B). Estos diseptos, más desarrollados en los primeros segmentos setíferos, son muy visibles y están particularmente muscularizados en su región dorsal.

##### **4.2.2.– Sistema muscular.**

En coherencia con el esquema general de la organización interna de los anélidos, los ejemplares de *L. cabiochi* muestran una musculatura longitudinal muy bien desarrollada organizada en cuatro paquetes bien individualizados y enmarcando la cavidad general corporal. Estos paquetes se disponen dos en posición dorsal y dos en posición ventral (Figuras 5C, 5D). No se observa musculatura circular parietal ni transversal, pero sí fuertes paquetes musculares asociados al movimiento de los parápodos y sedas (Figura 5D) así como a la retracción del prostomio, los cuales se encuentran unidos por un extremo al borde posterior del prostomio a nivel del cerebro y por el otro a la pared corporal a nivel de los setíferos 2 y 3 (Figura 6A).

##### **4.2.3.– Sistema digestivo.**

El sistema digestivo, como es común en los Anélidos y en particular en los Poliquetos, es más o menos recto y abre en una boca anterior a nivel del peristomio, y un ano posterior a nivel del pigidio. A diferencia de otros poliquetos, los laubieriópsidos, y en particular los ejemplares estudiados de *L. cabiochi*, presentan un sistema digestivo bastante simple que no muestra diferenciaciones notables en su recorrido por el interior del cuerpo.

Los aspectos más relevantes observados son: La presencia de una faringe corta en posición anterior tras la boca (Figura 8A); una asimismo corta región esofágica posterior a ella (Figuras 7A, 8B, 8C, 10C) habitualmente con forma lobulada debido a

fuertes estrechamientos en su trayecto que coinciden con la presencia de los disepimientos musculares anteriores (Figura 7B); y un intestino continuo, largo y recto en posición posterior que llegará hasta el ano (Figura 7B, 8D).

El sistema digestivo discurre en posición medio-dorsal por el interior de la cavidad celomática, y esto es posible en los anélidos gracias a la presencia de los antedichos septos así como a la presencia de mesenterios dorsales y ventrales que no son más que prolongaciones del propio peritoneo celomático, que lo sostienen. La presencia de estos mesenterios ha sido observada a lo largo de todo el trayecto del digestivo, pero es de nuevo (como ocurre con los disepimientos) más evidente en su región anterior, es decir, en asociación con la región esofágica (Figura 9C). También se observan septos asociados al trayecto del intestino (Figura 11B). La disposición de estos mesenterios es dorsal (uno) y ventro-lateral (dos) (Figura 9C).

#### **4.2.4.– Sistema circulatorio.**

De nuevo y en congruencia con el esquema general anelidiano, el sistema circulatorio se construye a partir del peritoneo mesodérmico y se organiza en dos vasos sanguíneos largos, uno dorsal y otro ventral al sistema digestivo. Estos vasos, están asociados a septos y mesenterios, y a ellos se les une un más o menos complejo sistema de vasos segmentarios asociados íntimamente al digestivo. En este estudio el vaso sanguíneo dorsal ha sido difícil de observar, pero la presencia del vaso longitudinal ventral ha sido muy evidente, en particular en la región anterior muy próximo a la cara ventral esofágica (Figuras 8A, 9C, 11C) así como los vasos de disposición segmentaria, de menor calibre, y localizados adosados a la cara externa del intestino (Figura 9D).

#### **4.2.5.– Sistema nervioso.**

El sistema nervioso anelidiano consta de un cerebro anterior de ubicación prostomial (sobre todo en poliquetos) y por tanto dorsal, y un cordón nervioso ventral largo y metamerizado, con un par de ganglios fusionados por segmento de los que parten ramas nerviosas para inervar los distintos elementos corporales (Figuras 6A, 8A, 8B, 8C, 9C). El cerebro o ganglio cerebroideo dorsal se conecta con la región ventral del sistema nervioso central por medio de unos conectivos nerviosos circumfaríngeos que rodean a la región anterior del digestivo, a menudo la faringe o en ocasiones el esófago. Este esquema general se ha encontrado en la especie estudiada (Figura 6B) si bien no se han podido llegar a observar los citados conectivos circumfaríngeos.

El ganglio cerebroideo se encuentra en la parte anterior del cuerpo (prostomio) ocupando todo su espacio interno; posee una forma más o menos cuadrangular y se

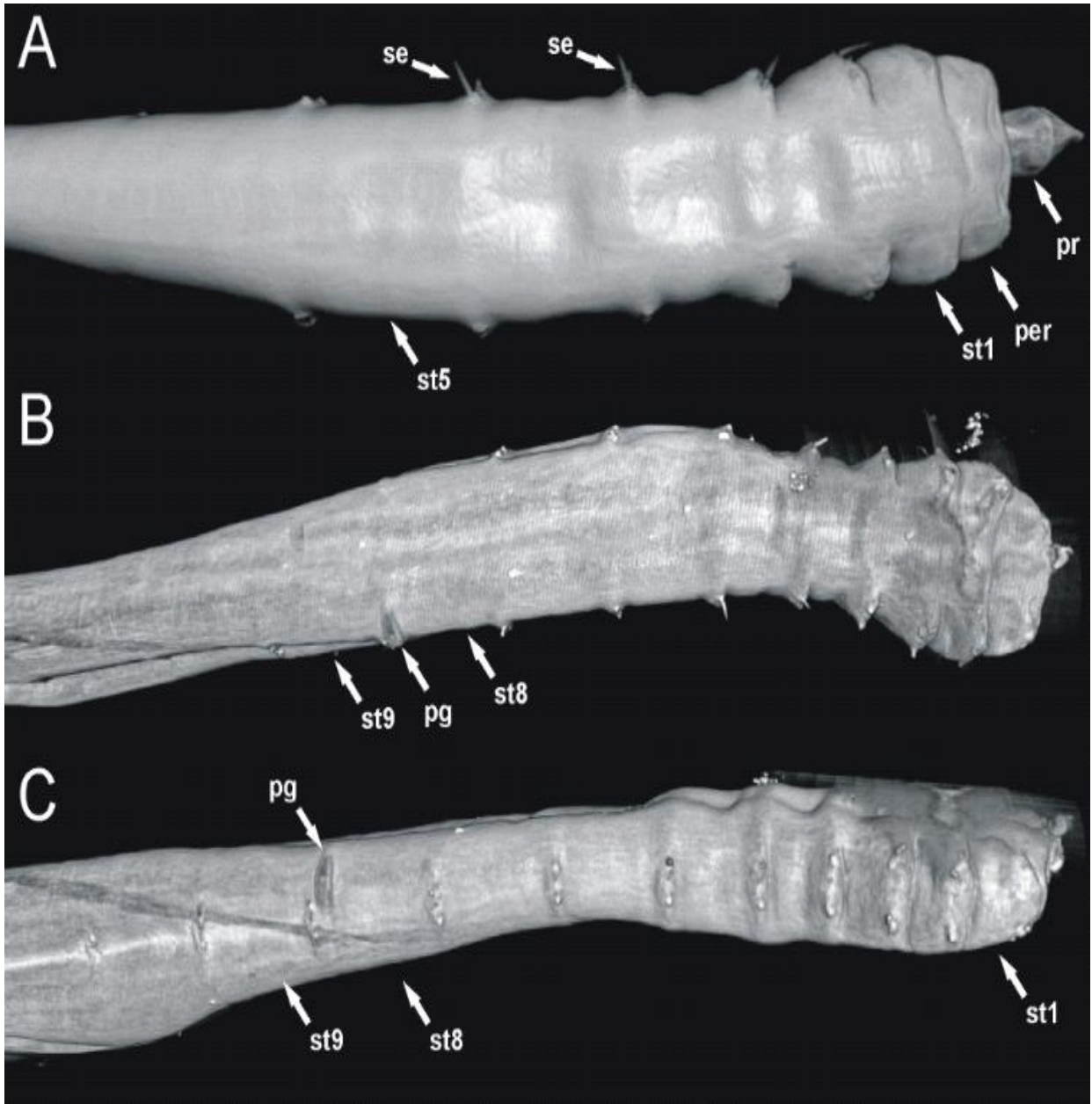
continúa hacia la parte posterior peristomial por unos largos lóbulos cerebrales (Figuras 6A, 6B). Debido a la típica retracción del prostomio en el interior del peristomio en fauveliósidos, la disposición cerebral es aparentemente peristomial, e incluso en ocasiones parece localizarse en el primer segmento setífero.

Existen unos potentes paquetes musculares que conectan directamente el cerebro y la cara interna del tegumento prostomial, los cuales se encargan de la anteriormente mencionada acción de retracción (Figura 6A).

#### **4.2.6.– Sistema reproductor.**

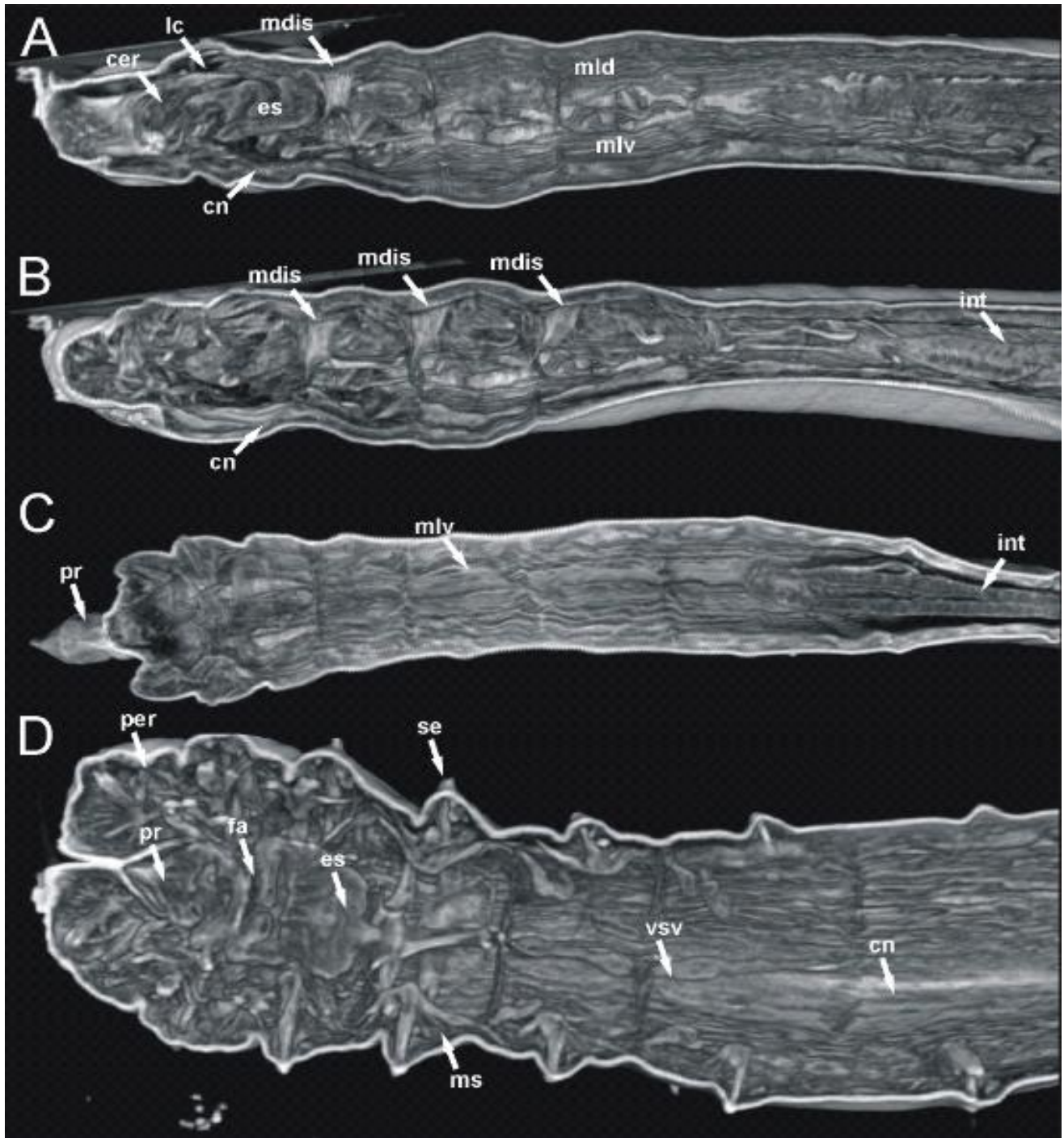
En Poliquetos, el aparato reproductor se encuentra muy simplificado si lo comparamos con el de los Clitelados, en los cuales está altamente regionalizado y siempre ubicado en una posición específica en el cuerpo, hasta el punto de ser empleado como un carácter taxonómico de alta relevancia. Sin embargo, en los Poliquetos las gónadas son simples masas de gametos en desarrollo asociadas a la pared peritoneal y de ubicación poco definida. Tras las fases iniciales del desarrollo de los gametos en el interior gonadal, éstos continúan su desarrollo flotando en el líquido celomático a la espera de ser evacuados bien por orificios corporales especiales (gonoporos), bien aprovechando orificios de otra naturaleza (e.g. nefridioporos) o bien a través de la rotura de la pared corporal.

El estudio micro-CT de los tres ejemplares de *Laubieriopsis* no ha revelado la presencia de gónadas, pero sí la existencia de grandes células sexuales femeninas (ovocitos) flotando en el espacio celomático y localizados especialmente a partir de la región media corporal (Figuras 8D, 9A, 9B, 9D, 10B) aunque en algún caso pueden llegar a estar presentes cerca de la región anterior (Figura 8A).



**Figura 4.** Imágenes en 3D de *L. cabiochi* obtenidas con CTVox. A. vista dorsal de la región anterior del ejemplar teñido con PTA; B y C. Vista dorsal y lateral derecha del ejemplar sin teñir.

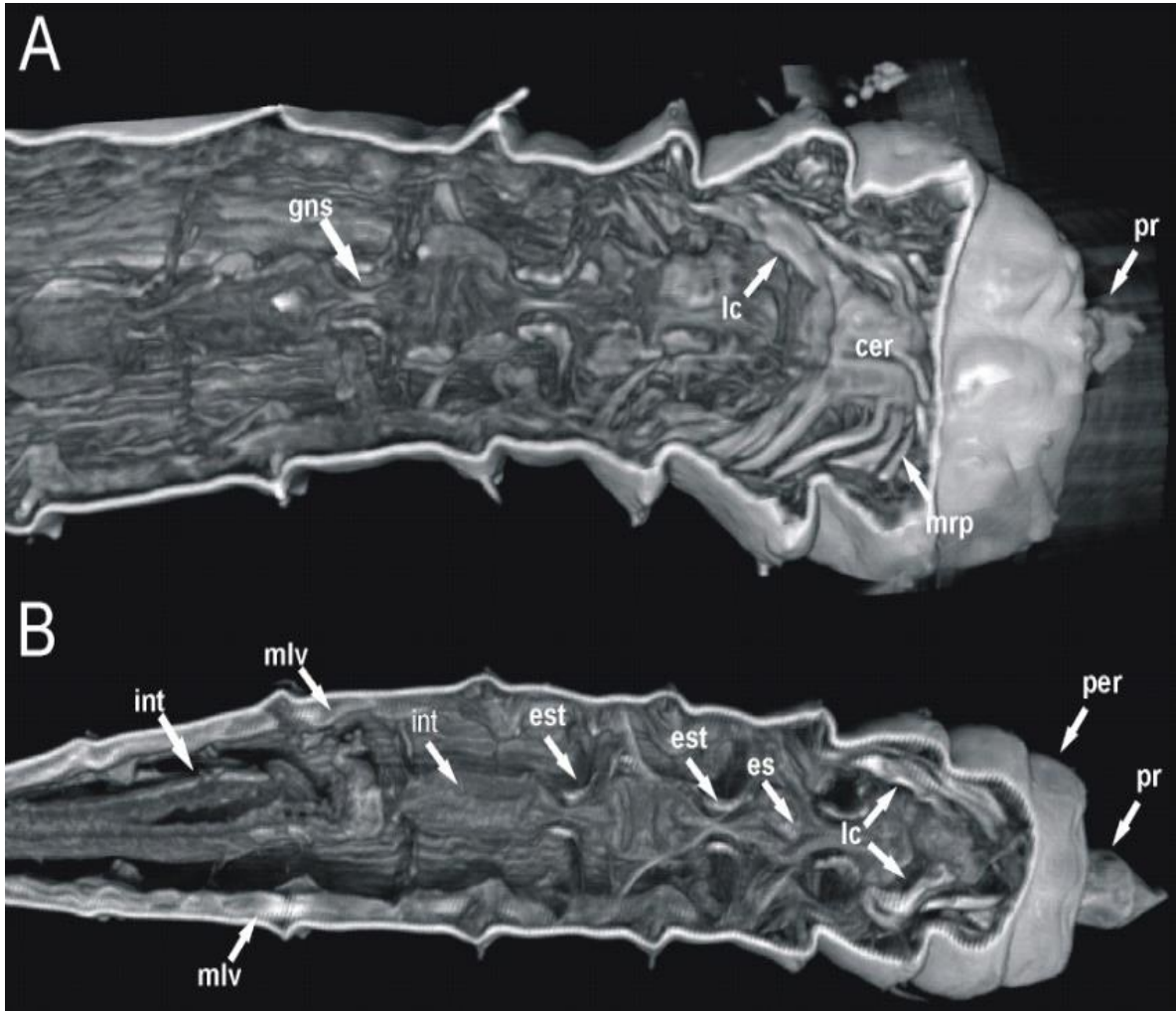
Abreviaturas: pg (papila genital); pr (prostomio); per (peristomimo); se (sedas); st (setígero).



**Figura 5.** Imagen en 3D de *L. cabiochi* obtenida con CTVox (A); teñido con PTA (B).

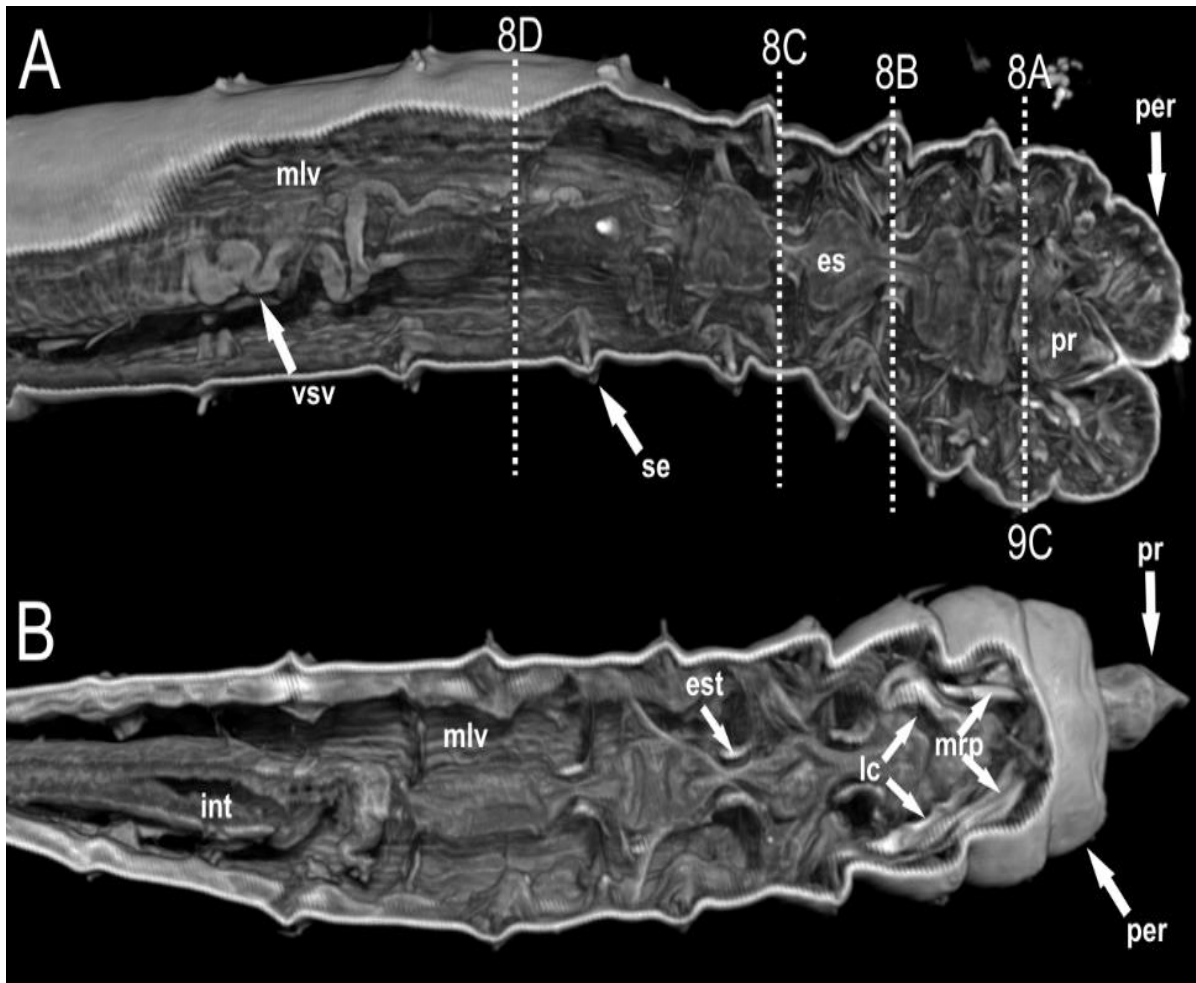
A: Corte sagital (sin teñir); B: Corte sagital (sin teñir); C: Corte frontal (teñido con PTA) y D: Corte frontal (sin teñir).

Abreviaturas: cer (cerebro); cn (cordón nervioso); es (esófago); fa (faringe); int (intestino); lc (lóbulo cerebral); mdis (músculo disepimento); mld (musculatura longitudinal dorsal); mlv (musculatura longitudinal ventral); ms (musculatura setígera); per (peristomio); pr (prostomio); se (seda); vsv (vaso sanguíneo ventral).



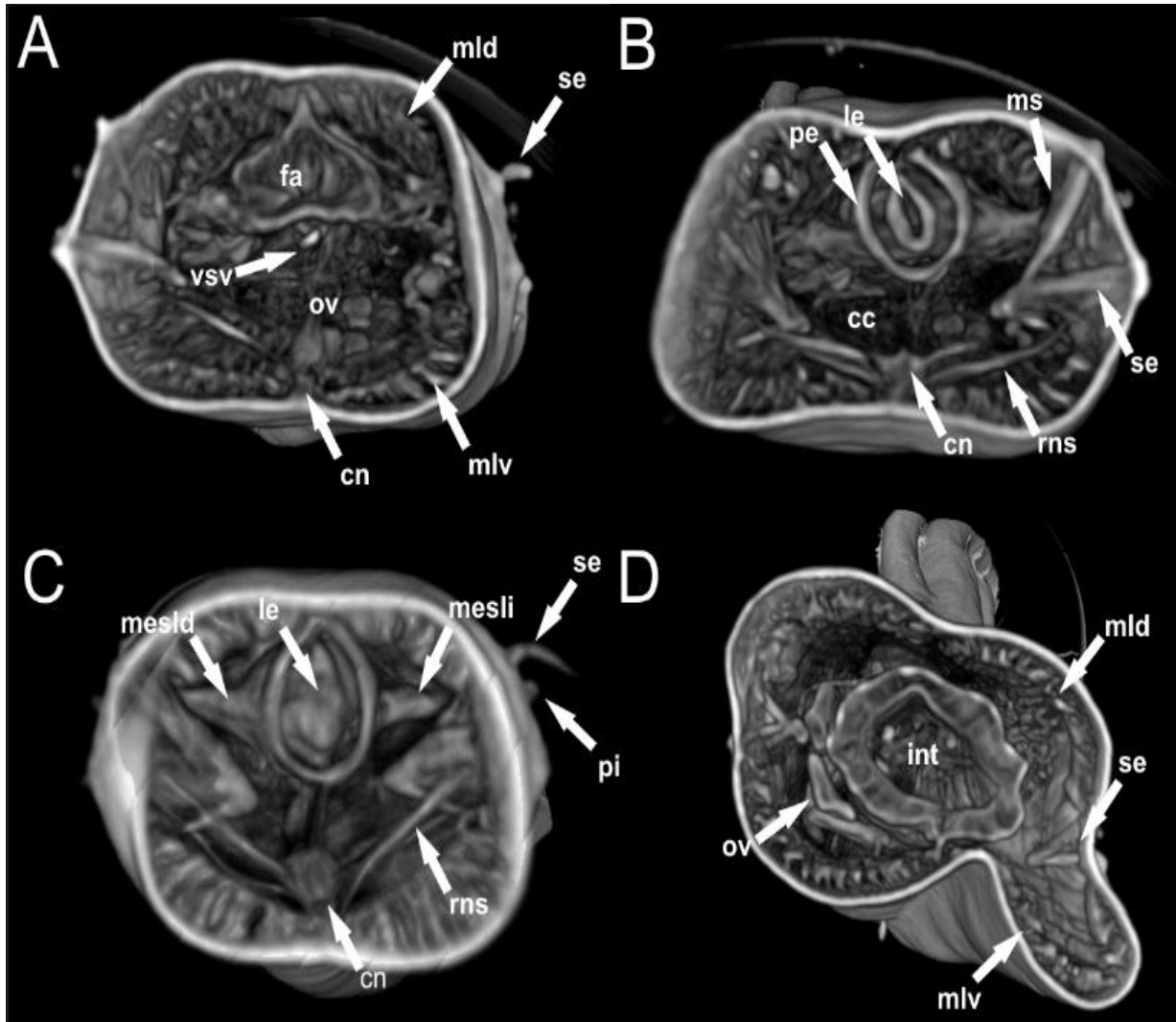
**Figura 6.** Imagen en 3D de *L. cabiochi*. Dos cortes frontales mostrando diferentes aspectos del sistema nervioso y digestivo.

Abreviaturas: cer (cerebro); es (esófago); est (estrangulamiento esofágico); int (intestino); gn s (ganglio nervioso segmentario); lc (lóbulo cerebral); mlv (musculatura longitudinal ventral); mrp (músculo retractor del prostomio); per (peristomio); pr (prostomio).



**Figura 7.** Imagen en 3D de *L. cabiochi*. Dos cortes frontales mostrando diferentes aspectos del sistema nervioso y digestivo. Líneas discontinuas en A mostrando la ubicación de los cortes transversales en la figura 8 y 9.

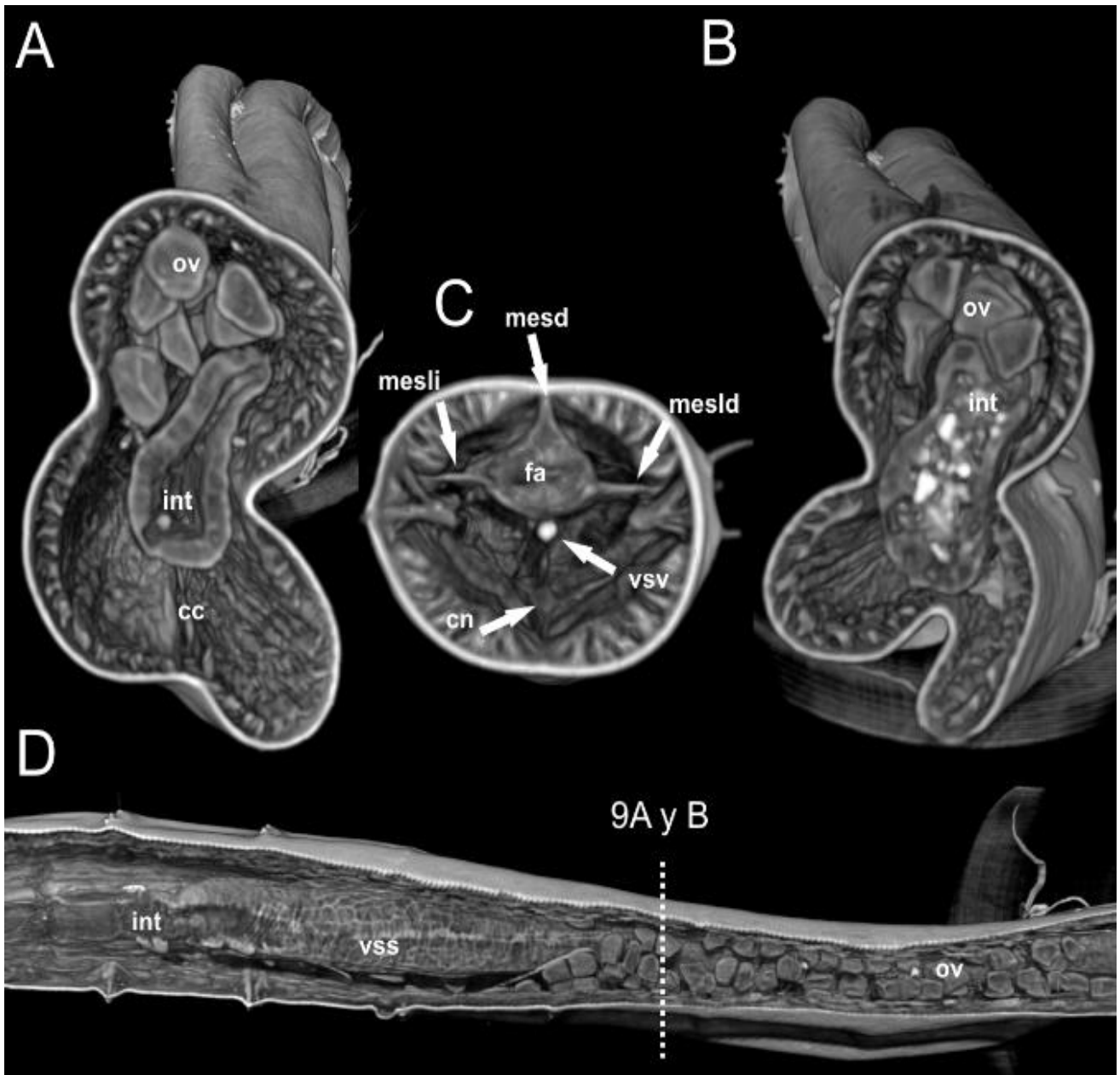
Abreviaturas: es (esófago); est (estrangulamiento esofágico); int (intestino); lc (lóbulo cerebral); mlv (musculatura longitudinal ventral); mrp (músculo retractor del prostomio); p (prostomio); per (peristomio); se (seda); vsv (vaso sanguíneo ventral).



**Figura 8.** Imagen en 3D de *L. cabiochi*. Cuatro cortes transversales mostrando diferentes aspectos de la anatomía interna de la región anterior del cuerpo. A. A nivel faríngeo; B. A nivel esofágico y C. A nivel de una estrangulación esofágica; D. A nivel del inicio del intestino.

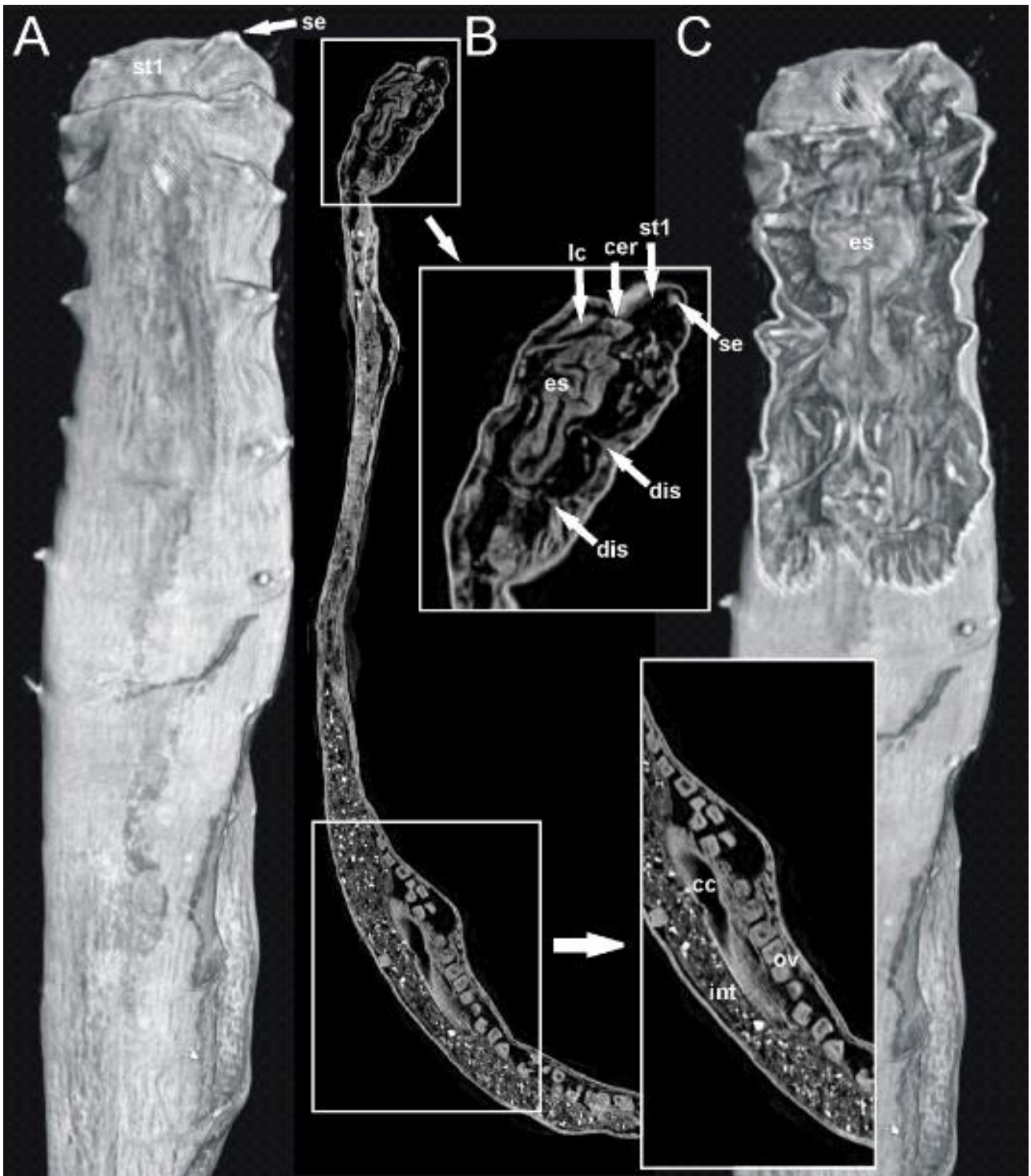
Abreviaturas: cc (cavidad celomática); cn (cadena nerviosa); fa (faringe); int (intestino); le (luz esofágica); mesld (mesenterio lateral derecho); mesli (mesenterio lateral izquierdo); mld (musculatura longitudinal dorsal); mlv (musculatura longitudinal ventral); ms (musculatura setígera); ov (ovocito); pe (pared esofágica); pi (papila interramal); rns (rama nerviosa segmentaria); se (seda); vsv (vaso sanguíneo ventral).



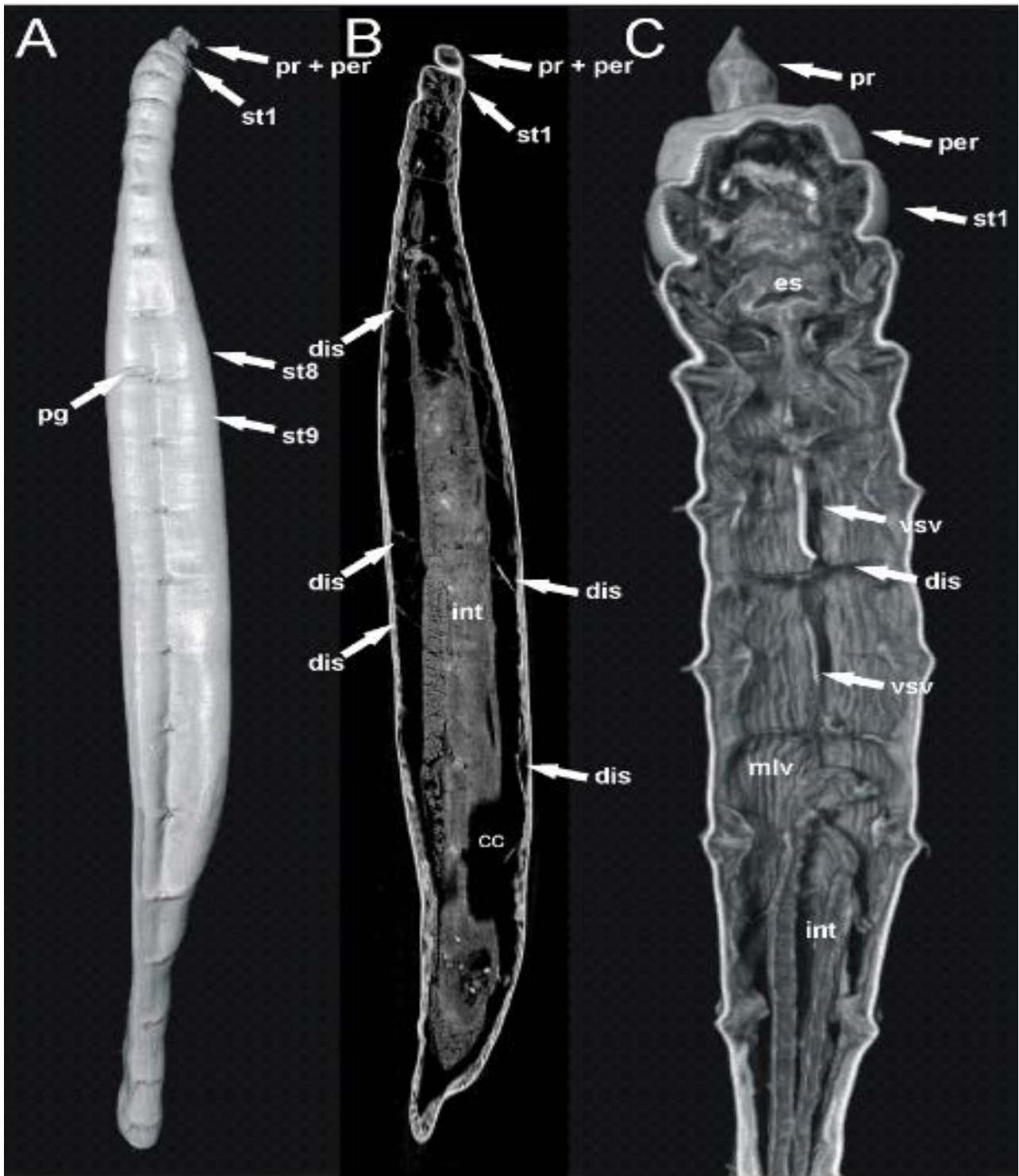


**Figura 9.** Imagen en 3D de *L. cabiochi*. Tres cortes transvesales a nivel del intestino (A y C) y de la faringe (B) y un corte sagital a nivel de la región corporal media (D) mostrando diferentes aspectos de la anatomía interna.

Abreviaturas: cc (cavidad celomática); cn (cadena nerviosa); es (esófago); fa (faringe); int (intestino); mesd (mesenterio dorsal); mesld (mesenterio lateral derecho); mesli (mesenterio lateral izquierdo); ov (ovocitos); vss (vasos sanguíneos segmentarios); vsv (vaso sanguíneo ventral).



**Figura 10.** Imágenes en 3D (A y C) y 2D (B) de *L. cabiochi* teñido con iodina, mostrando distintos elementos de la anatomía interna corporal. Abreviaturas: cc (cavidad celomática); cer (cerebro); dis (diseipimento); es (esófago); int (intestino); lc (lóbulo cerebral); se (seda); st (setígero); ov (ovocito).



**Figura 11.** Imágenes en 3D (A y C) y 2D (B) de *L. cabiochi* teñido con PTA, mostrando distintos elementos de la anatomía interna corporal.

Abreviaturas: cc (cavidad celomática); dis (diseipimento); es (esófago); int (intestino); mlv (musculatura longitudinal ventral); per (peristomio); pg (papila genital); pr (prostomio); st (setígero); vsv (vaso sanguíneo ventral).

## 5.- Discusión.

En este trabajo exploramos la técnica del micro-CT como una alternativa al proceso histológico tradicional ya que el micro-CT es una técnica sencilla, rápida y no destructiva, que complementa y, en algunas circunstancias, puede llegar a sustituir a la reconstrucción tradicional a partir de muestras histológicas. Esta técnica es sin duda mucho más rápida ya que precisa de un tratamiento mucho más simple de las muestras, pero presenta el problema de que los órganos que poseen densidades similares son difíciles de distinguir entre sí debido a la falta de detalle celular.

El examen de los tres ejemplares reconstruidos en 3D mostró estructuras anatómicas y morfológicas visibles que pueden ser interpretadas de manera fácil, lo que proporciona la misma información que el espécimen físico.

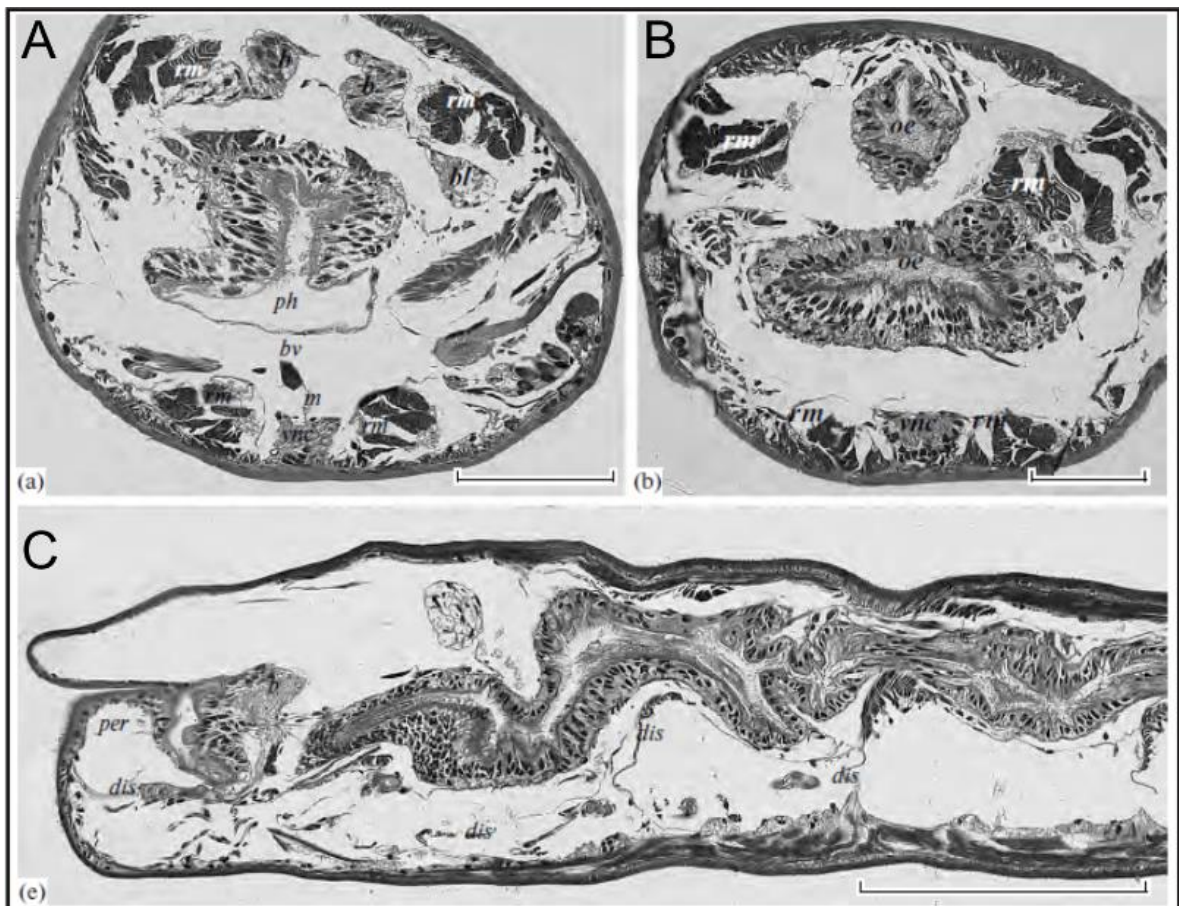
Trabajos realizados con anterioridad a esta memoria como son lo de ZHADAN Y ATROSHCHENKO (2010, 2012) y ZHADAN Y SALAZAR-VALLEJO (2014) abordaron ya el estudio de la anatomía externa e interna de los laubieriopsidos. En ellos se muestran las características de los ejemplares descritas anteriormente con la diferencia de que en estos casos se realizó el análisis mediante técnicas histológicas tradicionales, ofreciendo unas imágenes finales de gran resolución y que sirvieron de apoyo para comparar con las obtenidas por nosotros mediante microtomografía.

Las disecciones virtuales, por otro lado, nos permitieron evaluar las estructuras internas sin tener que destruir el ejemplar. Además la técnica del micro-CT permite observar también la posición natural de los órganos internos, mientras que cuando se disecciona, las relaciones espaciales de los órganos se pueden llegar a modificar.

Hay que tener en cuenta que el ejemplar que mostró más detalles fue aquel no teñido y deshidratado en HMDS, pero otros muchos autores también obtuvieron gran resolución al tratar las muestras con glicerol, acetona o tetróxido de osmio (ver ZHADAN Y ATROSHCHENKO, 2010).

En relación al análisis de la anatomía interna de la especie, comparando las imágenes obtenidas por nosotros frente a las publicadas por ZHADAN & ATROSHCHENKO (2010, 2012) y ZHADAN & SALAZAR-VALLEJO (2014) (Figura 12), se observa que las imágenes obtenidas con el micro-CT muestran un alto grado de concordancia con las obtenidas mediante las técnicas clásicas. Si bien el grado de detalle de las imágenes obtenidas con micro-CT a nivel histológico y citológico es claramente menor, la práctica totalidad de las estructuras internas corporales han sido localizadas.

Así, pocos aspectos anatómicos revelados por los trabajos anteriormente citados han pasado desapercibidos al micro-CT, cabiendo citar solamente el caso de la regionalización dorso-ventral de la región faríngea (comparar figura 8A con 12A) así como la presencia de unas “papilas epidérmicas” (ver figuras 4D y 4F en ZHADAN Y ATROSHCHENKO, 2010) localizadas bajo las papilas interramales de los parápodos (Figura 8C). De cualquier manera, ambas estructuras es muy probable que sean observadas tras un estudio más detallado del material así como el análisis de nuevos ejemplares.



**Figura 12.** Imágenes al microscopio electrónico de transmisión de *Laubieriosis* sp, dos cortes transversales (A y B) a nivel de la faringe y esófago respectivamente, y un corte sagital (C). Sacado de ZHADAN Y ATROSHCHENKO (2010).

Abreviaturas: bv (vaso sanguíneo); dis (diseipimento); m (mesenterio); oe (esófago); per (peristomio); ph (faringe); rm (músculos retractores del prostomio); scn (sistema nervioso central).

Por otro lado, y en lo relativo a la técnica, decir que en trabajos de histología clásica, para la obtención de buenos cortes es imprescindible un alto grado de experiencia y habilidad en el manejo del micrótopo y en la manipulación de los cortes. Y esto solo se consigue tras un período más o menos largo de aprendizaje, en muchas ocasiones perdiéndose parte del material.

En el caso del micro-CT estos problemas no se presentan pues en ningún momento se lleva a cabo disección ni cortes histológicos, con lo que una vez tratados los ejemplares como ya se ha explicado, se está en disposición de realizar una primera evaluación anatómica con gran rapidez.

En ese sentido, el micro-CT presenta una gran ventaja frente a los estudios clásicos ya que deja intacto el material original, y de esta manera los caracteres pueden ser estudiados posteriormente en múltiples ocasiones sin daño alguno. Además, el estudio de los datos recogidos tras el escaneo permiten llevarlo a cabo en tres dimensiones, mientras que con el material diseccionado debe ser realizado en dos dimensiones y además implica su necesaria desintegración para su montaje en portaobjetos y su observación bajo el microscopio.

En histología clásica la reconstrucción de la estructura o la visualización del interior de la muestra lleva mucho tiempo y puede verse comprometida por los artefactos causados cuando se procesa la muestra (arrugas, contracción de las secciones). En los estudios con micro-CT el software permite al investigador realizar muchas tareas de manera virtual, por lo que su uso evita muchas de las cuestiones que restringen el uso de material de colecciones de museos y abre el camino para estudios anatómicos mucho más detallados.

El problema principal de los ejemplares que presentan un cuerpo blando (como los poliquetos) es que casi no absorben rayos X y por lo tanto las imágenes resultantes tienen una resolución relativamente baja. Las estructuras duras pueden ser visualizadas sin problema, pero otras características internas como pueden ser los nervios, músculos y vasos sanguíneos pueden ser más difíciles de diferenciar e identificar.

Es importante tener en cuenta el tipo de tinción a emplear, la mayoría de tinciones que se utilizan en microtomografía no son específicas, a diferencia de las tinciones histológicas que cuentan con una larga historia de estudio y muchas han sido diseñadas para teñir tejidos o células específicas.

La mayoría de tinciones utilizadas en la técnica de micro-CT se utilizan para mejorar el contraste en lugar de distinguir entre los tejidos. Además tienen que ser capaces de penetrar en la muestra y ser de un peso molecular suficiente para absorber eficazmente los rayos X y las muestras deshidratadas en alcohol tienen menos permeabilidad que el material fresco (PATERSON *et al.*, 2014).

En el caso del estudio que se ha realizado se pudo observar que las tinciones con Iodina y PTA mostraron diferentes afinidades por los tejidos y acentuaron diferentes características tanto morfológicas como anatómicas. Así, la tinción de Iodina tiñe los tejidos blandos y se une fuertemente a las estructuras calcificadas y polisacáridos, se une especialmente a los tejidos epidérmicos (cutícula), aparato mandibular y ciertos tipos de quetas (FAULWETTER *et al.*, 2013).

El PTA, se une a ciertas proteínas (fibrina y colágeno) y tiñe la epidermis (mucho más fuerte que el Yodo) y fibras musculares (FAULWETTER *et al.*, 2013).

La tinción de tejidos debe utilizarse con cuidado, especialmente si las muestras están destinadas a estudios generales y/o si el material es valioso. El impacto que el método tiene sobre cada muestra es casi imposible de predecir debido a la gran diversidad de tipos de tejidos, componentes químicos y combinaciones de materiales que existen en los invertebrados. Sin embargo, en un estudio realizado por FAULWETTER *et al.* (2013), se observó que la radiación derivada del estudio de las muestras mediante micro-CT no afectó aparentemente a la identidad molecular de las muestras, y no se observó ningún tipo de daño en el rRNA 16S, ni parece haber causado ninguna mutación en el material molecular ya que el DNA de las muestras es extraído y amplificado sin ningún problema. Lo que no se puede asegurar es el efecto que pueden tener los colorantes a nivel molecular.

Los datos tridimensionales pueden difundirse de diversas maneras y los conjuntos de datos pueden llegar fácilmente a ocupar un tamaño de varios gigabytes, lo que plantea nuevos retos en materia de gestión, archivo, copias de seguridad y el almacenamiento de datos. En la actualidad la comunidad científica carece de infraestructuras, normas y políticas que permiten el acceso a los datos 3D (FAULWETTER *et al.*, 2013). Sin embargo, hoy en día se está creando un laboratorio virtual de acceso abierto, donde los datos que aparecen recogidos tienen en cuenta el tipo de procedimiento que sufrió cada muestra (fijación, escaneado, reconstrucción, etc). Este proyecto virtual recibe el nombre de Micro-CT<sub>lab.</sub> (KEKLIKOGLOU *et al.*, 2016).

Esta posibilidad ofrece una amplia gama de nuevas oportunidades de investigación y acelerarán significativamente el acceso a la información morfológica, lo que ayudará a superar uno de los principales cuellos de botella en la investigación sistemática y taxonomía que es la disponibilidad continua de material “tipo” a todos los usuarios de forma simultánea y permitirá la producción masiva de los datos a los que se podrá acceder desde un ordenador.

En la actualidad, aunque las muestras virtuales en la mayoría de los casos no pueden y no deben reemplazar el material de tipo físico, a menudo la información deseada se puede obtener a partir de una representación virtual, que complementa significativamente al estudio histológico, ya que, el examen de los ejemplares en su posición natural dentro del organismo permite a los investigadores evaluar su verdadera forma y también inferir la funcionalidad de las estructuras morfológicas o incluso descubrir nuevos caracteres diagnósticos.

El estado actual de la técnica sugiere que el micro-CT es una herramienta útil para estudios anatómicos, en particular para proyectos comparativos a gran escala y también para aislar áreas específicas o estructuras internas para estudios posteriores.

A pesar de las ventajas obvias que presentan los estudios en 3D, los obstáculos técnicos hacen que el método no sea utilizado (limitado y caro), y aparte se necesitan habilidades técnicas especiales para producir y procesar los datos, e incluso con esos conocimientos, la creación de la base de datos final (el cibertipo, término acuñado por Faulwetter) sigue siendo un proceso muy lento.

De acuerdo con FAULWETTER *et al.* (2013), los conjuntos de datos que están destinadas a servir como cibertipo deben cumplir al menos tres supuestos básicos: debe proporcionar información morfológica y anatómica con la precisión y fiabilidad proporcionada por el material de tipo físico, debe estar relacionado con el material original (no debe verse afectada la integridad morfológica, anatómica y molecular del espécimen original) y tiene que ser recuperable y de acceso libre.

Los museos de historia natural, que actualmente administran el patrimonio de colecciones de biodiversidad a nivel mundial, tendrán que asumir la tarea de desarrollar estándares para la creación adecuada de cibertipos. Esto incluirá la búsqueda de formas de almacenar y documentar estos tipos de datos tan voluminosos, hacerlos recuperables y asegurar su copia de seguridad y archivado.



Por lo tanto, el potencial de los estudios anatómicos nunca han sido tan grandes, y las técnicas de imágenes tridimensionales tienen el potencial para dar un fuerte impulso a los estudios de poliquetos y allanar el camino para nuevos descubrimientos (PATERSON *et al.*, 2014).

## **6.- Conclusiones.**

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el micro-CT es una técnica muy útil en el estudio de poliquetos, ya que nos permite visualizar las estructuras blandas del animal y poder analizar la anatomía externa e interna sin necesidad de destruir el material.

El problema de esta metodología es que no podemos distinguir bien las estructuras porque no se han desarrollado todavía tinciones específicas. Pese a esto, la microtomografía se presenta como un avance tecnológico muy relevante a la hora de complementar los estudios histológicos principalmente por no deteriorar la integridad del espécimen, por ser una técnica rápida y de fácil aprendizaje y porque nos permite visualizar la posición de las características de la muestra sin disección.

## 7.- Bibliografía.

- Bruker Method note (2016). Chemical drying of specimens to enhance contrast. 8 pp.
- Golding, R. y Jones, A. (2007). Micro-CT as a novel technique for 3D reconstruction of molluscan anatomy. *Molluscan Research*, 27(3), 123–128.
- Faulwetter, S., Vasileiadou, A., Kouratoras, M., Dailianis T. y Arvanitidis, C. (2013). Micro-computed tomography: Introducing new dimensions to taxonomy. *Zookeys*, 263, 1–45.
- Faulwetter, S., Dailianis T., Vasileiadou, A. y Arvanitidis, C. (2013). Contrast enhancing techniques for the application of micro-CT in marine biodiversity studies. *Microscopy and analysis*, 27(2): S4–S7.
- Faulwetter, S., Dailianis T., Vasileiadou, A. y Arvanitidis, C. (2014). Can micro-Ct become an essential tool for the 21st century taxonomist? An evaluation using marine polychaetes. *Microscopy and analysis*, 28(2): S9–S11.
- Keklikoglou, K., Faulwetter, S., Chatzinikolaou, E., Michalakis, N., Filiopoulou, I., Minadakis, N., Panteri, E., Perantinos, G., Gougousis, A. y Arvanitidis, C. (2016). A new web-based virtual lab of biological specimens using micro-computed tomography. *Bruker Users Meeting 2016*, 293–297.
- López, E. (2011). Occurrence of *Fauveliopsis glabra* (Fauveliopsidae: Annelida: Polychaeta) in a rhodolith bed off the south-eastern coast of Spain (western Mediterranean Sea). *Marine Biodiversity Records*, 4, 1–4.
- Magalhaes, W., Bailey-Brock, J. y Rizzo, A. (2014). *Lauberiopsis petersenae* n. sp. and *L. cf. cabiochi* (Amoureux, 1982) (Polychaeta: Fauveliopsidae) from dredge disposal sites off Honolulu, Hawaii. *Zootaxa*, 3893(1), 143–150.
- Paterson, G., Sykes, D., Faulwetter, S., Merk, R., Ahmed, F., Hawkins, L., Dinley, J., Ball, A. y Arvanitidis, C. (2014). The pros and cons of using micro-computed tomography in gross and micro-anatomical assessments of polychaetous annelids. *Memoirs of Museum Victoria*, 71, 237–246.
- Rouse, G. W. (2000). Family Fauveliopsidae. Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis. Fauna of Australia. P. L. Beesley, G. J. B. Ross and C. J. Glasby. Melbourne, CSIRO Publishing. 4A. Polychaeta, Myzostomia, Pogonophora, Echiura, Sipuncula, 220–222.
- Thiel, D., Purschke, G. y Böggemann, M. (2011). Abyssal Fauveliopsidae (Annelida) from the South East Atlantic. *Journal of Natural History*, 45, 923–937.

- Zhadan, A. y Atroshchenko, M. (2010). The Morphology of *Laubieriopsis* sp. (Polychaeta, Fauveliopsidae) and the Position of Fauveliopsids in the Polychaete System. *Biology Bulletin*, 37(9), 876–885.
- Zhadan, A. y Atroshchenko, M. (2012). A new species of Fauveliopsidae (Annelida) from the North Sea. *Zookeys*, 181, 1–10.
- Zhadan, A. y Salazar-Vallejo, S. (2014). Fauveliopsidae Hartman, 1971. En *Handbook of Zoology Online. Annelida. Polychaetes*, 1–11.