

UCH-FC
MAG-B
S-639
C-1

**Evaluación embriológica de la homología de
la región orbital en Neornithes**

**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

Daniel Smith Paredes

Septiembre, 2015

Director de Tesis Dr. Alexander Vargas

Co-director de Tesis Dr. Jorge Mpodozis

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Daniel Smith Paredes

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 13 de Mayo de 2015



Director de Tesis:

Dr. Alexander Vargas

.....

Co-director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Juan Fernández

.....

Dr. Miguel Allende

.....

[Handwritten signatures in blue ink, including a large signature that appears to be "Miguel Allende" and another signature above it.]

Para Jimmy;

Que sin importar que fuera, siempre quiso que hiciera algo

"An understanding of the natural world and what's in it is a source of not only a great curiosity but great fulfillment."

Sir David Attenborough



El joven Daniel Smith Paredes nació un 6 de Diciembre de 1989, en un día bañado por el sol primaveral, según el mismo recuerda. Desde pequeño siempre tuvo una gran curiosidad por el mundo natural y por el reino animal. Su infancia pasó velozmente, sin las contrariedades ni problemas de salud que aquejan a los grandes genios. Aunque perdida la inocencia, su interés por la naturaleza se mantuvo intacto, motivándolo a ingresar en el año 2008 a estudiar Biología en la Universidad de Chile, lo cual resultó casi fatal para dicho interés. A pesar de los obstáculos, mayoritariamente provenientes del área de la química, este joven logró graduarse dignamente. Gracias a una serie de eventos afortunados, se salvó también su pasión por lo vivo y se generó en él una vocación científica, que lo ha llevado al lugar en donde hoy se encuentra.

Feliz y contento, este muchachos se encuentra hoy en un estupendo momento. Qué otros eventos afortunados se presentarán en la vida de este joven y hacia dónde lo conducirán, sólo el tiempo lo dirá..

Agradecimientos

Estoy muy agradecido.

Agradezco a mi familia. A mi mamá y a mi hermano Simón por su apoyo y preocupación constante, por su cariño y por todo en realidad. A Miccaella por la paciencia que, a pesar de todo, ha tenido. Por convertirse en mi familia y convertirme en la suya.

Agradezco también a mis amigos. Si bien el desarrollo de esta tesis podría haber sido realizado en soledad, siempre es más grato poder dejar de trabajar para ir a jugar fútbol, tomar once al casino de Arte o sacar la vuelta. Agradezco, y confieso necesitar, todo eso.

Científicamente, quiero agradecer a Alex, por el espacio y la libertad entregadas, a Jompoma por la voluntad de involucrarse, a Chico por el empujón y la guía, a Soto por su ayuda, al Pollo por el trabajo en equipo y a mi mismo, pieza fundamental en la realización de esta tesis, por el resto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
INFORMACIÓN PALEONTOLÓGICA	3
DISCREPANCIA DE LA INFORMACIÓN EMBRIOLÓGICA	7
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
a. NOMENCLATURA	14
b. ANIMALES EXPERIMENTALES	14
c. TINCIONES ESQUELÉTICAS	15
d. SERIES DE OSIFICACIÓN	15
e. ESPECIMENES FÓSILES	23
RESULTADOS	24
DESARROLLO DEL FRONTAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN	24
DESARROLLO DEL LACRIMAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN	26
DESARROLLO DEL NASAL A PARTIR DE UN NÚMERO VARIABLE DE CNTROS DE OSIFICACIÓN	29
PERSISTENCIA DEL PREFRONTAL EN MANIRAPTORA	33

DISCUSIÓN	35
PERSISTENCIA EMBRIONARIA DEL POSTORBITAL	38
DESARROLLO DEL LACRIMAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN	41
PERSISTENCIA DEL PREFRONTAL EN MANIRAPTORA	42
VALIDEZ DE LAS SECUENCIAS DE OSIFICACIÓN Y NÚMERO DE EMBRIONES	49
DESARROLLO Y EVOLUCIÓN	50
CONCLUSIONES	57
UTILIDAD DE LAS SERIES DE OSIFICACIÓN	59
REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	FILOGENIA DE TERÓPODA	2
FIGURA 2	COMPARACIÓN DEL CRÁNEO DE UN AVE MODERNA Y UN TERÓPODO BASAL	4
FIGURA 3	ESQUEMA DE LA EVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL CRÁNEO EN TERÓPODOS	6
FIGURA 4	ESQUEMA DEL CRÁNEO DE UN EMBRIÓN DE POLLO DE 10 DÍAS DE INCUBACIÓN	14
FIGURA 5	ORÍGEN MIXTO DEL DERMATOCRÁNEO EN EL POLLO	16
FIGURA 6	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE PERDIZ CHILENA	17
FIGURA 7	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE PATO ...	18
FIGURA 8	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE PALOMA	19
FIGURA 9	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE QUELTEHUE	20
FIGURA 10	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE TAGUA ...	21
FIGURA 11	SECUENCIA DE OSIFICACIÓN DEL EMBRIÓN DE CATA	22
FIGURA 12	DESARROLLO DEL FRONTAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN EN PATO Y QUELTEHUE	25
FIGURA 13	DESARROLLO DEL LACRIMAL EN PERDIZ, PATO Y POLLO	27
FIGURA 14	SECUENCIA DE DESARROLLO DEL LACRIMAL EN QUELTEHUE, TAGUA Y CATA	28

FIGURA 15	SECUENCIA DE DESARROLLO DEL NASAL EN PATO, TAGUA Y CATA	31
FIGURA 16	SECUENCIA DE DESARROLLO DEL NASAL EN QUELTEHUE, PALOMA Y PERDIZ	32
FIGURA 17	LACRIMAL DE DEINONYCHUS MOR747	34
FIGURA 18	ONTOGENIA DEL CRÁNEO EN ALLIGATOR	40
FIGURA 19	PERSISTENCIA DEL PREFRONTAL EN MANIRAPTORA	44
FIGURA 20	REINTERPRETACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL PREFRONTAL EN TERÓPODA	45
FIGURA 21	MORFOLOGÍA DEL NASAL EN PALEOGNATOS	48
FIGURA 22	COMPARACIÓN DEL DESARROLLO EN ARCO SAURIOS	52
FIGURA 23	DESARROLLO DE CENTROS DE OSIFICACIÓN	53

RESUMEN

El registro fósil muestra que en el linaje conducente a las aves modernas a partir de sus ancestros terópodos se pierden el prefrontal y el postorbital. Esta información contrasta con las observaciones de embriones de aves. En estas se observa el desarrollo del hueso lacrimal a partir de dos centros de osificación, uno de los cuales ha sido interpretado como la persistencia embrionaria del prefrontal. El frontal también tiene un origen a partir de dos centros de osificación, provenientes además de dos capas germinales diferentes (cresta neural y mesodermo), lo que ha alimentado diversas hipótesis sobre la homología de esta segunda osificación.

Estudiando embriones de seis especies distintas de aves se encontró que la osificación del lacrimal a partir de dos centros de osificación es una sinapomorfía de las aves modernas. Se encontró que un elemento homologable al prefrontal, sólo está presente transitoriamente en el cráneo de la perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*), y que este elemento pasa a formar parte del nasal, que se desarrolla a partir de otros dos centros de osificación, encontrados también en la paloma (*Columba livia*) y el queltehue (*Vanellus chilensis*). Finalmente, se encontró evidencia del desarrollo de dos centros de osificación

dando origen al frontal en el pato (*Anas platyrhynchos*) y el quelehue (*Vanellus chilensis*), cuya posición sugiere una homología con el postorbital.

ABSTRACT

The fossil record shows that in the lineage leading to modern birds from their theropod ancestors, the prefrontal and postorbital bones were lost. This information contrasts with the observations of modern bird embryos. In these, the lacrimal bone develops from two ossification centers, one of which has been interpreted as the embryonic remnant of the prefrontal. The frontal bone also develops from two ossification centers, although derived from two different germinal layers (neural crest and mesodermal cells), which has fueled contrasting hypothesis regarding the homology of this second ossification.

Studying embryos of six different species of modern birds, we found that the development of the lacrimal bone from two separate centers is a synapomorphic character for birds. We found one element potentially homologous to the prefrontal in the skull of the Chilean tinamou (*Nothoprocta perdicaria*), but this element later fuses with the nasal, which develops from two other different ossification centers. Those last two centers were also found in the rock pigeon (*Columba livia*) and the Chilean lapwing (*Vanellus*

chilensis). Lastly, we found a second center of ossification of the frontal bone in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) and the Chilean lapwing, in a position that strongly suggests its homology with the lost postorbital.

INTRODUCCIÓN

Las aves modernas, o Neornithes, son el único linaje vivo de dinosaurios, siendo sus parientes vivos más cercanos los cocodrilos, dentro del grupo Arcosauria. Las aves se encuentran más cercanamente emparentadas con los dinosaurios bípedos carnívoros (Theropoda), y más específicamente, se encuentran dentro de un gran grupo de terópodos pequeños y emplumados, los Maniraptora (FIGURA 1).

Su origen evolutivo es una historia compleja de modificación e innovación morfológica. Comparadas con sus parientes vivos más cercanos, los crocodylia, se pueden encontrar en las aves una larga lista de diferencias morfológicas, metabólicas y conductuales. La evolución del esqueleto es por mucho, la mejor comprendida de estas transformaciones, gracias a la gran cantidad de formas transicionales preservadas en el registro fósil. Más aún, en los últimos años la biología evolutiva del desarrollo (evo-devo) ha presentado nueva información, integrando datos embriológicos y paleontológicos, revelando los mecanismos detrás del origen evolutivo de la innovadora morfología de las aves (Botelho et al., 2014; Botelho et al., 2015, Bhullar et al., 2012).

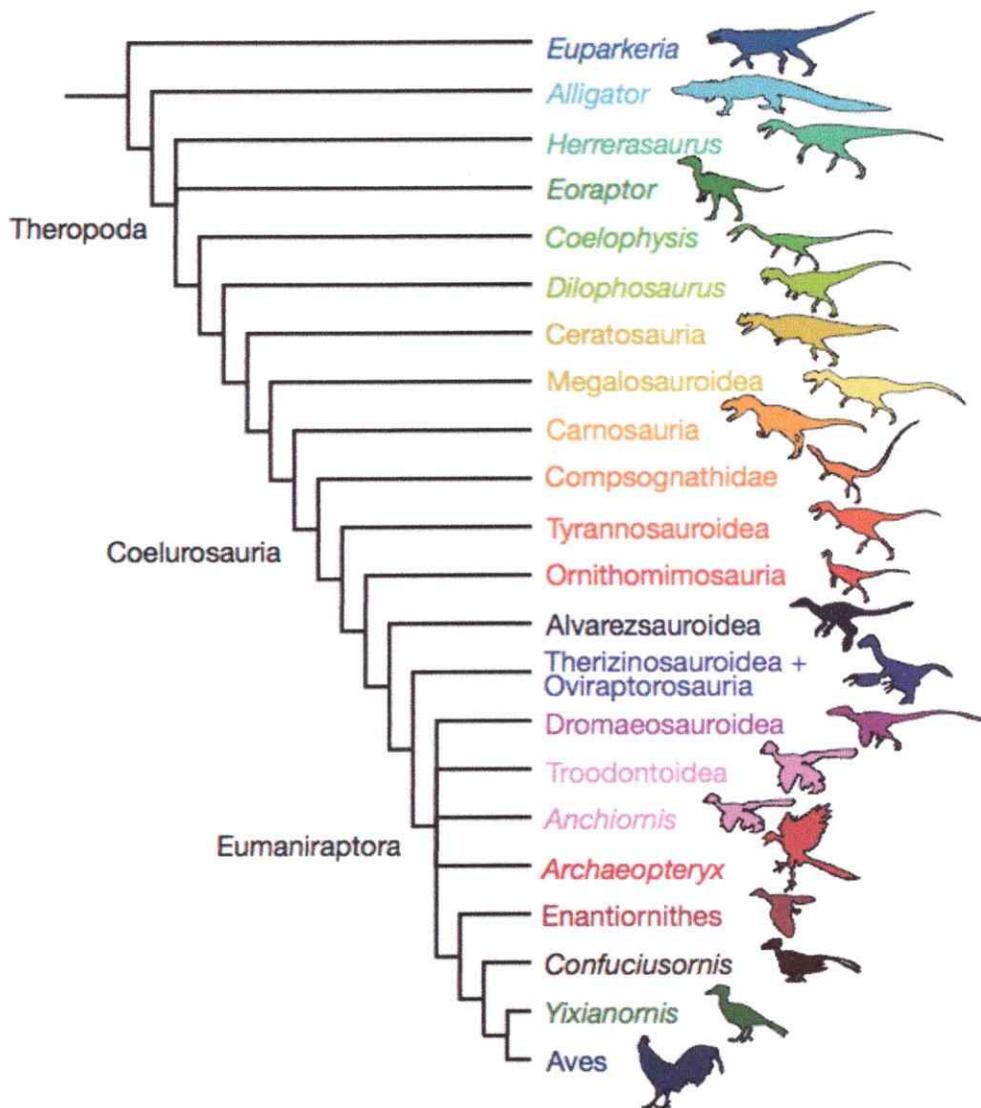


Fig. 1. Filogenia simplificada de la relaciones entre los principales grupos de terópodos. Tomado de Bhullar, 2012.

El cráneo de las aves representa una de las regiones más transformadas morfológicamente respecto a un terópodo basal (FIGURA 2), y, al mismo tiempo una de las menos estudiada en términos de integración de embriología y morfología/paleontología. Las dificultades que se presentan en el estudio de la embriología del cráneo, en general, se suman a la derivada morfología del cráneo aviario, dando como resultado un entendimiento incierto sobre la homología de los elementos óseos que lo componen. Así, la paleontología y la embriología presentan evidencias contrastantes que dan lugar a interpretaciones muy distintas sobre la identidad de los huesos craneales.

INFORMACIÓN PALEONTOLÓGICA

De la vasta lista de transformaciones morfológicas, el cráneo de Neornithes es la estructura esquelética más modificada, al compararla con la de sus ancestros. Las aves modernas tienen un cráneo compuesto principalmente de huesos fusionados, albergando un cerebro y ojos proporcionalmente muy grandes. La premaxila, sin dientes, ocupa una mayor proporción del rostro, mientras la maxila se ha reducido, acompañada de una disminución en el tamaño de la fenestra anterorbital, característica de Arcosauria. La fenestración diapsida, por otra parte, ha desaparecido

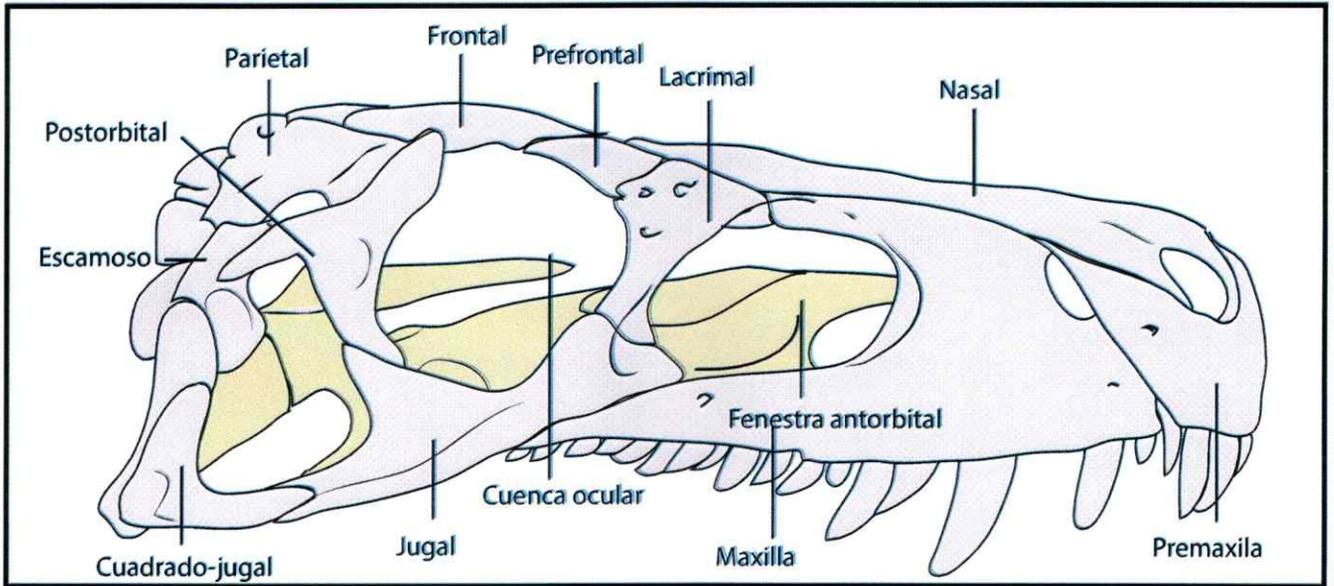
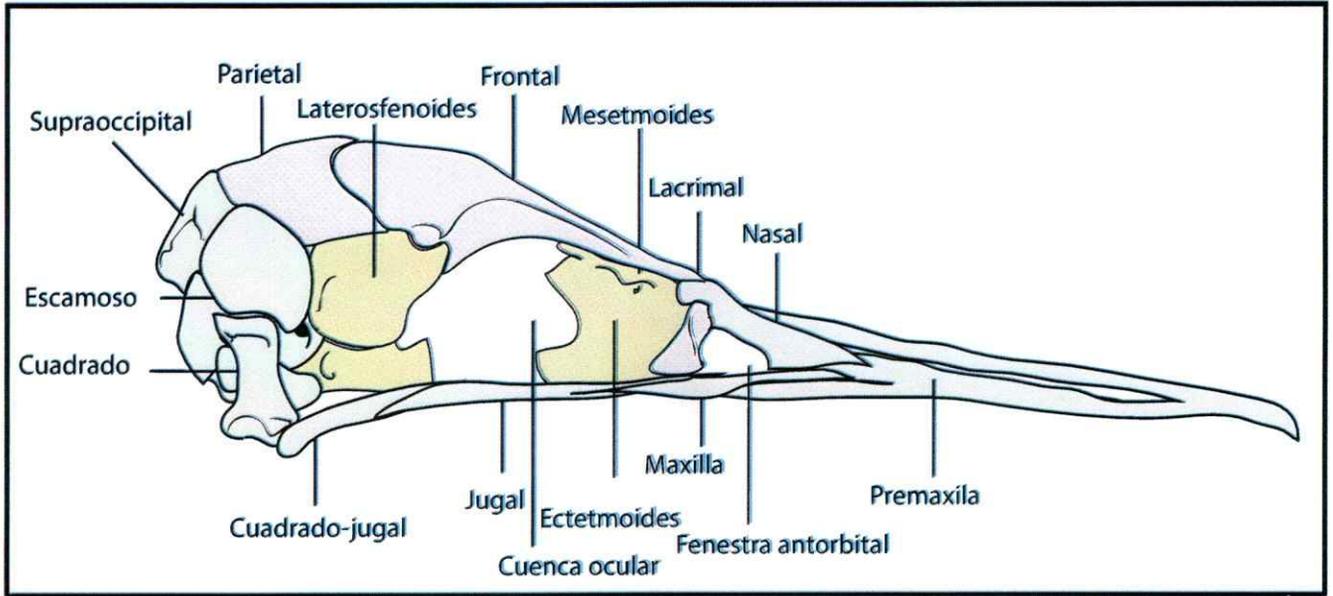


Fig. 2. Comparación del cráneo de un ave moderna juvenil (*Sula variegata*) y el del un terópodo basal (*Herrerasaurus ischigualanstenensis*, modificado de Sereno y Novas, 1994) que ilustra la modificación del cráneo en términos de pérdida de dientes, reducción de la fenestración, aumento del tamaño de la premaxila, pérdida del prefrontal y el postorbital. Sumado a estos cambios, la mayoría de los huesos del cráneo de las aves adultas se fusionan entre sí, dejando poco o ningún rastro del límite o identidad de los elementos individuales.

como resultado de la pérdida del hueso postorbital, que unía la barra yugal con la región superior del cráneo. Así, el cráneo sólido y robusto de los arcosaurios basales dio paso al delgado y esbelto cráneo de las aves actuales.

La homología del cráneo, en términos paleontológicos, no ha sido cuestionada, referente a la identidad de los elementos presentes en el cráneo de los terópodos. El número reducido de huesos ha sido interpretado de la manera más simple. En la línea evolutiva que dio origen a las aves, se ha descrito una tendencia a la pérdida de elementos óseos (FIGURA 3). En los primeros arcosaurios, ancestros remotos de las aves, desapareció el postfrontal y la septomaxila, acompañando la aparición de la fenestra anteorbital y el desarrollo de una apófisis nasal de la maxila, bordeando la fenestra en la posición de la ausente septomaxila.

Dentro de Theropoda, se pierde el prefrontal en dinosaurios maniraptores. Esta pérdida va de la mano con el desarrollo de una apófisis posterior del hueso lacrimal (rojo en Fig. 3), que adquiere una forma de T (ej. Fig. 3: G, H), comparada con la usual forma de L invertida observada en terópodos no-maniraptores (ej. Fig 3: C,D)

Más cerca de Neornithes, dentro del clado Ornithurae, siguiendo el aumento del tamaño del frontal, se perdió el

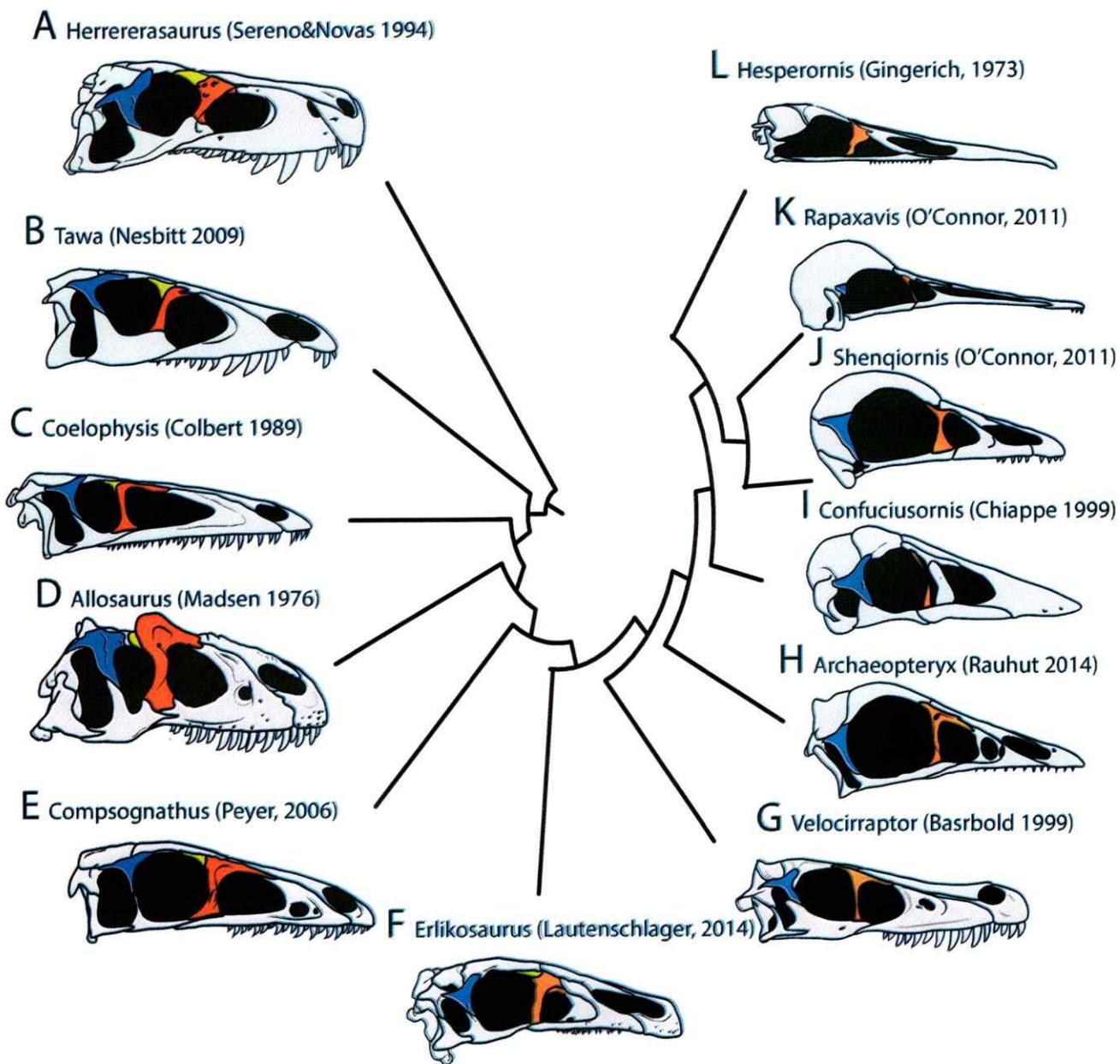


Fig. 3. Esquema de la evolución de la morfología del cráneo en terópodos. Se resaltó en azul el postorbital, en amarillo el prefrontal y en rojo el lacrimal para poner énfasis en las modificaciones morfológicas de estos elementos y de su relación con otras estructuras del cráneo que cambian junto a ellos, como la órbita, las ventanas craneales y la forma del cráneo.

postorbital (azul en Fig 3 A-I) y, con esto, las fenestras temporales.

DISCREPANCIA DE LA INFORMACIÓN EMBRIOLÓGICA

Estudios del desarrollo de embriones de aves modernas (principalmente el pollo, *Gallus gallus*) han entregado versiones diferentes a la historia evolutiva propuesta en base a la evidencia paleontológica en comparación con sus ancestros terópodos, desafiando la homología de los elementos óseos que limitan la órbita en Neornithes.

Hasta mediados del siglo XX, se discutía sobre la identidad del elemento anterior a la órbita (lacrimonasal según la paleontología: rojo en figura 3), siendo identificado tanto como el prefrontal o como el lacrimonasal. Jolie (1957) considera el paso del *ducto lacrimonasal* como un argumento suficiente para homologar este hueso al lacrimonasal y asumir la ausencia del prefrontal. Sin embargo, Erdmann (1940) identificó dos centros de osificación originando este hueso y homologó el más dorsal de éstos (centro supraorbital) al prefrontal y el más ventral (centro orbital) al lacrimonasal de otros amniotas (FIGURA 4).

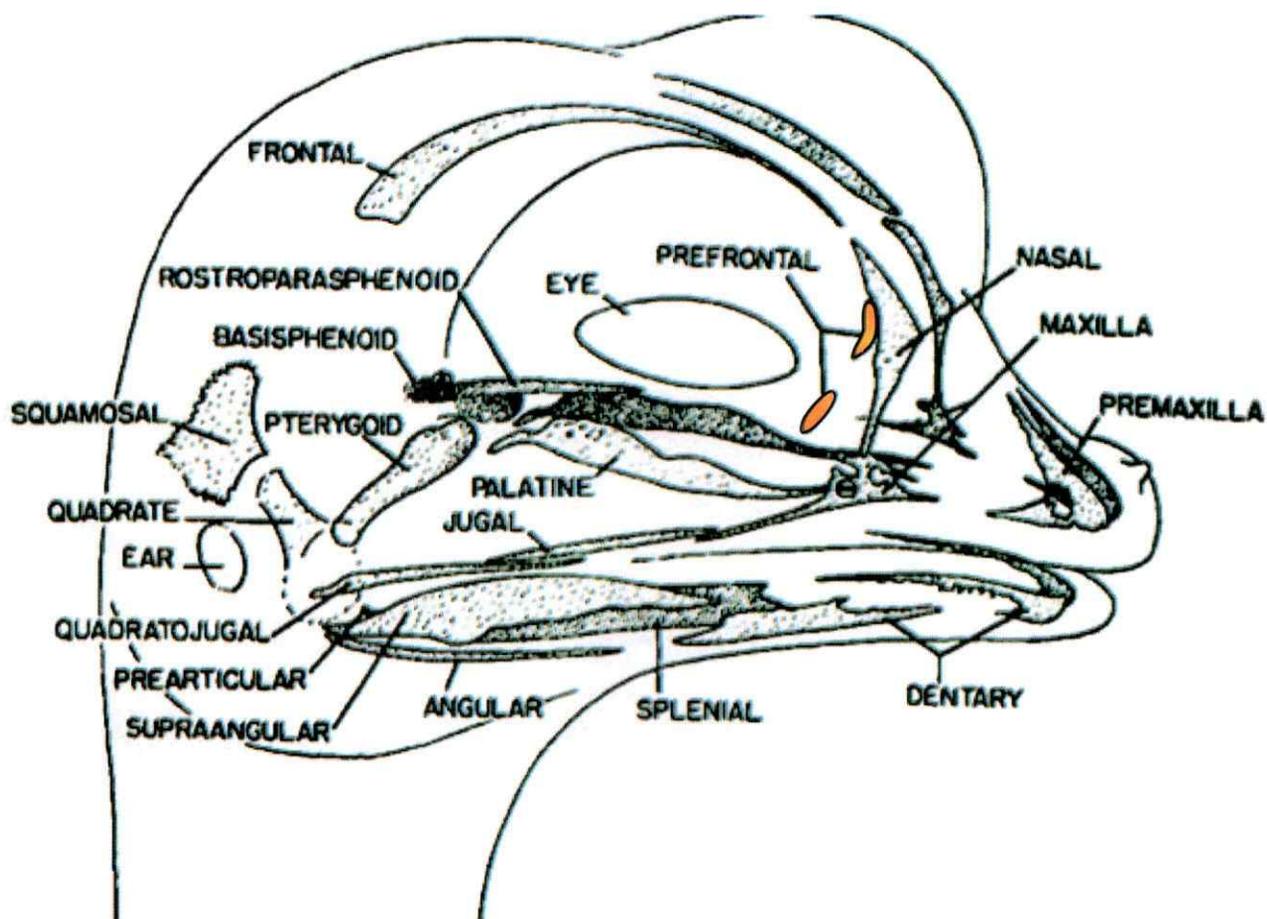
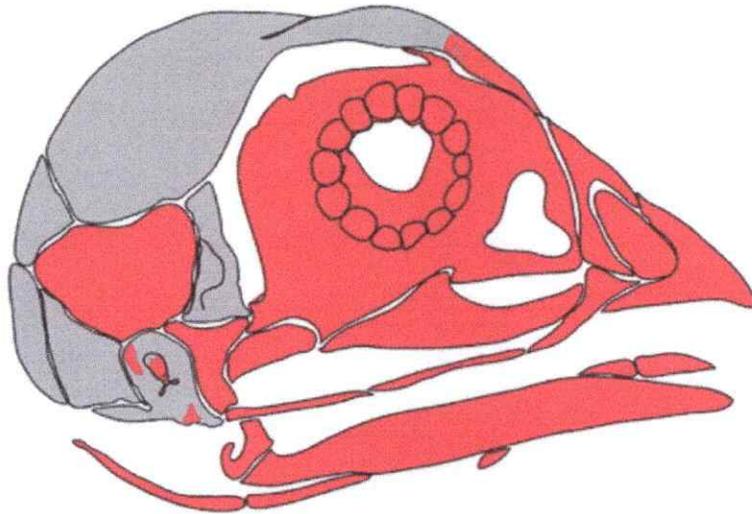


Fig. 4. Esquema del cráneo en un embrión de pollo de 10 días de incubación. El lacrimal (en rojo) se origina a partir de dos centros de osificación, el centro supraorbital (dorsal) y el orbital (ventral). Tomado de Jolie, 1957.

Observaciones más recientes también describen el origen del lacrimal a partir de dos centros de osificación en el ave paleognata *Dromaius* (Maxwell, 2009), sin embargo, este estudio no identificó al centro supraorbital como homólogo al prefrontal, prefiriendo la interpretación de que el lacrimal presenta dos centros de osificación..

Bittner describe en el pollo una osificación independiente dando origen la apofisis postorbital del frontal, la cuál relaciona con el postorbital de los reptiles (Jolie, 1957). Erdmann (1940), por su parte, también describe una osificación en esa posición, pero la homologa al postfrontal. Durante la década de los '70, mediante el uso de quimeras heteroespecíficas, se propuso que el frontal correspondía a un hueso de origen mixto, formado por dos centros de osificación; uno derivado de células de la cresta neural y otro derivado de células del mesodermo (Le Lievre & Le Douarin, 1975; Le Lievre, 1978) (FIGURA 5). En base a la evidencia de un origen mixto del frontal en aves, y del origen del frontal y el parietal de mamíferos a partir de células de la cresta neural y el mesodermo, respectivamente, se ha propuesto que el frontal de las aves corresponde a un elemento originado tras la fusión del frontal y el parietal,



■ Cresta Neural

■ Mesodermo

Fig. 5. Origen mixto del dermatocráneo en el embrión de pollo, (tomado de Gross y Hanken, 2008). En rojo se destacan los elementos que se originan a partir de células de la cresta neural, mientras que en gris se muestran los elementos de origen mesodérmico. El caso del frontal es especial, al presentar un origen mixto.

mientras el parietal correspondería al interparietal de otros amniotas (Noden y Schneider 2006).

Desde la biología del desarrollo se han propuesto diversas hipótesis de homología del cráneo de las aves, mientras que la evidencia paleontológica sólo se pronuncia sobre la identidad de los huesos presentes en el adulto, sin referirse a osificaciones tempranas que se fusionan rápidamente. Esta tesis propone la integración de la evidencia paleontológica y embriológica, enfocada a una revisión de la evolución de la zona circumorbital en el linaje terópodo conducente a las aves modernas y su desarrollo embrionario en distintos representantes de este grupo. Esto permitirá discriminar entre diferentes posibilidades evolutivas, tales como la fusión temprana de elementos previamente separados, elementos que cesaron de formarse en la evolución (agénesis), o la evolución de nuevos centros de osificación (neomorfismo).

El estudio de las secuencias de osificación no es sólo útil para el planteamiento de hipótesis de homología o historia evolutiva de un grupo, sino que también facilita la comprensión del desarrollo de los huesos craneales de aves. Los estudios previos del desarrollo de la osificación en aves, realizados por Maxwell (Maxwell, citas) no reflejan procesos embrionarios reales, debido a dos serios problemas metodológicos: El primero es un muestreo pobre de estadios

embrionarios, que resulta en que se pasan por alto momentos claves en los cuales se pueden observar estructuras transitorias que duran algunas horas. El segundo es el uso de tinciones ácidas que descalcifican el tejido, borrando la marca sobre las osificaciones más pequeñas, alterando el resultado del estudio. La poca claridad que generan estos resultados, y la falta de integración de esta información con la evidencia paleontológica, son causales de la discrepancia entre las actuales hipótesis de homología.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Reconocer los centros de osificación que rodean la órbita durante el desarrollo de aves modernas (Neornithes) y evaluar las hipótesis de homología de estos elementos en un contexto que integre la información paleontológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la variación evolutiva en aves modernas observando las osificaciones circumorbitales embrionarias en diferentes familias.
2. Establecer en diferentes familias de aves si el lacrimal en efecto se desarrolla a partir dos osificaciones.
3. Evaluar en diferentes familias de aves la presencia de el prefrontal y postorbital.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Nomenclatura

Se siguió la terminología anatómica de Baumel y Witmer (1993), complementado con literatura especializada. Los estadios del desarrollo de las especies utilizadas se basaron en los estadios propuestos para pollo (HH) por Hamburger y Hamilton (1951).

b. Animales experimentales

Huevos fertilizados fueron comprados a distintos distribuidores locales; los huevos de pollos Broiler (*Gallus gallus*) fueron comprados a Agrícola Chorombo, los huevos de pato (*Anas platyrhynchos*) comprados a Agrícola Metrenco y los huevos de perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*) a Tinamou Chile

Los huevos de cata australiana (*Melopsittacus undulatus*) se obtuvieron de colonias reproductoras mantenidas por el laboratorio de Biología del Conocer y el laboratorio de Ontogenia y Filogenia, mientras que los huevos de paloma (*Columba livia*) fueron obtenidos de posturas esporádicas de las palomas mantenidas en el vivero de los mismos laboratorios.

Los huevos de tagua (*Fulica armillata*) y queltehue (*Vanellus chilensis*) fueron colectados, con permiso del SAG, en diversas localidades de la región metropolitana. Se

completaron las series obtenidas con ejemplares preparados pertenecientes al Laboratorio de Ontogenia y Filogenia. Al no saberse con seguridad la edad de los embriones, se les nombró de acuerdo al número del nido y al número de huevo del nido.

Todos los huevos, tanto los comprados como los obtenidos de las aves del vivero, fueron incubados a 37.5°C y 70% de humedad en un incubador automático desde el inicio de su desarrollo. Los huevos colectados en terreno fueron observados por transiluminación y sumergidos en agua para determinar su posible estado de desarrollo e incubados bajo las mismas condiciones que los demás huevos, por el tiempo que se estimó necesario para obtener los estadios deseados.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la legislación chilena y fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal.

c. Tinciones esqueléticas

Se prepararon series completas de tinciones esqueléticas de todas las especies utilizadas, de embriones en estadios comprendidos entre HH32 y HH39. Los embriones fueron fijados en 100% Metanol (MetOH) durante dos a tres días, luego de lo cual se post-fijaron entre diez a treinta minutos en Formalina al 4%, seguido de un breve paso por agua destilada y teñidos durante dos a seis horas con 0.03% Rojo Alizarina (Sigma-Aldrich), en 2% KOH, a temperatura

ambiente. Luego los embriones fueron lavados con agua destilada (dH₂O) durante una noche y posteriormente incubados durante varios días en una secuencia de 1:5, 1:1 y 4:5 Glicerol:dH₂O.

d. Series de osificación

En base a diferentes embriones, con diferentes grados de osificación, se estableció una secuencia de osificación del cráneo de la perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*) (FIGURA 6), pato doméstico (*Anas platyrhynchos*) (FIGURA 7), paloma (*Columba livia*) (FIGURA 8), queltehue (*Vanellus chilensis*) (FIGURA 9), tagua (*Fulica armillata*) (FIGURA 10) y cata australiana (*Melopsittacus undulattus*) (FIGURA 11).

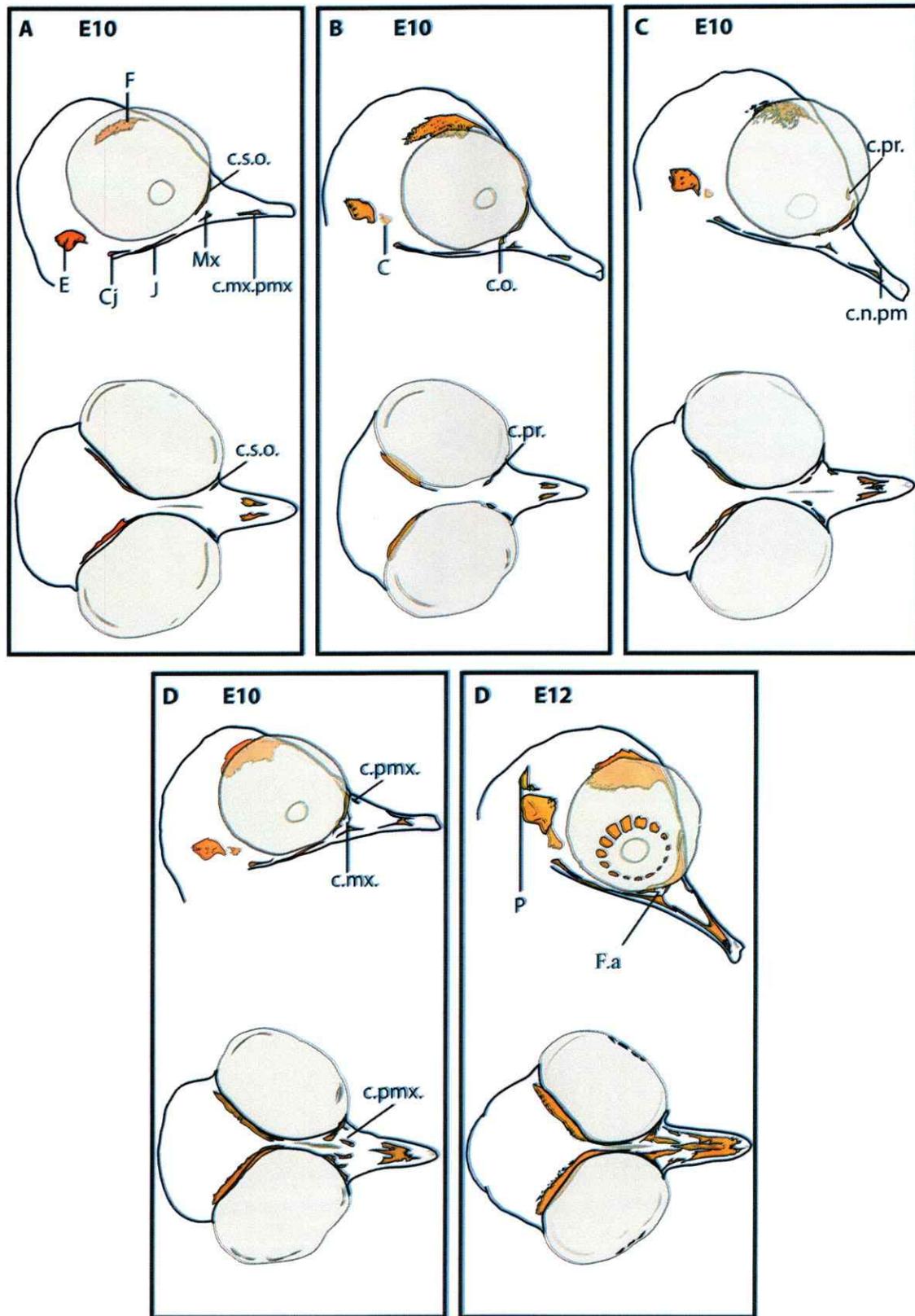


Fig. 6. Secuencia de osificación del cráneo en la perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*) entre los días 10 y 12 de incubación. C: cuadrado, Cj: cuadradojugal, C.n.pmx: centro nasal de la premaxila, C.mx.n: centro maxilar del nasal, C.mx.pmx: centro maxilar de la premaxila, C.o: centro orbital del lacrimal, C.pmx.n: centro premaxilar del nasal, C.pr.n: centro prefrontal del nasal, C.s.o: centro supraorbital del lacrimal, E: escamoso, F: frontal, J: jugal, Mx: maxila, P: parietal.

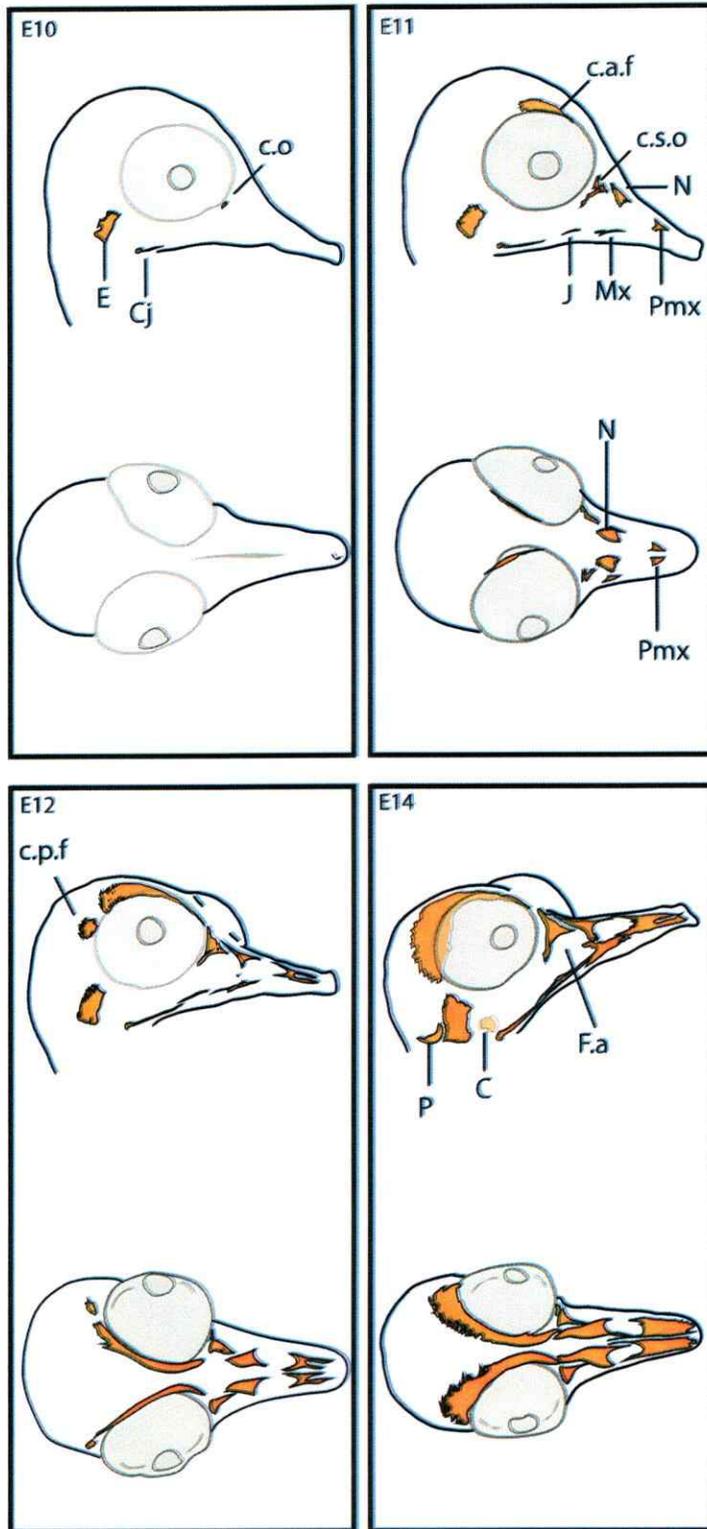


Fig. 7. Secuencia de tosificación del cráneo del pato doméstico (*Anas platyrhynchos*) entre los días 10 y 14 de incubación. C: cuadrado, Cj: cuadradojugal, C.a.f: centro anterior del frontal, C.o: centro orbital del lacrimal, C.p.f: centro posterior del frontal, C.s.o: centro supraorbital del lacrimal, E: escamoso, F.a: fenestra antorbital, J: jugal, Mx: maxila, N: nasal, P: parietal, Pmx: Premaxila

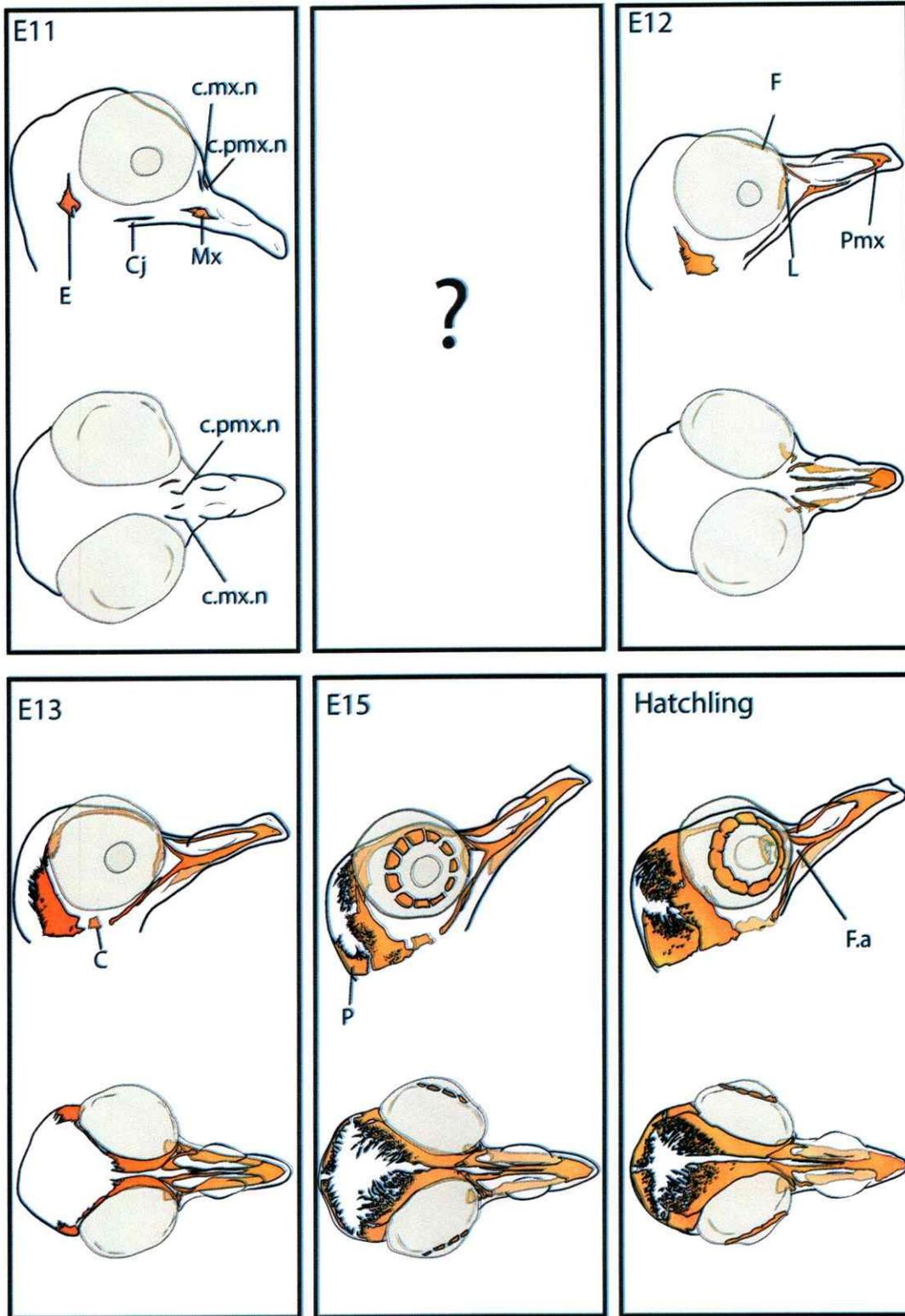


Fig. 8. Secuencia de osificación del cráneo en lapaloma (*Columba livia*) entre los días 11 de incubación y la eclosión los 17 días. C: cuadrado, Cj: cuadradojugal, C.mx.n: centro maxilar del nasal, C.pmx.n: centro premaxilar del nasal, E: escamoso, F: frontal, F.a: fenestra antorbital, J: jugal, L: Lacrimal, Mx: maxila, P: parietal.

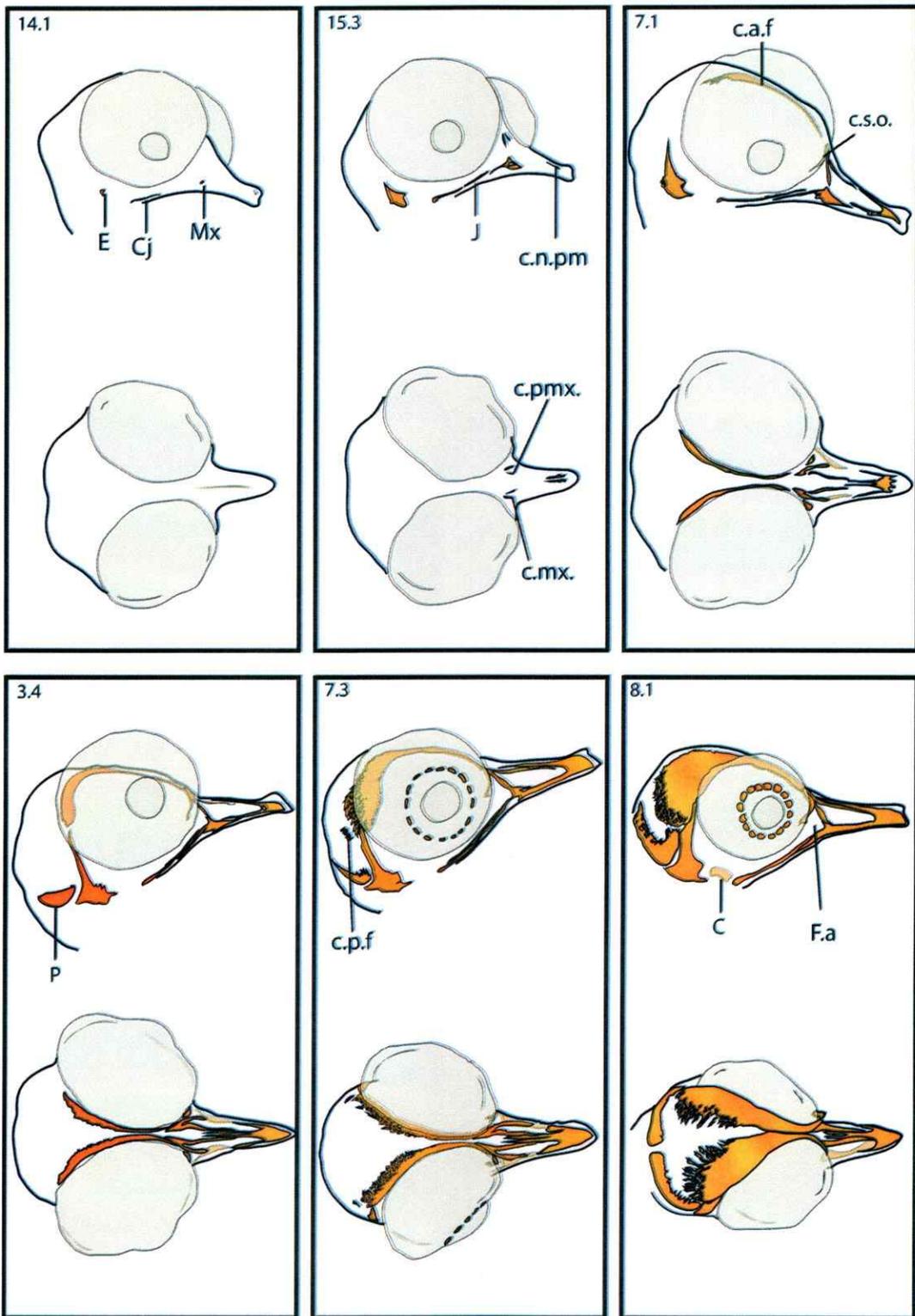


Fig. 9. Secuencia de osificación del cráneo en el queltehue (*Vanellus chilensis*). C.a.f: centro anterior del frontal, C: cuadrado, Cj: cuadradojugal, C.n.pm: centro nasal de la premaxila, C.mx.n: centro maxilar del nasal, C.p.f: centro posterior del frontal, C.pmx.n: centro premaxilar del nasal, C.s.o: centro supraorbital del lacrimal, E: escamoso, F: frontal, Fa: fenestra antorbital, J: jugal, Mx: maxila, P: parietal.

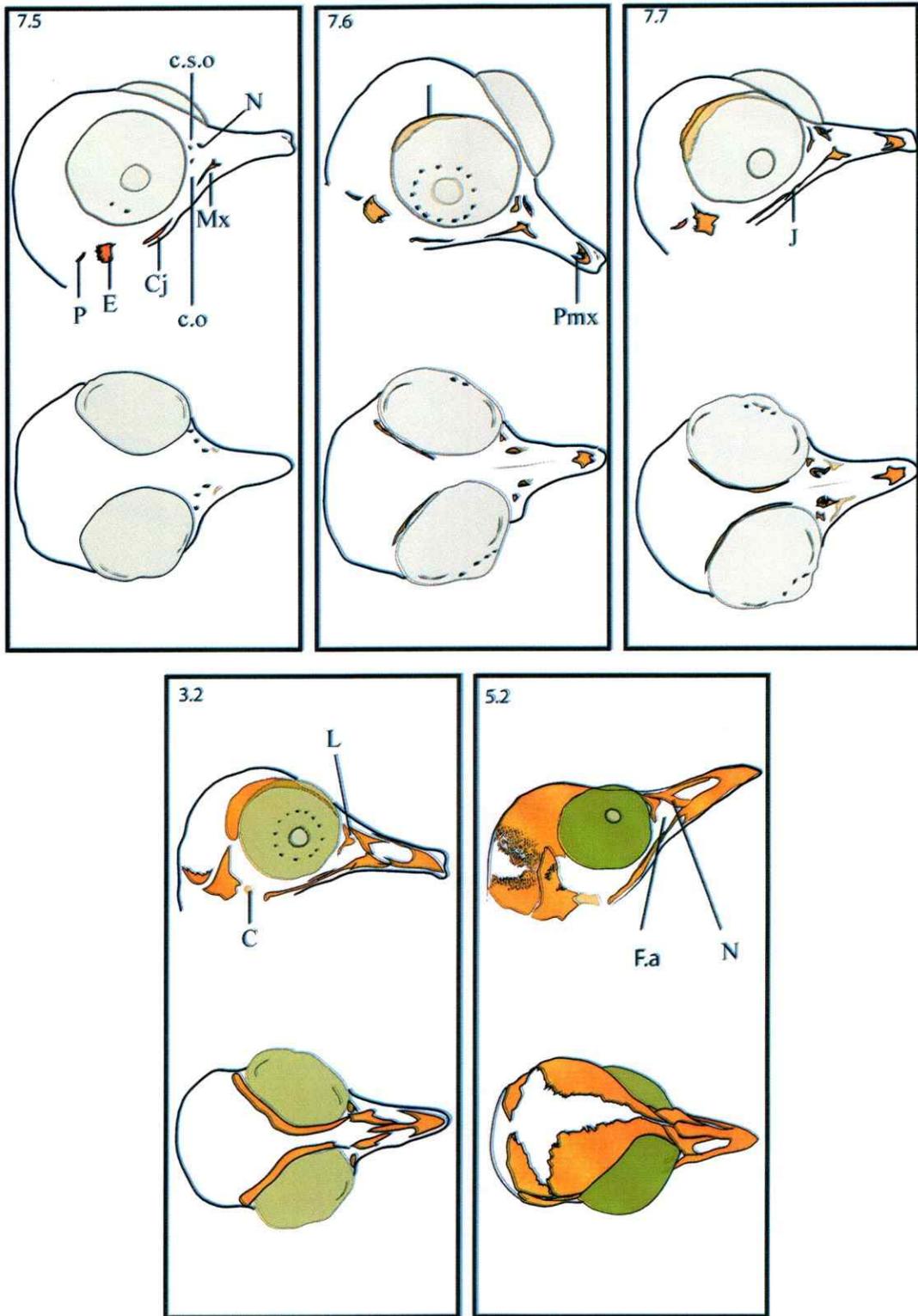


Fig. 10. Secuencia de osificación del cráneo del embrión de tagua (*Fulica armillata*). C: cuadrado, Cj: cuadrado-jugal, C.o: centro orbital del lacrimal, C.s.o: centro supraorbital del lacrimal, E: escamoso, F: frontal, F.a: fenestra antorbital, J: jugal, Mx: maxila, N: nasal, P: parietal, Pmx: Premaxila

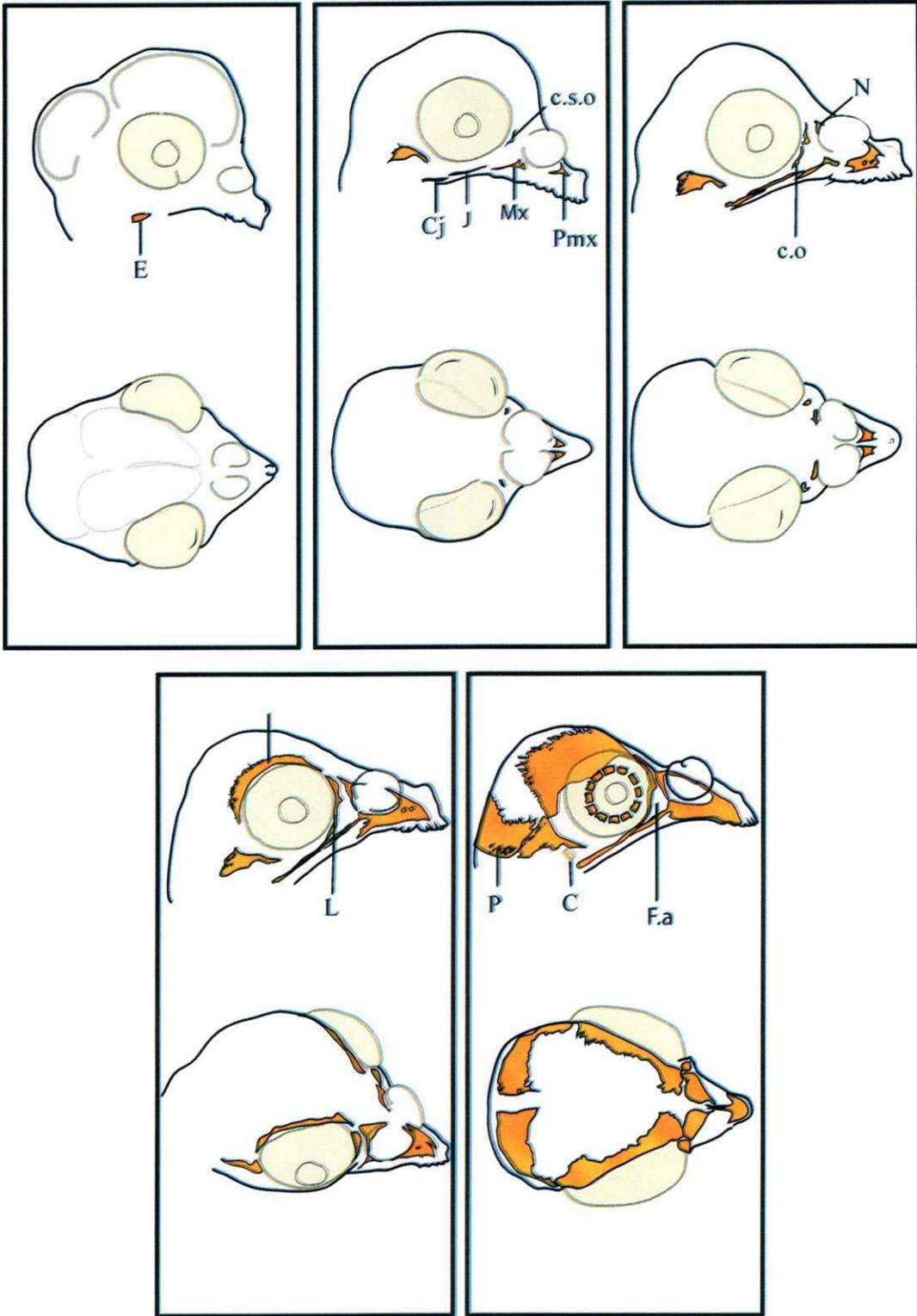


Fig. 11. Secuencia de osificación del cráneo del embrión de cata (*Melospittacus undulattus*). C: cuadrado, Cj: cuadradojugal, C.o: centro orbital del lacrimal, C.s.o: centro supraorbital del lacrimal, E: escamoso, F: frontal, F.a: fenestra antorbital, J: jugal, Mx: maxila, N: nasal, P: parietal, Pmx: Premaxila

Para la presentación de los resultados del estudio, se referirá a los centros de osificación, en la mayoría de los casos, por el nombre del elemento que originan. De acuerdo a descripciones anteriores, dos centros de osificación se desarrollan frente al ojo. Basado en la posición de estos dos centros de osificación, limitando cercanamente con el borde anterior de la órbita, se referirá a ellos con la nomenclatura utilizada por otros autores (Jolie, 1957; Cracraft, 1969; Maxwell, 2009). Así, el centro más ventral corresponde al centro orbital y el más dorsal al centro supraorbital. En los casos en que el nasal se desarrolla a partir de dos centros de osificación, se hará referencia a estos como el centro premaxilar y centro maxilar, de acuerdo al nombre del proceso del nasal que originan.

e. Especímenes fósiles

Principalmente se recurrió a literatura especializada para obtener información sobre la morfología de los elementos óseos. Se observaron *in situ* restos fósiles de *Deinonychus antirhopus* en el Museum of the Rockies (Bozeman, Montana, E.E.U.U.) y de *Tyrannosaurus rex* (FIELD Museum of Natural History, Chicago, Illinois, E.E.U.U).

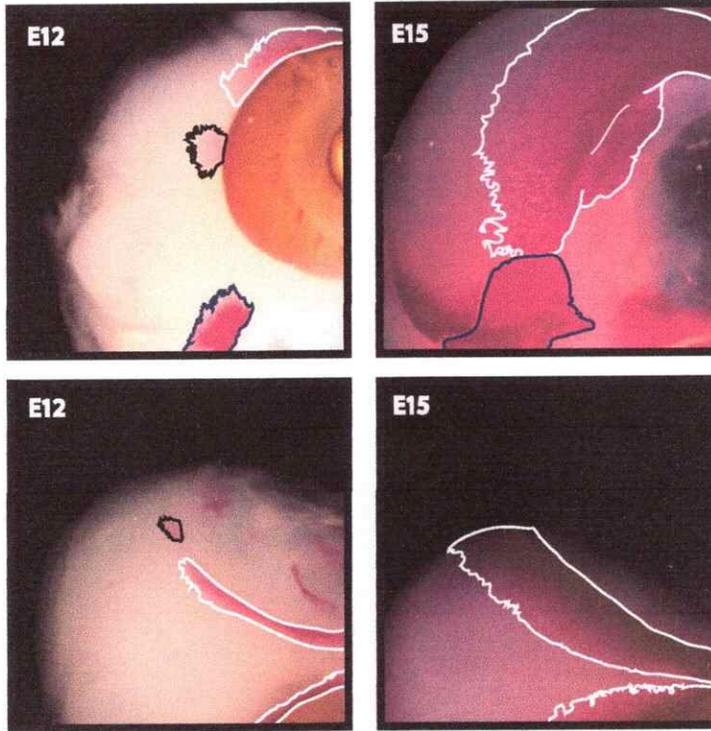
RESULTADOS

DESARROLLO DEL FRONTAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN

Tanto en el pato doméstico (*A. platyrhynchos*) como en el queltehue (*V. chilensis*) el frontal se desarrolla a partir de dos centros de osificación claramente separados. En ambas especies sólo se encontró el centro posterior del frontal separada en un único embrión. En el pato, el centro posterior es mucho más pequeño que el anterior y se desarrolla en la región caudal del margen posterior del ojo, en contacto con la órbita, a los 12 días de incubación (FIGURA 12A). Alrededor del día 15 de incubación, ambos centros se han fusionado, y el frontal se extiende hasta contactar el escamoso en su borde más ventral.

El centro posterior del frontal del embrión de queltehue, en tanto, también se desarrolla posterior al margen del ojo, pero no lo contacta como en el caso del pato. Esto, probablemente debido a la extensión dorsal de la apófisis postorbital del escamoso y la extensión ventral del centro anterior del frontal (FIGURA 12B). Más avanzado el desarrollo, ambos centros de osificación se encuentran fusionados.

A

Anas

B

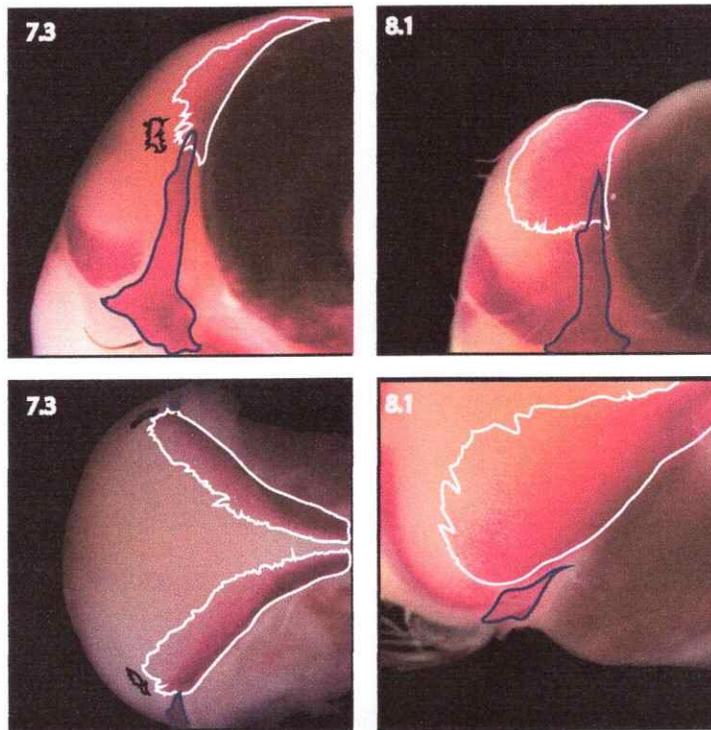
Vanellus

Fig. 12. Comparación de la región postorbital del pato doméstico (*Anas platyrhynchos*) y del queltehue (*Vanellus chilensis*) en dos estadios no equivalentes de desarrollo. En ambas especies se observa una osificación posterior a la órbita (en negro), por detrás del límite posteroventral del frontal (en blanco), y dorsal al escamoso (en azul). También, en ambas especies, esta osificación se fusiona a la región caudal del frontal, que alcanza un límite mucho más posterior y medial, alejado de la órbita, contactándose con el parietal. Los límites de los elementos fueron marcados a mano alzada, sólo con el fin de mostrar su extensión y de facilitar su identificación.

DESARROLLO DEL LACRIMAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN

En todas las especies observadas, con excepción de la paloma, el hueso lacrimal se desarrolla a partir de dos centros de osificación separados, el centro supraorbital y el centro orbital (FIGURA 13 Y 14). En la perdiz chilena (*N. perdicaria*) el centro supraorbital es dorsoventralmente alargado y osifica antes que el centro orbital, que es más pequeño (FIGURA 13 A, B y C). Por otra parte, el lacrimal del pato doméstico (*A. platyrhynchos*) se forma a partir de un centro supraorbital pequeño y un centro orbital alargado, que osifica más temprano (FIGURA 13 D, E y F).

En el pollo (*G. gallus*), ambos centros de osificación, de tamaño similar, corresponden a dos delgadas astillas de hueso, osificando en estrecha relación con el voluminoso nasal (FIGURA 13 G, H e I). Los centros de osificación del lacrimal en la tagua (*F. armillata*) también son de tamaño similar, observándose como dos pequeños elementos óseos que se fusionan temprano dando origen a un lacrimal reducido (FIGURA 14 D, E y F), esto en contraste con los centros de osificación observados en el queltehue (*V. chilensis*), en el cual la situación es similar a la observada en la perdiz, con un centro orbital de menos tamaño que el alargado centro supraorbital (FIGURA 14 G, H e I).

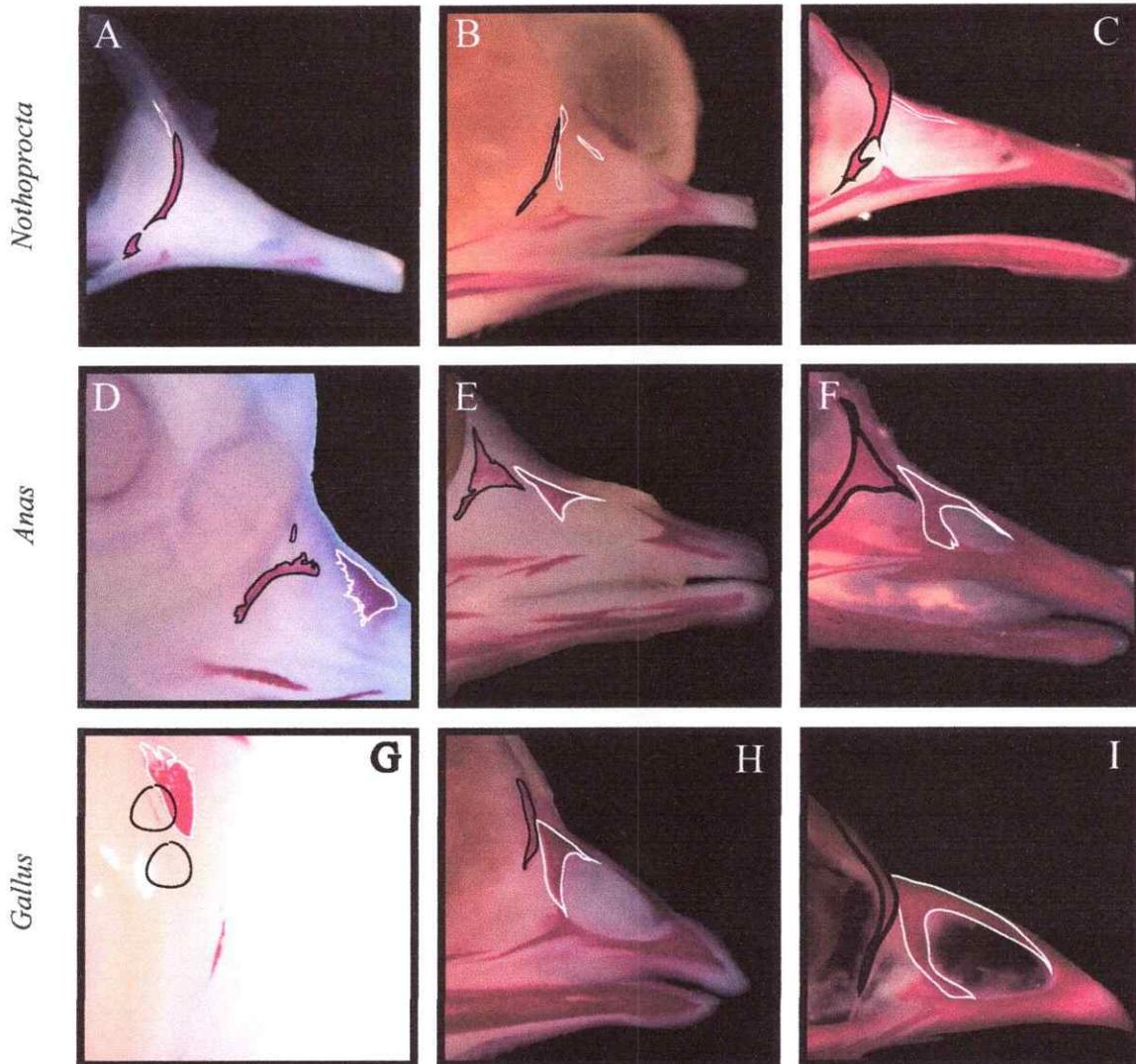


Fig.13 Secuencia de desarrollo del lacrimal y el nasal en *Nothoprocta* (A, B y C), *Anas* (D, E y F) y *Gallus* (G, H e I). En negro, se destaca el lacrimal, formado por dos centros de osificación (A, D y G) que luego se fusionan para dar origen a un único elemento. En blanco se destaca el nasal, que se desarrolla a partir de un centro de osificación en *Anas* y *Gallus* (D y G) y a partir de tres centros en *Nothoprocta* (A). Los límites de los elementos fueron marcados a mano alzada, sólo con el fin de mostrar su extensión y de facilitar su identificación

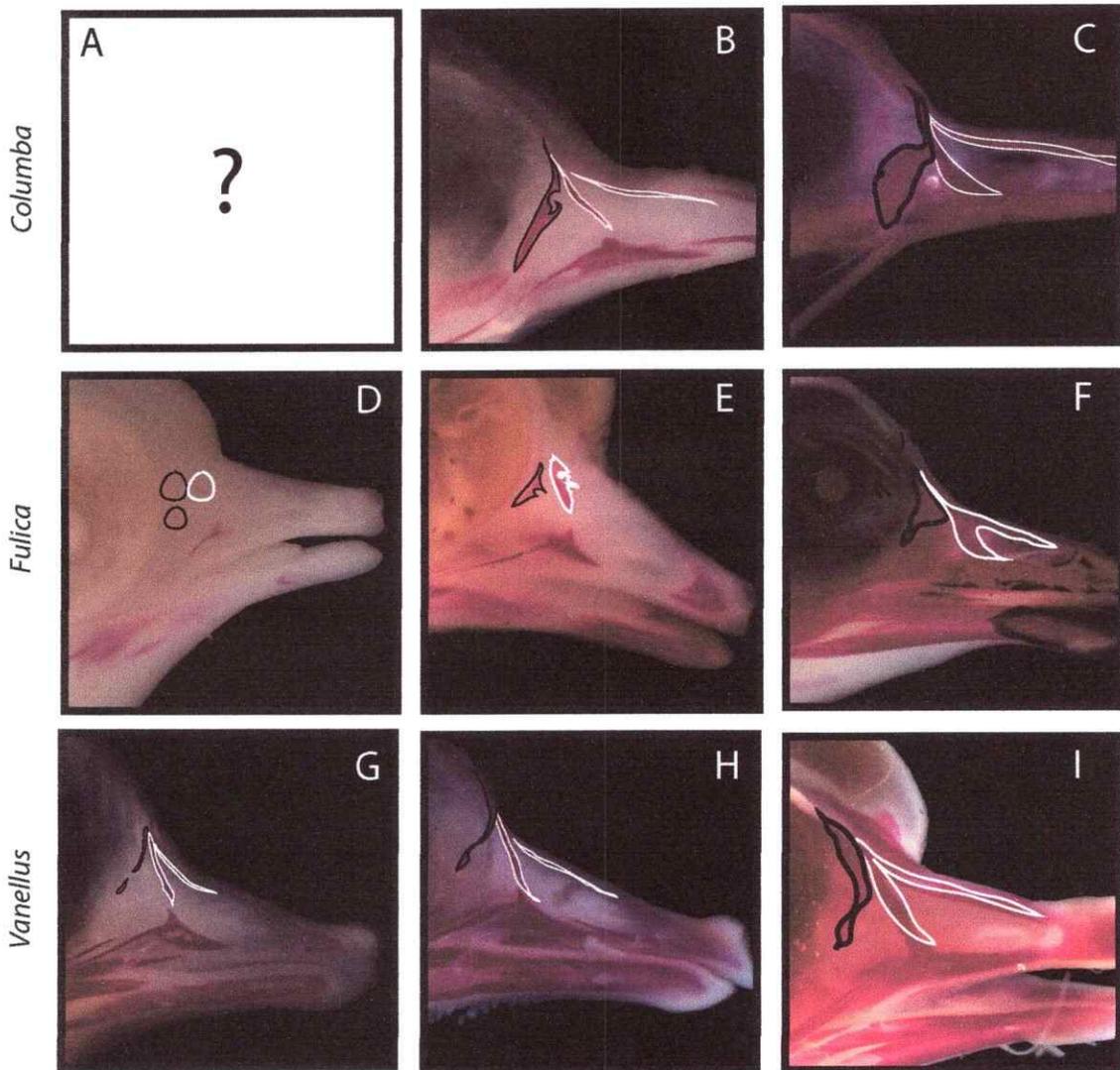


Fig.14. Secuencia de desarrollo del lacrimal y el nasal en *Columba*, *Fulica* y *Vanellus*. En negro, se destaca el lacrimal, formado por dos centros de osificación (D y G) que luego se fusionan para dar origen a un único elemento. En blanco se destaca el nasal, que se desarrolla a partir de un centro de osificación en *Fulica* (D) y a partir de dos centros de osificación en *Columba* (B) y *Vanellus* (G y H). No se observaron dos centros de osificación originando el lacrimal en *Columba* (A), presumiblemente por falta de muestra del estadio indicado, no por que no exista. Los límites de los elementos fueron marcados a mano alzada, sólo con el fin de mostrar su extensión y de facilitar su identificación

En la cata (*M. undulattus*) el centro orbital comienza a osificar como un centro pequeño, pero posteriormente crece más que el centro supraorbital, expandiéndose ventral y caudalmente para formar la apófisis infraorbital, característica de los Psittaciformes.

DESARROLLO DEL NASAL A PARTIR DE UN NÚMERO VARIABLE DE CENTROS DE OSIFICACIÓN

El nasal osifica a partir de un centro de osificación en el pollo (*G. gallus*), el pato (*A. platyrhynchos*) (FIGURA 15 A, B y C), la tagua (*F. armillata*) (FIGURA 15 D, E y F) y la cata (*M. undulattus*) (Figura 15 G, H e I). Esto en contraste con el nasal del queltehue (*V. chilensis*) (FIGURA 16 D, E y F) y la paloma (*C. livia*) (FIGURA 16 G, H e I) cuyo nasal osifica a partir de dos centros de osificación. Estos centros corresponden a las apófisis premaxilar y maxilar del nasal, que delimitan el borde caudal de la narina y contactan con la premaxila y la maxila, respectivamente. Ambos centros, en la dos especies, comienzan a osificar como dos pequeñas astillas delgadas y separadas durante varios días, en los que crecen y se fusionan al contactarse sus extremos más caudales.

En la perdiz chilena (*N. perdicaria*), estos dos centros de osificación separados también se observan, sin embargo, se puede observar un tercer centro de osificación en una

posición más dorsal y caudal que también llega a formar parte del nasal (FIGURA 16 A, B y C). Este elemento óseo, el centro prefrontal del nasal, es el primero de los centros que dan origen al nasal en osificar, alrededor del décimo día de incubación, seguido por los centros premaxilar y maxilar. Los tres elementos se fusionan, alrededor del día 12 de incubación.

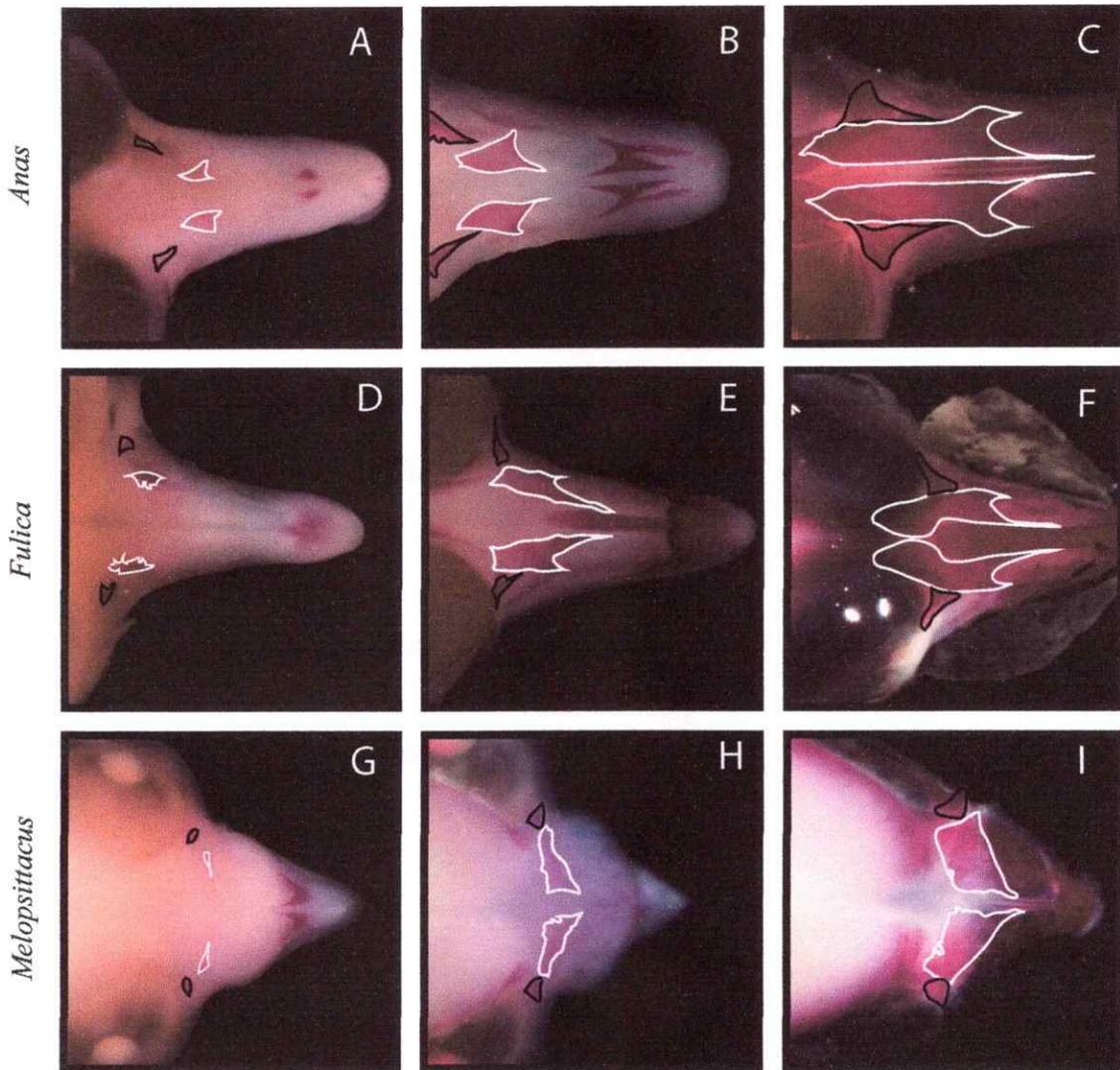


Fig.15. Secuencia de desarrollo del lacrimal y nasal en vista dorsal en *Anas* (A, B y C), *Fulica* (D, E y F) y *Melopsittacus* (G, H e I). En negro se destaca la porción dorsal del lacrimal, correspondiente al centro supraorbital, mientras que en blanco se muestra el crecimiento del nasal, a partir de un único centro de osificación.. Los límites de los elementos fueron marcados a mano alzada, sólo con el fin de mostrar su extensión y de facilitar su identificación

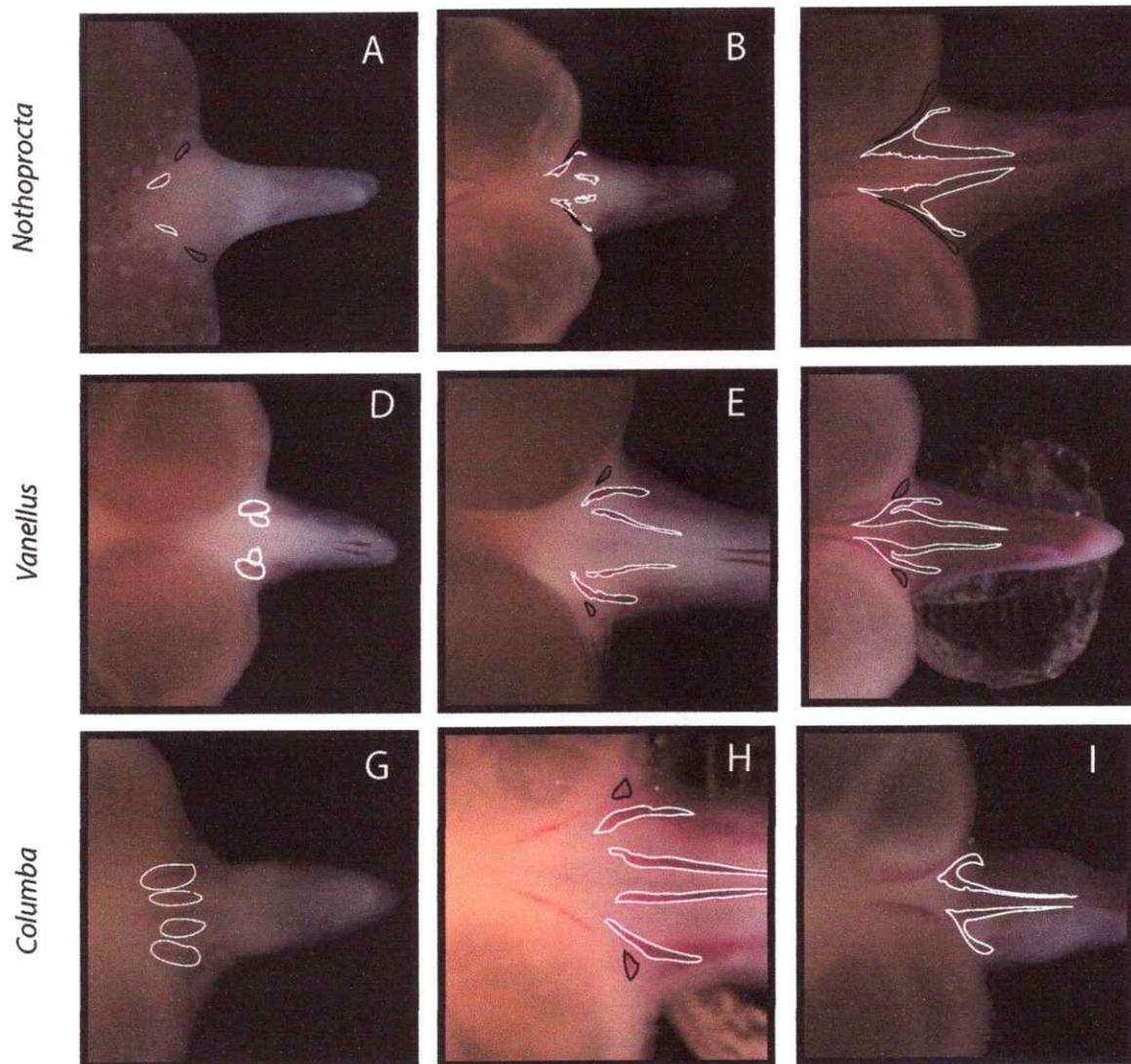


Fig.16. Secuencia de desarrollo del lacrimal y nasal en vista dorsal en *Nothoprocta*, *Vanellus* y *Columba*. En negro se destaca la porción dorsal del lacrimal, correspondiente al centro supraorbital, mientras que en blanco se muestra el crecimiento del nasal, a partir de tres centros de osificación en *Nothoprocta*: en A, se muestra en blanco que el único centro que formará el nasal que ha osificado es el centro prefrontal, en B, se observan los centros maxilar y premaxilar del nasal y en C se ven los tres centros fusionados. En *Vanellus* y *Columba* el nasal se desarrolla a partir de dos centros de osificación (en D y E y en G y H, respectivamente), el centro maxilar y premaxilar. Los límites de los elementos fueron marcados a mano alzada, sólo con el fin de mostrar su extensión y de facilitar su identificación

PERSISTENCIA DEL PREFRONTAL EN MIEMBROS DE MANIRAPTORA

La examinación del cráneo fragmentado de *Deinonychus*, espécimen MOR747 (Museum of the Rockies, Bozeman, Montana), reveló que éste preserva una pieza que representa gran parte del lacrimal y del hueso prefrontal. En vista lateral, la sutura entre estos huesos no es obvia (FIGURA 17), mientras que la vista medial revela un lacrimal con forma de L con un prefrontal triangular sobrepuesto en vista lateral.

Vista lateral



Vista medial

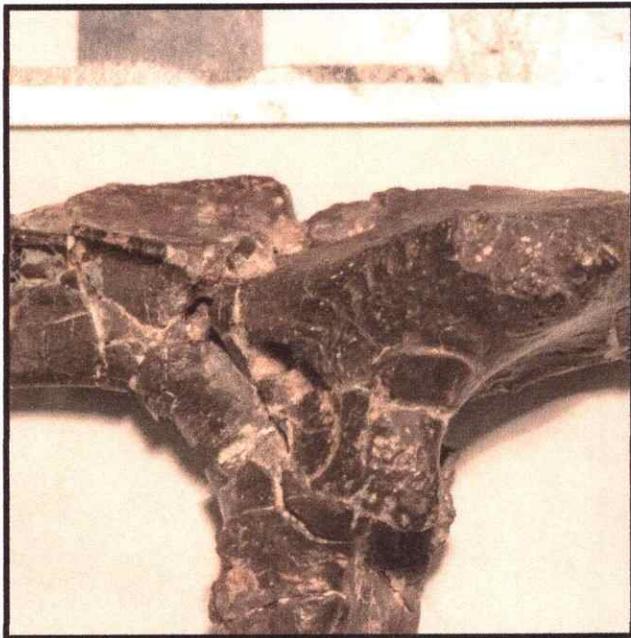


Fig. 17. El hueso lacrimal del *Deinonychus* (MOR 747) conserva asociado el hueso prefrontal. En vista lateral se observa el prefrontal como un elemento triangular ubicado por sobre el lacrimal. En vista medial, se puede ver que el lacrimal tiene forma de "L invertida", al igual que en terópodos no maniraptores, y la disposición de ambos elementos óseos en la región en la que articulan.

DISCUSIÓN

Las transformaciones morfológicas en el recorrido evolutivo desde terópodos basales hasta las aves modernas han sido profundas, siendo muy notorias la pérdida de los dientes, el aumento del tamaño relativo del cerebro y la órbita, reducción de la fenestración craneal, aumento del tamaño del frontal y la premaxila, disminución del tamaño de la maxila, y la aparente pérdida del prefrontal y del postorbital. Es importante preguntarse cómo se relacionan estas modificaciones entre sí, y si es que existe una explicación mecanística a nivel de la embriología que unifique estas transformaciones como el resultado de un proceso más global.

Bhullar (2012) identifica cuatro eventos de pedomorfosis en el cráneo en la línea de terópodos que conduce a las aves. El resultado de estas transformaciones es que las aves modernas presentan una morfología adulta del cráneo que, en sus proporciones, es más similar a la configuración del cráneo de embriones o juveniles tempranos de arcosaurios no aviarios. El primero de estos eventos de pedomorfosis ocurre entre los terópodos más basales y Eumaniraptora, y es en este nodo donde se describe la pérdida definitiva del prefrontal. El segundo evento ocurre entre Eumaniraptora y *Confuciusornis*, y el tercero entre este nodo y Ornithurae. Además de este tercer evento de pedomorfosis, se describe peramorfosis (crecimiento más allá del estado observado en

el adulto del ancestro) de la premaxila, y es durante esta transición cuando se pierde el postorbital. Por último, el cuarto evento ocurre entre la base de Ornithurae y Neornithes, las aves modernas. Es interesante que muchas de las características craneales - y también postcraneales - derivadas, que observamos hoy en Neornithes, también hayan aparecido en forma paralela en otros grupos de aves extintas. El caso de los enantiornithes es el más llamativo, dada la morfología primitiva que se observa en los miembros más antiguos del linaje y la evolución de un aumento en la fusión de elementos óseos, pérdida de dientes, aumento en la relación del tamaño de la premaxila y la maxila y reducción o pérdida del postorbital, en formas más derivadas dentro de ese clado, que ocurren de manera independiente a las transformaciones observadas más cerca de Neornithes (O'Connor, 2011). La similitud entre esta tendencia evolutiva con la observada en paralelo en el clado hermano que incluye a Neornithes, Ornithuromorpha, y la gran diversidad ecológica de estos grupos hacen difícil pensar en un escenario funcionalista, sino más bien apuntan a tendencias ontogenéticas y mecanismos comunes del desarrollo dentro del clado que incluye a estos grupos, que tendrían como consecuencia resultados fenotípicos similares.

Entender el cráneo de las aves como el resultado de una historia de pedomorfosis en diversos puntos del linaje

terópodo conducente a éstas, permite relacionar algunos aspectos de su morfología, como el gran tamaño del cerebro o el ojo en relación al cuerpo, y junto a estos la modificación anatómica ósea que pueda acompañar un cambio de esta naturaleza, pero no nos da luces sobre el fenómeno biológico que subyace a este resultado. La pedomorfosis es un resultado, identificable mediante la comparación con el estado ancestral, pero no es un mecanismo. Para entender el fenómeno causal al resultado que describimos como un cráneo pedomórfico, es necesario entender el desarrollo del cráneo, hasta el nivel celular, incluyendo el estudio de los ritmos de migración e interacciones de la cresta neural, proliferación y diferenciación del mesénquima, formación de tejido óseo y la interacción entre estos distintos elementos. El primer paso en este entendimiento es comprender la verdadera historia e identidad de los huesos que componen el cráneo de la aves, y este fue el propósito de esta tesis.

PERSISTENCIA EMBRIONARIA DEL POSTORBITAL

El centro de osificación que da origen a la región posterior del hueso frontal en el pollo ha sido interpretado como el postfrontal por Erdmann (1940) y como el postorbital por Bittner (Jolie, 1957), basado en su posición. Noden y Schneider (2006) lo consideran homólogo

al parietal, basado en su origen mesodérmico, implicando que el frontal de las aves corresponde a un hueso fronto-parietal. Esto también ha dado pie a interpretar el parietal de las aves como un interparietal, homólogo al observado en mamíferos (Kobayashi, 2012). Las aves son dinosaurios terópodos, y como tales, su morfología debe ser interpretada en el contexto de la evolución morfológica dentro de Theropoda. El interparietal sólo estuvo presente en ancestros muy remotos de las aves, previo al origen de Arcosauria, y de esta forma ningún arcosaurio, ni menos un terópodo, preservan un interparietal.

Si bien la posición que ocupa el frontal de las aves modernas corresponde a la ocupada por el parietal y el frontal en otros amniotas, evidenciado por el desplazamiento hacia caudal del límite entre los huesos frontal y parietal en las aves (Kobayashi, 2012), esto puede ser el resultado de la expansión hacia caudal del frontal, que acompañó el aumento de tamaño del cerebro y los ojos en la línea conducente a Neornithes.

El postorbital se pierde en Ornithurae, un clado originado en el Mesozoico que incluye a las aves actuales. Curiosamente, se reduce independientemente en Enantiornithes, otro diverso grupo de aves mesozoicas, sumándose a una larga lista de paralelismos con Ornithurae (O'Connor, 2011). En arcosaurios no-avianos vivientes (i.e. Crocodylia), el postorbital se conserva. En *Alligator*, este se desarrolla a partir de un único centro de osificación

cerca del margen caudal del ojo, posterior a un delgado y largo centro de osificación del hueso frontal (Rieppel, 1993; Vickaryous, 2009) (FIGURA 18). La posición que ocupa este hueso en el cráneo de *Alligator* es reveladora; la posición del centro de osificación que le da origen es la misma, relativa a la órbita, que ocupa el centro posterior del frontal observado en el pato y el queltehue (FIGURA 12), lo que apoya la hipótesis referente a su homología con el centro más caudal que da origen al frontal en las aves. Por otra parte, los mamíferos no tienen un hueso postorbital, lo que ha dificultado la inferencia de su origen embriológico (cresta neural vs mesodermo) en otros amniotas, condicionando esta información al desarrollo de mapas de destino del cráneo en reptiles.

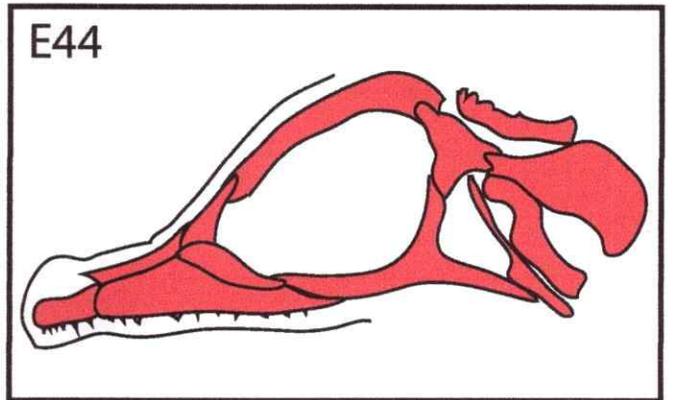
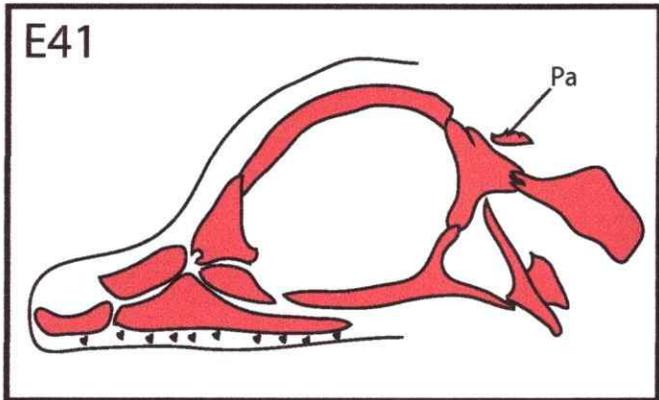
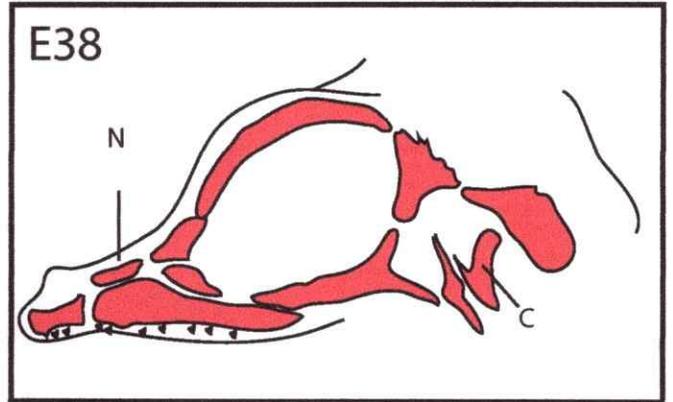
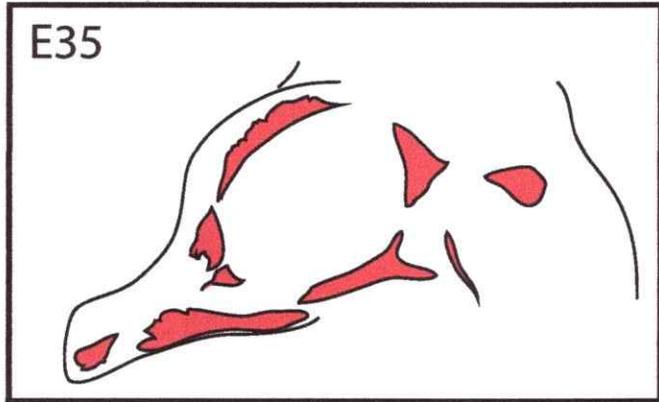
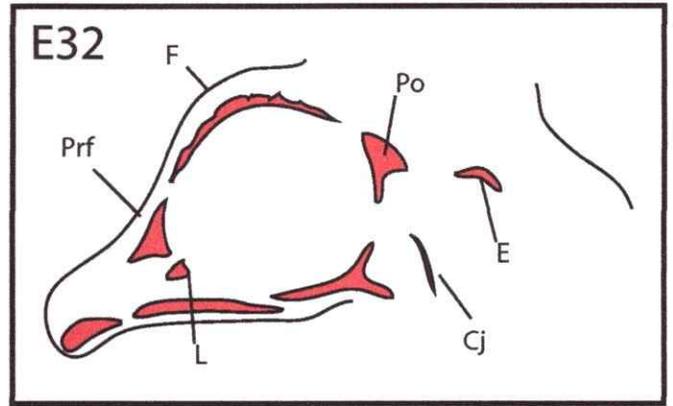
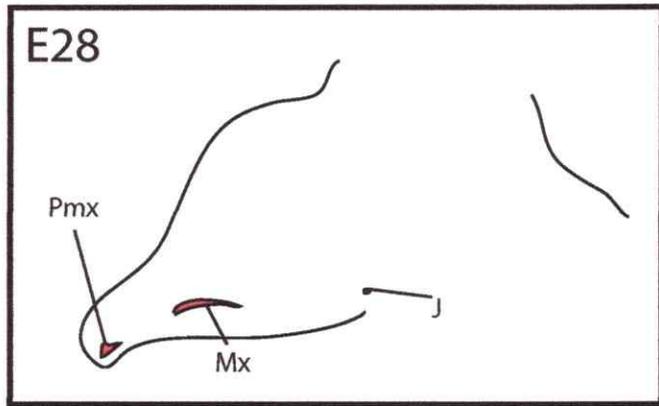


Fig. 18. Ontogenia del cráneo de *Alligator mississippiensis*, (adaptado de Rieppel, 1993), entre los días 28 y 44 de incubación. En E28, han comenzado a osificar el jugal, J, la maxila, Mx, y la premaxila, Pmx. En E32 se observa el prefrontal, Prf, el lacrimal, L, el frontal, F, el postorbital, Po, el escamoso, E, y el cuadradojugal, Cj. En E38 ya se encuentran el nasal, N, y el cuadrado, C, mientras que el parietal es el último hueso dérmico del cráneo en aparecer en E41.

DESARROLLO DEL LACRIMAL A PARTIR DE DOS CENTROS DE OSIFICACIÓN

El desarrollo del lacrimal a partir de dos centros de osificación separados ha sido descrito por Maxwell (2009) en el emú (*Dromaius*) (Paleognatae) y por Erdmann (1940) en el pollo (*Gallus*) (Galliformes). En el presente trabajo se mostró que este es el caso en la perdiz chilena (Paleognatae), el pato (Anseriformes), el queltehue (Charadriiformes), la tagua (Gruiformes) y la cata australiana (Psittaciformes). Todas estas especies observadas siguen un patrón similar, originándose dos centros de osificación separados, ubicados en la región anterior a la órbita, que se fusionan prontamente (en estadios similares a HH35-36 del pollo). Únicamente en la paloma (Columbiformes) se detectó un sólo centro de osificación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esto podría deberse a la rapidez de la fusión, dificultando la detección de la ventana temporal en que existen dos elementos independientes.

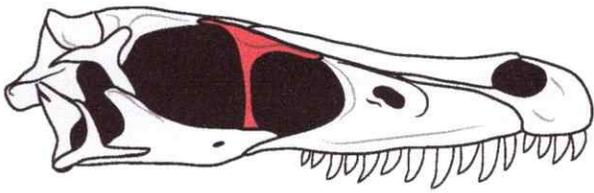
La evidencia sugiere fuertemente que el desarrollo del lacrimal a partir de dos centros de osificación corresponde a la condición ancestral para todas las aves modernas. Esto contrasta con el desarrollo del lacrimal en *Alligator*, a partir de un único centro de osificación (Rieppel, 1993; Vickaryous, 2009).

PERSISTENCIA DEL PREFRONTAL EN MANIRAPTORA

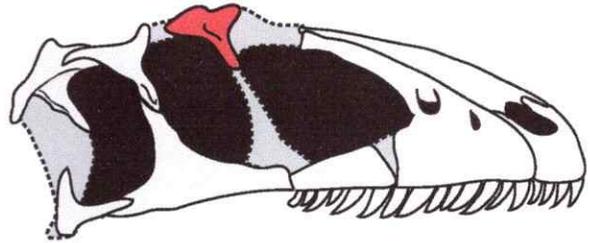
La pérdida del hueso prefrontal en dinosaurios maniraptores, fue acompañada por la adquisición de un lacrimonasal en forma de T, en lugar de la forma de L-invertida observada en terópodos no-maniraptores. De esta manera, dentro de Maniraptora, dinosaurios como *Velociraptor* (Barsbold y Osmólska, 1999), presentan un lacrimonasal con forma de T y ninguna evidencia de un prefrontal. En tanto en *Deinonychus* (especimen MOR747), otro miembro de Maniraptora, hay un prefrontal y un lacrimonasal con forma de L invertida, lo cual apoya la idea de una fusión del lacrimonasal y el prefrontal hacia la base de Maniraptora, contra la noción de la simple pérdida del prefrontal (FIGURA 19). *Sinornithosaurus*, otro miembro de Maniraptora, también presenta un prefrontal separado (Turner et al., 2012), mientras que en China se han encontrado fósiles de un enantiornithe juvenil (Comunicación personal con Jingmai O'Connor) que preserva un elemento separado del lacrimonasal en la posición del prefrontal (aunque no se sabe si este elemento óseo permanecía separado en el adulto o se fusionaba a otro hueso del cráneo, como el lacrimonasal o el nasal). Todo esto sugiere que la pérdida del prefrontal en Maniraptora, corresponde en realidad a la fusión temprana del centro de osificación que le da origen a otros elementos óseos, presumiblemente en una etapa temprana del desarrollo embrionario. De esta forma, el centro de

osificación del prefrontal persistió más allá de Maniraptora, fusionado al lacrimal (u otro elemento) en la mayoría de los casos, u osificando separadamente y sin fusionarse en otros, como en *Deinonychus* MOR747 o *Sinornithosaurus* (FIGURA 20).

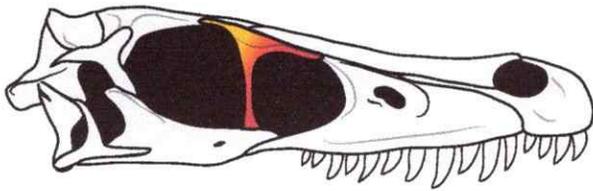
A *Velociraptor* (Barbold 1999)



Deinonychus (Ostrom 1969)



B *Velociraptor*



Deinonychus

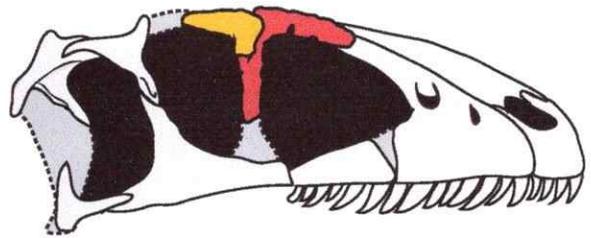
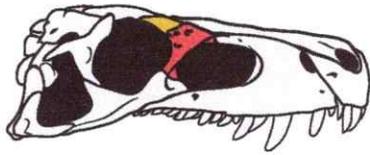
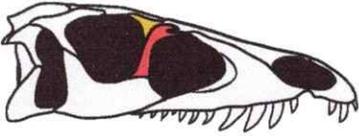


Fig. 19. Persistencia del prefrontal en Maniraptora. Las interpretaciones clásicas han favorecido la hipótesis de una pérdida del prefrontal en dinosaurios η maniraptores (A), así denominando el elemento anteroorbital con forma de T como lacrimal en *Velociraptor*, e incluso en *Deinonychus*. La morfología del lacrimal en forma de L y la presencia de un prefrontal en *Deinonychus* MOR747 permite especular sobre la verdadera naturaleza del lacrimal en otros maniraptores, en los que sugerimos, el prefrontal y el lacrimal se fusionan tempranamente, dando origen a un elemento con la característica forma de T, que se expande hacia la región posterior ocupada por el "desaparecido" prefrontal (B).

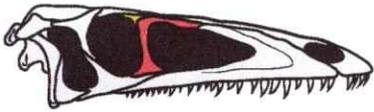
A Herrerasaurus (Sereno&Novas 1994)



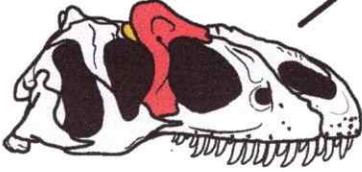
B Tawa (Nesbitt 2009)



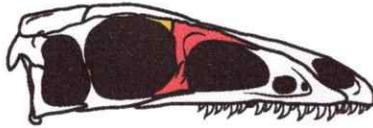
C Coelophysis (Colbert 1989)



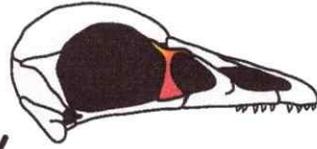
D Allosaurus (Madsen 1976)



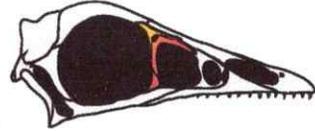
E Compsognathus (Peyer, 2006)



J Shenqiornis (O'Connor, 2011)



I Archaeopteryx (Rauhut 2014)



H Velociraptor (Basrbold 1999)



G Deinonychus (Ostrom, 1969)



F Erlikosaurus (Lautenschlager, 2014)



Fig. 20. Esquema de la evolución de la morfología del cráneo en terópodos, con énfasis en la historia evolutiva de los huesos lacrimal y prefrontal. Se resaltó en amarillo el prefrontal y en rojo el lacrimal. La evidencia presentada en este trabajo permite especular sobre la persistencia del prefrontal, fusionado al lacrimal, dando origen al característico elemento con forma de T, homologado al lacrimal de terópodos más basales. La presencia de un elemento en la posición del prefrontal en un enantiornithe juvenil, podría significar incluso la presencia de un prefrontal en grupos más cercanos a las aves modernas.

En la perdiz chilena (*N. perdicaria*) se observa un centro de osificación ubicado en posición caudal al borde posterior de los centros premaxilares y maxilares del nasal, justamente en la posición del prefrontal de otros terópodos. Sin embargo, a diferencia de lo propuesto anteriormente, este elemento se fusiona con el hueso nasal en vez del lacrimal. Cabe destacar que el prefrontal muestra una gran plasticidad dentro del clado Tyrannosauroidea (grupo externo a Maniraptora), en el cual ha sido descrito como fusionado al frontal, al lacrimal, o no fusionado a ningún otro elemento (Brochu, 2003; Currie, 2003). La perdiz chilena posee una osificación en una posición claramente comparable a la del prefrontal de dinosaurios, lo cual sugiere que en este linaje basal de neornithes, este elemento pasó a fusionarse con el nasal, en contraste a su previa tendencia a fusionarse con el lacrimal en maniraptores basales.

El nasal de otras paleognatas presenta una marcada proyección caudal, que podría corresponder con este centro prefrontal de la perdiz, algo que no ha sido estudiado en detalle. Así, la perdiz chilena, y quizás las otras aves paleognatas, pueden representar el último grupo preservando un centro de osificación prefrontal; esto sugerido por la morfología adulta (FIGURA 21). De ser así, la pérdida por agénesis de este centro de osificación prefrontal sería una sinapomorfía de aves neognatas, en las que no se observó un

elemento óseo en esta posición en ningún momento del desarrollo en ninguna especie estudiada.

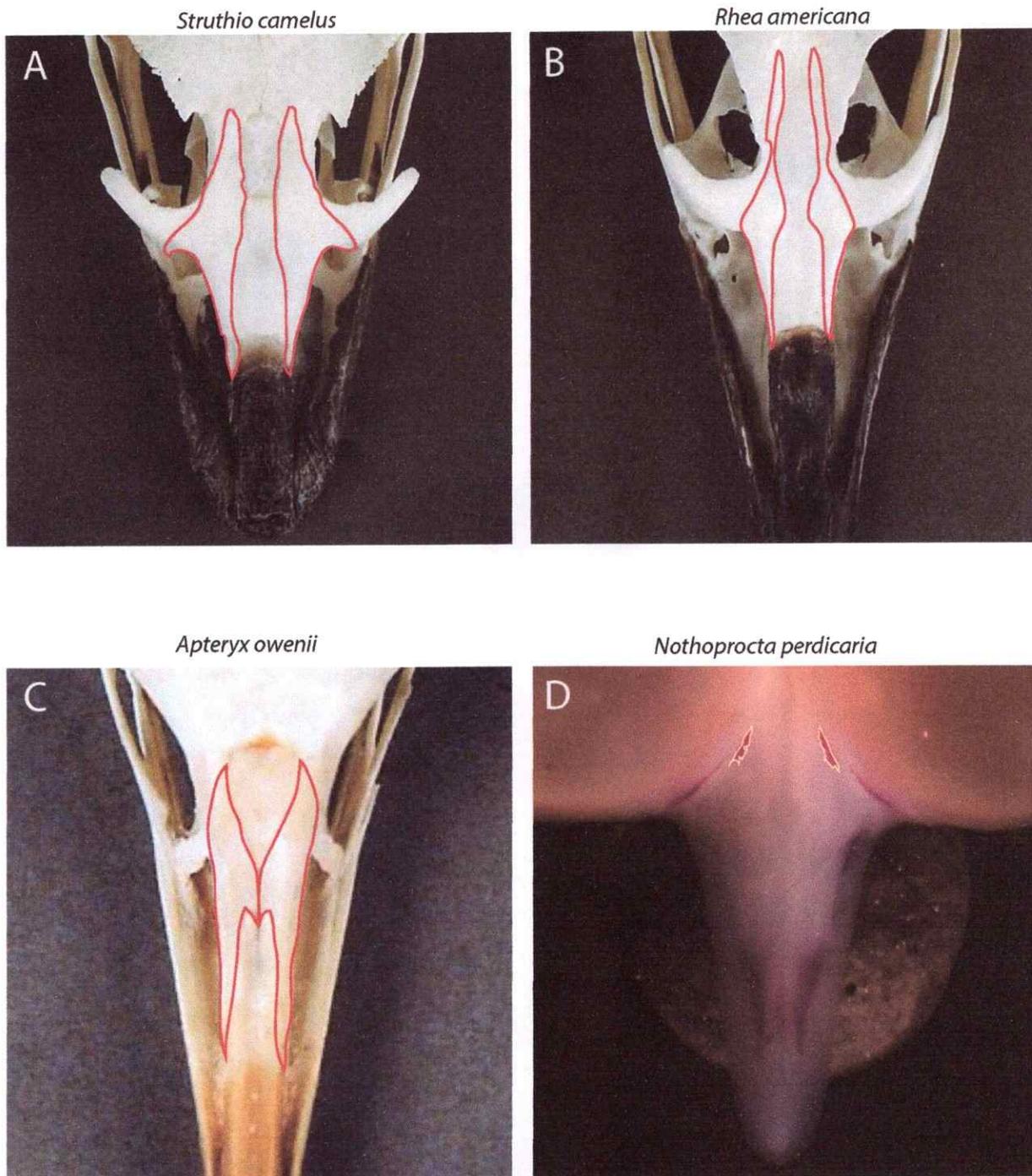


Fig. 21. Comparación de la morfología del cráneo en una vista dorsal entre varios paleognatos. Se puede observar que el nasal se proyecta caudalmente, lateral a la exposición externa del ectethmoides, una distancia considerable hacia posterior del borde más rostral de la órbita, delimitada por el lacrimal en A. el avestruz, B. el ñandú y C. el Kiwi (imágenes tomadas del sitio de acceso libre www.skullsite.com). En D: embrión de 10 días de incubación de una perdiz chilena se puede observar que en la posición ocupada, en los adultos de las otras especies por dicha proyección del nasal, osifica el centro prefrontal del nasal, sugiriendo la presencia de un elemento individual separado del o los demás centros de osificación que pudieran estar dando origen al nasal

VALIDEZ DE LAS SECUENCIAS DE OSIFICACIÓN Y NÚMERO DE EMBRIONES

Un gran problema enfrentado a la hora de determinar qué tan representativa es una determinada secuencia de embriones y qué tan fielmente refleja el desarrollo normal de una determinada especie, es que cada embrión representa un momento particular de su propia secuencia ontogenética. Particularmente, a la hora de estudiar el desarrollo de centros de osificación, cuando nos encontramos con un embrión con un centro de osificación separado de otro, ¿podemos decir a ciencia cierta que eso representa el desarrollo normal de otros individuos de su especie? El problema se acrecenta al considerar que dichos centros de osificación permanecen separados por muy poco tiempo, fusionándose prontamente a otros elementos próximos. La validación de los datos obtenidos suele asociarse a un gran número de embriones mostrando la misma característica, sin embargo, debido a la ya mencionada naturaleza de los centros de osificación estudiados y al limitado número de embriones utilizables por especie, esto se hizo difícil. Así, el caso del centro posterior del frontal, aquí homologado al postorbital, sólo fue observado en un embrión de pato y un embrión de queltehue, sin embargo en la misma posición tanto en esas dos especies, como en la posición reportada en el embrión de *Alligator* o en embriones de pollo. Más aún, no logramos observar este centro separado

en el pollo, la única especie en la que había sido reportado.

Los dos centros de osificación originando el lacrimal fueron observados en todas las especies (con excepción de la paloma), en algunos casos en más de un embrión, validando más aún esta observación, que ya había sido reportada en otras especies, igualmente a lo descrito para el caso del nasal de la paloma y el queltehue. He ahí el valor del amplio muestreo taxonómico realizado; la observación en varias especies del mismo rasgo embrionario (aún este sea visto en sólo un embrión por especie) nos permite afirmar que lo que observamos se repite, conformando un patrón establecido de desarrollo dentro del grupo de las Aves.

DESARROLLO Y EVOLUCIÓN

Al comparar el desarrollo de un embrión de ave con el de un embrión de otro arcosaurio, como un cocodrilo, caimán o aligador, u otro reptil, se observa que el desarrollo está acelerado. En *Alligator* la osificación comienza en el cráneo cerca de los 28 días de incubación (Rieppel, Vickaryous) (FIGURA 18), mientras que en el pollo comienza alrededor de los 7 días y medio (proporcionalmente similar al tiempo en que comienza en *Alligator*, cerca de un tercio del tiempo total de desarrollo embrionario) en el que,

cinco días más tarde, ya han osificado todos los huesos dérmicos del cráneo. Esto en contraste con *Alligator*, en que la aparición del último hueso dérmico del cráneo, el parietal, ocurre casi 14 días más tarde que el inicio de la osificación (FIGURA 22).

Los patrones de desarrollo observados permiten pensar que la velocidad con la que avanza el desarrollo de las aves, podría traer como consecuencia que los elementos óseos individuales se encuentran e interaccionan en estados de diferenciación más inmaduros. Se desconoce cuáles son las condiciones en las que dos centros de osificación próximos se fusionan para dar origen a un elemento individual, pudiendo tratarse de condensaciones independientes o simplemente de sitios en los que se inicia la osificación dentro de una misma condensación mesenquimática (FIGURA 23).

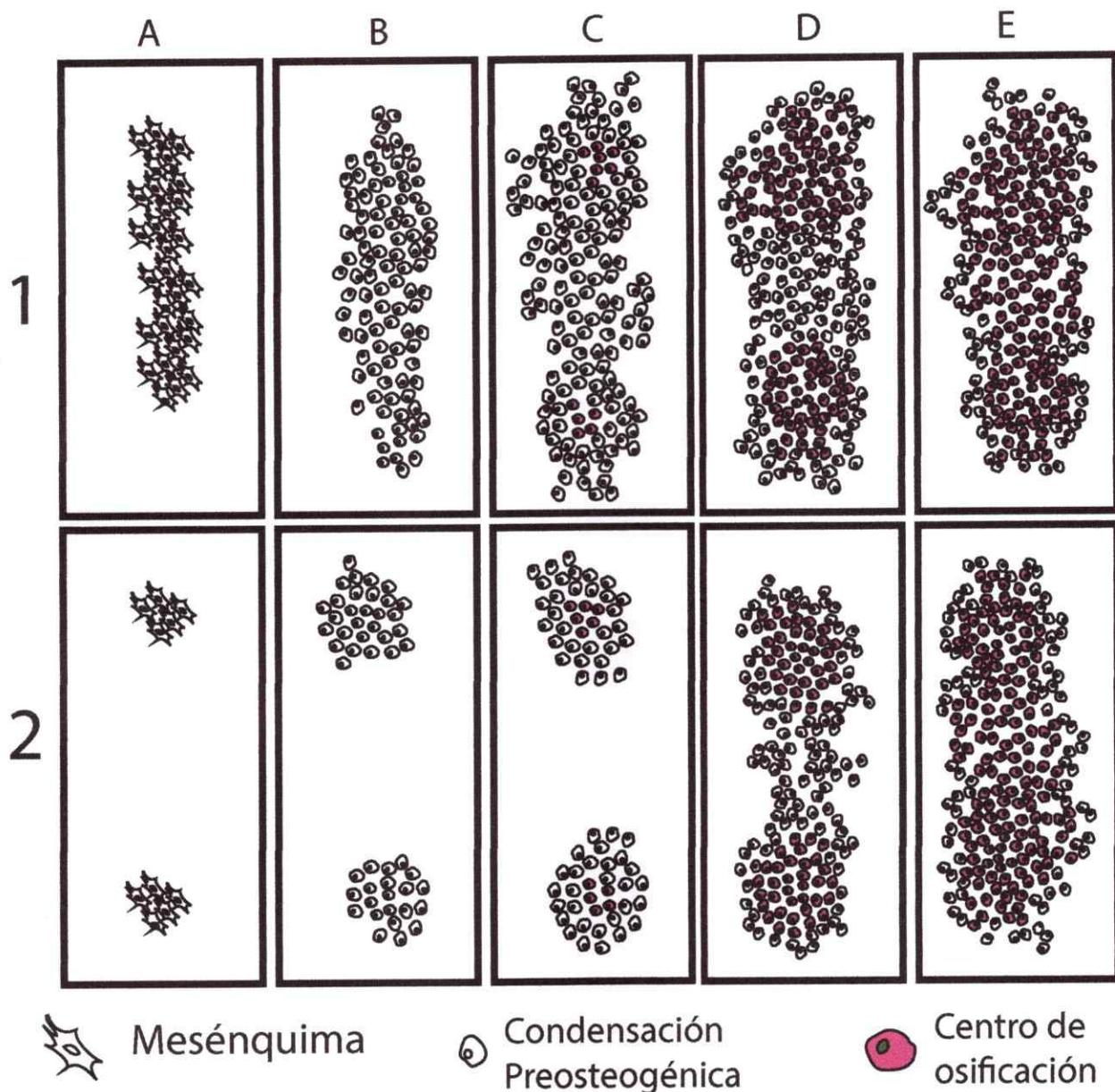


Fig. 23. Dos alternativas hipotéticas del desarrollo y fusión de dos centros de osificación. En la fila superior (1) se representa la posibilidad de que ambos centros de osificación correspondan a una única condensación mesenquimática comienza a osificar en dos puntos distintos, mientras que en la fila inferior (2) se representa la opción alternativa, en la que los centros de osificación corresponden a dos condensaciones mesenquimáticas individuales y separadas. A. Las células de la cresta neural, o del mesodermo, terminan su migración en regiones específicas de la cabeza, dejando de migrar, aumentando las uniones célula-células, desarrollándose una condensación mesenquimática. B. Diferenciación de la condensación mesenquimática a un tejido preosteogénico. C. Proliferación del tejido preosteogénico y comienzo de la depositación de matriz extracelular calcificable y/o calcificación del tejido. D. Aumento del área del tejido calcificado. El hipotético "encuentro" de las dos poblaciones de células preosteogénicas (2D), no deja evidencias histológicas o histoquímicas. E. Continúa el crecimiento óseo y comienza a madurar el tejido. Sólo quedará evidencia del origen separado de ambos centros de osificación en 2E, si existen diferencias en la orientación o la identidad de los componentes de la matriz ósea depositada por ambos centros de osificación. En el caso contrario, ambos elementos se fusionan, siendo indistinguible el origen mixto del elemento.

De todas formas, la matriz extracelular secretada por las células derivadas de una condensación mesenquimática individual, tras contactar la matriz extracelular derivada de una condensación vecina, no dejará evidencia o rastro de este punto de contacto, a menos que exista: a) una polaridad marcada en el tejido, b) diferencias entre las proteínas de la matriz extracelular, o c) que se desarrolle un límite celular o acelular, con propiedades diferentes a las del resto del hueso, entre ambos huesos. Si el caso de las aves refleja un desarrollo progenético, en el que ocurre una maduración temprana que resulta en una truncación de la ontogenia, observaríamos suturas entre los centros de osificación que se fusionan en el pollo, como se observan en *Alligator*. En el caso en que la osificación avance más rápido, manteniendo un estado poco diferenciado o inmaduro, esto no ocurrirá, y mientras más temprano se fusionen los elementos, menos rastro quedara de su origen separado. Esto permitiría explicar como la "perdida" del prefrontal y del postorbital, en vista de la evidencia presentada en esta tesis, correspondería a la fusión de estos elementos con un elemento vecino (el nasal en el caso de la perdiz, y el frontal en el caso del pato y el queltehue, respectivamente).

Otros aspectos del desarrollo, observados al comparar la embriología de las especies estudiadas, se hacen más difíciles de interpretar; Aunque enorme, la variación

morfológica que observamos en los adultos no tiene una relación directa con la también enorme variación embriológica que se logró ver en este estudio. Por motivos de tiempo y para enfocar el tema en un punto específico, se discutió con énfasis el desarrollo y homología de tres elementos óseos, sin embargo se hacen evidentes y llamativas las diferencias en los tiempos de osificación de los elementos óseos en las diferentes especies (ej. Aceleración de la osificación del parietal en la tagua, respecto a los demás elementos), las diferencias en los tamaños y formas entre elementos homólogos de distintas especies durante el desarrollo (ej. El tamaño y forma del escamoso o el tamaño del ojo en las diferentes especies) o incluso la variación en el número de elementos que dan origen a un hueso individual, etc. A pesar de la dificultad de encontrar explicaciones a estas diferencias en la embriología misma, se hace interesante y desafiante buscarlas.

CONCLUSIONES

La posible homología de los centros de osificación debe ser analizada cuidadosamente. En base a la información embriológica recabada en esta tesis, se evaluaron las hipótesis de homología al contrastarlas con la evidencia fósil. Por una parte, se logró confirmar el origen al lacrimal a partir de dos centros de osificación (supraorbital y orbital) en todas las especies observadas, salvo en la paloma (*C. Livia*). La presencia de dos centros de osificación dando origen al lacrimal, contrasta con el único centro de osificación de otros amniotas, y debe ser interpretada como una novedad evolutiva adquirida en el linaje conducente a las Neornithes.

También, se observaron dos tipos de desarrollo para el hueso nasal; uno a partir de un solo centro de osificación (*Gallus*, *Anas*, *Fulica* y *Melopsittacus*) y otro a partir de más de un centro (*Nothoprocta*, *Columba* y *Vanellus*). En la paloma y el queltehue, el nasal se desarrolla a partir de dos centros de osificación correspondientes a sus procesos maxilar y premaxilar, que se fusionan en la región de unión de ambos procesos en la esquina caudal superior de la narina. En contraste, en la perdiz, un tercer centro de osificación, que se desarrolla en el borde anterior de la órbita, más dorsal, posterior y medial respecto al centro supraorbital del lacrimal, se fusiona a la región posterior

del nasal, a los procesos maxilar y premaxilar. La observación de un centro de osificación en la posición del prefrontal, en la perdiz, sugiere que este elemento puede ser homólogo al prefrontal encontrado en otros terópodos basales. Esto indicaría la persistencia de un centro de osificación homólogo al que da origen al frontal en otros amniotas en maniraptora, incluyendo neornithes paleognatos, asumiendo su fusión a otros elementos del cráneo como el nasal en el caso de la perdiz. La presencia variable del hueso prefrontal dentro de Maniraptora (clado en que mayoritariamente este hueso no se encuentra y en el que su pérdida se define como una sinapomorfía), podría explicarse como un paralelismo entre las diferentes especies, en las que el centro de osificación del prefrontal no se fusiona a otro elemento del cráneo, mientras que su fusión en etapas embrionarias sería una sinapomorfía del clado.

De esta manera, la evidencia indica que, al menos en neognatos, este centro de osificación desaparece y por lo tanto, el centro supraorbital homologado por Erdmann al prefrontal y presente en todas las especies de aves observadas incluyendo la perdiz, no puede ser homologado a este elemento, difiriendo importantemente en su posición. De esta forma, y como ya se dijo, el desarrollo del lacrimal a partir de dos centros de osificación corresponde a una posible sinapomorfía de, al menos, Neornithes, independiente de si se desarrolla o no un prefrontal.

Por último, a pesar de que no se observaron dos centros de osificación dando origen al frontal en todas las especies (sólo se ven en *Anas* y *Vanellus*), el frontal comienza a osificar en diferentes regiones en distintas especies, sugiriendo la presencia de más centros de osificación. La posición del centro posterior del frontal descrita en el pollo y observada en el pato y el queltehue, se encuentran en la misma posición que el postorbital de *Alligator* y la ausencia de postfrontal e interparietal en todos los terópodos descritos, indican que este centro de osificación probablemente corresponde al postorbital, que se fusiona al frontal durante el desarrollo embrionario.

UTILIDAD DE LAS SERIES DE OSIFICACIÓN

En contraste al conocimiento que se tiene en distintos niveles del desarrollo de la osificación endocondral, se sabe poco de la ontogenia de los huesos dérmicos, así como de la relación entre el desarrollo de las condensaciones mesenquimáticas que los proceden y características como el tamaño, forma o número de estos elementos. Peor es la situación cuando se intenta hablar del desarrollo de estos huesos en un contexto evolutivo. El entender la secuencia y temporalidad con que osifican los distintos elementos óseos, la relación entre estos centros de osificación y su destino, hace posible comenzar a estudiar fenómenos como el

establecimiento de una región preosteogénica, el comienzo de la osificación, la interacción establecida entre un centro de osificación y el tejido circundante, además de qué factores influyen en el crecimiento, el establecimiento de la forma o los procesos involucrados en la fusión de elementos independientes.

El estudio de la ontogenia del cráneo en diferentes animales no-modelo que abarquen un rango amplio de especies dentro de la filogenia, abre la puerta a encontrar patrones de variación morfológica y de desarrollo embrionario no conocidos, que a su vez puedan funcionar como buenos modelos para entender dichos fenómenos. Generar conocimiento sobre el desarrollo de un gran número de especies emparentadas sirve, no sólo en un contexto de biología evolutiva, sino también en el contexto de la biología del desarrollo, como herramienta importante para comprender diversos procesos y mecanismos embriológicos.

REFERENCIAS

Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, y Tabin CJ (2007) Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development* 134: 3133–3144

Barsbold R y Osmólska H (1999) The skull of *Velociraptor* (Theropoda) from the late Cretaceous of Mongolia. *Acta Palaeontologica Polonica* 44, 2, 189–219.

Baumel JJ (1963) *Handbook of Avian Anatomy*. 2nd Edition. Publication of the Nuttall Ornithological club, No. 23.

Bhullar BS et al. (2012) Birds have Paedomorphic dinosaur skulls. *Nature* 487, 223–226.

Brochu CA (2003) Osteology of *Tyrannosaurus rex*: Insights from a nearly complete skeleton and high-resolution computed tomographic analysis of the skull. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 22: S4, 1–138

Botelho JF, Ossa-Fuentes L, Soto-Acuña S, Smith-Paredes D, Nuñez-León D, Salinas-Saavedra M, Ruiz-Flores M, Vargas AO (2014) New developmental evidence clarifies the evolution of wrist bones in the dinosaur-bird transition. *PlosBiology*, 12(9)

Botelho JF, Smith-Paredes D, Soto-Acuña S, Mpodozis J, Palma V, Vargas AO (2015) Skeletal plasticity in response to embryonic muscular activity underlies the development and evolution of the perching digit of birds. *Scientific Reports*. 5, 9840.

Brusatte SL y Sereno P. C. (2007). A new species of *Carcharodontosaurus* (Dinosauria: Theropoda) from the Cenomanian of Niger and a revision of the genus. *Journal of Vertebrate Paleontology* 27(4):902-916

Carroll RL (1997) *Vertebrate paleontology and evolution*, 7th ed. Freeman, New York, USA.

Chiappe LM, Norell MA y Clark JM (1998) The skull of a relative of the stem-group bird *Mononykus*. *Nature*, vol. 392, 275-278.

Chiappe LM, Shu'an J, Quiang J y Norell MA (1999) Anatomy and systematics of the Confuciusornithidae (Theropoda, Aves) from the late Mesozoic of Northeastern China. *Bulletin of the American Museum of Natural History*.

Clark JM, Norell MA y Rowe T (2002) Cranial anatomy of *Citipati osmolskae* (Theropoda, Oviraptorosauria), and a reinterpretation of the holotype of *Oviraptor philoceratops*. *American Museum Novitates* 3364: 1-24.

Colbert EH (1989) The Triassic dinosaur *Coelophysis*. - Bulletin of the Museum of Northern Arizona 57, 1-160.

Colbert EH y Russell DA (1969) The small Cretaceous dinosaur *Dromaeosaurus*. American Museum Novitates 2380, 149.

Couly GF, Coltey PM y Le Douarin NM (1993) The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. Development 117: 409-429.

Cracraft J (1968) The Lacrimal-Ectethmoid Bone complex in Birds. A single Character Analysis. American Midland Naturalist, Vol. 80, No. 2, pp. 316-359.

Currie PJ (1995) New Information on the Anatomy and Relationships of *Dromaeosaurus albertensis* (Dinosauria: Theropoda). Journal of Vertebrate Paleontology, Vol. 15, No. 3, pp. 576-591.

Elzanowski A (2002) Archaeopterygidae (Upper Jurassic of Germany). En "Mesozoic Birds: Above The Heads of Dinosaurs". Editado por L. M. Chiappe y L. M. Witmer. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.

Erdmann K (1940) Zur Entwicklungsgeschichte der Knochen im Schädel des hühnes bis zum Zeitpunkt des Ausschlüpfens aus dem ei. Z. F. Morphol. U. Ökol. D. Tiere. Bd. 36.

Foth C y Rauhut WM (2013). Macroevolutionary and morphofunctional patterns in theropod skulls: A morphometric approach. *Acta Palaeontologica Polonica* 58 (1), 2013: 1-16

Gingerich PD (1973) Skull of *Hesperornis* and early evolution of birds. *Nature*, vol. 243.

Gilbert SF (2010) *Developmental Biology*. 9th Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Gross JB y Hanken J (2008). Review of fate-mapping studies of osteogenic cranial neural crest in vertebrates. *Developmental Biology* 317 (2008) 389-400

Hamburger V y Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49-92.

Hanken J y Hall BK (1993) *The Skull*. Vol. 1: Development. Chicago: University of Chicago Press.

Hanken J y Hall BK (1993) *The Skull*. Vol. 2: Patterns of Structural and Systematic Diversity. Chicago: University of Chicago Press.

Jollie MT (1957) The head skeleton of the chicken and remarks in the anatomy of this region in other birds. *Journal of Morphology*, vol. 100, No. 3.

Kardong KV (2012) Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. 6th edition. McGraw-Hill.

Koyabu D, Maier W y Sanchez-Villagra MR (2012) Paleontological and developmental evidence resolve the homology and dual embryonic origin of a mammalian skull bone, the interparietal. PNAS. Vol. 109, No 35.

Lautenschlager S, Witmer LM, Altangerel P, Zanno LE y Rayfield EJ (2014) Cranial anatomy of *Erlikosaurus andrewsi* (Dinosauria, Therizinosauria): New insights based on digital reconstruction. Journal of Vertebrate Paleontology 34(6):1263-1291.

Le Lièvre CS y Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. J. Embryol. Exp. Morph. Vol. 34, 1, pp. 125-154.

Le Lièvre CS (1978) Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. J. Embryol. Exp. Morph. Vol. 47, pp. 17-37.

Madsen JH (1976) *Allosaurus fragilis*: A revised osteology. Bulletin 109, UTAH geological survey

Maxwell EE (2008) Ossification sequence of the avian order Anseriformes with comparison to other precocial birds. Journal of Morphology 269-1095-1113.

Maxwell EE (2009) Comparative ossification and development of the skull in palaeognathous birds (Aves:Palaeognathae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156, 184-200

Maxwell EE y Harrison LB (2008) Ossification sequence of the common tern (*Sterna hirundo*) and its implications for the interrelationships of the Lari (Aves, Charadriiformes). *Journal of Morphology* 269:1056-1072.

Nakashima K et al. (2002) The novel Zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.

Nesbitt SJ, Smith ND, Irmis RB, Turner AH, Downs A, Norell MA (2012) A complete skeleton of a late Triassic saurischian and the early evolution of dinosaurs. *Science*, 326, 1530.

Noden DM y Schneider RA (2006) Neural Crest Induction and Differentiation - Advances in Experimental Medicine and Biology, ed Saint-Jeannet J (Landes Bioscience, Georgetown, TX), pp 1-23.

O'Connor JK y Chiappe LM (2011) A revision of enantiornithine (Aves: Ornithothoraces) skull morphology. *Journal of Systematic Palaeontology*, 9:1, 135-157.

Ostrom JH (1969) Osteology of *Deinonychus antirrhopus*, and unusual theropod from the lower Cretaceous of Montana.

Bulletin 30, Peabody Museum of Natural History, Yale University, New Haven, Connecticut.

Parker WK (1869) On the Structure and Development of the Skull of the Common Fowl (*Gallus domesticus*). Philosophical transactions of the Royal society of London, Vol. 159, pp. 755-807.

Peyer K (2006) A reconsideration of *Compsognathus* from the upper Tithonian of Canjuers, Southeastern France. Journal of Vertebrate Paleontology 26(4):879-896.

Pourquié O (2009) The Skeletal System. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Rauhut OWM (2014) New observations on the skull of *Archaeopteryx*. Palaontol Z 88:211-221

Richman JM, Buchtová M y Boughner JC (2006) Comparative ontogeny and phylogeny of the upper jaw skeleton in amniotes. Developmental Dynamics 235:1230-1243.

Rieppel O (1993) Studies on skeleton formation in reptiles V. Patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* DAUDIN (Reptilia, Crocodylia). Zoological Journal of the Linnean Society, 109: 301-325.

Romer AS (1997) The Osteology of the Reptiles. 2nd Edition. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Rowe T(1989). A New Species of the Theropod Dinosaur *Syntarsus* from the Early Jurassic Kayenta Formation of

Arizona. Journal of Vertebrate Paleontology, Vol. 9, No. 2, pp. 125-136.

Schowing J (1968). Influence inductrice de l'encephale embryonnaire sur le développement du crâne chez le Pulet. J. Embryol. Exp. Morph. Vol. 19, 1, pp. 9-22.

Sereno PC y Novas FE (1994) The skull and neck of the basal theropod *Herrerasaurus ischigualastensis*. Journal of Vertebrate Palaeontology, Vol. 13, issue 4, pages 451-476.

Sues HD (1977a) The skull of *Velociraptor mongoliensis*, a small Cretaceous theropod dinosaur from Mongolia. Palaontologische Zeitschrift 51, 173-184.

Tokita M (2003) The skull development of parrots with special reference to the emergence of a morphologically unique cranio-facial hinge. Zoological Science, 20(6):749-758.

Turner AH, Makovicky PJ, Norell MA (2012) A review of dromaeosaurid systematics and paravian phylogeny. Bulletin of the American Museum of Natural History, 371:1-206.

Vickaryous MK y Hall BK (2008) Development of the Dermal Skeleton in *Alligator mississippiensis* (Archosauria, Crocodylia) with comments on the homology of Osteoderms.

Zanno LE (2008) A taxonomic and phylogenetic reevaluation of Therizinosauria (Dinosauria: Theropoda): Implications for the evolution of Maniraptora. A dissertation submitted

to the faculty of The University of Utah in partial
fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of
Philosophy in Geology Department of Geology and Geophysics
The University of Utah.