

**NUEVOS DATOS EMBRIOLÓGICOS SOBRE LA
EVOLUCIÓN DE ELEMENTOS BASIPODIALES EN
MAMÍFEROS**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Macarena Ruiz Flores

Enero, 2018

**Director de Tesis Dr:
Alexander Vargas Milne**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Macarena Ruiz Flores

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:
Dr. Alexander Vargas

Co-Director de Tesis
Dr. Rodrigo Suarez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals

Dr. Michel Sallaberry

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento de los proyectos ANILLO ACT-172099 y FONDECYT 1150906

From so simple a beginning,
endless forms most beautiful
have been, and are being,
evolved.

Charles Darwin

Laws in biology are few, and those dared
to be articulated are most certain to
be broken by some organism.

Sean B. Carroll

Love with your heart,
use your head for everything else.

Captain Desillusion



Nacida en Santiago de Chile, el año 2009 entra, a ciegas (como todos) a la Licenciatura en Ciencias mención Biología en la Universidad de Chile. A pesar de eso decide ingresar al Magister en Ciencias Biológicas de la misma universidad el año 2016, parece que eso sí salió bien. En el futuro nada debería malir sal.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por siempre preocuparse de mí, y no interferir en mis decisiones, tanto.

Al Dante, por siempre preguntar lo que no sé, pero sobre todo por ser mi compañero todo este tiempo.

Al Rayo y todos los que ahí viven, porque enseñan de todo, incluso biología, te hacen sentir en casa y porque la única forma de soportar que no resulte el experimento la 20ava vez, es que los almuerzos siempre parezcan almuerzo de fin de semana.

Al universo, por no destruir el campus cada vez que lo deseé camino a dar una prueba.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Animales de experimentación.....	18
Inmunofluorescencia whole-mount.....	19
Cortes histológicos.....	21
Tinción de esqueleto whole-mount.....	22
Tinción de cartílago.....	22
Tinción de hueso.....	22
RESULTADOS.....	24
Desarrollo del carpo.....	24
Desarrollo del tarso	28
Tarsales distales.....	28
Astrágalo y Calcáneo.....	29
Formación de centros de osificación.....	32
DISCUSIÓN.....	38
Fusión de elementos distales del basipodio.....	40
Astrágalo y Calcáneo.....	43
Fusión de centros de osificación.....	49
CONCLUSIÓN.....	52
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema de tarsos de tetrápodos	6
FIGURA 2.	Esquema carpo y tarso de synapsidos	10
FIGURA 3.	Filogenia de synapsidos	12
FIGURA 4.	Esquema sobreposición Astrágalo/Calcáneo	13
FIGURA 5.	Serie de desarrollo embrionario <i>M.musculus</i>	19
FIGURA 6.	Serie desarrollo del Carpo	26
FIGURA 7.	Serie desarrollo del Carpo, cortes	27
FIGURA 8.	Serie desarrollo del Tarso	30
FIGURA 9.	Serie desarrollo del Tarso, cortes	31
FIGURA 10.	Serie de osificación embrionaria	33
FIGURA 11.	Serie de osificación post-natal	35
FIGURA 12.	Carpo y Tarso adulto	37
FIGURA 13.	Esquema de carpos	42
FIGURA 14.	Esquema de tarsos	47
FIGURA 15.	Esquema de las regiones del astrágalo	49
FIGURA 16.	Esquema fusión de centros de osificación	50

RESUMEN

La condición basal para synapsida es tener un astrágalo que en su cara posterior articula con la cara anterior del calcáneo, ambos elementos en el mismo plano del eje dorso-vental. Además, presentan un elemento basipodial distal por cada dedo, muy similar a la estructura que encontramos en la mayoría de los reptiles actuales. Cuando entramos a la rama de los cynodontes, uno de los cambios que podemos observar en el basipodio es la disminución de elementos distales de 5 (uno por cada dedo) a 4. En la literatura siempre se describe este cambio como la fusión del elemento distal correspondiente con el dedo 5 con el correspondiente al dedo 4, en el caso de la mano: fusión del carpal distal 4 y el 5 (CD 4+5) formando el unciforme; en el caso de la pata: fusión del tarsal distal 4 y el 5 (TD 4+5) formando el cuboide. En terápsidos tempranos, el metatarso que corresponde al quinto dedo no se articula con ningún elemento del tarso, parece estar "flotando", hasta Theria, en donde se asocia al cuboide o al metatarso del dedo 4. También, a partir de Therias troncales, se observa consistentemente la superposición de una pequeña porción del astrágalo sobre el calcáneo, condición que se incrementa en

Metatheria y aún más en Placentarios, donde encontramos que en el eje dorso-ventral la superposición del astrágalo sobre el calcáneo es casi completa, es decir, el contacto ocurre entre la cara ventral del astrágalo y la cara dorsal del calcáneo.

En este trabajo se encuentra que al mirar el desarrollo del esqueleto del carpo y el tarso de *Mus musculus*, utilizando métodos como inmunofluorescencia whole-mount, se observan cambios similares a los recién descritos en la filogenia, como el cambio de posición entre el astrágalo y calcáneo, observando en estadios tempranos (13,5dpc) que tienen una posición relativa similar a la de reptiles y que luego en el desarrollo se superponen, pasando por estadios similares al de Therias troncales, hasta finalmente llegar a la conformación de Placentarios. Con respecto al carpo se observa que se forman 5 carpales distales y que efectivamente durante el desarrollo el cuarto y quinto se fusionan, formando un solo elemento final: el unciforme. En cambio, durante el desarrollo del tarso nunca se forma un quinto tarsal distal y, por lo tanto, el cuboide no correspondería a una fusión, sino que es el tarsal distal 4 solo. También se observa que el metatarso del dedo 5 se encuentra inicialmente desalineado como en terápsidos basales, y luego se asocia, en parte al tarsal distal 4 (aunque no de la misma manera que en synapsidos basales) y en parte al metatarso del dedo 4.

ABSTRACT

The basal synapsid condition is to have an astragalus with a posterior face that contacts with the anterior calcaneum face, both elements at the same level of the dorso-ventral axis. They also present one distal basipodial element for each digit, a similar structure to what is found in reptiles. When looking at the cynodont branch, one of the changes in the basipodial structure is the reduction of basipodial distal elements from 5 (one for each digit) to 4. In the literature this change is always explained as the fusion of the distal element corresponding to the fifth digit and the corresponding to the fourth one, when looking at the hand: fusion of the 4th and 5th distal carpal forms up the unciform; When looking at the foot: fusion of the 4^t and 5th distal tarsals form the cuboid. In early therapsids, metatarsal 5 does not articulate with the tarsus and has an "offset" appearance. In therians, it articulates with the cuboid or the metatarsal 4. Also, since stem Therians the overlap of a small portion of the astragalus over the calcaneum is consistently observed. This condition increases in Metatherians and even more in Placental mammals where the overlap is almost complete which means that the

contact occurs between the ventral face of the astragalus and the calcaneums's dorsal face.

This work shows that when looking at the skeletal development of the carpus and tarsus in *Mus musculus* using whole-mount immunofluorescence, among other techniques, is possible to observe changes that are similar to those described in the phylogeny, as is the change of the astragalus-calcaneus relative position. Looking at early stages (13,5dpc) we see a structure similar to reptiles and that later in development astragalus and calcaneus overlap, passing through stages similar to stem Therians and finally arriving to the Placental mammal conformation. About the carpus it's observed that 5 distal carpals form and later in development the fourth and fifth fusion, forming up one final element: the unciform. On the other hand, what happens in the tarsus is that a fifth distal tarsal never forms, therefore, the cuboid would not be a fusion but only the fourth distal tarsal. Metatarsal 5 is first offset, as in basal therapsids, and then articulates with the cuboid, but also with metatarsal 4.

INTRODUCCIÓN

El salir del agua para habitar la tierra es un cambio que ha ocurrido muchas veces y en diferentes grupos de seres vivos durante la evolución de la vida en la tierra. Este cambio es acompañado no solo por un cambio conductual, sino que también por un cambio significativo en la estructura de los organismos. En el grupo de los vertebrados, el pez ancestral del cual se originó la extremidad de los tetrápodos era capaz de producir elementos esqueléticos óseos discretos, pero no el autopodio (huesos de la muñeca y tobillo, además de los dígitos), lo cual es considerado la innovación clave en la evolución de la extremidad de tetrápodos (Newman 2005). Cuando observamos este evento de cambio de ambiente, específicamente en el grupo de los tetrápodos, notamos que, una vez en la tierra, son las extremidades las principales encargadas de soportar el peso del cuerpo durante la locomoción y estructuralmente podemos ver que a medida que el organismo se hace más terrestre, como en el paso de anfibios a amniotas, la cantidad de elementos óseos que se encuentran en el basipodio disminuye (Fig.1) (O'keefe 2006), presumiblemente relacionado con el aportar una mayor estabilidad en las extremidades delanteras y traseras.

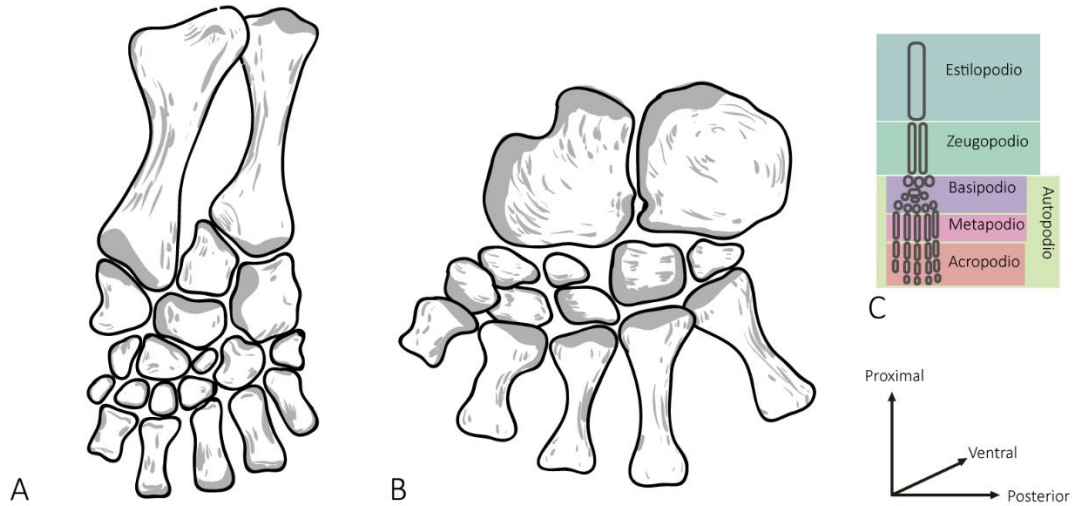


Figura 1. Esquema de tarsos de tetrápodos. A) *Trematops milleri* (anfibio primitivo). B) *Ophiacodon retroversus* (pelycosaurio). Modificado de Lewis (1964). C) Esquema de las divisiones de la extremidad de tetrápodos.

En tetrápodos las extremidades y el proceso embriológico por el cual se forman es bastante conservado, sobre todo en las porciones más cercanas al cuerpo. La extremidad se va formando de proximal a distal y a lo largo de este eje podemos siempre distinguir los mismos elementos: la región más proximal, llamada Estilopodio, compuesta por un solo elemento, luego una región intermedia, llamada Zeugopodio, donde encontramos dos elementos y finalmente la región distal, llamada Autopodio (Gilbert, 2010). Esta última a su vez se subdivide en tres regiones: el basipodio (en donde se pueden distinguir 3 niveles de elementos: los más proximales, los centrales y los distales), el metapodio y, por último, el acropodio como la región más distal de la extremidad (Fig.1C).

Sabemos que la formación del esqueleto de las extremidades ocurre relativamente temprano en el desarrollo. El primordio de la extremidad se forma en la pared corporal y aquí el esqueleto comienza a formarse de proximal a distal a partir de condensaciones de células mesenquimales pre-cartilaginosas provenientes del mesodermo lateral. Este será el primer proceso de patterning del esqueleto (Goldring 2006). Luego ocurre la condrogénesis primaria, proceso en el cual estas células se diferencian a condrocitos, los cuales comienzan a secretar proteínas de matriz extracelular formando el templado de cartílago. Estos condrocitos, durante el proceso de condrogénesis secundaria, maduran y se diferencian posteriormente en condrocitos hipertróficos, que finalmente sufren apoptosis. El templado de cartílago es invadido por el sistema vascular, que además trae osteoblastos, y así el molde de cartílago pasa por el proceso de osificación endocondral, en el que finalmente ocurre la calcificación de la matriz extracelular formando los centros de osificación gracias a la deposición de calcio (Lai 2005).

Durante el proceso de condrogénesis primaria es cuando por primera vez se hace posible distinguir elementos relativamente discretos que pudiesen originar un elemento óseo. Las diferencias estructurales que podemos observar en las diversas especies se hacen conspicuas, en general, más tarde en el desarrollo y se deben al re-patterning de estas estructuras. Las transformaciones que pueden producir una reducción del número final de elementos ocurren de diferentes

formas: En primer lugar, puede ocurrir la no formación de la condensación de células mesenquimales o la fusión de dos condensaciones, usualmente este fenómeno ocurre con las condensaciones que se forman más tardíamente en la secuencia de desarrollo. Luego, a nivel de cartílago puede ocurrir la no osificación de un templado de cartílago o la fusión de dos templados, por lo tanto, disminuyendo la cantidad de elementos óseos cuando comparamos con los elementos cartilaginosos que observamos durante el desarrollo. Y finalmente puede ocurrir la fusión de centros de osificación (Müller 1991), en donde los centros de dos o más templados de cartílago, independientes pero colindantes crecen hasta contactarse, formando finalmente un único elemento óseo.

Volviendo a la disminución de elementos óseos en el basipodio que observamos en la filogenia hacia tetrápodos más terrestres, una de las preguntas que surgen al abordar este tema es si esta disminución, más allá de las explicaciones funcionales o seleccionistas que se puedan dar, es consecuencia de la no formación de elementos que preceden a la formación del elemento óseo final, o si es una consecuencia de la fusión de elementos, ya sean condensaciones mesenquimales, centros de cartílago o de osificaciones, durante el desarrollo.

Al revisar el registro paleontológico, podemos ver variación en la forma y tamaño de ciertos elementos, que podrían sugerir una fusión,

pero series de estadios tempranos del desarrollo que pudiesen contestar satisfactoriamente esta pregunta escasamente se conservan en el registro fósil, sobre todo cuando nos referimos a elementos no óseos.

Si avanzamos en la filogenia hacia el clado de los amniotas y miramos su tarso, encontramos que uno de los elementos óseos más importantes es el astrágalo, es considerado una de las características destacadas de este grupo y una de sus synapomorfías (Meyer 2013). Este es uno de los elementos más proximales del tarso, junto con el calcáneo (también llamado fibulare), articula con la tibia en su parte más proximal y en su parte más distal con los elementos centrales del tarso, además de encontrarse en una posición anterior respecto del calcáneo. Otra de las características que encontramos en los primeros amniotas es que el metatarso de cada dedo se conecta al tarso, por un tarsal distal, los cuales en su parte proximal articulan con los elementos centrales del tarso. Lo mismo se puede observar en el carpo: el metacarpo de cada dedo se conecta al carpo por un carpal distal. Es decir, siempre encontramos 5 tarsales distales y 5 carpales distales, uno por cada de dedo.

Esta disposición es la que encontramos en los amniotos troncales, reptiles basales e incluso en los sinápsidos más basales como pelycosaurios (Fig.2 A y B).

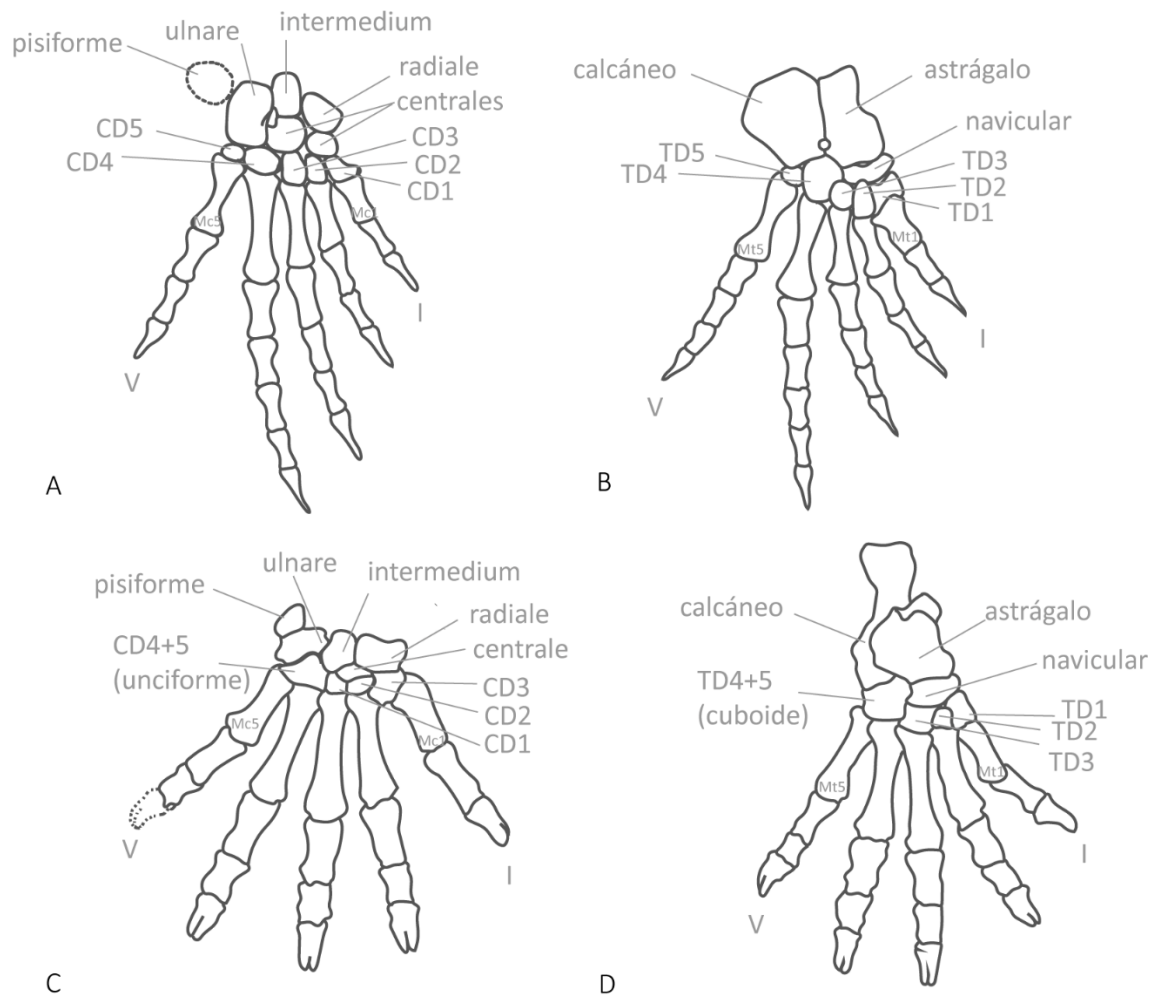


Figura 2. (A-B) Pelycosaurio Haptodus. A Carpo, B) Tarso. (C-D) Placentario Patriofelis. C) Carpo, D) Tarso. CD:carpal distal; TD:tarsal distal; Mt: metatarso; Mc: metacarpo. Modificado de Carroll 1988.

Pero cuando entramos al grupo de los terápsidos encontramos la tendencia de disminución de elementos basipodales.

En primer lugar, se puede observar que tanto en el grupo de los terápsidos que darán origen a los mamíferos, como en los que no, ocurre una disminución de los tarsales y carpales distales de 5 (uno por cada dedo, como era el estado más primitivo) a solo 4. En el caso de la mano, el metacarpo del dedo 5 se monta sobre el carpal distal más posterior, ahora llamado unciforme y que sostienen tanto al dedo 4 como al 5. En el caso de la pata se observa esta misma disminución de tarsales distales, solo que el metatarso del dedo 5 queda desalineado del resto de la pata (Qiang 1999) y al tarsal distal más posterior se le da el nombre de cuboide (Fig.2 C y D). Para ambos casos se describe siempre en la literatura que lo sucedido fue una fusión entre el carpal o tarsal distal 4 y 5 para formar este nuevo elemento (Hopson 1995), aunque no hay clara evidencia de que eso haya sido realmente lo que sucedió. La única excepción es Romer quien propone que lo ocurrido tanto en el carpo como en el tarso es la pérdida del elemento más posterior (Romer 1966).

Luego, cuando entramos al clado Theria, vemos que el desalineamiento del dedo 5 en la pata se pierde. Por un lado, vemos que en el caso de los Marsupiales este metatarso se acomoda sobre el cuboide, muy similar a lo que observábamos en la mano. Por el otro, en placentarios pasa algo parecido, pero este metatarso se acomoda con el cuboide en su parte más posterior y también con el metatarso 4 en algunas especies (Fig.3).

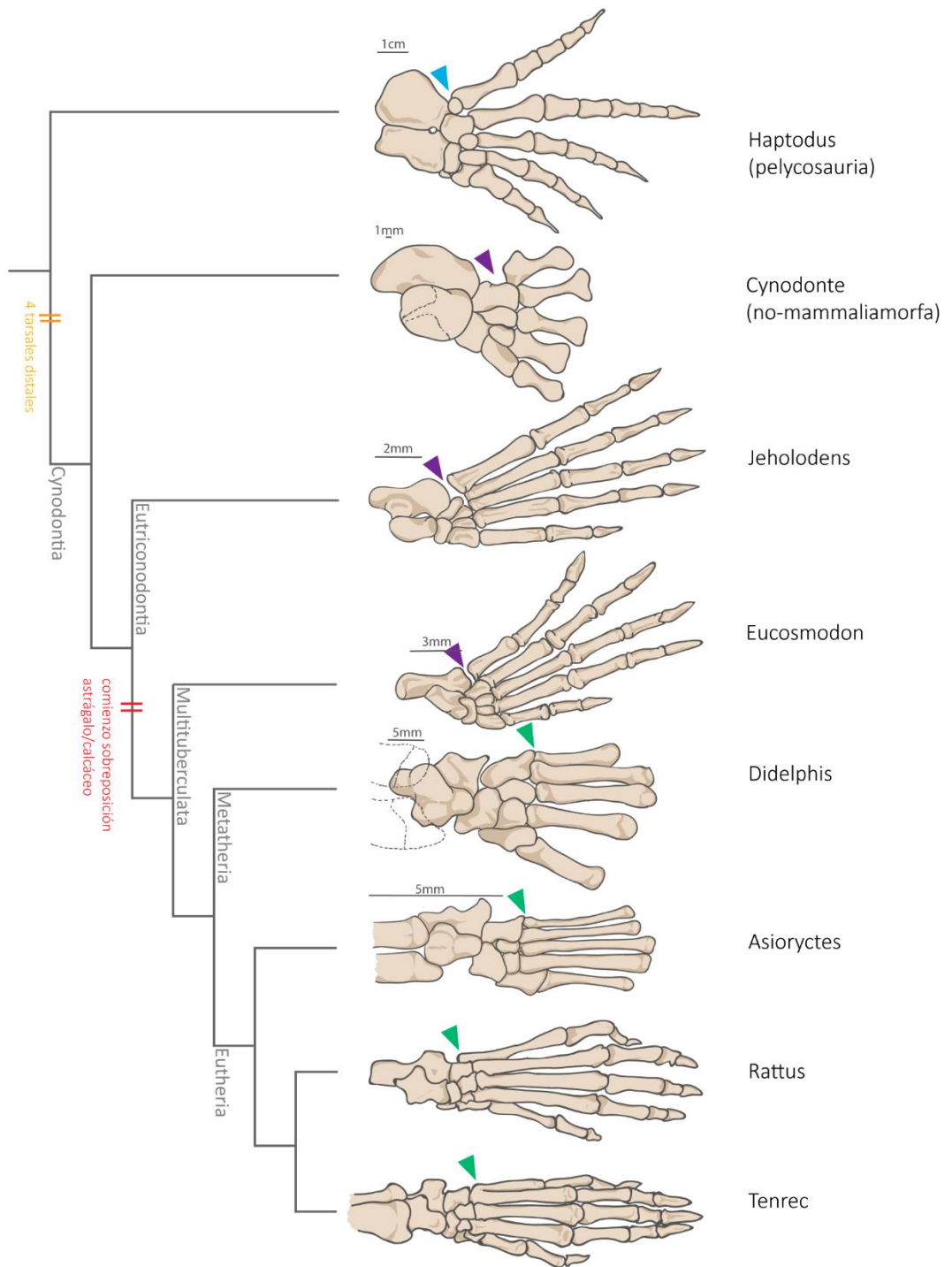


Figura 3. Filogenia resumida de synapsidos ilustrando los cambios que ocurren en el tarso.

- ▲ Condición ancestral con 5 tarsales distales.
- ▲ Pérdida del 5to tarsal distal, dedo 5 desalineado.
- ▲ Condición más derivada, pérdida del 5to tarsal distal y pérdida del desalineamiento.

En segundo lugar, podemos ver la tendencia de superposición del astrágalo sobre el calcáneo, que ocurre de manera gradual en la filogenia. En pelycosaurios e incluso en cynodontes basales, el astrágalo y el calcáneo están en la misma disposición que amniotos primitivos: el astrágalo en posición anterior al calcáneo (Fig.4). En cambio, en placentarios el astrágalo se encuentra dorsal al calcáneo y al observar la filogenia es posible comenzar a ver este cambio gradual de posición. Para este cambio se han propuesto ventajas funcionales en cuanto a la estabilidad y posibilidad de movimiento (Horovitz 2000), pero no se ha ahondado en los mecanismos por los cuales se produce este cambio.

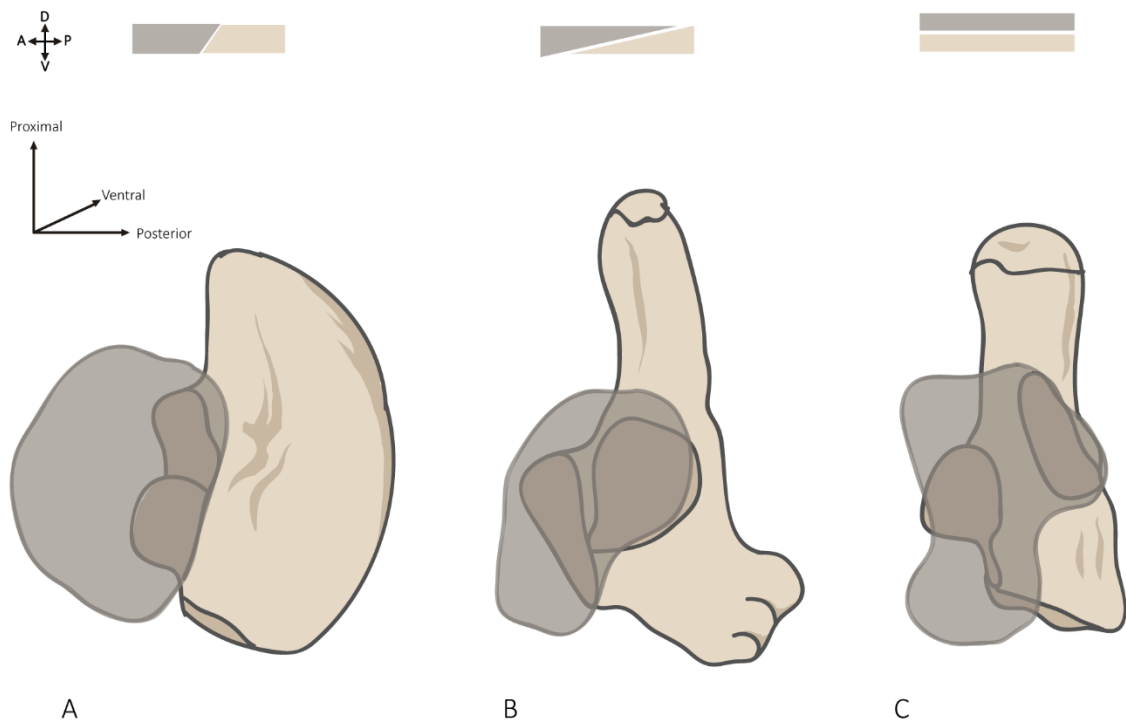


Figura 4. Esquema de la sobreposición del astrágalo sobre el calcáneo A) Cynodonte no mammalianomorpha; B) Pucadelphys, metatheria; C) Mamífero placentario.

Modificado de Horovitz (2000)

Al observar la embriología y la filogenia es posible distinguir un "paralelismo" entre estos dos procesos, por un lado, encontramos que durante el desarrollo de organismos más derivados existen estados tempranos que se asemejan tanto en estructura como en expresión genética a estadios tardíos de organismos más primitivos. Y por otra parte también podemos observar que muchos de los cambios en la estructura que vemos en la filogenia tienen un correlato durante el desarrollo, pudiendo ser explicados por cambios temporales en la formación y maduración de elementos, en este caso, de la extremidad. Este fenómeno ha sido llamado recapitulación por Haeckel, pero conceptos de su interpretación son debatibles a la luz del conocimiento actual. De todas formas este fenómeno, descrito por científicos incluso antes de que Haeckel desarrollara su Ley Biogenética, difícilmente puede ser ignorado. Probablemente la recapitulación pueda ser mejor explicada desde el concepto de que la filogenia no es ni más, ni menos que el resultado de sucesivas ontogenias que se van modificando y estableciendo a lo largo del tiempo (Garstang 1921).

En este trabajo se pretende, a través de la observación de ciertos estadios de desarrollo del esqueleto apendicular, específicamente del carpo y tarso de *Mus musculus*, dilucidar si algunas de las reducciones de elementos óseos que podemos observar en la filogenia de los synapsidos se deben a la fusión o a la pérdida de la formación de elementos más tempranos, además de observar cómo y

en qué posición ocurre la formación el astrágalo y del calcáneo. Para este fin son utilizadas diferentes técnicas que permiten ver y caracterizar el desarrollo de este proceso, utilizando, por ejemplo, marcadores moleculares que se expresan diferencialmente durante el desarrollo, como Colágeno de tipo II, que es producido por los condrocitos inmaduros y Colágeno tipo IX, que es producido por condrocitos más tarde en el desarrollo permitiendo la observación de la extremidad completa (Botelho 2014). Para estadios más avanzados del desarrollo embrionario e incluso para estados post natales se observó la formación de centros de osificación utilizando rojo de Alizarina en la técnica de diafanizado. Además se realizaron cortes histológicos que permitieron observar la citoarquitectura del tejido.

HIPÓTESIS

La disminución de elementos óseos en el tarso (específicamente en el caso de los elementos basipodiales distales) que se observa en la filogenia que da origen a los mamíferos placentarios actuales no ocurre por fusión de elementos tempranos, como es consenso general en la literatura, sino que por agénesis del quinto tarsal distal.

Estadios que se observan a través del desarrollo del esqueleto del carpo y tarso de placentarios actuales como *Mus musculus*, conservan similitudes estructurales con los organismos adultos que se encuentran en la filogenia que los origina.

OBJETIVOS

En este trabajo se pretende, a través de la observación de ciertos estadios de desarrollo del esqueleto apendicular, específicamente del carpo y tarso de *Mus musculus*:

- Determinar si la cantidad de elementos óseos presentes en el carpo y tarso en *M. musculus* se debe a la fusión o a la no formación de elementos más tempranos.
- Observar cómo y en qué posición ocurre la formación el astrágalo y del calcáneo.
- Dilucidar si algunas de las reducciones de elementos óseos que podemos observar en la filogenia de los synapsidos se deben a la fusión o a la pérdida de la formación de elementos más temprano.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Animales de experimentación.

Para este trabajo fueron utilizados embriones de ratones (*Mus musculus*), criados en el bioterio del laboratorio de Ontogenia y Filogenia. Para conseguir estos embriones con los días adecuados de desarrollo se realizaron cruzas programadas de dos noches, en general juntando dos hembras en el momento adecuado del ciclo reproductivo, y un macho. El momento del ciclo reproductivo de la hembra se estimó haciendo citología vaginal (Byers 2012), y así utilizando a las hembras que se encontraran cercanas a entrar o en la etapa de proestro. Luego de dos noches el macho es retirado de la jaula. La efectividad de la crusa era observada alrededor de 11-12 días después por mera observación. En los días de desarrollo embrionario requeridos las hembras fueron sacrificadas, primero sedándolas con isofluorano en una cámara y posteriormente aplicando una dosis letal de ketamina/xilacina intraperitoneal. Posteriormente la hembra fue diseccionada para la extracción de los embriones. Estos últimos, al sacarlos fueron, lavados en Buffer fosfato (PBS), se comprobaron los días de desarrollo comparando con una serie de desarrollo (Fig. 5). Una vez determinados los días de desarrollo (dpc: días post coito) los embriones fueron fotografiados y tratados según la técnica requerida.

Para los ejemplares post natal, de una crucea fructífera fueron tomadas las crías es los días requerido y sacrificados de la misma forma que a las hembras preñadas.

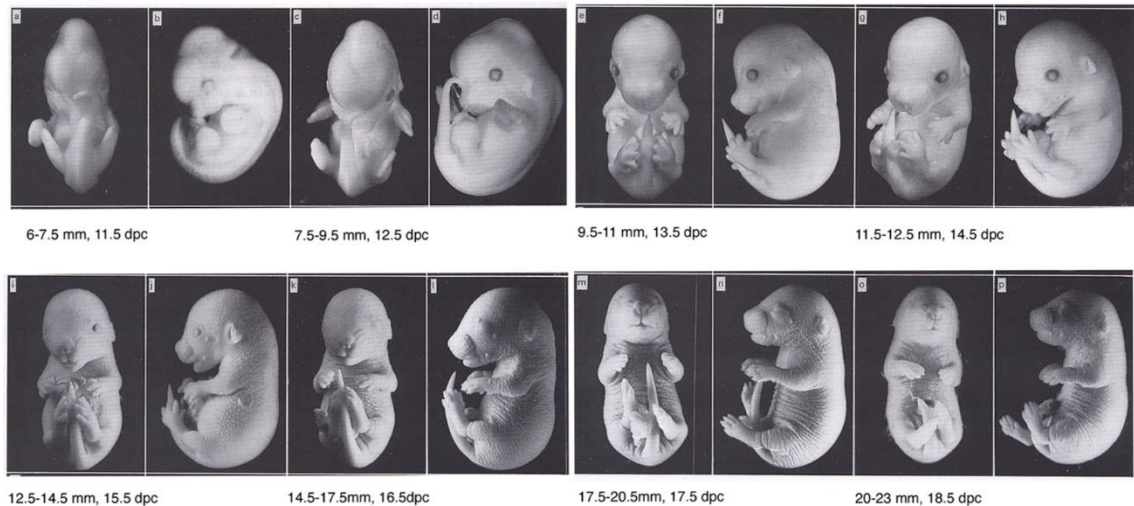


Figura 5. Etapas del desarrollo embrionario de *Mus musculus*. (Theiler, 1972)

b) Inmunofluorescencia whole-mount

Para esta técnica los embriones fueron fijados primero en una solución de metanol:dimetilsulfóxido (DMSO) en proporción 4:1 (Dent's fix) por 30 minutos, en agitación. Posteriormente deshidratados en metanol 100%, para luego guardarlos a -80°C .

Se continuó blanqueando los especímenes utilizando una solución de metanol:DMSO:H₂O₂ (30%) en proporción de 4:1:1 (Dent's bleach) durante una noche. Luego se lavan con una solución de tritón al 0,1% en PBS (PBS-t). A continuación, para permitir la penetración

de los anticuerpos en el cartílago, los embriones son tratados con Hyaluronidasa (Sigma) a una concentración de 2mg/mL en PBS-t a 37°C durante 1 hora. Posteriormente los embriones son lavados y rehidratados con PBS-t para luego agregar el anticuerpo primario en una solución compuesta de suero de cabra (Gibco) 5% DMSO 5% en PBS-t (solución de bloqueo) que se incuba por 2 noches en agitación a 5°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-colágeno del tipo II (Santa Cruz Biotechnology) hecho en conejo y anti-colágeno de tipo IX (Santa Cruz Biotechnology) hecho en cabra. Ambos fueron utilizados en una concentración final de 0,2ug/100uL de solución de bloqueo.

Posteriormente los embriones son lavados repetidamente con PBS-t para luego agregar el anticuerpo secundario, también disuelto en la solución de bloqueo. En el caso de haber utilizado anti-colágeno de tipo II se utilizó un anticuerpo secundario fluorescente (conjugado con Cy3) anti-conejo y en el caso de haber utilizado anti-colágeno de tipo IX, un anticuerpo secundario fluorescente (conjugado con Cy3) anti-cabra (Jackson Immunoresearch), ambos en proporción de 1:300 anticuerpo:solución de bloqueo, y se incuban durante una noche a 5°C, en agitación y oscuridad.

Finalmente se retira el anticuerpo secundario, los embriones son lavados con PBS-t, pasados a una solución de glicerol 10%, tritón 0,5% en Urea 4M (Scale B) por entre 1 y 3 noches para terminar

pasando los embriones por sucesivas soluciones de glicerol y PBS-t hasta llegar a glicerol 85%.

Los embriones son observados y fotografiados en una lupa de fluorescencia Nikon C-DSD230 acoplada a una cámara Nikon-digital sight DS-Fi2.

c) Cortes histológicos

Para esta técnica los embriones son fijados en formalina al 4% por entre 3 y 5 días a 5°C. Una vez pasado este tiempo los embriones son lavados con PBS para quitar el exceso de fijador y deshidratados en soluciones con concentraciones ascendentes de etanol, en PBS, hasta llegar a etanol 100%. Finalmente son pasados a Neoclear (Merck) donde se mantienen por entre 2 y 3 días. Posteriormente son incluidos en parafina, cortados en el micrótomo con un espesor de 8µm y montados en portaobjetos.

Para teñir los cortes montados, primero se desparafinan poniéndolos en una placa calefactora a 50°C por 40 minutos, se pasan a NeoClear y se vuelven a hidratar en una batería con concentraciones descendentes de etanol, en agua, para luego pasarlos a una solución de Alcian Blue por 40 minutos (para teñir cartílago), lavados con agua y luego a una solución de Nuclear red por 30 minutos (para observar los núcleos celulares), lavados en agua y vueltos a deshidratar en la serie de etanol hasta llegar a

etanol 100%, posteriormente se pasan a NeoClear y finalmente son cubiertos.

d) Tinción de esqueleto whole mount (diafanizado)

En esta parte se evitó hacer doble tinción de cartílago (Alcian Blue) y hueso (Rojo de Alizarina) debido a la descalcificación que produce el ácido necesario para la tinción de cartílago.

- Tinción de cartílago:

Para esta tinción los embriones fueron deshidratados en metanol y dejados en metanol 100% por 3 días a temperatura ambiente y en agitación. Luego se cambia el metanol por una solución de Azul de Alcian (Alcian Blue 86X, Sigma) 0.05%, ácido acético 20% y Etanol 80% por 1 día.

- Tinción de hueso:

Para esta técnica los embriones fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por 4 días, a 5°C. A los embriones más tardíos y los ejemplares post natales se les retiró la piel, para obtener una mejor penetración de la tinción, antes de continuar con el proceso.

Los embriones fueron lavados en PBS para eliminar el exceso de fijador, posteriormente fueron inmersos en una solución de Rojo de Alizarina (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich) al 0,2%, hidróxido

de potasio (KOH) 0,5% en agua por entre 2 y 5 noches, dependiendo del tamaño.

Luego, en ambos casos, son puestos en una solución de hidróxido de potasio 2% por entre 3 horas y 2 días (dependiendo del tamaño y el tipo de fijación), para posteriormente pasarlos por una serie de glicerol 100%:KOH 0,5% (1:3, 1:1 y 3:1) hasta finalmente alcanzar glicerol 100%.

Los embriones más pequeños fueron fotografiados en una lupa Olympus SZX10 acoplada a una cámara y los embriones más grandes y los estadios postnatales fueron fotografiados directamente utilizando la cámara Cannon Rebel T3i.

RESULTADOS

a) Desarrollo del carpo.

Al mirar el desarrollo de carpo en los estadios estudiados (Fig. 6) es posible notar que en la etapa más temprana (13,5dpc) se observan diferencias entre los tipos de preparación. Cuando se utiliza la técnica de inmunofluorescencia es posible notar más centros de formación de cartílago y estos a su vez tienen límites comparativamente más definidos que cuando observamos la preparación con tinción de Alcian Blue. Avanzando en el desarrollo, los elementos y sus límites se vuelven más conspicuos y la diferencia entre la inmunofluorescencia y el diafanizado es menor.

Al comparar entre el resultado obtenido utilizando colágeno de tipo II y de tipo IX podemos notar que son bastantes similares en cuanto a la resolución que permiten para observar elementos separados, pero que en estadios tempranos con anti-colágeno de tipo II los elementos, en algunos casos, tienen un tamaño mayor, es decir que esta molécula está siendo expresada por un número mayor de las células que forman el

elemento. Estas diferencias disminuyen hacia el último estadio.

En cuanto a los centros de cartílago que se pueden distinguir, podemos notar que en el estadio 13,5dpc se encuentran cinco elementos basipodiales distales, uno correspondiente a cada dedo.

En el estadio 14,5dpc se observa que el carpal distal 4 y 5 aumentan de tamaño y se contactan, pero aún se pueden distinguir sus límites (Fig. 6E). En el siguiente estadio se puede ver que los templados de cartílago de los carpales distales 4 y 5 ya se fusionaron (Fig.6F), formando el unciforme. Además encontramos un elemento del basipodio central, que no se observa en el adulto.

Los cortes en parafina permiten apreciar estos mismos eventos. Pero a diferencia de las otras preparaciones, se puede observar solo en esta que en el estadio 16,5dpc parece haber otro elemento, muy pequeño, de cartílago que se fusiona con el unciforme en su parte más ventral (Fig. 7), cuando ya ha ocurrido la fusión de los carpales distales, este elemento se encuentra distal y posterior al radiale y al parecer en un plano bastante más ventral.

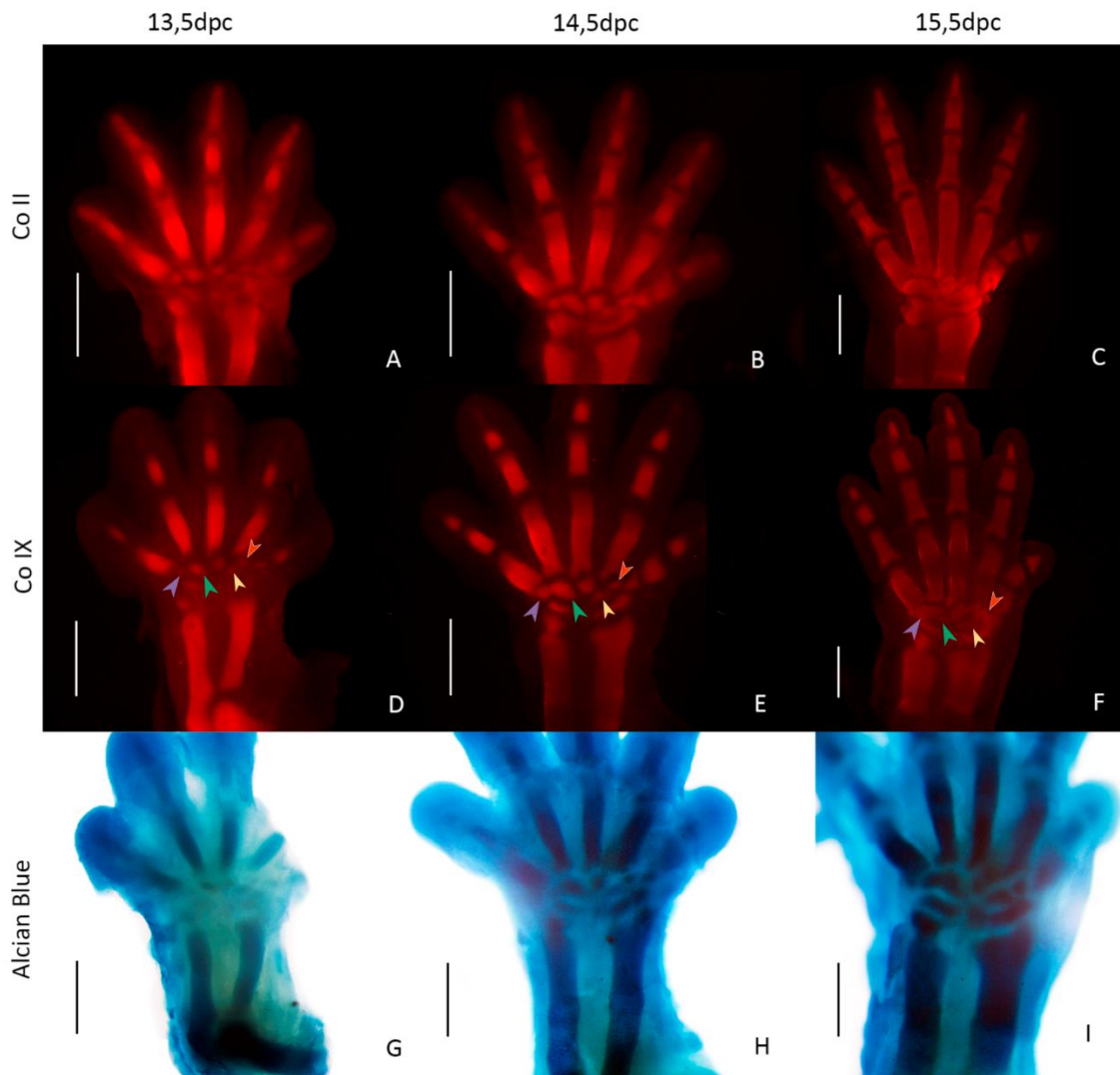


Figura 6. Desarrollo del carpo izquierdo en vista dorsal de *Mus musculus* en 3 estadios diferentes, utilizando dos técnicas. (A-C) Inmunofluorescencia whole mount contra colágeno de tipo II (Co II); (D-F) inmunofluorescencia whole mount contra colágeno de tipo IX (Co IX); (G-I) Diafanizado con tinción Alcian Blue. ▲ carpal distal 5; ▲ carpal distal 4; ▲ carpal distal 2; ▲ centrale. Escala: 0,5mm.

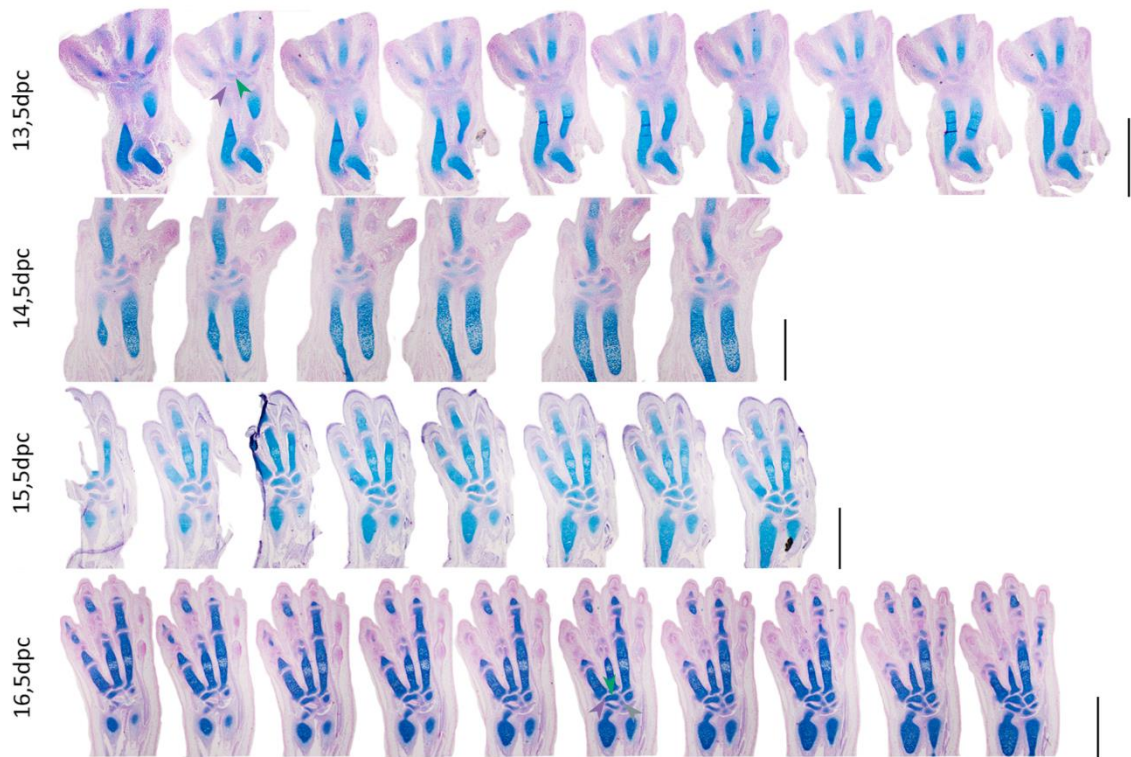


Figura 7. Serie de cortes en parafina de 8 μ m de espesor de carpos izquierdos, de diferentes estadios, con tinción de cartílago (Alcian Blue) en azul y núcleos celulares (Nuclear Red) en rojo. De derecha a izquierda dorso-ventral. ▲ carpal distal 5; ▲ carpal distal 4; ▲ elemento de cartílago que se pega al CD4+5. Escala: 1mm.

b) Desarrollo del tarso.

Las diferencias observadas entre preparaciones son similares a las descritas para el carpo, obteniendo en el estadio más temprano un resultado con elementos más nítidos en las preparaciones de inmunofluorescencia.

- Tarsales distales.

Con respecto a la cantidad de elementos que se encuentran, desde el estadio más temprano (13,5dpc) (Fig. 8) es posible distinguir solo 4 elementos basipodiales distales, el quinto dedo no está sostenido por uno de estos elementos y donde se esperaría encontrar no se observa ningún otro elemento. Si pasamos al estadio 14,5dpc podemos notar que el tarsal distal 4 aumenta de tamaño, ocupando toda la parte posterior del carpo y que ahora el metatarso del quinto dedo comienza a acomodarse sobre este (Fig. 8 D y G). En el último estadio de esta serie vemos que el quinto metatarso tiene su parte más anterior sobre el tarsal distal 4, pero que parte posterior se extiende hacia proximal, en una posición posterior al tarsal distal 4 (Fig. 8E).

Los cortes en parafina (Fig. 9) también demuestran que no se forma ningún elemento de cartílago en todo el eje dorso-ventral, en la posición donde debería estar el quinto tarsal distal.

- Astrágalo y Calcáneo.

Por otra parte, en el estadio 13,5dpc se puede observar que el astrágalo está formado por (al menos) 2 centros de cartílago, que en este momento del desarrollo ya se contactaron, uno formando la porción anterior y el otro la porción posterior (Fig. 8C). Algo similar ocurre con el calcáneo, en donde parece haber un centro de cartílago distal y otro proximal que lo componen (Fig. 8 C y D). Ni en otros cynodontes ni en otros amniotas se ha descrito el desarrollo del calcáneo como un elemento compuesto.

En el primer estadio presentado, calcáneo y astrágalo se encuentran uno al lado del otro, sin que exista superposición, el primero en la parte más posterior del tarso y el segundo en la parte anterior. Cuando continuamos al segundo estadio (14,5dpc), la porción que parece formar la parte más posterior del astrágalo se comienza a solapar dorsalmente al calcáneo, para finalmente en el último estadio (15,5dpc) ya la mayor parte del cuerpo principal del astrágalo se encuentra sobre el calcáneo.

En los cortes en parafina es posible observar con mayor claridad que la parte del astrágalo que se superpone está en una posición más dorsal que la otra, ya que aparece primero en la serie de cortes al avanzar desde dorsal hacia ventral (Fig. 9).

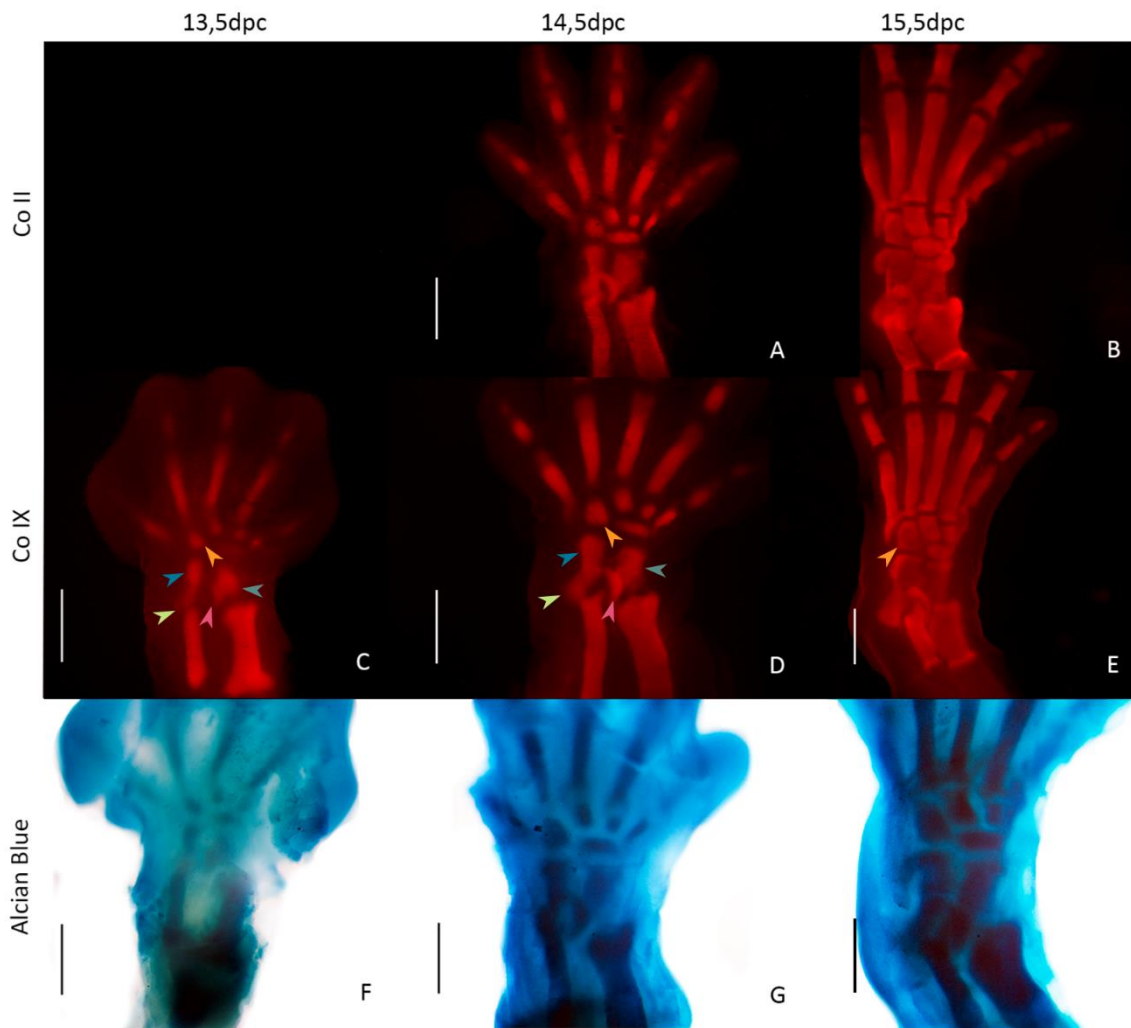


Figura 8. Desarrollo del tarso izquierdo en vista dorsal de *Mus musculus* en 3 estadios diferentes, utilizando dos técnicas. (A-B) Inmunofluorescencia whole mount contra colágeno de tipo II (Co II); (D-F) inmunofluorescencia whole mount contra colágeno de tipo IX (Co IX); (G-I) diafanizado con tinción Alcian Blue. ▲ carpal distal 4; ▲ cartílago distal del calcáneo; ▲ cartílago proximal del calcáneo; ▲ cartílago posterior del astrágalo; ▲ cartílago anterior del astrágalo. Escala: 0,5mm.

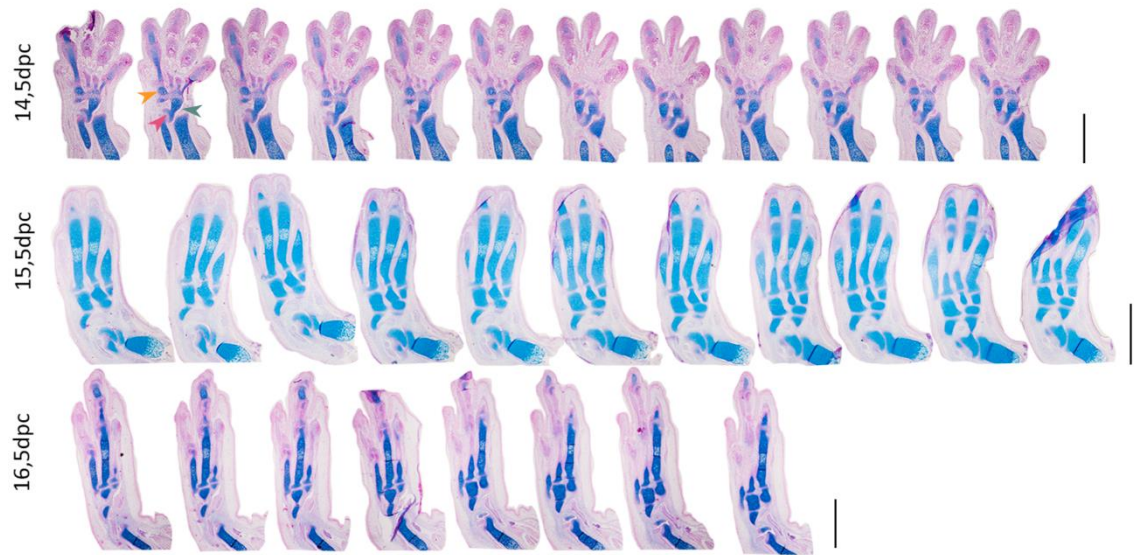


Figura 9. Serie de cortes en parafina de 8 μ m de espesor de tarsos izquierdos, de diferentes estadios, con tinción de cartílago (Alcian Blue) en azul y núcleos celulares (Nuclear Red) en rojo. De derecha a izquierda dorso-ventral. \blacktriangle tarsal distal 4; \blacktriangle cartílago posterior del astrágalo; \blacktriangle cartílago anterior del astrágalo. Escala: 1mm.

c) Formación de centros de osificación.

En los primeros estadios de la serie de embriones es posible notar que las primeras osificaciones que aparecen en las extremidades son las correspondientes al estilopodio y zeugopodio, además de que la extremidad posterior presenta un retraso en el desarrollo al compararla con la anterior, reflejado en el tamaño de los centros de osificación que se observan (Fig. 10). Estas osificaciones comienzan en la parte central de los elementos y su crecimiento avanza hacia los extremos. En el estadio 16,5dpc podemos observar que, tanto el carpo como en el tarso comienza la osificación de los metacarpos y metatarsos, respectivamente, comenzando por los dedos 2, 3 y 4. Estos centros de osificación continúan extendiéndose y recién en los últimos días de desarrollo embrionario (18,5dpc) podemos ver que comienza la osificación de las falanges de los dedos, tanto del carpo como del tarso y que además comienza la osificación del calcáneo, presentando solo un centro de osificación.

En la serie de desarrollo post natal (Fig. 11) se puede observar que en el estadio 2dpn ya comenzó la osificación del astrágalo, también a partir de un solo centro de osificación. Estos dos elementos: calcáneo y astrágalo, son los primeros elementos del basipodio en comenzar la osificación.

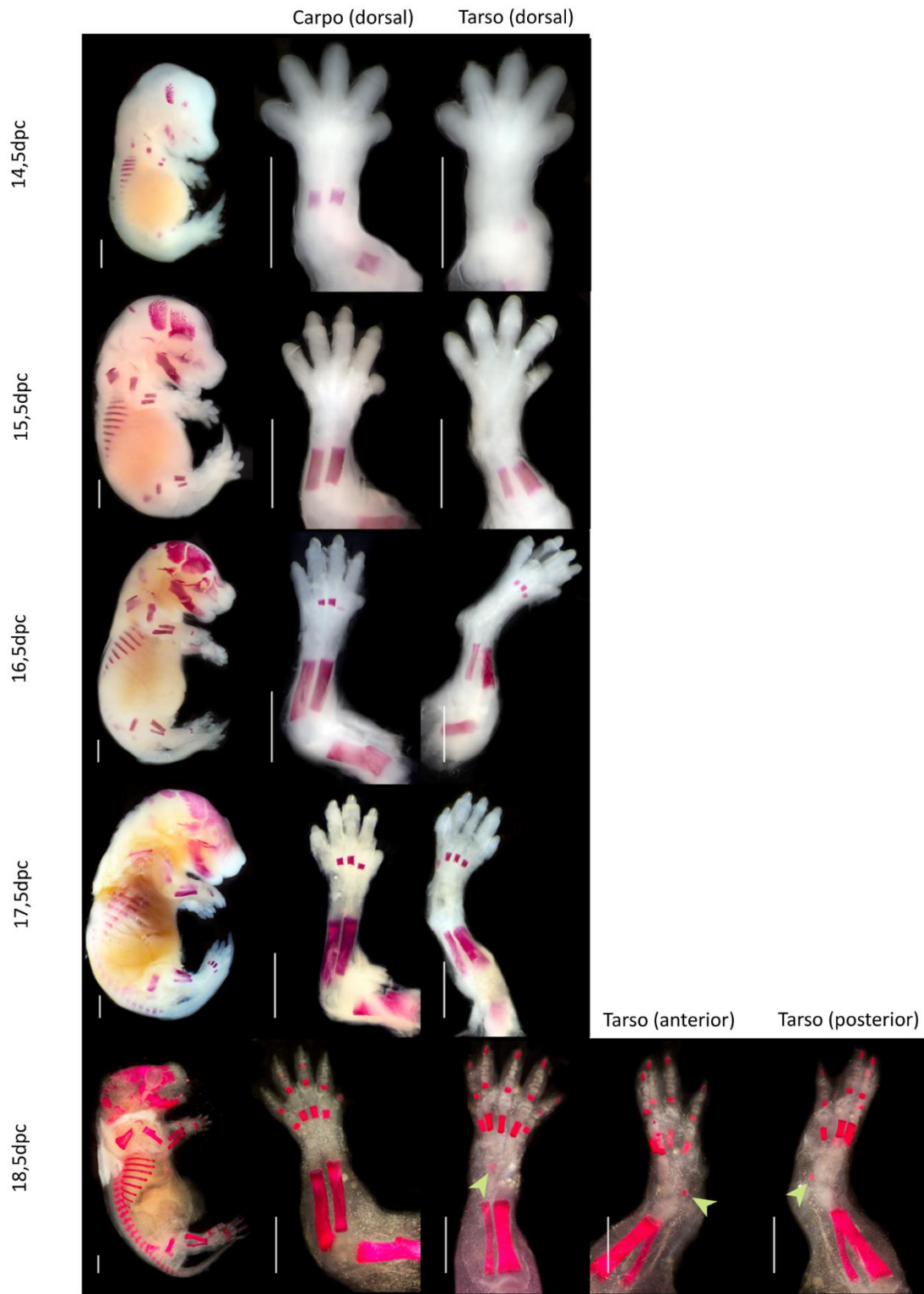


Figura 10. Serie de osificación (en rojo) de carpos y tarsos en diferentes estadios embrionarios. Osificaciones teñidas con Rojo de Alizarina. ▲ centro de osificación del calcáneo. Escala: 2mm.

En el estadio 4dpn se puede ver que acaba de comenzar la osificación del tarsal distal 4 y del tarsal distal 1. Por el contrario, en el carpo aún no comienza la osificación en ningún elemento del basipodio.

En el estadio 6dpn ya se puede observar que todas las osificaciones del basipodio del carpo comenzaron. En los elementos en los que en estadios de desarrollo más tempranos observamos fusión de elementos en su etapa de cartílago, como es el caso del unciforme, podemos ver que el elemento final osifica a partir de un solo centro. En el caso del tarso, podemos ver que en esta etapa comienza la osificación del tarsal distal 3.

En el último estadio post natal presentado (8dpn) en el carpo podemos observar que los centros de osificación de los elementos del basipodio ya casi han alcanzado la forma de los elementos óseos finales y que además ha ocurrido la fusión de los centros de osificación del segundo carpal distal y el centrale, formando un único elemento óseo. En el caso del tarso podemos ver que el astrágalo y el calcáneo ya casi han alcanzado la forma que tienen los elementos óseos finales y que ha comenzado la osificación del tarsal distal 2 y del navicular.



Figura 11. Serie de osificación (en rojo) de carpos y tarsos en diferentes estadios post-natales. Osificaciones teñidas con Rojo de Alizarina. ▲ osificación calcáneo; ▲ osificación astrágalo; ▲ osificación cuboide; ▲ osificación navicular; ▲ osificación tarsal distal 3; ▲ osificación unciforme; ▲ osificación centrale; ▲ osificación carpal distal 2; ▲ fusión carpal distal 2+centrale. Escala: 2mm.

Cuando comparamos el último estadio post-natal y el esqueleto adulto, podemos distinguir un cambio más en el tarso y es la fusión del navicular con el tarsal distal 3. Como notamos, en el estadio 8dpm ya se formó el centro de osificación tanto del tarsal distal 3 como del navicular, lo cual indica que este elemento nuevo (navicular+TD3) corresponde a la fusión de dos elementos en su estado de osificación, y podemos notar que, a simple vista, en el adulto, no es posible observar alguna marca que delate este proceso.

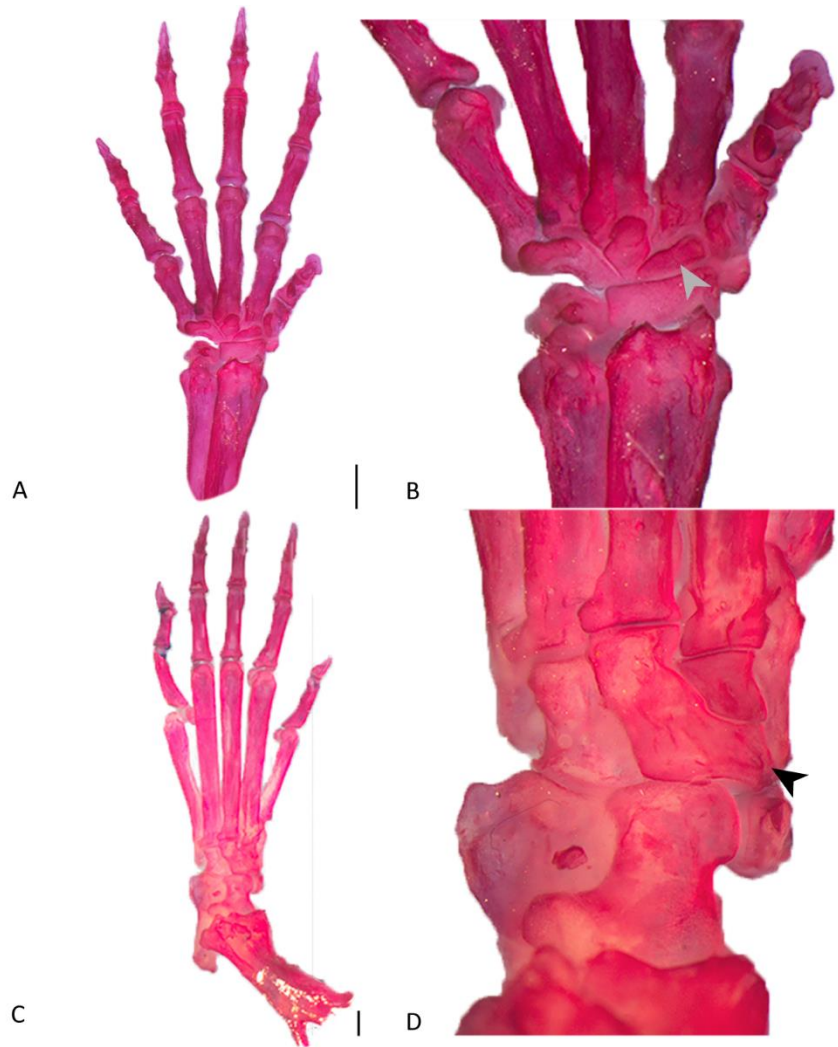


Figura 12. (A y B) Carpo y (C y D) tarso en vista dorsal de *Mus musculus* adulto. Tinción con Rojo de alizarina. ▲ elemento formado por la fusión del navicular y el tarsal distal3; ▲ elemento formado por la fusión del centrale y el carpal distal 2. Escala: 1mm.

DISCUSIÓN

Tener series ontogenéticas en el registro fósil del esqueleto de mamíferos (o de la rama de synapsidos que los originan), sobre todo si es del desarrollo temprano, como mencionaba en un comienzo, es extremadamente difícil. Esto no es ninguna sorpresa debido a todas las condiciones que tienen que ocurrir para que un ser vivo se fosilice y es menos sorprendente aún, ya que los tejidos en estos estadios son muy poco susceptibles a sufrir este proceso.

Lo que sí es bastante sorprendente es la poca información que existe acerca de estas series ontogénicas en organismos actuales, incluso tan utilizados en la ciencia como lo es el ratón (*Mus musculus*), donde se puede encontrar una gran variedad de escritos acerca de los genes que se expresan muy al principio del desarrollo (como cuando se establecen los ejes corporales) por ejemplo, unos cuantos acerca de las osificaciones y unos pocos acerca de ciertas anomalías que tienen consecuencia en determinadas partes del esqueleto, y siempre (en estos dos últimos casos) la técnica utilizada es el diafanizado doble de cartílago-hueso (Alcian Blue-Alizarin Red). De ahí la importancia de, primero, conocer realmente cómo es el proceso de desarrollo del esqueleto con una aproximación

más específica que la distinción gruesa entre cartílago y hueso, técnica que además puede llevar a equivocaciones en cuanto al tiempo de aparición de centros de osificación (Yamazaki, 2010) y que además, como se muestra en los resultados, al observar estadios tempranos, la identificación de elementos deja bastante lugar a la interpretación del observador.

La inmunofluorescencia whole-mount es una buena herramienta, no solo porque nos permite observar al organismo en sus tres dimensiones, sino porque el uso de anticuerpos permite la visualización de cambios de expresión de moléculas de una manera mucho más fina, permitiendo la observación de cambios sutiles durante el desarrollo. Esto se puede observar en las preparaciones en donde se utiliza un anticuerpo anti-colágeno de tipo II (CoII) al compararlas con las anti-colágeno de tipo IX (CoIX). En el primer caso, en el estadio más temprano, el tamaño de elemento como el carpal distal 5 (Fig. 6A) es mayor que el que se observa con CoIX (Fig. 6D), debido a que la expresión de colágeno II ocurre más temprano en el desarrollo, secretado por condrocitos inmaduros. La expresión de CoIX, por otro lado, ocurre durante la diferenciación temprana de cartílago, por lo tanto, más tarde en el desarrollo. Así, el uso de una mayor variedad de anticuerpos que representen etapas diferentes del desarrollo de estos elementos, puede ser de gran utilidad para comprender su homología durante la formación del esqueleto (Lai 2005).

- Fusión de elementos distales del basipodio.

Establecer homologías siempre tiene un grado de dificultad y esta dificultad es cada vez mayor cuando aumentamos la cantidad de organismos y la distancia filogenética entre los organismos que estamos estudiando. En el caso del tarso amniota queda la discusión acerca de la homología del astrágalo; en la mayoría de los casos se describe como la fusión de elementos, pero siempre con la pregunta de cuáles e incluso si está compuesto por los mismos elementos en la rama que da origen a los reptiles que en la que da origen a mamíferos. Por otra parte, dentro de synapsida encontramos que basalmente (pelycosaurios, por ejemplo) existía un número importante de elementos centrales en el basipodio, tanto del tarso como del carpo, y que la mayoría posteriormente no se observa cuando avanzamos en la filogenia hacia los mamíferos actuales (excepto el navicular, que es muy consistente y en algunos grupos en donde se refieren a ellos como centralia, sin identificarlos a cabalidad) y no está claro si estos elementos dejaron de formarse o se fusionaron a otros elementos.

Pero la homología de los tarsales y carpales distales 4 y 5 no ha estado en discusión, desde terápsida en adelante el elemento basipodial distal más posterior se ha homologado como la fusión de estos elementos (Carroll, 1988; Hopson, 1995), con una única excepción: Romer, quien dice que lo sucedido, tanto para el carpo

como para el tarso, fue la desaparición del quinto carpal/tarsal distal (Romer 1966).

La disminución de elementos basipodiales distales ha sido descrita en otros grupos: en archosauriamorpha ocurre, y se propone que el tarsal distal perdido es el 5 (Carroll, 1988). En urodelos ocurre la fusión del carpal distal 1+2 (Alberch 1982), aunque este último es un caso mucho más especial, ya que la formación del esqueleto del autopodio es al revés que en el resto de los vertebrados (Wagner, 2014)

Como se presentó en este trabajo, el unciforme, en el carpo, efectivamente se forma por la fusión de dos elementos que durante el desarrollo son homologables al carpal distal 4 y el carpal distal 5, y por lo tanto podemos asegurar que en el carpo del ratón (durante etapas tempranas del desarrollo) se retiene la condición de pelycosaurios (e incluso podemos incluir a los no-amniotos) de tener 5 carpales distales (Fig.13). Además, más tarde en el desarrollo, después de que la fusión entre estos carpales distales haya sucedido, se agrega otro elemento a la fusión, no descrito previamente, que parece estar en una posición más ventral y proximal. Elementos, que se encuentran en una posición similar en otras especies de Rodentia son descritos como centrale (Thorington, 2000). Por lo que el "unciforme" en el caso de *Mus musculus*, al menos, estaría formado por 3 elementos de cartílago fusionados.

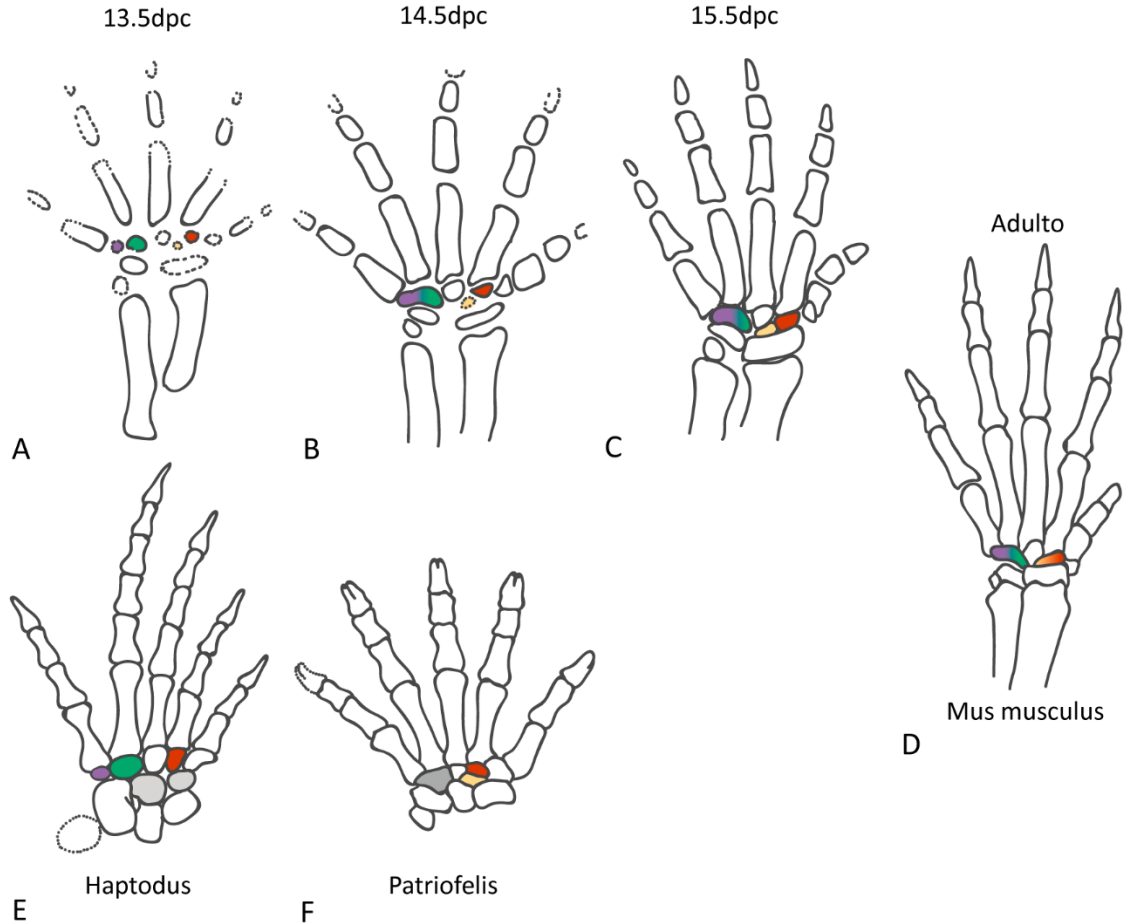


Figura 13. Esquema de carpos. A-D: Serie de desarrollo de *M. musculus* mostrando fusión de elementos. E: pelycosaurio con configuración de elementos similar a A. F: Placentario con configuración de elementos similar a B. ● CD5; ● CD4; ● centrale; ● CD2.

Por otra parte, el cuboide está formado por un solo elemento, que tempranamente en el desarrollo (en estadio de cartílago formado por condrocitos inmaduros) puede ser identificado como el tarsal distal 4 debido a su posición respecto al metatarso del cuarto dedo. Aun así, queda la pregunta de qué ocurre más temprano en el desarrollo, por ejemplo, en estadio de condensación mesenquimal.

Hasta el momento la evidencia muestra la formación de un único elemento, contrario a la descripción de fusión usualmente aceptada.

Además de esta clara confirmación desde el campo de la embriología, curiosamente, el registro paleontológico también insinuaba que lo que ocurría en el tarso era diferente a lo que ocurría en el carpo. Afortunadamente una de las transiciones mejor documentadas en el registro fósil de vertebrados es la del linaje de los synapsidos, de reptil a mamífero, y podemos ver que la evolución de mamíferos desde un ancestro reptil con rasgos mamiferianos es el resultado de la acumulación constante de muchos cambios que presenta una gran variedad de formas intermedias (Carrano 2006). Desde cynodontes y hasta therias troncales es posible ver no solo la disminución de tarsales distales, sino que, al mismo tiempo, el desalineamiento del quinto dedo, de lo cual se podría inferir que lo sucedido es la no-formación (agénesis) del quinto tarsal distal, ya que el cuarto tarsal distal está alineado con el metatarso del dedo 4 (Fig.14).

- Astrágalo y Calcáneo.

La homología del astrágalo es discutida, tanto por la homología de los elementos del tarso no-amniota que lo conforman, como la homología entre el astrágalo de la rama que da origen a los

mamíferos y la que origina a los reptiles. Baur identificaba al astrágalo como homólogo al intermedium (Baur, 1885), es decir que el astrágalo no era un elemento compuesto. Los resultados presentados en este trabajo permiten descartar esta posibilidad, ya que se observa que el astrágalo se compone al menos de dos centros de cartílago, sin embargo, establecer la homología de estos centros con los elementos del tarso no-amnioto es discutible y se necesita observar este proceso utilizando otros marcadores y en estadios más tempranos en los cuales los elementos estén completamente separados. Aun así, se puede decir que esta nueva información nos hace inclinar hacia la teoría de Gegenbaur, quien propone que el astrágalo está compuesto por el tibiale y el intermedium (Lewis, 1964; Cihák, 1972), el primero correspondería al elemento de cartílago anterior y el segundo al elemento posterior que observamos en los resultados. Esta propuesta concuerda además con lo observado en la embriología de reptiles modernos, en donde se observa que el astrágalo se forma a partir de dos cartílagos (Schaeffer, 1941) y apoya la noción del astrágalo como característica diagnóstica de amniotos, heredado desde el ancestro común entre mamíferos y reptiles. De todas formas, no se pueden descartar del todo las teorías en donde el astrágalo estaría compuesto por más elementos.

Lo que con seguridad se desprende de la observación de la formación del astrágalo en las etapas que se presentan en este trabajo, es

que el centro de cartílago posterior, en el adulto forma la región del astrágalo que se denomina "cuerpo principal" y que el cartílago anterior forma las regiones denominadas "cuello" y cabeza distal" (Polly, 2007).

Con respecto a la homología del calcáneo en cambio, no ha habido gran discusión, siempre se presenta como homólogo al fibulare, aunque hay algunos autores que lo describen como un elemento compuesto. Cihàk lo describe como la fusión de un "homólogo al pisiforme" y el fibulare (Cihàk 1972). Lo que sí es diferente al resto de los amniotas es la presencia de un tubérculo calcáneo (Horovitz, 2000), que es posible observar incluso desde terápsida. Este elemento se forma en la parte más proximal y es precisamente la que forma la expansión que es el talón, además, durante el desarrollo post natal más tardío se puede observar que tiene una osificación propia (Patton, 1995; Parson, 1904), por lo que es descrito siempre como una epífisis del calcáneo y corresponde al lugar de inserción del tendón de Aquiles.

Los resultados de este trabajo sugieren que hay, tempranamente en el desarrollo, por los menos 2 centros de cartílago que lo componen. Una opción es que esta fusión de elementos nos muestre la historia evolutiva de una epífisis de tracción. Este es un término para denotar una proyección en un extremo de un hueso donde se inserta un tendón y que tiene un centro de osificación

propio. Se sugiere que varias de las epífisis serían sesamoides que secundariamente se fusionaron al hueso principal (Parsons 1908; Barnett 1958). La homología de estos elementos también presenta dificultad, ya que lo observamos posterior al contacto entre estos elementos, por lo cual se hace necesario observar este proceso en estadios aún más tempranos, antes de que este suceso ocurra. Por otra parte, se podría examinar la identidad de sesamoide de este cartílago más proximal.

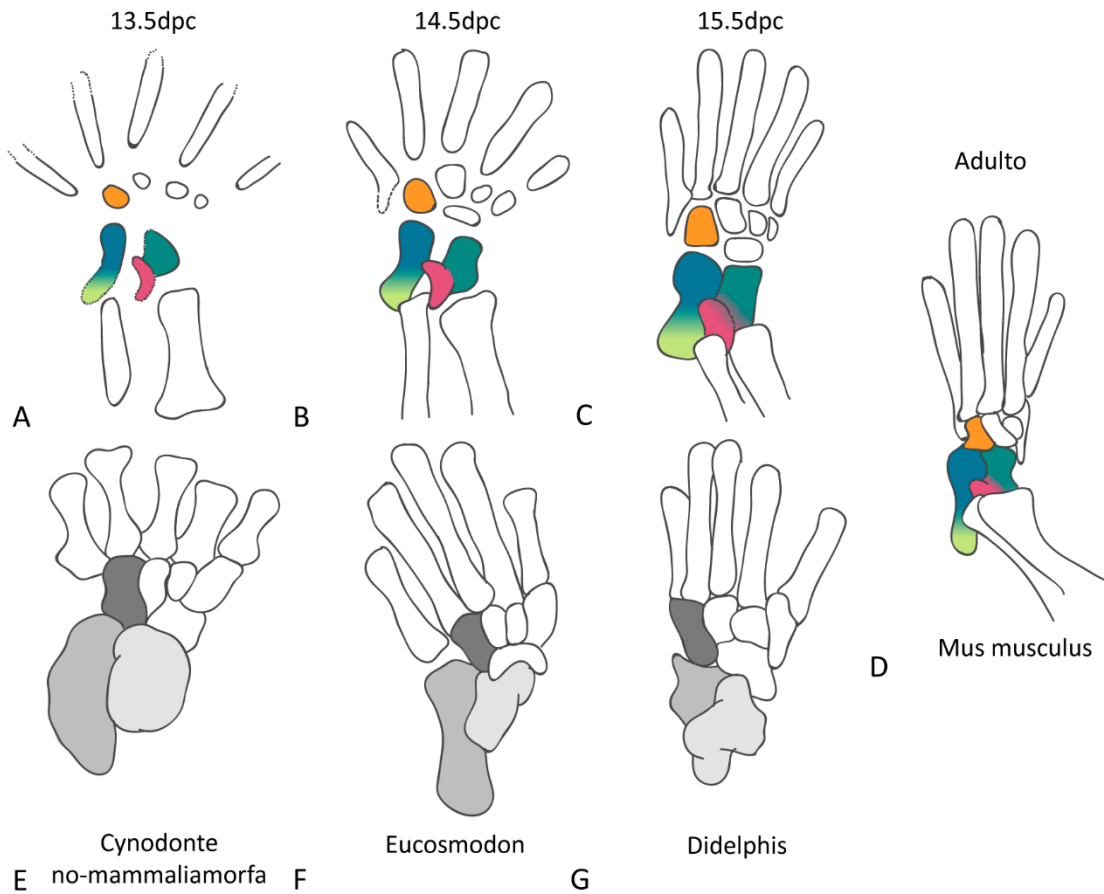


Figura 14. Esquema de tarsos. A-D: Serie de desarrollo de *M. musculus* mostrando fusión de elementos. E: cynodonte con configuración de elementos similar a A. F: Multituberculado con configuración de elementos similar a B. G: Marsupial con configuración de elementos similar a C. ● CD4; ● cartílago distal del calcáneo; ● cartílago proximal del calcáneo; ● cartílago posterior del astrágalo; ● cartílago anterior del astrágalo.

A través de la filogenia de synapsida también es posible ver el cambio en la postura general del organismo, pasando de una configuración en donde las extremidades se sitúan al lado del cuerpo, con un estilopodio prácticamente horizontal al suelo, a una postura en donde las extremidades pasan a estar bajo el cuerpo, con el estilopodio casi vertical. Este cambio de posición se puede

correlacionar con el cambio de posición relativa del calcáneo y el astrágalo. En principio, organismos como pelycosaurios presentan la configuración de reptiles con ambos huesos en el mismo plano del eje dorso-ventral y con la cara posterior del astrágalo contactando la cara anterior del calcáneo. En cynodontes también encontramos a estos elementos en el mismo plano, pero el contacto cambia: ahora la superficie de la cara del calcáneo que contactaba la del astrágalo se extiende hacia anterior y mira un poco hacia dorsal (Jenkins, 1970).

Más tarde en la filogenia, en therias troncales el astrágalo y el calcáneo ya no están en el mismo plano del eje dorso-ventral, el calcáneo se encuentra en una posición más dorsal, superponiéndose al calcáneo. Este proceso continúa de forma gradual hasta llegar a placentarios, en donde la superposición es prácticamente total.

Obviamente, está última es la condición que presenta el ratón en su etapa adulta, pero, para fortuna de este trabajo, durante su desarrollo embrionario es también posible observar como este cambio va ocurriendo gradualmente, mostrando etapas muy similares a las que encontramos a través de la filogenia. De hecho, la parte que se comienza a superponer y en placentarios está sobrepuesta del todo sobre el calcáneo es la llamada cuerpo principal del astrágalo y que justamente en este trabajo vemos que es la que inicialmente está formada por el cartílago posterior (Fig.15).

Esta especie de recapitulación hace el favor de recordarnos lo importante que puede ser que el observar la paleontología al abarcar interrogantes acerca del desarrollo ya que puede ayudar a responder varias preguntas, y viceversa.

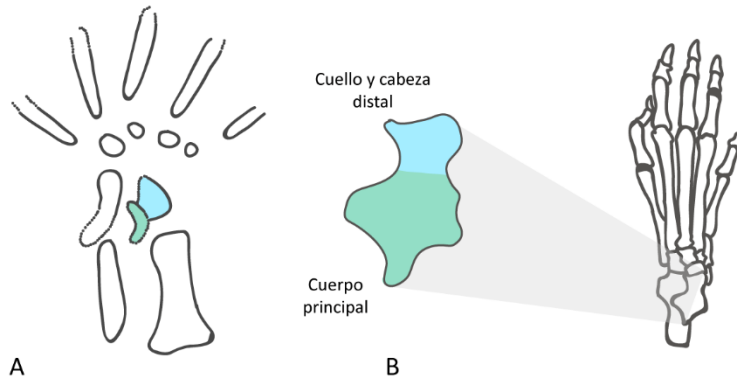


Figura 15. Esquema de las regiones del astrágalo. A: tarso *M. musculus* a los 13dpc mostrando los cartílagos que lo componen; B: esquema del astrágalo *Rattus* adulto mostrando las regiones que se describen en general para el tarso de placentarios.

- Fusión de centros de osificación.

La fusión de centros de osificación e incluso de huesos ya formados, durante la ontogenia no es un evento raro, podemos ver, por ejemplo, tempranamente en el desarrollo, fusión de centros de osificación en el cráneo en las aves (Smith, 2015), o en los huesos largos cuando se fusiona el centro osificación de las epífisis con la diáfisis, terminando el periodo de crecimiento.

Estas fusiones pueden ocurrir de manera temprana en el desarrollo, en general en huesos que se forman a partir de osificación directa.

Pero en ocasiones la fusión de elementos de desarrollo indirecto puede ocurrir relacionada con la parálisis muscular (Barnett, 1958; Eyal, 2015).

Podemos ver que hay dos huesos compuestos en el tarso y carpo de *Mus musculus*, que conserva los centros de osificación propios de cada elemento de cartílago original. Son las que ocurren entre el tarsal distal 3 y el navicular en el tarso, y el que ocurre entre el carpal distal 2 y el centrale, en el carpo (Fig.16). Tempranamente en el desarrollo vemos que se desarrollan como centros de cartílagos independientes y que crecen hasta alcanzar la forma bien delimitada, propia del elemento, en estadios embriológicos tardíos, en el caso del carpo, y en post-natales en el caso del tarso, se forma un centro de osificación en cada uno, pero luego, en el adulto forman un solo hueso.

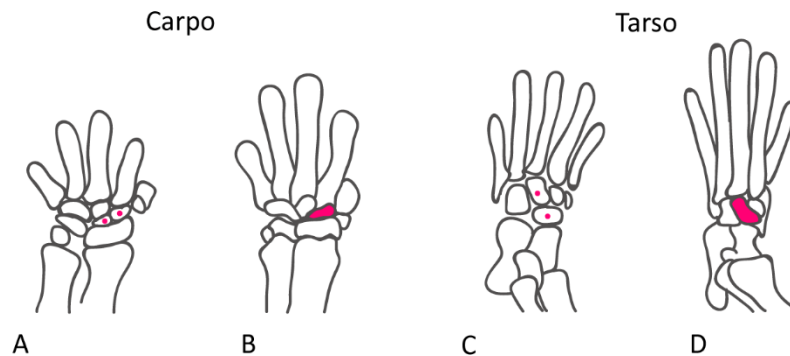


Figura 16. Esquema fusión de centros de osificación. A: carpo 6dpn mostrando centros de osificación del centrale y CD2; C: tarso 8dpn mostrando centros de osificación del navicular y TD3; B y D: carpo y tarso de adultos, respectivamente, mostrando elementos ya fusionados.

En el caso del tarso este rasgo parece ser característico del ratón, ya que en parientes cercanos como *Rattus* no se observa esta fusión, no es muy claro el momento en el que ocurre, pero con seguridad en un ratón de 3 semanas y media de vida la fusión ya ha ocurrido (Richbourg, 2017). Los mecanismos y condiciones necesarias para que ocurran estos fenómenos no son claras, pero considerando la zona del tarso en donde se encuentran estos elementos y la forma plantígrada de caminar del ratón, podría tener relación con la actividad muscular, aunque para saber realmente lo que ocurre es necesario incluir el desarrollo de la musculatura en esta ecuación.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se pudo comprobar mediante la observación del desarrollo de *Mus musculus*, la homología de los elementos basipodiales distales en el carpo, y que efectivamente el unciforme, como está descrito previamente, está formado por la fusión del carpal distal 4 con el carpal distal 5. Por el contrario, fue posible revelar que el cuboide, en el tarso, siempre descrito como la fusión entre el tarsal 4 y el tarsal 5, en realidad es homólogo solo al tarsal distal 4, el quinto tarsal distal no se forma, por lo menos, como condensación cartilaginosa. Se reporta que el astrágalo, ya en el estadio 13.5dpc, está formado por dos centros de cartílago, lo cual permite descartar la teoría de Baur de que el astrágalo es homólogo al intermedium, y sugeriría que la teoría más correcta es la de Gegenbaur, en la cual el astrágalo corresponde a la fusión entre el tibiale y el intermedium, al igual que en reptiles, pero se necesita información de estadios más tempranos para poder descartar completamente las teorías donde el astrágalo estaría formado por más de dos elementos. Sí se puede asegurar que el cartílago posterior forma el cuerpo principal y el cartílago anterior forma el cuello y cabeza distal del astrágalo al final de su desarrollo. Además, se

encuentra que el calcáneo también se forma por la unión de dos cartílagos, uno distal y otro proximal, pero no es posible determinar la homología de estos elementos.

En los estadios de desarrollo embrionario presentados se observa el proceso de superposición del astrágalo sobre el calcáneo, proceso que también se observa al estudiar la filogenia de synapsidos.

Estas especies de paralelismos que se pueden observar cuando comparamos lo que sucede en el desarrollo con lo que encontramos en el registro paleontológico, como es la superposición del astrágalo y la fusión de los carpales distales, nos recuerda que esta división (embriología versus paleontología) es artificiosa y solo útil para responder a qué nos dedicamos, pero esconde una visión mayor que es que finalmente, la ontogenia y la filogenia son parte de un mismo proceso.

BIBLIOGRAFÍA

Alberch, P. 1983. MORPHOLOGICAL VARIATION IN THE NEOTROPICAL SALAMANDER GENUS *BOLITOGLOSSA*. *Evolution*, 37: 906-919.

Barnett, C.H., Lewis, O.J. 1958. The evolution of some traction epiphyses in birds and mammals. *J. Anat.* 92(4):593-601.

Baur, G. 1885. On the morphology of the tarsus in mammals. *Amer. Nat.* 19:86-88.

Botelho, J.F. Ossa-Fuentes, L. Soto-Acuña, S. Smith-Paredes, D. Nuñez-León, D. Salinas-Saavedra, M., Ruiz-Flores, M., Vargas, A.O. 2014. New Developmental Evidence Clarifies the Evolution of Wrist Bones in the Dinosaur-Bird Transition. *PLOS Biology* 12(9): e1001957.

Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L., Taft, R.A. .2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLOS ONE* 7(4): e35538.

Carrano, M.T., Gaudin, T.J., Blob, R.W. Wible, J.R. 2006. *Amniote paleobiology*. The University of Chicago Press, Chicago and London.

Carroll, R.L. 1988. *Vertebrate paleontology and evolution*. Freeman and company, New York.

Cihák, R. 1972. *Ontogenesis of the Skeleton and Intrinsic Muscles of the Human Hand and Foot*. Springer, Berlin.

Eyal, S., Blitz, E., Shwartz, Y., Akiyama, H. Schweitzer, R., Zelzer, E. 2015. On the development of the patella. *Development*. 142:1831-1839.

Garstang, W. 1922. The Theory of Recapitulation: A Critical Re-statement of the Biogenetic Law. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*. 35: 81-101.

Gilbert, S.F. 2010. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.

Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. and Ijiri, K. 2006. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 97: 33-44.

Hopson, J.A. 1995. Patterns of evolution in the manus and pes of non-mammalian therapsids. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 15(3):615-639.

Horovitz, I. 2000. The tarsus of *Ukhaatherium nessovi* (Eutheria, mammalia) from the late cretaceous of Mongolia: An appraisal of the evolution on the ankle in basal therians. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 20(3):547-560

Jenkins, F.A. 1970. CYNODONT POSTCRANIAL ANATOMY AND THE "PROTOTHERIAN" LEVEL OF MAMMALIAN ORGANIZATION. *Evolution*. 24: 230-252.

Kielan-Jaworowska, Z. 1975. Evolution of the therian mammals in the Late Cretaceous of Asia. Part I. Deltatheridiidae. *Paleontol. Pol.* 33:103-132.

Lai, L. P. and Mitchell, J. 2005. Indian hedgehog: Its roles and regulation in endochondral bone development. *J. Cel. Biochem.* 96: 1163-1173

Lewis, O.J. 1964. The homologies of the mammalian tarsal bones. *J. Anat.* 98:195-208.

Meyer, T.E., Anderson, J.S. 2013. Tarsal fusion and the formation of the astragalus in *Hylonomus lyelli*, the earliest amniote, and other early tetrapods. *Journal of Vertebrate Paleontology* 33(2):488-492

Muller G.B. 1991. Evolutionary transformation of limb pattern: Heterochrony and secondary fusion. En Hinchliffe, J.R., Hurle, J.M., Summerbell, D. Developmental patterning of the vertebrate limb. Plenum Press, New York.

Newman, S. A. and Müller, G. B. 2005. Origination and innovation in the vertebrate limb skeleton: an epigenetic perspective. J. Exp. Zool. 304B: 593-609.

O'keefe, F.R., Sidor, C.A., Larsson, H.C.E., Maga, A., Ide, O. 2006. Evolution and homology of the astragalus in early amniotes: New fossil, new perspectives. J. Morphol. 267:415-425.

Parsons, F.G. 1904. Observations on Traction Epiphyses. J. Anat. Physiol. 38:248-158.

Parsons, F.G. 1908. Further remarks on traction epiphyses. J. Anat. Physiol. 42:388-96.

Patton, J.T., Kaufman, M.H. 1995. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. J. Anat. 186:175-185.

Polly, D. 2007. Limbs in mammalian evolution. En Fins into limbs. Hall, B.K. University of Chicago Press.

Qiang, J., Zhexi, L., Shu-an, J. 1999. A Chinese triconodont mammal and mosaic evolution of the mammalian skeleton. Nature 398:326-330.

Richbourg, H. A., Martin, M. J., Schachner, E. R. and McNulty, M. A. 2017. Anatomical Variation of the Tarsus in Common Inbred Mouse Strains. Anat. Rec., 300: 450-459.

Romer, A.S. 1966. Anatomía comparada (vertebrados). Editorial Interamericana.

Romer, A.S. 1922. The locomotor apparatus of certain primitive mammal-like reptiles. Bulletin of AMNH 46:517-606.

Salton, J.A., Szalay, F.S. 2004. The Tarsal Complex of Afro-Malagasy Tenrecoidea: A Search for Phylogenetically Meaningful Characters. Journal of Mammalian Evolution. 11(2):73-104.

Schaeffer, B. 1941. The morphological and functional evolution of the tarsus in amphibians and reptiles. Bulletin of the AMNH 78:6.

Smith, D. 2015. Evaluación embriológica de la homología de la región orbital en neornithes. Universidad de Chile.

Szalay, F.S. 2006. Evolutionary history of the marsupials and an analysis of osteological characters. Cambridge University Press.

Theilere, K. 1972. The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer, New York.

Thorington, R.W. and Darrow, K. 2000. Anatomy of the Squirrel Wrist: Bones, Ligaments, and Muscles. JOURNAL OF MORPHOLOGY 246:85-102

Wagner, G. 2014. Homology, genes and evolutionary innovation. Princeton University Press, New Jersey.

Yamazaki, Y., Yuguchi, M., Isokawa, K. 2011. Whole-mount bone and cartilage staining of chick embryos with minimal decalcification. Biotechnic & Histochemistry 86:351-358.