

UCH-FC
MAG-B
084
C.I



**LA HOMOLOGÍA DEL PROCESO ASCENDENTE
DEL ASTRÁGALO EN AVES: UN CASO DE
REVERSIÓN EVOLUTIVA.**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Luis Andrés Ossa Fuentes

Octubre, 2014

Directores de Tesis:
Dr. Alexander O. Vargas
Dr. Jorge Mpodozis

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

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

Luis Andrés Ossa Fuentes

Ha sido aprobado 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 3 de Septiembre de 2014.

Director de Tesis:
Dr. Alexander O. Vargas


.....

Co-Director de Tesis
Dr. Jorge Mpodozis


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals (Presidente)


.....

Dr. David Rubilar


.....



Este trabajo está dedicado a don Étienne Geoffroy Saint-Hilaire y al barón Jean Léopold Nicolas Frédéric Cuvier. En el fondo (*bien en el fondo*), ustedes tenían razón.

...“Johannes Müller made great use of embryology (...) and, according to his pupil Reichert, firmly held the opinion that *embryology was the final court of appeal in disputed points of comparative anatomy*”...(Russell, 1916; pág. 138).

...“Fairies wear boots and you gotta believe me yeah I saw it, I saw it, *I tell you no lies*”... (Black Sabbath, 1970).

Biografía

(O anti-crónica de vida)

Según lo que relata mi madre nací un miércoles 19 de Febrero a las 4:00 AM, de ahí paso el tiempo, estudié en el Instituto Nacional y previo a un paso en falso en la Facultad de Medicina de la UChile llegué a Licenciatura en Biología. No diré que siempre me gustaron los bichitos y las plantitas (como la mayoría de la gente bióloga-like lo hace), sino más bien que mis intereses/preguntas iban por tratar de definir (para mis adentros como dice Zaratustra) lo que era (es) un ser vivo, y como este cambia de forma desde el huevo hasta el adulto. Las respuestas no las encontré en los electivos de 4to medio, ni en mi paso (en falso) por tres años en Tecnología Médica (aun no sé porque entré ahí). Solo fui cocinando mis respuestas a medida que pasaban los años y consumía varios libros y ramos en Biología. Ahora creo tener algún atisbo de una respuesta propia, pero no se las voy a revelar, hay libros que hablan mejor y más lindo que yo.



Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias al apoyo de CONICYT, Beca Magíster Nacional 2012 Folio Beca: 22120395.

Primero quiero agradecerme a mí mismo por permitirme pensar en hacer esto y soportarme mi mal genio/humor negro/acidez. Segundo, A mi familia que siempre me prestó ropa (= chilenuismo que significa apoyar en las buenas y malas). Tercero, a mis tutores (Alexander y Jompoma) por darme el espacio para construir epigénicamente este trabajo.

Cuarto, poniendo atención al plano más personal e incisivo/lacerante (como un puñal atravesando la carne) agradezco (dos puntos): A los del Museo de Historia Natural, Rodrigo Otero, Sergio Soto y David Rubilar, por las nutridas conversaciones de paleontología, evolución y jugo que hasta el día de hoy siguen influenciando mi forma de pensar. A los del Vargaslab: Joao (que ya no está con nosotros.....porque se fue a New Zealand a cazar kiwis) por sus enseñanzas filosóficas y experimentales. Los Danieles (Nuñez /Smith) por, una vez más, soportarme y tener el tiempo de compartir una amistad y el cosonimiento de la evodevo en conversaciones de pasillo. Camila, por querer a mi merced y compartir los mismos amores y odios por el mundo y la existencia. A los del Rayo: Carolina (compañera en armas y pelambre), Elisa, Sara (por compartir el amor a Anneke), Pedro, Daniel (Severin), Juan, Alfonso, Máximo, Cristianes (Profesor Gonzalez y Dr. Morales), Rosana y Florencia por la buena onda, la conversación de sobremesa interminable y el reto oportuno cuando se me arrancaban los enanos pal bosque (o las cabras para el cerro). A los que fueron del Rayo: Patricio Ahumada, por las nutridas conversaciones de evolución, arte y poesía (que aún no la entiendo). Macarena Faunes, por enseñarme de la vida, la neurociencia, compartir cortes de pelo y competencias deportivas.

(En este momento debería llorar?)

Para los que no están nombrados aquí reclamen a la FIFA.

Índice de Contenidos

Índice de contenidos.....	ii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Abreviaturas y Nomenclatura.....	ix
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
a. Consideraciones Paleontológicas.....	5
b. Consideraciones Embriológicas.....	7
c. Deficiencias y Discrepancias.....	9
Hipótesis del trabajo.....	12
Hipótesis general.....	12
Hipótesis específica.....	12
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos.....	15
Tinción whole-mount para tejidos esqueléticos.....	15
Histología.....	16
Inmunohistoquímica.....	17
Inmunofluorescencia whole-mount.....	18
Resultados.....	20
1. Series Ontogenéticas del tarso proximal aviano:	
I. Formación de Cartílago.....	20
2. Histología en cortes seriados.....	28
2.1 Histología normal para cartílago.....	28
2.2 Inmunohistoquímica para Colágenos II y IX.....	40

3. Inmunofluorescencia whole-mount para Colágenos II y IX.....	46
4. Series Ontogenéticas del tarso proximal aviano:	
II. Secuencias de Osificación.....	52
Discusión.....	57
1. Similitudes de ontogenias tarsales en Aves.....	57
2. Comparación con representantes fósiles de Theropoda.....	62
3. Comparación con ontogenia temprana de <i>Alligator</i> , indicios de la conformación del tarso en Archosauria. Comparación de ontogenia temprana del tarso entre Amniotos y Anfibios actuales.....	65
4. <u>Comentario Final</u> : Comparación con representantes fósiles de anfibios no-amniotos, stem-amniotos y amniotos basales.....	71
 Conclusiones.....	 74
Bibliografía.....	75

Lista de Figuras

- Figura 1.** Anatomía comparada del tarso de tetrápodos. *Página 6.*
- Figura 2.** Evolución del tarso proximal en Archosauria. *Página 7.*
- Figura 3.** Estudios embriológicos del desarrollo del tarso proximal en reptiles. *Página 8.*
- Figura 4.** Estudios embriológicos del desarrollo del tarso proximal aviano. *Página 10.*
- Figura 5.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Nothoprocta perdicaria*. *Página 22.*
- Figura 6.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Gallus gallus*. *Página 23.*
- Figura 7.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Anas platyrhynchos*. *Página 24.*
- Figura 8.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Columba livia*. *Página 25.*
- Figura 9.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Melopsittacus undulatus*. *Página 26.*
- Figura 10.** Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Taeniopygia gutatta*. *Página 27.*
- Figura 11.** Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH29-HH30 *Gallus gallus*. *Página 30.*
- Figura 12.** Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH31 *Gallus gallus*. *Página 31.*

Figura 13. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH31 *Gallus gallus*. Página 32.

Figura 14. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH32 *Gallus gallus*. Página 33.

Figura 15. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH34 *Gallus gallus*. Página 34.

Figura 16. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH34 *Gallus gallus*. Página 35.

Figura 17. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH32 *Anas platyrhynchos*. Página 36.

Figura 18. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH34 *Anas platyrhynchos*. Página 37.

Figura 19. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH32 *Nothoprocta perdicaria*. Página 38.

Figura 20. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH34 *Nothoprocta perdicaria*. Página 39.

Figura 21. Inmunohistoquímica para Colágeno IX en cortes, serie 1 dorso-ventral HH 32 *Gallus gallus*. Página 41.

Figura 22. Inmunohistoquímica para Colágeno IX en cortes, serie 2 dorso-ventral HH 32 *Gallus gallus*. Página 42.

- Figura 23.** Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes, serie sagital (latero-medial) HH 32 *Gallus gallus*. *Página 42.*
- Figura 24.** Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 34 *Gallus gallus*. *Página 43.*
- Figura 25.** Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 32 *Nothoprocta perdicaria*. *Página 44.*
- Figura 26.** Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 34 *Nothoprocta perdicaria*. *Página 45.*
- Figura 27.** Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno II, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. *Página 47.*
- Figura 28.** Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno IX, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. *Página 48.*
- Figura 29.** Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno II bajo microscopía confocal spin-disc, tarso lateral *Coturnix japonica*. *Página 49.*
- Figura 30.** Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno IX bajo microscopía confocal spin-disc, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. *Página 50.*
- Figura 31.** Reconstrucciones 3D y diagramas de isocuperficies para los estadios mostrados en la Fig. 31, Serie ontogenética de *C. japonica*. *Página 51.*

- Figura 32.** Tinción Whole Mount Rojo de Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Gallus gallus*. *Página 53.*
- Figura 33.** Tinción Whole Mount Rojo de Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Nothoprocta perdicaria*. *Página 54.*
- Figura 34.** Tinción Whole Mount Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Coturnix japonica*. *Página 55.*
- Figura 35.** Tinción Whole Mount Alizarina para caracterizar la osificación en el tarso proximal en *Vanellus chilensis*. *Página 55.*
- Figura 36.** Resumen comparativo entre las ontogenias tarsales tempranas de especies de Aves utilizadas en este estudio. *Página 58.*
- Figura 37.** Resumen general extendido de las ontogenias tarsales tempranas en Aves, incluyendo a la revisión de McGowan (1985) en Paleognatas. *Página 61.*
- Figura 38.** Resumen de las ontogenias completas del tarso aviano, incluyendo las etapas de condrogénesis y osteogénesis. *Página 62.*
- Figura 39.** Resumen de los estudios embriológicos del tarso en aves más los resultados de esta tesis. *Página 63.*
- Figura 40.** Comparación de la osificación del tarso en *Coturnix japonica* con *Dilophosaurus*. *Página 65.*

Figura 41. Comparación general entre las ontogenias tarsales de representantes actuales amniotos y no-amnitos. *Página 70.*

Figura 42. Esquema modificado de Mayer & Anderson (2013). *Página 73.*

Lista de Abreviaturas y Nomenclatura

a = ast = astrágalo

cal = calcáneo

T = Ti = tibia

F = Fi = fíbula

t = tib = te = tibiale

f = fib = fe = fibulare

i = in = int = intermedium

c = centrale

c1 = centrale 1

c4 = centrale 4

c3 = centrale 3

dt = tarsales distales

asc = A = proceso ascendente

Cal OC = centro de osificación del calcáneo

Lat OC = centro de osificación lateral del tarso

Asc OC = centro de osificación del proceso ascendente /

intermedium

Med OC = centro de osificación medial del tarso

RESUMEN

El astrágalo de amniotos actuales se forma a partir de la fusión de cartílagos tempranos, presentando solo un centro de osificación. En tetrápodos no-amniotos y stem-amniotos existen tres huesos en la misma posición anatómica del astrágalo: tibiale, intermedium y centrale 4. Estudios embriológicos en amniotos describen la formación del astrágalo a partir de la fusión de dos cartílagos embrionarios (Tibiale e Intermedium: Mammalia, Liolaemidae, Alligatoridae) y en algunos linajes un tercer cartílago adicional, del centrale 4 (Chelonia, Gekkonidae). En Aves aún no está resuelto la identidad de los elementos que forman el tarso proximal. Los estudios embriológicos más recientes han descrito al astrágalo como derivado de un sólo cartílago, el tibiale, mientras que estudios más antiguos (siglo XIX) describen dos. En aves, el astrágalo presenta un proceso ascendente que crece dorsalmente por encima de la tibia en dirección proximal, que desarrolla un centro de osificación independiente, una condición considerada neomórfica para entre los amniotos, que generalmente presentan una sólo osificación. Identificamos el número de elementos cartilagosos que conforman el tarso proximal en Aves, mediante observaciones histológicas y montajes completos de tinciones para de componentes de la matriz extracelular (MEC) de cartílago y hueso. El astrágalo resulta de la fusión inusualmente tardía de los cartílagos del tibiale e intermedium, los cuales además se fusionan al fibulare conformando un cartílago común en el tarso proximal.

Notamos que el intermedium durante la ontogenia se va modificando y creciendo en dirección próximo-dorsal sobre la tibia, constituyendo lo que hasta la fecha se describió como el proceso ascendente. La re-indetificación del proceso ascendente como el intermedium revela un caso de reversión, en el cual el intermedium volvió a desarrollar su propio centro de osificación, como en tetrápodos basales.

ABSTRACT

The Astragalus of crown amniotes is formed from the fusion of early cartilages, presenting only one center of ossification. In non-amniote tetrapods and stem-amniotes there are three bones in the same anatomical position: Tibiale, Intermedium and Centrale 4. Embryological studies in non-avian reptiles described the astragalus formation as a fusion of two embryonic cartilages (Intermedium and Tibiale: Mammalia, Liolaemidae, Alligatoridae) and in some lineages a third additional cartilage is present (Gekkonidae, Chelonia). In Birds the identity of the elements forming the Astragalus is unclear. Recent Embryological studies have described the proximo-astragalus as derived from a single tibiale cartilage, while older studies described fusion with an intermedium. In birds, the astragalus presents an ascending process that grows proximo-dorsally over the tibia, which develops its own ossification center, a unique trait within amniotes who generally present a single ossification center in the astragalus.

We identify the number of elements of the proximal tarsus in Aves by observations of components of the extracellular matrix (ECM) of cartilage and bone. An intermedium is present that fuses unusually late to the tibiale. These fuse to the fibulare to conform a common proximal cartilage. We note that the intermedium during ontogeny grows in a proximo-dorsal direction over the tibia, forming what is currently described as the ascending process of the astragalus. Re-identification

of the ascending process as the intermedium reveals a case of reversion in which the intermedium once again develops its own ossification center, as it once did in basal tetrapods.

INTRODUCCION

a. Consideraciones Paleontológicas.

El tarso proximo-medial de amniotos, el Astrágalo (Carroll, 1988; Rieppel, 1993), ha sido identificado como un hueso compuesto en base a evidencia paleontológica y embriológica.

La identificación paleontológica está basada en la presencia de múltiples centros de osificación fusionados en reptiles basales, y sus posiciones relativas comparadas a los elementos separados presentes en tetrápodos basales no-amniotos (Peabody, 1951. **Figura 1A**). Por ejemplo, en el anfibio Temnospóndilo *Acheloma (Trematops)*, se describen tres huesos separados (Tibiale, Intermedium y Centrale 4) en la posición anatómica que ocupa el astrágalo del eureptil basal *Captorhinus* (Schaeffer, 1941; Peabody, 1951; O'Keefe et al, 2006) el cual presenta 3 centros de osificación (**Figura 1B**). Un estadio intermedio en la transformación de este elemento tarsal, se evidencia en los amniotos troncales *Diadectes* y *Gephyrostegus* en donde sólo el Tibiale y el Intermedium están fusionados, sin involucrar elementos centrales (Carroll & Holmes, 2007) (**Figura 1C**).

A diferencia de los reptiles troncales, en el grupo de los Reptiles modernos (crown reptilia o Sauropsida), el astrágalo desarrolla un único centro de osificación (Carroll, 1988) con la excepción de las Aves, donde el astrágalo presenta un proceso ascendente que se proyecta en dirección próximo-dorsal, por encima de la tibia, y que desarrolla su propio

centro de osificación que luego se fusiona a la del cuerpo principal del astrágalo (y a la tibia, conformando el tibiotarso. McGowan, 1985). (Figura 2).

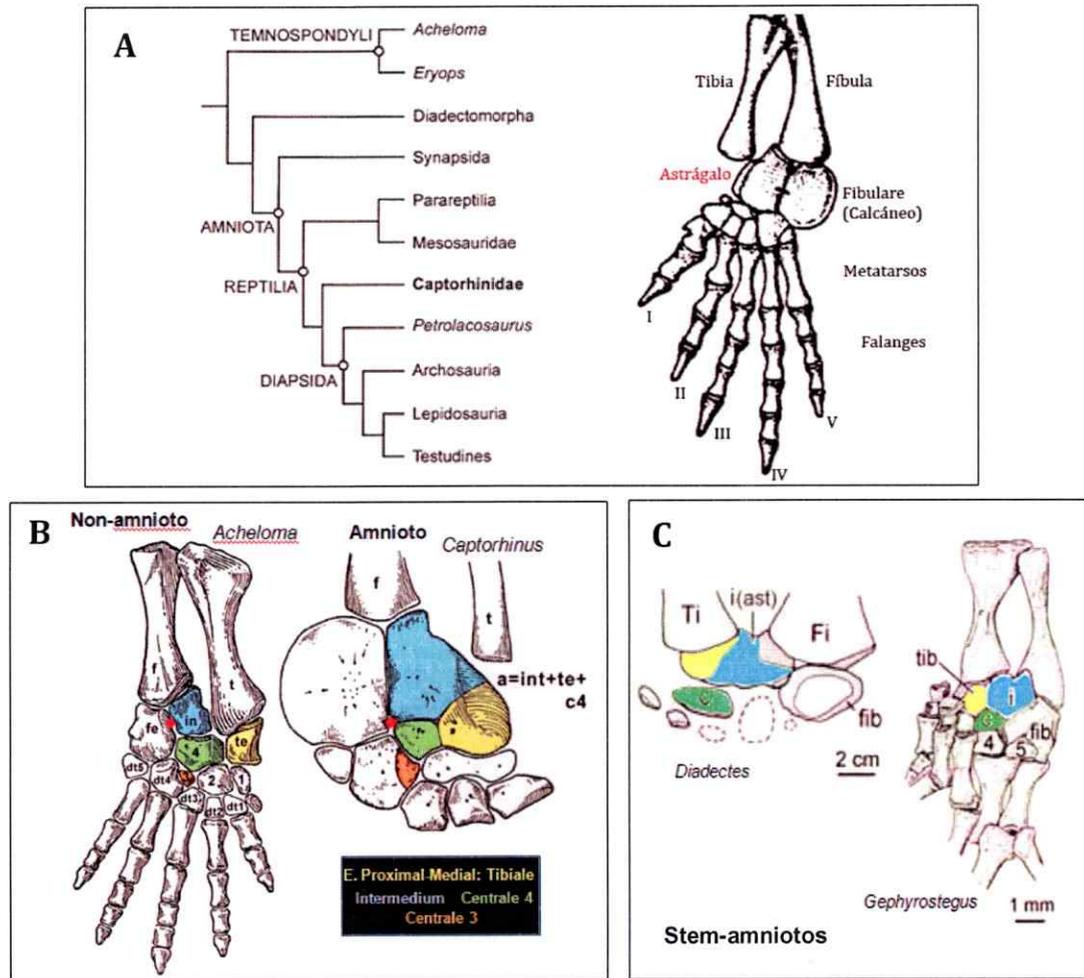


Figura 1. Anatomía comparada del tarso de tetrápodos. **A)** Filogenia de tetrápodos y anatomía del tarso proximal de amniotos, el astrágalo se destaca en color rojo. **B)** Conformación del tarso en non-amniotos y la correspondencia con las posiciones relativas en el astrágalo de amniotos. **C)** Tarso proximal de los Stem-amniotos *Diadectes* y *Gephyrostegus*. En color amarillo se muestra el elemento proximal-medial o Tibiale, en celeste el Intermedium; en verde el Centrale 4 y en naranja el Centrale 3. Usaremos esta coloración para las figuras siguientes. Figuras **1A** y **1B** modificadas de O'Keefe et al, (2006) y Figura **1C** modificada de Carroll & Holmes, (2007).

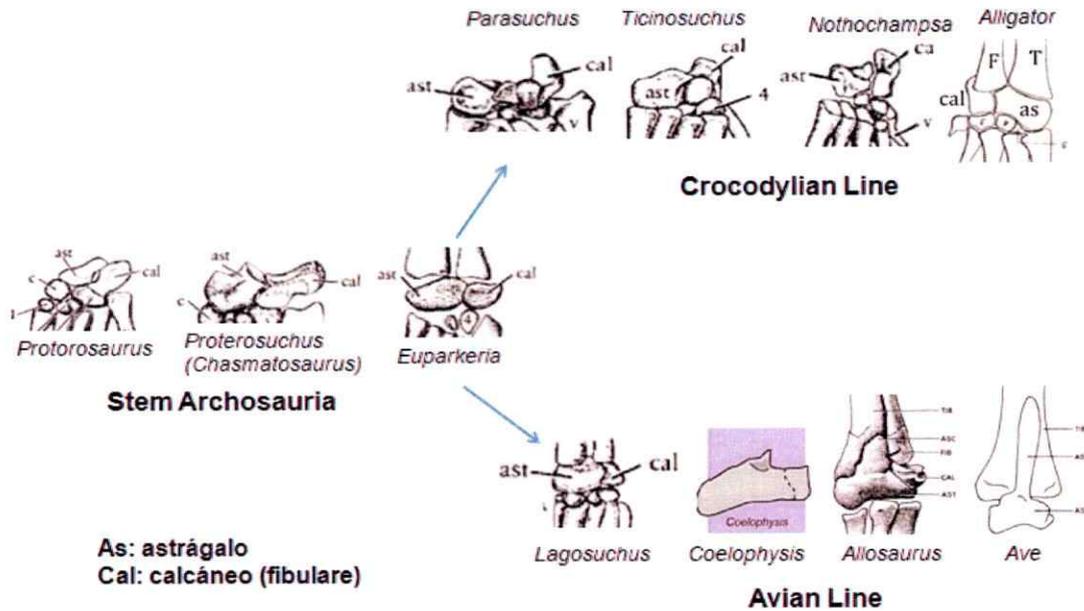


Figura 2. Evolución del tarso proximal en el linaje de reptiles Archosauria. En Crocodylia (Archosauria basales) el astrágalo, se desarrolla a partir de un único centro de osificación (Carroll, 1988). Esto se observa en Stem Archosauria y el linaje conducente a cocodrilos. Hacia la base del linaje aviano, en Lagosuchus se conserva la misma condición, ya a partir de Coelophysis el astrágalo presenta un proceso ascendente que se proyecta en dirección próximo-dorsal por encima de la tibia (McGowan, 1985).

b. Consideraciones Embriológicas.

En lagartijas del género *Liolaemus* (Fabrezzi et al, 2007) y en el cocodrilo *Alligator mississippiensis* (Müller & Alberch, 1990), (Figura 3A y 3B) se han descrito solo dos cartílagos proximales que componen el astrágalo, un intermedium, y hacia medial, un cartílago que es identificado variablemente como un centrale, o el tibiale (No ahondaremos aquí en este polémica: por conveniencia, nos referiremos a este cartílago como el Tibiale, según Gegenbaur, 1878 y Schaeffer, 1941. En el Geckko *Gonatodes albogularis* (Leal et al, 2010) se ha descrito 3 cartílagos que forman el astrágalo: tibiale + intermedium + centrale 4, recapitulando en la condrogénesis la secuencia que ocurre en tetrápodos basales (Figura 3C).

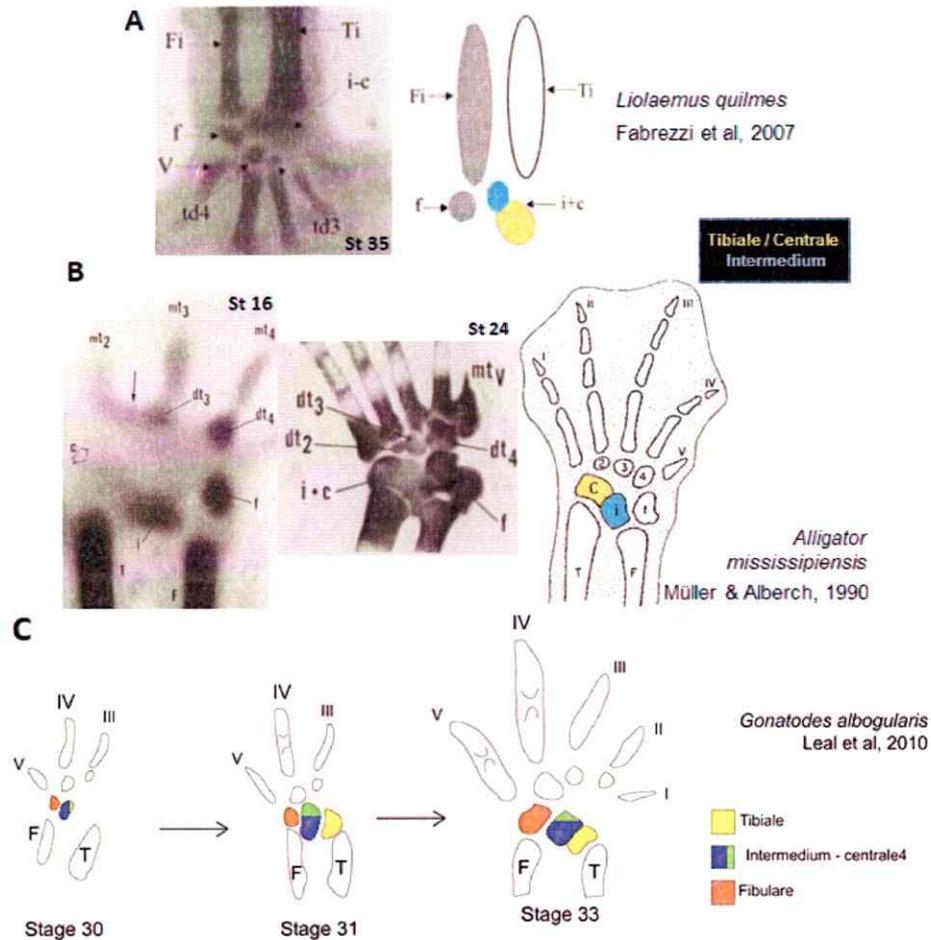


Figura 3. Estudios embriológicos del desarrollo del tarso proximal en reptiles. **A)** En la lagartija *Liolaemus quilmes* en estadio 35 se observa el tarso proximal conformado por el fibulare y el complejo intermedium+centrale (centrale, como elemento proximal-medial designado), posteriormente este complejo osifica dando origen al astrágalo. **B)** En el cocodrilo *Alligator mississippiensis* se describe de la misma manera que en *Liolaemus*, encontramos que en estadio 16 encontramos en el tarso proximal al centrale (como elemento proximal-medial designado), el intermedium y el fibulare. Posteriormente en estadio 24 se genera un complejo intermedium+centrale que cuando osifica da origen al astrágalo propiamente tal. Para la figura 3B y 3C el elemento proximal-medial se ilustra con amarillo en los esquemas y el intermedium de color celeste. **C)** En el Geckko *Gonatodes albogularis* se describe la formación del astrágalo por el tibiale (amarillo), intermedium (azul) y centrale 4 (verde). **Abreviaturas:** **3A)** Ti=tibia, Fi=fibula, f=fibulare, i+c=intermedium+centrale, td=tarsal distal. **3B)** T=tibia, F=fibula, f=fibulare, i+c=intermedium+centrale, dt=tarsal distal, mt=metatarso. Figura 3A modificada de Fabrezzi et al. (2007), 3B modificada de Müller & Alberch (1990) y 3C modificada de Leal et al. (2010).

La formación del tarso proximal en Aves fue descrita por primera vez por Morse (1872, 1880). Este autor describió la fusión de 3 cartílagos: tibiale + intermedium + fibulare, constituyendo un astrágalo-fibulare más un proceso ascendente

que crece próximo-dorsalmente respecto a la Tibia. Este proceso, propio del linaje aviano, Morse lo homologa a un intermedium embrionario (**Figura 4A**).

Posteriores estudios embriológicos en *Gallus gallus* (Pollo) (Hinchliffe 1977; Burke & Fedducia, 1997) identifican solo dos cartílagos proximales tarsales: uno medial como tibiale y otro lateral como fibulare (también nombrado como calcáneo) (**Figura 4B**). Respecto al proceso ascendente del astrágalo, McGowan (1984, 1985) basándose en Hinchliffe (1977) no lo identifica como el intermedium sino que lo señala como una prolongación del cartílago del Astrágalo en Aves Paleognatas y Neognathas (**Figura 4C**).

McGowan señala que el Astrágalo y Calcáneo se fusionan conformando un sólo cartílago en el que posteriormente aparecen 3 centros de osificación independientes que corresponden al calcáneo, astrágalo, y su proceso ascendente, recalcando que la osificación del proceso ascendente sería una innovación evolutiva (neomorfismo). Posteriormente, estos centros se fusionan generando el astrágalo calcáneo. Finalmente se fusionan con el extremo distal de la Tibia, conformando el Tibiotarso (**Figura 4D**).

c. Deficiencias y Discrepancias.

La revisión de la literatura da cuenta de la discrepancia en la identificación de los elementos tarsales de Aves según diferentes estudios embriológicos. Hasta la fecha, todos los estudios embriológicos en aves no han descrito lo que ocurre

en estadios tempranos del desarrollo, no quedando claro el número de condensaciones cartilaginosas que aparecen en la formación del tarso proximal.

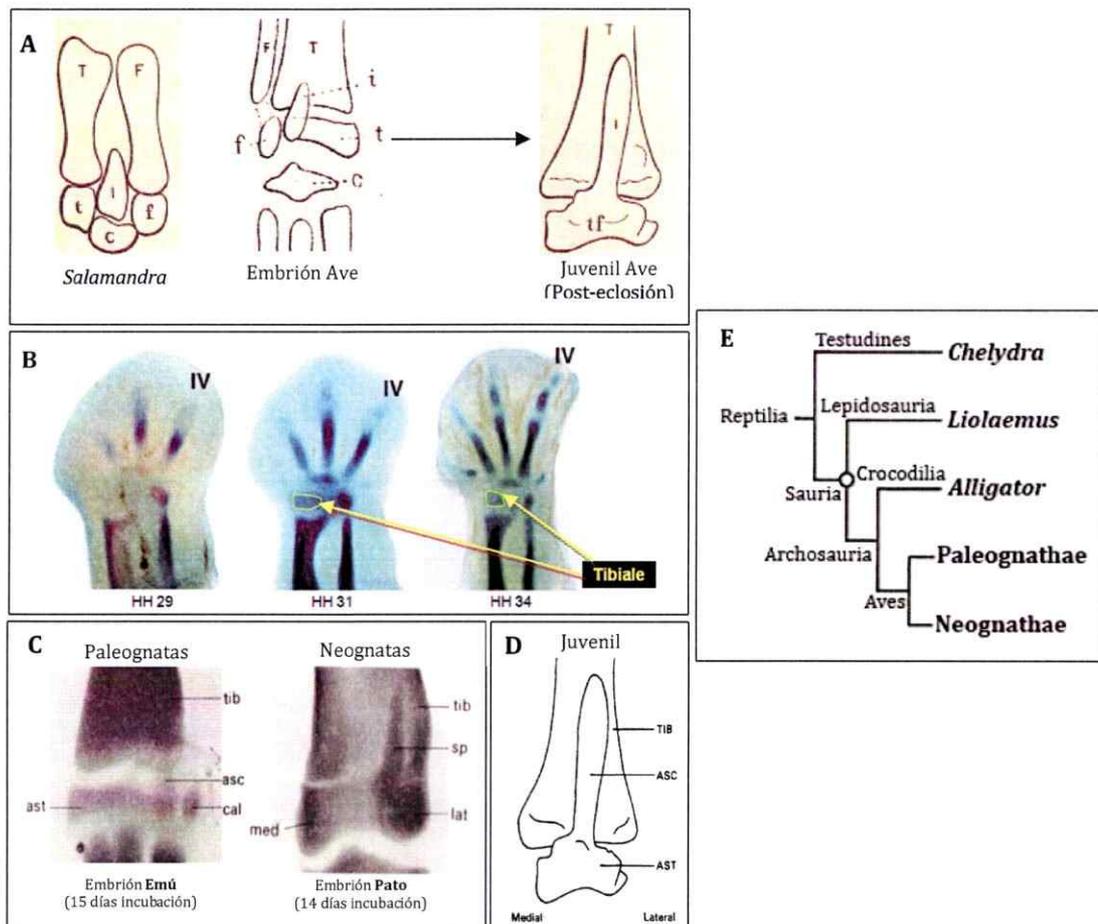


Figura 4. Estudios embriológicos del desarrollo del tarso proximal aviano. **A)** Propuesta de Morse (1880) que señala que el proceso ascendente es un elemento independiente en el embrión de ave y corresponde al intermedium que se observa en Salamandra y No-amniotos adultos. **B)** Serie ontogenética de la extremidad inferior en Pollo, con tinción alcian blue para cartilago, donde se señalan al elemento proximal-medial como Tibiale (amarillo). **C)** Tinción alcian blue para cartilago en embrión de Emú de 15 días (ave paleognata) y en embrión de Pato de 14 días (ave neognata) en donde se describe que el proceso ascendente en paleongantas es una prolongación del astrágalo(tibiale) y en neognatas es una prolognación del fibulare(calcáneo). **D)** Juvenil de avestruz donde se muestra el astrágalo con su proceso ascendente. **E)** Filogenia resumen donde se muestran los grupos considerados en los estudios embriológicos descritos. **Abreviaturas:** **4A)**, T=tibia; F=fibula; t=tibiale; f=fibulare; i=intermedium; c=centralia; tf=tibiale-fibulare. **4C,** Paleognatas: ast=astrágalo(tibiale); asc=proceso ascendente; cal=calcáneo(fibulare); tib=tibia. Neognatas, med=cóndilo medial(=tibiale=astrágalo), lat=cóndilo lateral(=fibulare=calcáneo), sp=proyección cartilagenosa del fibulare(calcáneo). Figura 4A modificada de Morse (1880), 4B modificada de Burke & Feduccia (1997), 4C y 4D modificadas de McGowan (1985).

De la bibliografía revisada se puede sugerir dos posibles respuestas con 105 años de diferencia: (1) Según Morse (1872, 1880) el proceso ascendente corresponde al intermedium, desarrollando una osificación independiente como en anfibios y los primeros amniotos, constituyéndose el tarso proximal con tres elementos: tibiale/intermedium/fibulare. (2) Según McGowan (1984, 1985) el proceso ascendente es un completa innovación evolutiva, desarrollado a partir de una prolongación cartilaginosa del cartílago del astrágalo. Conformándose el tarso por el cartílago del astrágalo y el del calcáneo.

Por lo tanto, la aplicación de un estudio embriológico más detallado, focalizado en estadios más tempranos del desarrollo, es indispensable para generar un nuevo marco empírico posibilitando una nueva perspectiva de la evolución del desarrollo en el tarso de Aves a partir de reptiles.

Hipótesis de trabajo

En la ontogenia temprana del tarso proximal aviano aparecen tres condensaciones cartilaginosas independientes: tibiale, intermedium y fibulare, siendo el proceso ascendente un intermedium modificado.

Hipótesis específicas

Se evaluará,

(i) El tarso proximal aviano desarrolla tres cartílagos embrionarios en su ontogenia temprana.

(ii) El proceso ascendente del astrágalo aparece desde el comienzo como un elemento independiente (Morse, 1880), y luego se fusiona al tibiale, en vez de originarse como una proyección a partir del astrágalo (McGowan, 1985).

(iii) La osificación "neomórfica" del tarso proximal aviano corresponde en realidad al intermedium.

Objetivos



Objetivo General:

Describir mediante diferentes técnicas y tinciones histológicas, incluyendo inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, el origen embriológico y ontogenia temprana de los diferentes elementos cartilagosos presentes en el desarrollo del tarso proximal en especies de aves representativas: *Gallus gallus* (pollo, Galliformes), *Nothoprocta perdicaria* (perdiz chilena, Tinamiformes), *Coturnix japonica* (codorniz japonesa, Galliformes), *Melopsittacus undulatus* (cata australiana, Psittaciformes), *Taeniopygia guttata* (diamante, Passeriformes), *Vanellus chilensis* (queltehue, Charadriiformes) y *Columbia livia* (paloma, Columbiformes). Esta información es necesaria para poder reconstruir la evolución del desarrollo del tarso proximal en Aves desde Reptilia basales.

Objetivos específicos:

1. Realizar series ontogenéticas completas mediante la técnica de diafanización con Alcian Blue/Rojo Alizarina para comparar el desarrollo temprano del tarso proximal en las especies de aves señaladas, con el fin de observar la condrogénesis temprana del tarso proximal y la aparición de los centros de osificación tardíamente en el desarrollo.

2. Realizar cortes y tinciones histológicas para cartílago e inmunohistoquímica/ fluorescencia para Colágeno II y Colágeno IX, a fin de observar si en etapas tempranas del desarrollo [5 a 10 días incubación] el proceso ascendente se desarrolla a partir de un cartílago temprano independiente (el intermedium), o bien se desarrolla a partir del cartílago pre-existente del astrágalo. La ventaja de usar Colágeno IX es que revela focos de maduración al interior de cartílagos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tinción whole mount para tejidos esqueléticos:

Diafanización y obtención de series ontogenéticas completas de la extremidad inferior en algunas especies de aves: Se obtuvieron y aislaron completamente las extremidades inferiores de embriones de *Gallus gallus* (Pollo), *Nothoprocta perdicaria* (perdiz chilena), *Coturnix japonica* (codorniz japonesa), *Melopsittacus undulatus* (cata australiana), *Taeniopygia guttata* (Diamante), *Vanellus chilensis* (queltehue) y *Columbia livia* (paloma); desde los 5 días de incubación hasta el estadio de eclosión. Se realizó la Tinción dicrómica Alcian Blue/Rojo Alizarina. Con el fin de caracterizar, a nivel macroscópico, las condensaciones condrogénicas en estadios tempranos (5-8 días incubación) y posterior aparición de los centros osificación (cerca de la eclosión) en el tarso proximal de estas aves. Los embriones fueron fijados por deshidratación en Metanol absoluto (100%) por 2 hrs. a temperatura ambiente, luego fueron teñidos por inmersión en Alcian Blue al 0,03% en solución Etanol 80%/Ácido acético glacial 20%; posteriormente, se dejaron en KOH 1% para pasarlos (los embriones más tardíos) por la solución de Alizarina al 1% en KOH 0,5%. Finalmente los embriones fueron transparentados en una batería de glicerol: glicerol 20%/1%KOH, glicerol 50%/ agua destilada 50%, glicerol 90%/ agua destilada 10%. Los estadios del desarrollo fueron estandarizados por la clasificación de Hamburger & Hamilton

(1951). Los preparados fueron fotografiados en una lupa OLYMPUS SZX10.

Histología:

Obtención de cortes seriados de estadios tempranos [entre HH29 y HH36] del desarrollo de extremidad inferior en embriones de *Gallus gallus*, *Nothoprocta perdicaria* y *Anas platyrhynchos*: Los embriones se fijaron en Formalina 10% en PBS 1%, pasaron por una batería de deshidratación con Etanol en concentraciones crecientes (50%, 70%, 95% (x2), 100% (x2), Xilol (x2)) y posterior inclusión en parafina al vacío por 30 min (paraplast a 58°C). Se realizaron cortes a lo largo del eje dorso-plantar y coronal de grosor del orden de 10-13µm. Posteriormente los cortes obtenidos se sometieron a una batería de hidratación y tinción con los siguientes procedimientos: (I) Tinción tricómica Hematoxilina de Mayer/Rojo de Safranina O/Fast Green. (II) Tinción dicrómica Alcian Blue/Nuclear Red. Los colorantes Rojo Safranina O y Alcian Blue reaccionan para teñir matriz extracelular (MEC) exclusiva de cartilago (Safranina O reacciona con condroitín sulfato y Alcian blue con ácido hialurónico); Rojo Alizarina para teñir MEC exclusiva de tejido óseo (o en su defecto, en deposiciones de calcio); Hematoxilina de Mayer y Nuclear Red son colorantes nucleares y finalmente Eosina y Fast Green son colorantes citoplasmáticos. Finalmente los preparados fueron deshidratados en tiempos cortos y montados con medio de montaje Entellan ©. Los preparados histológicos fueron

fotografiados en un microscopio OLYMPUS MVX10.

Inmunohistoquímica:

Obtención de cortes seriados coronales y dorso-ventrales de estadios tempranos [entre HH32 y HH34] del desarrollo de extremidad inferior en embriones de *Gallus gallus* y *Nothoprocta perdicaria*: Se procedió a efectuar Inmunohistoquímica en los cortes seriados para caracterizar la presencia de los siguientes componentes de matriz extracelular de cartilago: Colágeno II y Colágeno IX. Se siguió el siguiente protocolo: [1] Los embriones se fijaron en Formalina 10% en PBS 1%; [2] pasaron por una batería de deshidratación con Etanol en concentraciones crecientes (50%, 70%, 95% (x2), 100% (x2), Xilol (x2)) y posterior inclusión en parafina al vacío por 30 min (paraplast a 58°C). [3] Se realizaron cortes a lo largo del eje dorso-plantar y coronal de grosor del orden de 10-13µm. [4] Los cortes fueron desparafinados en una placa calefactora a 60°C por 30 minutos; [5] rehidratados en una batería de alcoholes decrecientes (Neoclear (x2), Etanol 100% (x2), 95% (x2), 75 (x2), 50 (x2)); [6] puestos en una solución de bleaching H₂O₂ 3% en PBS 1X 50%/Metanol 50% por 30 minutos; [7] sumergidos en buffer citrato (pH 6) 80°C por 30 minutos; [8] tratados con Hialuronidasa 2mg/mL por 2 horas; [9] lavados con PBSt 0,1% 3 veces (c/u 5 minutos); [10] para luego bloquear 2 horas en solución 5% suero normal de cabra (NGS) en PBSt 0,1%. [11] Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-Colágeno tipo 2 II-II6B3-s IgG hecho en ratón (dilución 1:20,

DSHB), y anti-Colágeno tipo 9 2C2-s IgG hecho en ratón (dilución 1:20, DSHB) incubando con parafilm toda la noche a 4°C en cámara húmeda. [12] Posteriormente, se hicieron 4 lavados (c/u de 5 minutos) con PBSt 0,1%. [13] Se utilizó anticuerpo secundario Biotinilado hecho en burro anti-ratón IgG BA2000, se cubrió con parafilm en cámara húmeda por 2 horas. [14] Se hicieron 4 lavados (c/u de 5 minutos) con PBSt 0,1%. [15] Se incubó consolución AB (avidina-biotina) por 1 hora con parafilm en cámara húmeda. [16] Se hicieron 4 lavados (c/u de 5 minutos) con PBSt 0,1%. [17] Finalmente, se reveló con DAB (ImpactDab) (40 microlitros DAB/ 1 mL Buffer solución DAB) hasta ver marcaje y se detuvo la reacción con PBS 1X. Como último paso los cortes fueron deshidratados en tiempos cortos y montados con medio de montaje Entellan ©. Los cuales fueron fotografiados en un microscopio OLYMPUS MVX10.

Inmunofluorescencia Whole-Mount

Se obtuvieron embriones tempranos de *Coturnix japonica* (entre HH29 y HH37), los cuales se sometieron al siguiente protocolo:

[1] fueron fijados en solución de Dent (4:1 Metanol:Dimetilsulfóxido (DMSO)) por dos horas a temperatura ambiente, deshidratados en metanol (x2) por 10 minutos y dejados a -80°C para post-fijación. [2] Los embriones fueron tratados con solución Dent-bleaching (4:1:1 metanol:DMSO:H₂O₂) por 24 horas a temperatura ambiente. [3] El anticuerpo primario fue diluido en PBST/5% suero normal de cabra (NGS)/5% DMSO. [4] El anticuerpo primario utilizado fue anti-Colágeno

tipo 9 IgG hecho en ratón (dilución 1:20, DSHB) y anti-Colágeno tipo 2 II-II6B3-s IgG hecho en ratón (dilución 1:20, DSHB). [5] La incubación del anticuerpo primario fue llevada a cabo por 48 horas a 4°C en agitación moderada. [6] Se efectuaron 6 lavados (c/u x 1 hora) en PBST para sacar exceso del primario, [7] para luego incubar toda la noche a 4°C con Alexa Fluor 488 anti-ratón hecho en cabra IgG (H+L) (A-11031, Molecular Probes) como anticuerpo secundario. [8] El secundario fue lavado nuevamente 6 veces en PBST (c/u x 1 hora). [9] los embriones fueron transparentados en solución Scale (1:1 Glicerol 100%: Urea 4M) (Hama et al. 2011) por al menos 1 semana. [10] Finalmente fueron fotografiados con un microscopio spin-disc (DSU) confocal de epifluorescencia Olympus BX61 y una lupa de epifluorescencia NIKON CDS230. [12] Las fotografías obtenidas fueron analizadas y editadas con el programa Cell Sens ©.

RESULTADOS

1. Series Ontogenéticas del tarso proximal aviano:

I. Formación de Cartilago.

Se realizaron tinciones whole-mount con Alcian Blue en series ontogenéticas tempranas de las siguientes especies de aves: La paleognata *Nothoprocta perdicaria* (perdiz chilena, **Figura 5**); y las neognatas *Gallus gallus* (pollo, **Figura 6**), *Anas platyrhynchos* (pato, **Figura 7**), *Columbia livia* (paloma, **Figura 8**), *Melopsittacus undulatus* (cata australiana, **Figura 9**) y *Taeniopygia guttata* (diamante, **Figura 10**).

Por observación directa, se estandarizaron todas las series ontogenéticas a los estadios HH29 a HH40 de la embriogénesis del pollo *Gallus gallus* elaborada por Hamburger & Hamilton (1951).

En los resultados obtenidos, entre los estadios HH29-HH31, aparecen tres condensaciones cartilaginosas en el tarso proximal. Sin evidencia de eventuales conexiones pre-cartilaginosas.

Para *Nothoprocta*, *Gallus*, *Anas*, *Columbia* y *Melopsittacus* (**Figuras 5-9** respectivamente): los primeros estadios, cercanos a HH29, la condensación lateral (fibulare) es la primera en aparecer y forma parte del "eje primario" de la extremidad inferior, en línea con la fibula hacia proximal y el dedo 4 hacia distal. Inmediatamente después en HH30 aparece la condensación intermedia (intermedium) y ya cercano a HH31 se diferencia la condensación medial (tibiale).

Entre los estadios HH32-HH36 observamos que estas tres condensaciones se fusionan (fusión tripartita) para formar el tarso proximal, en donde el tibiale genera el cóndilo medial, el intermedium genera el proceso ascendente, el cual crece sobre la superficie dorsal de la tibia en dirección proximal, y el fibulare el cóndilo lateral. Es para destacar que esta última condensación también genera un proceso, pero por la cara ventro-lateral de la tibia en donde crece hacia proximal, análogamente a lo que ocurre con el proceso ascendente.

Finalmente, la serie ontogenética de *Taeniopygia* (Figura 10) presenta una variación respecto a las otras aves. En HH31 aparece una condensación anexa en la zona medial proximal, la cual se va posicionando sobre la condensación del intermedium, entre HH32-34, para finalmente fusionarse y generar la forma del proceso ascendente en HH35. Aparentemente por lo revisado en esta serie, esta condensación adicional se generaría dentro del tendón del músculo *extensor digitorum longus* (Baumel, 1979) que llega a insertarse a esta región del tarso, por lo que podría tratarse de un cartílago sesamoide ectópicamente desarrollado sobre el intermedium. En lo que respecta a la ontogenia de las condensaciones del tarso, estas aparecen de manera separada (fibulare, intermedium, tibiale) como lo observado en las otras aves, para generar en HH37 la fusión tripartita del tarso proximal.

Nothoprocta perdicaria
Serie HH29-HH40

Alcian Blue
Whole Mount

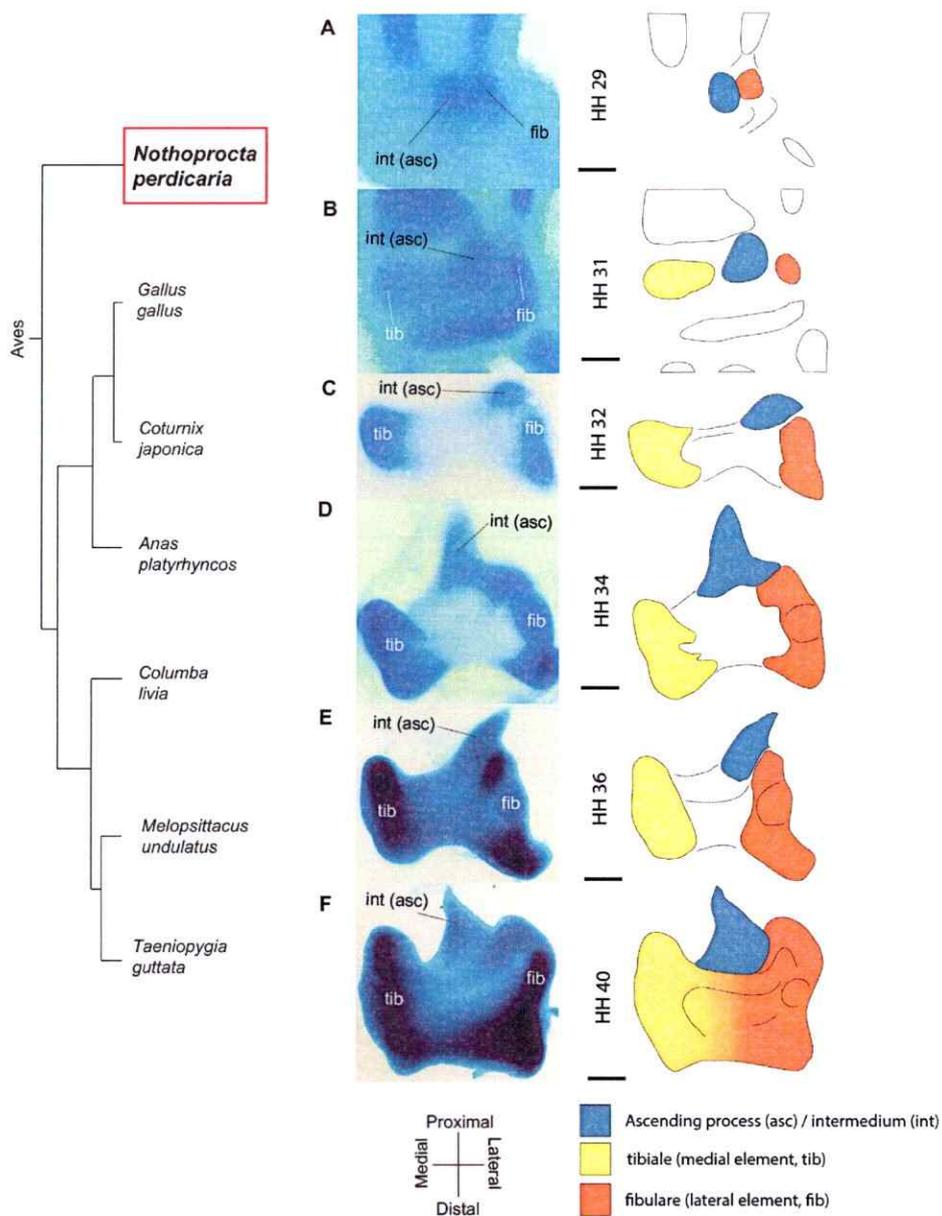


Figura 5. Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Nothoprocta perdicaria*. Tinción whole-mount con Alcian Blue. (A) HH29, (B) HH31, (C) HH32, (D) HH34, (E) HH36, (F) HH40. Detalles en texto. Abreviaciones: tib=tibiale, fib=fibulare, int(asc)=intermedium/proceso ascendente. Barras (A-C)=100µm. (D)=200µm. (E-F) = 500µm.

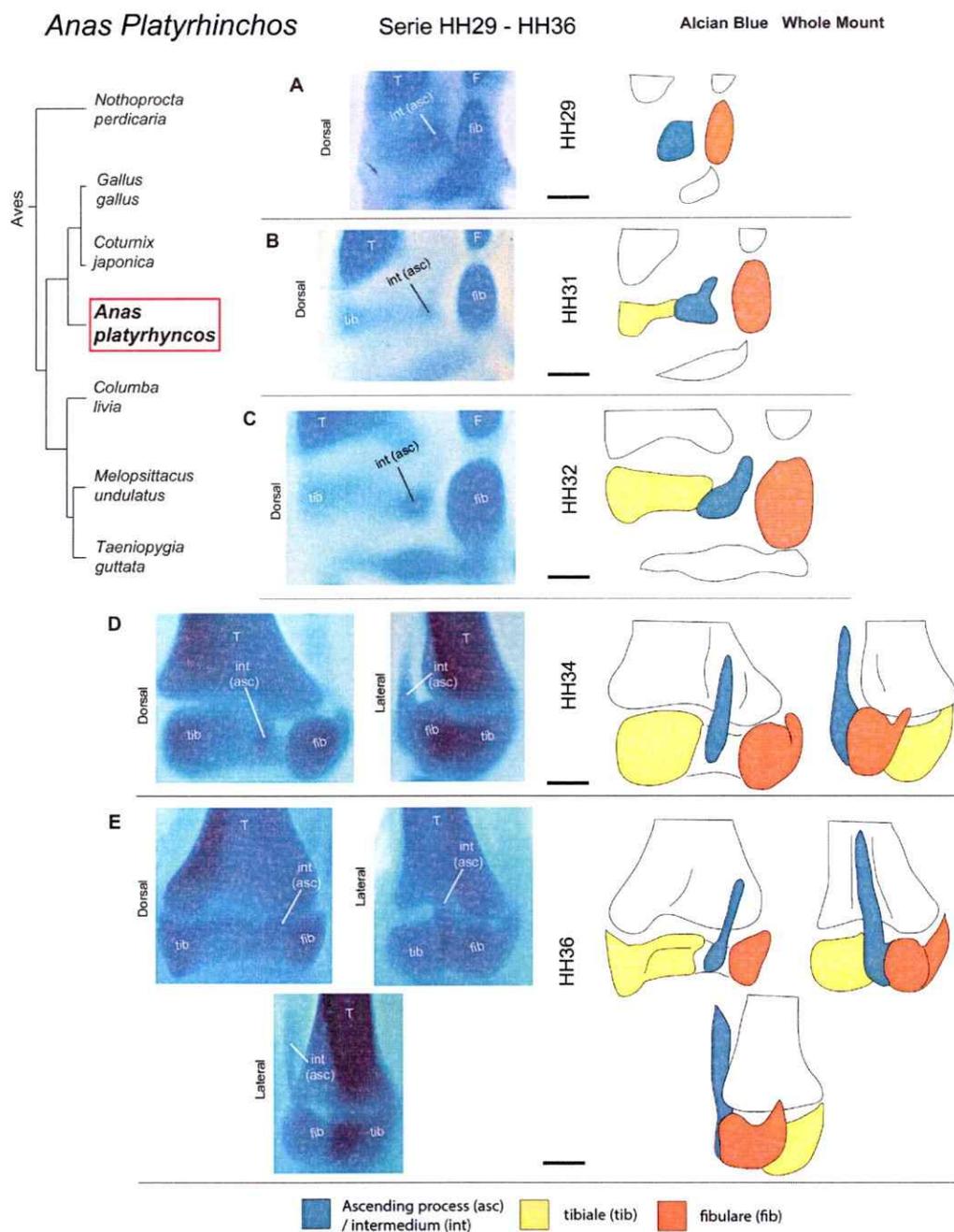


Figura 7. Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Anas platyrhynchos*. Tinción whole-mount con Alcian Blue. (A) HH29, (B) HH31, (C) HH32, (D) HH36. Detalles en texto. Abreviaciones: tib=tibiale, fib=fibulare, int(asc)=intermedium/proceso ascendente. Barras (A-C)=100 μ m. (D-F)=200 μ m.

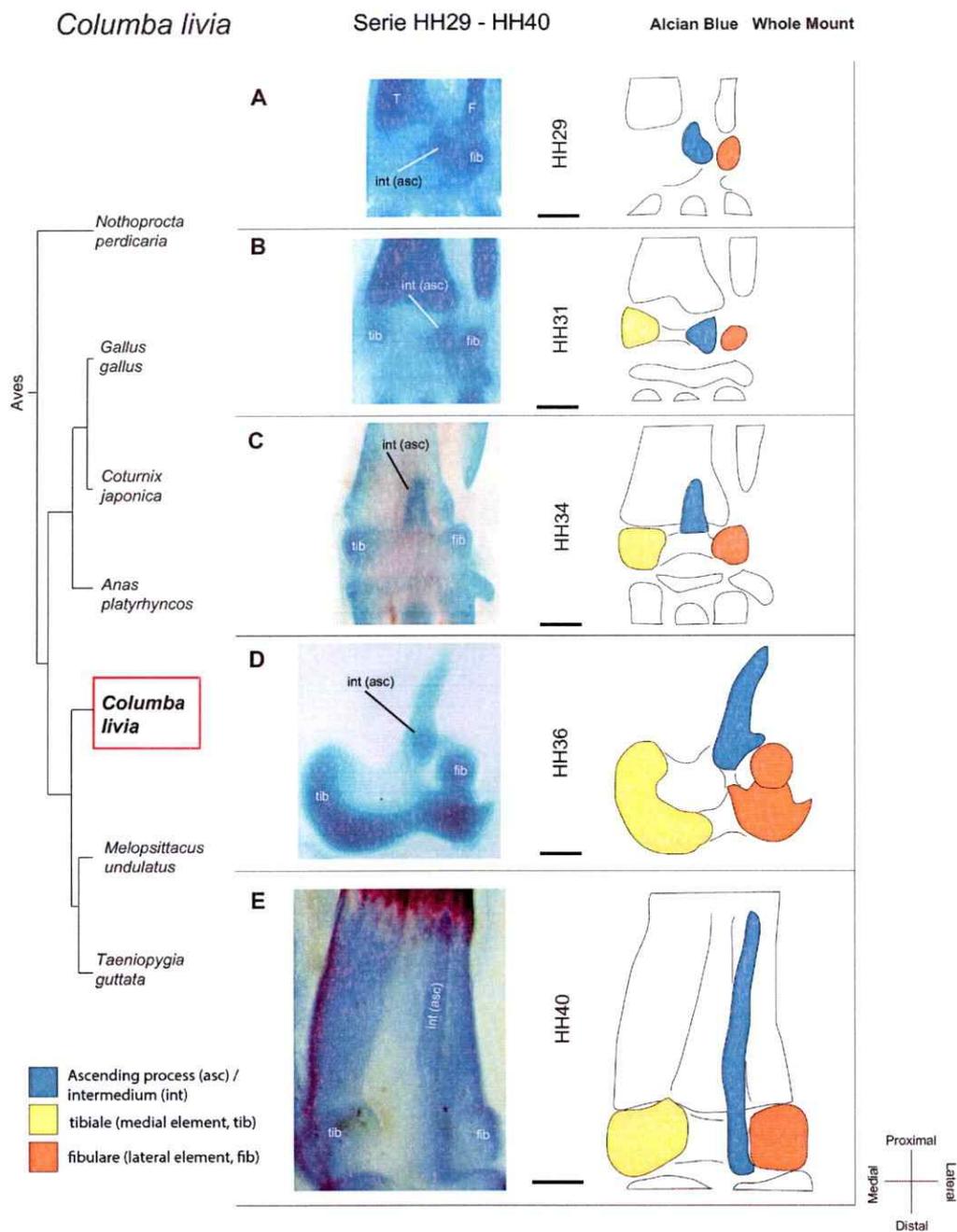


Figura 8. Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Columba livia*. Tinción whole-mount con Alcian Blue. (A) HH29, (B) HH31, (C) HH34, (D) HH36, (E) HH40. Detalles en texto. Abreviaciones: tib=tibiale, fib=fibulare, int(asc)=intermedium/proceso ascendente. Barras (A-C)=100µm. (D)=200µm. (E)=300µm.

Melopsittacus undulatus

Serie HH29-E36

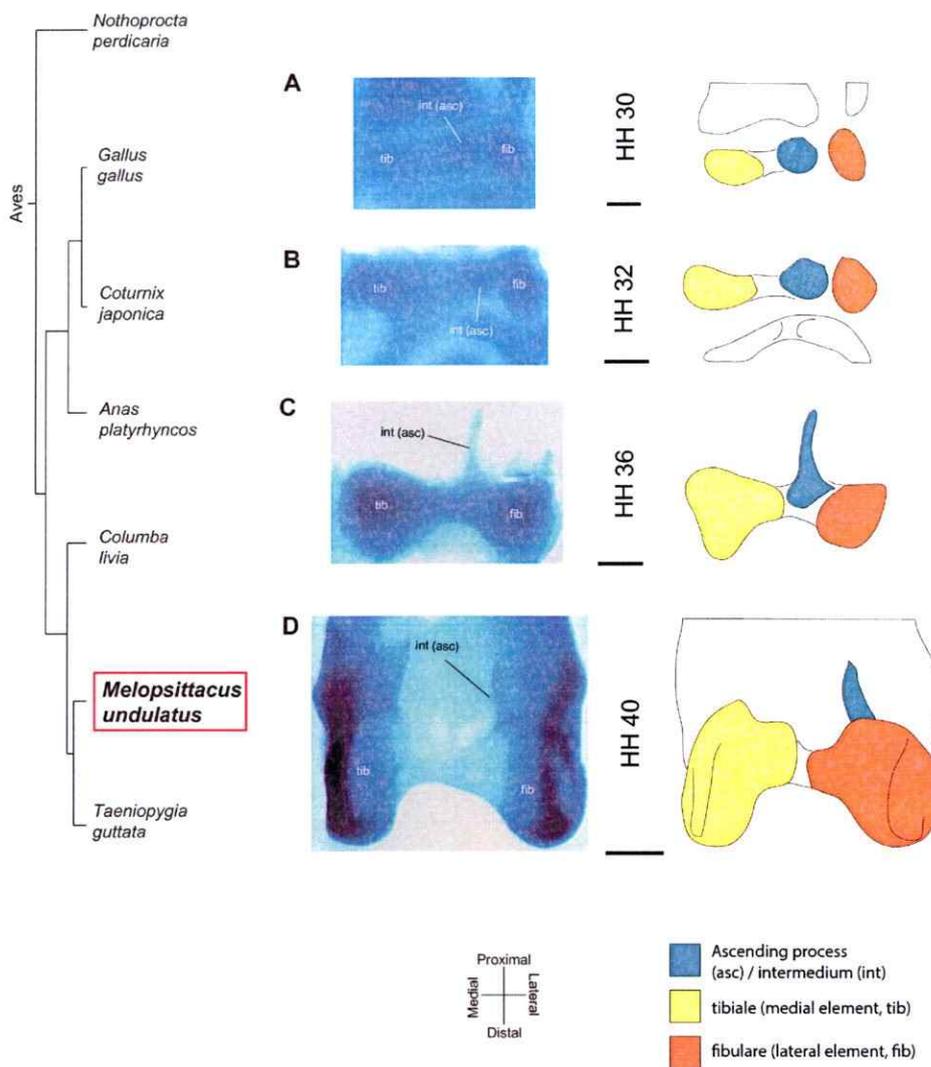
Alcian Blue
Whole Mount

Figura 9. Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Melopsittacus undulatus*. Tinción whole-mount con Alcian Blue. (A) HH30, (B) HH32, (C) HH36, (D) HH40. Detalles en texto. Abreviaciones: tib=tibiale, fib=fibulare, int (asc)=intermedium/proceso ascendente. Barras (A-C)=100µm. (D)=300µm.

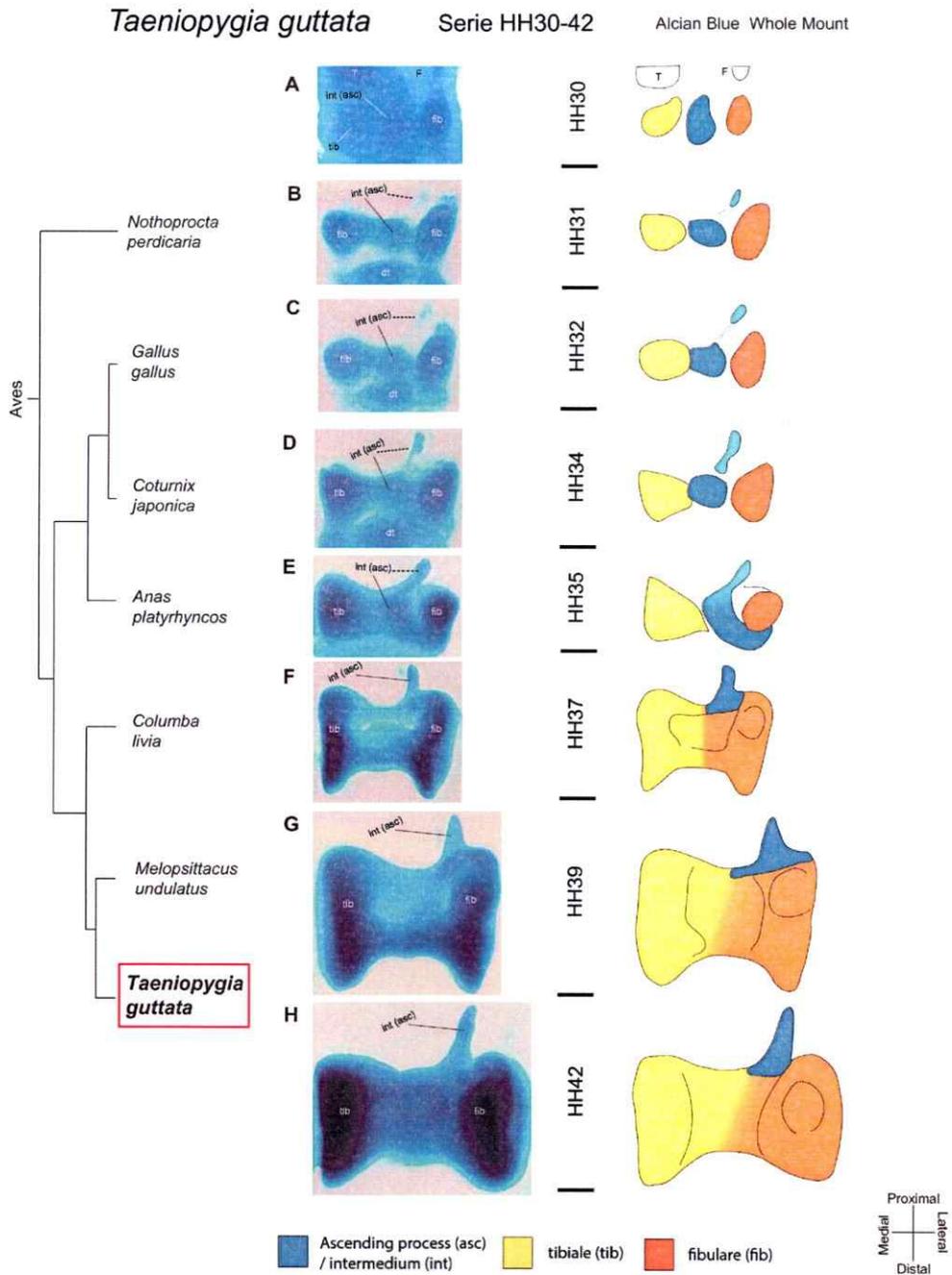


Figura 10. Serie ontogenética temprana del tarso proximal de *Taeniopygia guttata*. Tinción whole-mount con Alcian Blue. (A) HH30, (B) HH31, (C) HH32, (D) HH34, (E) HH35, (F) HH37, (G) HH39, (H) HH42. Detalles en texto. Abreviaciones: tib=tibiale, fib=fibulare, int(asc)=intermedium/proceso ascendente. Barras (A-E)=100 μ m. (F)=200 μ m. (G-H)=300 μ m.

2. Histología en cortes seriados (stacks).

2.1 Histología normal para cartílago:

Se obtuvieron cortes coronales seriados de grosor 10-12 μm , de patas de embriones tempranos de *Gallus gallus* (HH29-34, **Figuras 11-16** respectivamente), *Anas platyrhynchos* (HH32-34, **Figuras 17-18**) y *Nothoprocta perdicaria* (HH32-34, **Figuras 19-20**). Los cuales fueron teñidos con las tinciones Alcian Blue/Nuclear Red y Safranina O/Hematoxilina/FastGreen.

Gallus gallus. En HH29-30, presenta tres condensaciones: tibiale, intermedium y fibulare (**Figura 11**, cortes 3 y 4) que son independientes: Cada uno presenta un foco de células concéntricamente dispuestas con diferenciación temprana de cartílago y límites definidos (pericondrio temprano). Entre HH31-34 (**Figuras 12-13** para HH31, **Figura 14** para HH32 y **Figuras 15-16** para HH34) la condensación del intermedium se posiciona dorsalmente respecto a la tibia, presentando un pericondrio separado bien definido. Recién entre HH32 y HH34, se observan conexiones (fusión) entre los cartílagos del intermedium, el tibiale y el fibulare, las cuales se unen a nivel próximo-dorsal.

Anas platyrhynchos. En HH32 (**Figura 17**) están presentes las tres condensaciones con pericondrios claramente independientes (cortes 3-6), destacando el intermedium, el cual presenta una forma cilíndrica alargada, posicionándose distalmente entre la tibia y la fíbula. En HH34 (**Figura 18**) se mantiene la misma condición, estableciéndose el contacto entre las tres condensaciones como lo observado en *Gallus*.

Nothoprocta perdicaria. En HH32 (**Figura 19**) mantiene el mismo patrón que *Gallus* y *Anas*, con la diferencia que la condensación del intermedium presenta una forma piramidal que se extiende dorsalmente a la tibia con una gruesa base distal cercana al tibiale y en menor medida al fibulare, manteniendo en todo momento un pericondrio independiente. En HH34 (**Figura 20**), como en *Gallus* y *Anas*, las tres condensaciones del tarso proximal terminan contactándose entre sí.

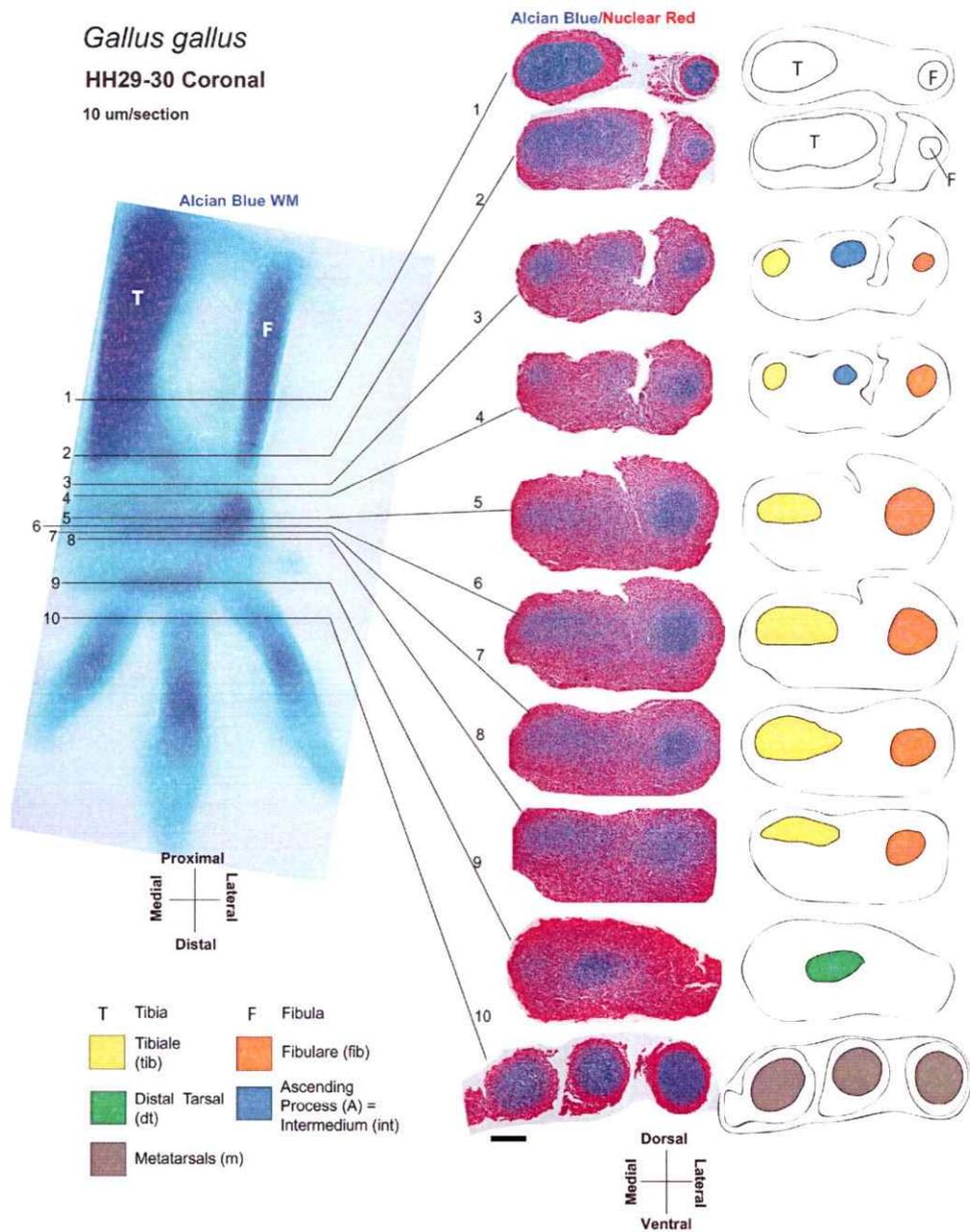


Figura 11. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH29-HH30 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Notar la presencia de las tres condensaciones proximales en los planos 2 y 3. Barra = 100 μm .

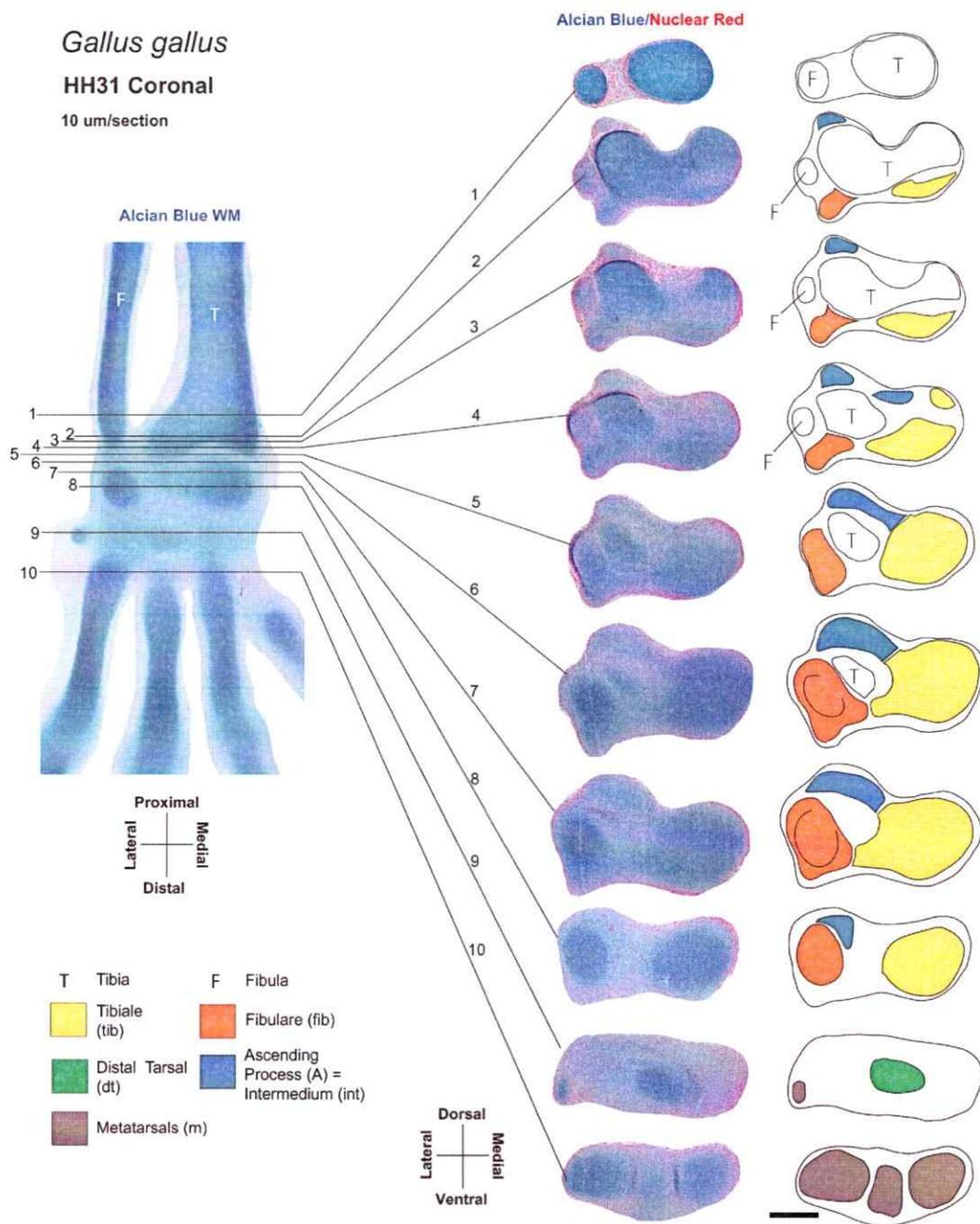


Figura 12. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH31 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Ya se observa la posición dorsal a la tibia del intermedium (planos 2 al 6) y su proximidad hacia distal con el tibiale y fibulare (planos 5 al 9). Barra = 100µm.

Gallus gallus

HH31 Coronal

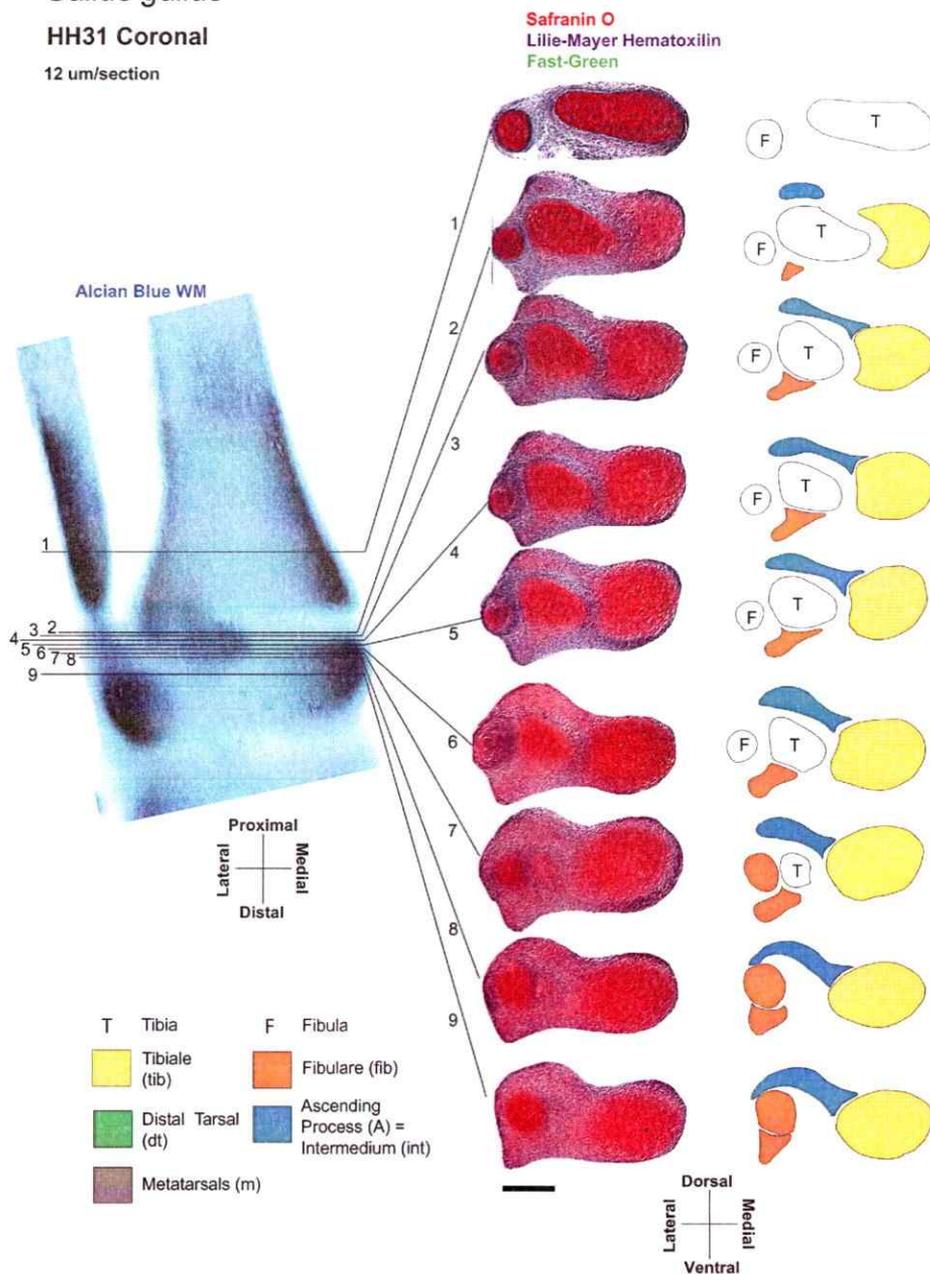
12 μ m/section

Figura 13. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lilie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH31 *Gallus gallus*. Secciones de 12 micrones de espesor. Se observa la posición dorsal a la tibia del intermedium (planos 2 al 8) y su proximidad hacia distal con el tibiale y fibulare (planos 3 al 9). Barra = 100 μ m.

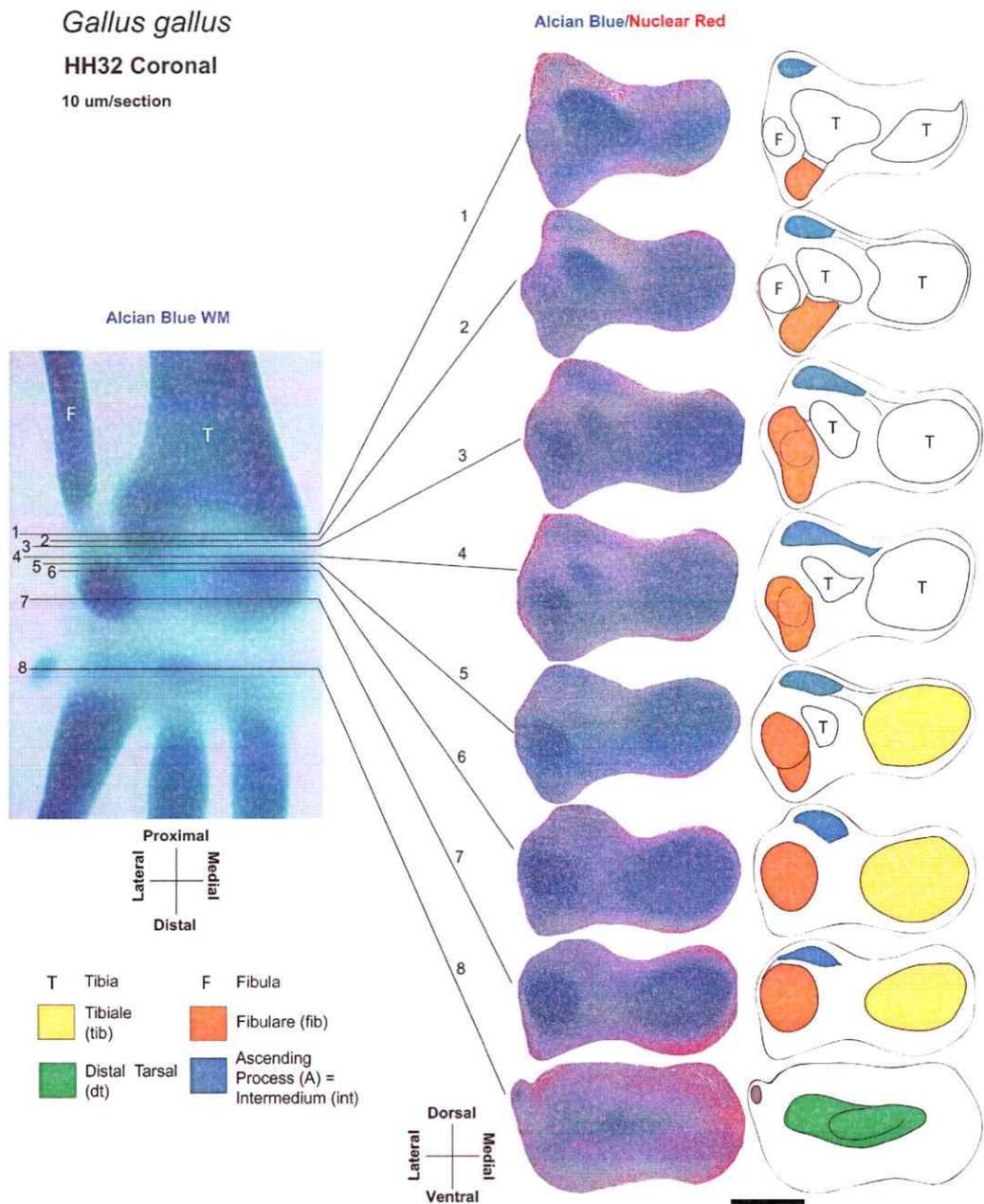


Figura 14. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH32 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Se observa la posición dorsal a la tibia del intermedium (planos 1 al 7) y su proximidad hacia distal con el tibiale y fibulare (planos 5 al 7). Barra = 200µm.

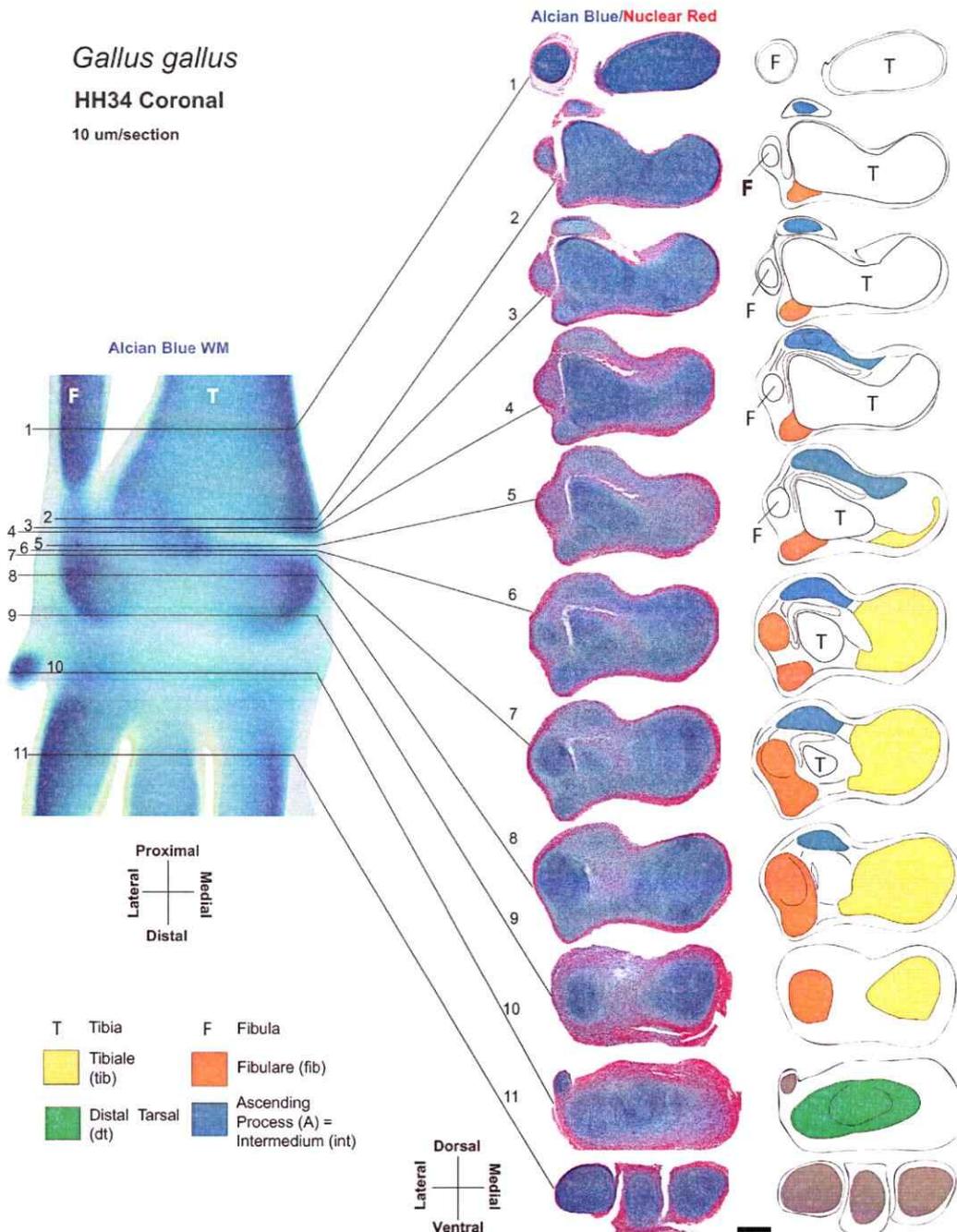


Figura 15 Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH34 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Se observa la posición dorsal a la tibia del intermedium (planos 2 al 8) y su proximidad hacia distal con el tibiale y fibulare (planos 6 al 8). Barra = 100 μ m.

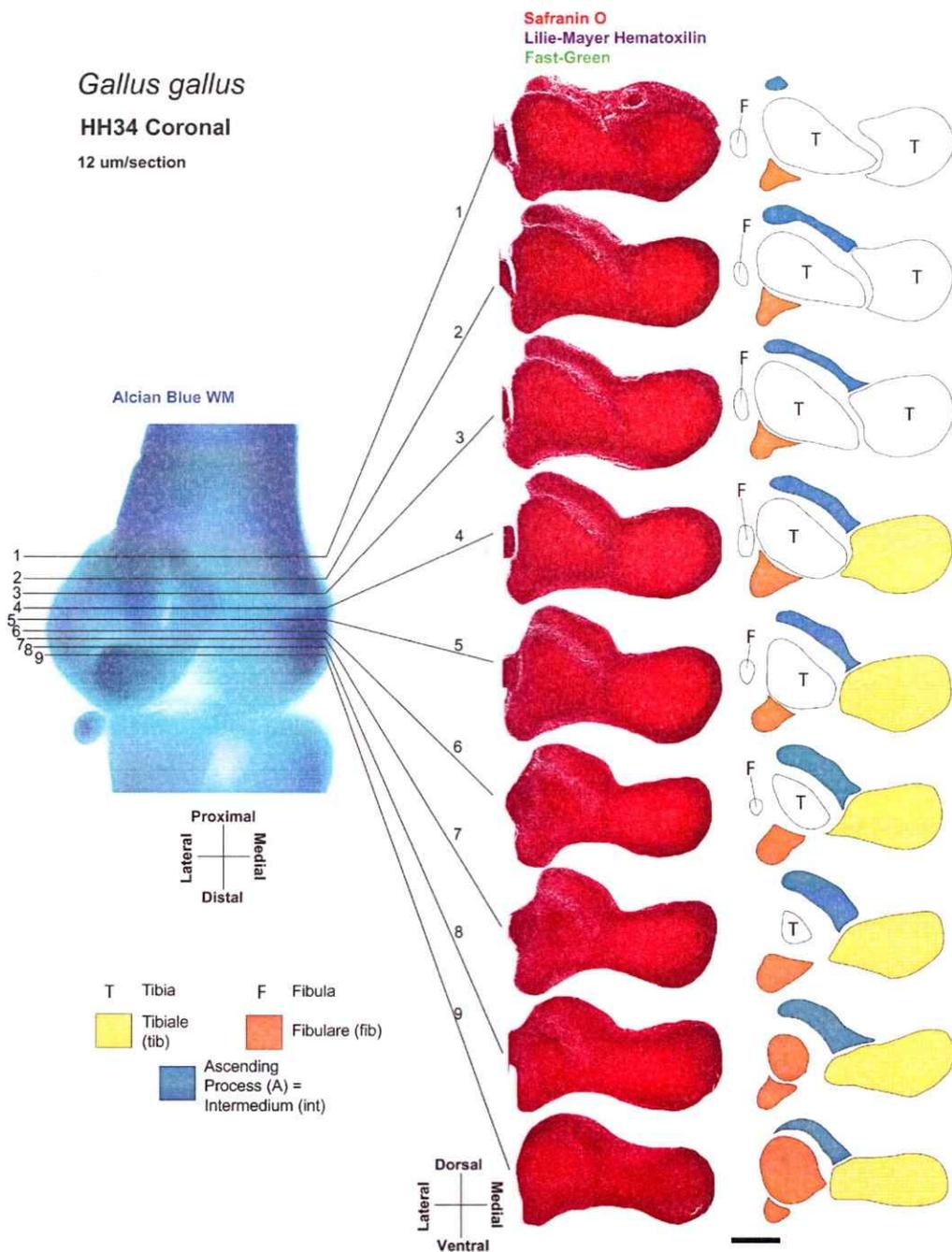


Figura 16. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH34 *Gallus gallus*. Secciones de 12 micrones de espesor. Se observa la posición dorsal a la tibia del intermedium (planos 1 al 9) y su proximidad hacia distal con el tibiale y fibulare (planos 4 al 9). Barra = 100 μm .

Anas Platyrhynchos

HH32 Coronal

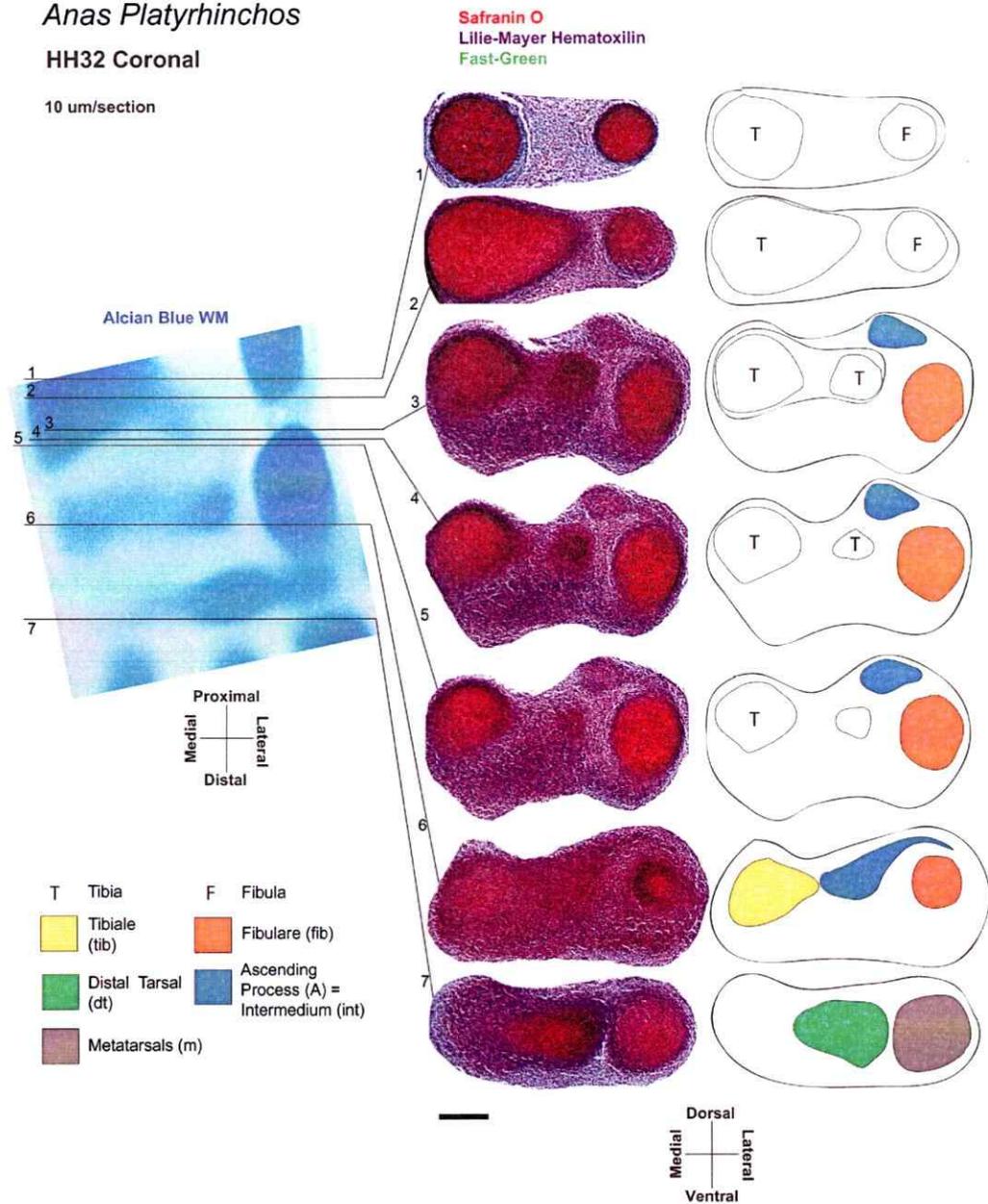
10 μ m/section

Figura 17. Histología normal, tinción Safranina/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH32 *Anas platyrhynchos*. Secciones de 10 micrones de espesor. Se observa al intermedium dorsal pero más lateralizado en relación a la tibia y como se observó en detalle en *Gallus*. Se ubica principalmente entre tibia y fibulare (planos 3-5), solo en la parte distal se contacta con el tibiale y fibulare (plano 6). Barra = 100 μ m.

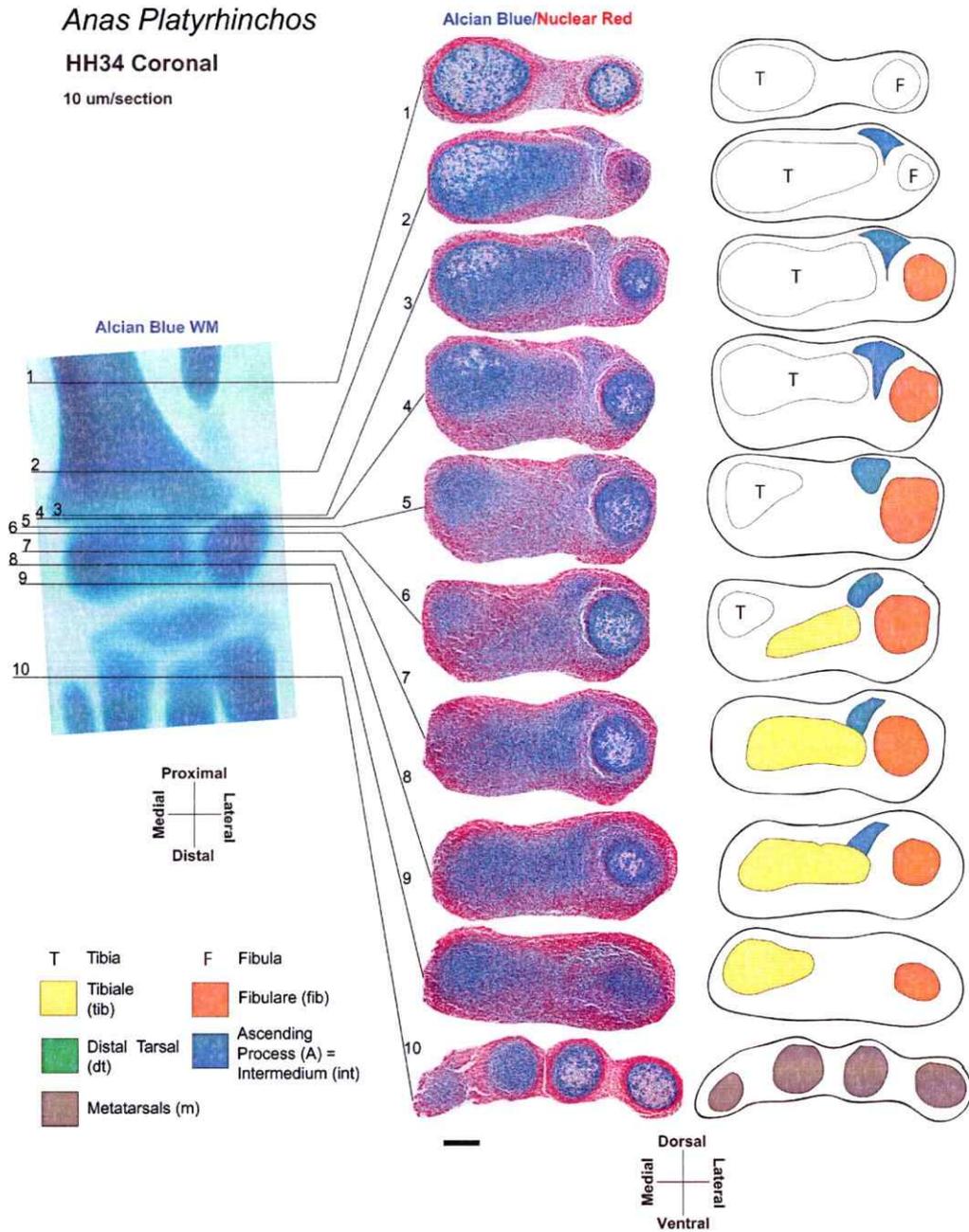


Figura 18. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH34 *Anas platyrhynchos*. Secciones de 10 micrones de espesor. Intermedium se ubica dorsalmente entre tibia y fíbula/fibulare (planos 2 al 5). Se contacta distalmente con tibiale y rodea al fibulare (planos 5 al 8). Barra = 100 μ m.

Nothoprocta Perdicaria
HH32 Coronal

10 μ m/section

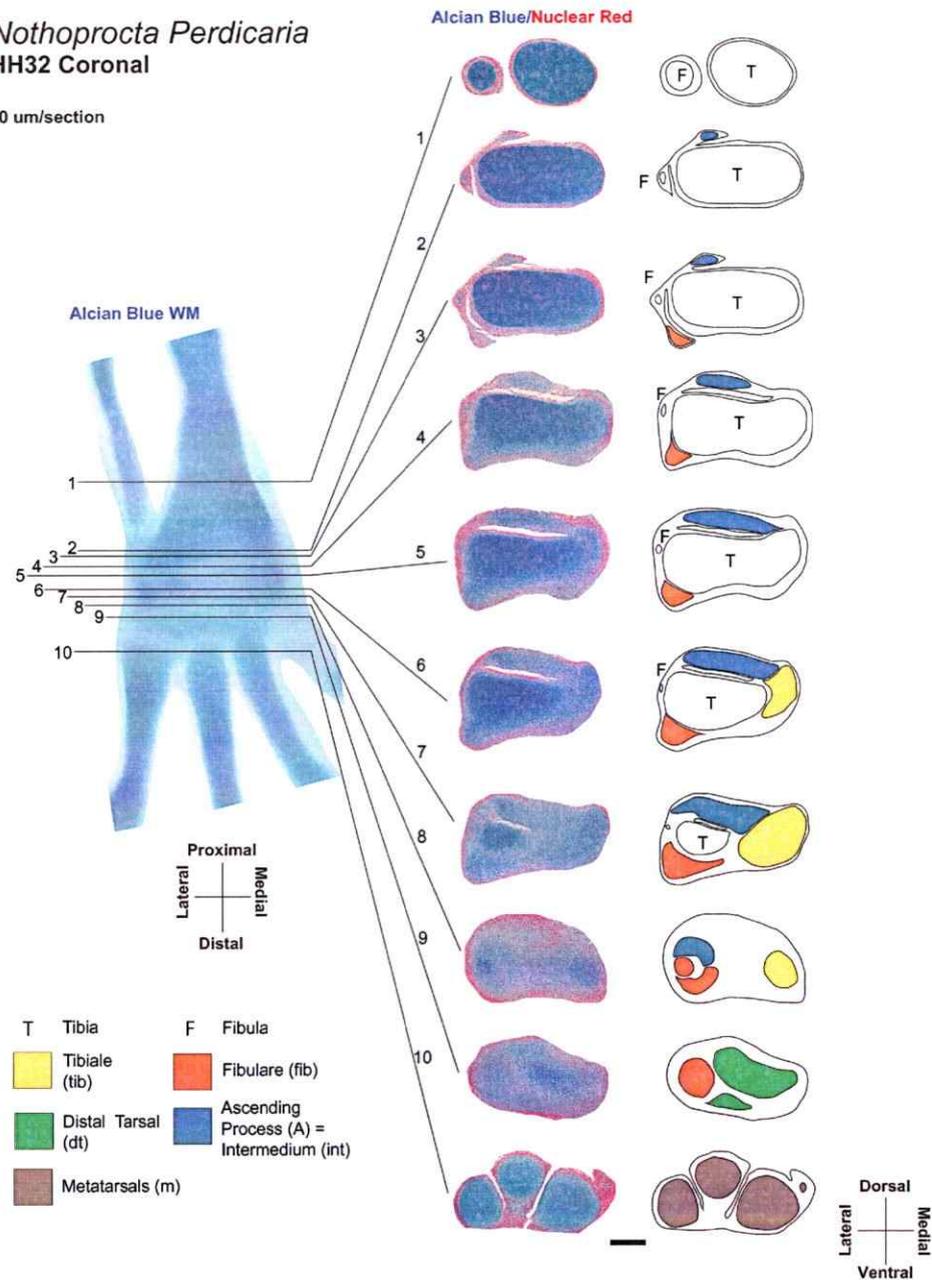


Figura 19. Histología normal, tinción Alcian-Blue/Nuclear Red, serie coronal HH32 *Nothoprocta perdicaria*. Secciones de 10 micrones de espesor. El intermedium se muestra por sobre la tibia como una gran barra de cartílago (planos 2 al 7), el cual se contacta con el tibiale (planos 6-7) y fibulare (plano 8). Barra = 100 μ m.

Nothoprocta perdicaria

HH34 Coronal

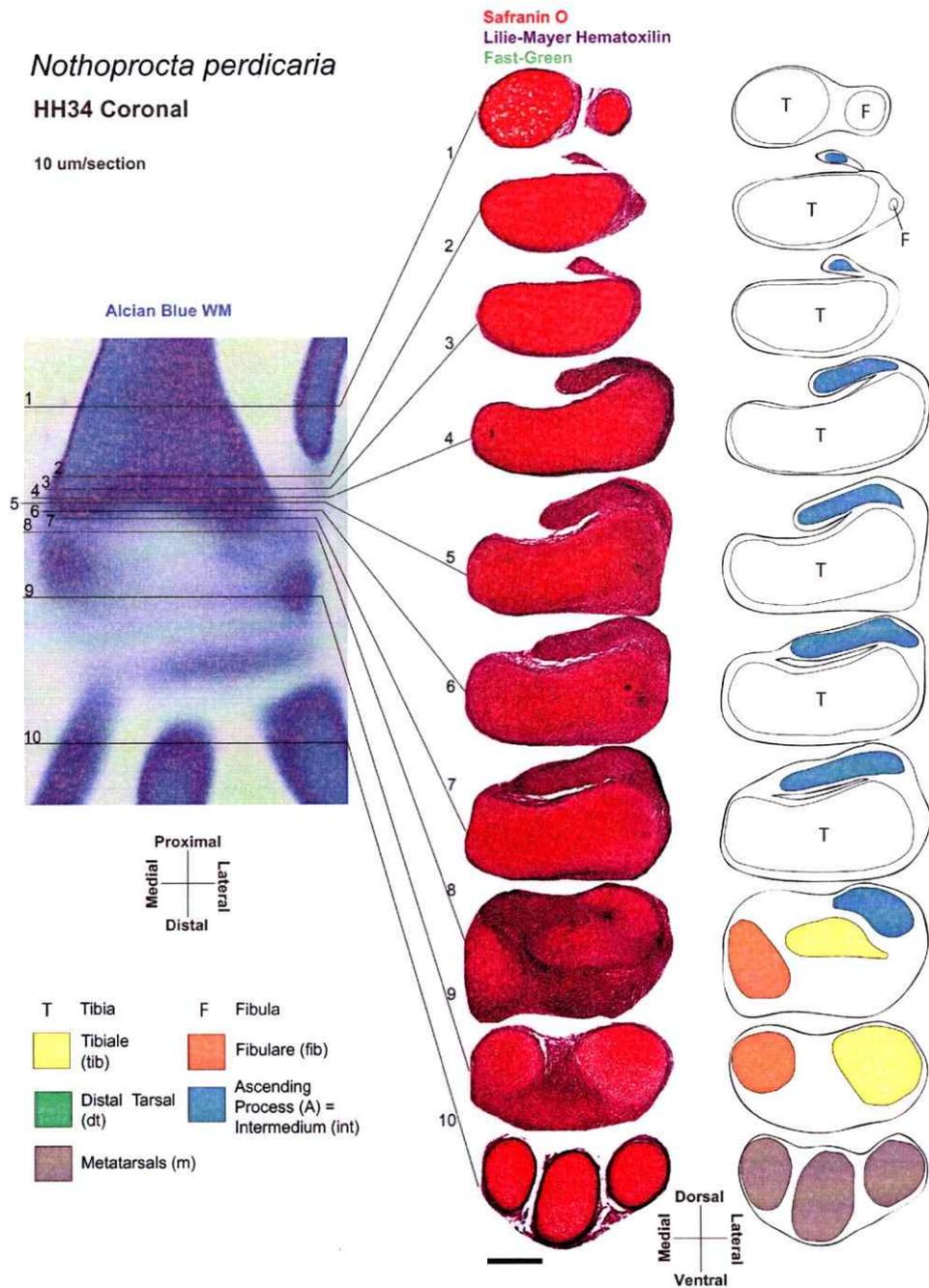
10 μ m/section

Figura 20. Histología normal, tinción Safranina-/Hematoxilina de Lillie-Mayer/Fast Green, serie coronal HH34 *Nothoprocta perdicaria*. Secciones de 10 micrones de espesor. El intermedium se muestra por sobre la tibia como una gran barra de cartílago mucho más extenso (planos 2 al 7), el cual se contacta con el tibiale (planos 8). Barra = 100 μ m.

2.2 Inmunohistoquímica para Colágenos II y IX:

Se realizaron cortes (grosor 10-12 μm) de patas de embriones HH32-HH34 de *Gallus gallus* (HH32, **Figuras 21-23**; HH34, **Figura 24**) y *Nothoprocta perdicaria* (HH32, **Figura 25**; HH34, **Figura 26**).

Gallus gallus: En HH32 dos series dorso-ventrales para Colágeno IX (**Figuras 21 y 22**) muestran la aparición de tres intensas marcas correspondientes a las condensaciones del tibiale, intermedium y fibulare. Destacando claramente, tres focos de diferenciación de cartílago independientes en el tarso proximal. Los cuales se corresponden a las posiciones relativas de las tres condensaciones aquí descritas. En la tercera serie para HH32 sagital (**Figura 23**), esta vez para Colágeno II, se describen secciones en la porción lateral del tarso proximal, mostrando la extensión del fibulare, la posición dorsal a la tibia del intermedium, el contacto entre estas dos condensaciones y el crecimiento (o proceso) del fibulare por la cara ventral de la tibia, en dirección proximal. En HH34 se obtuvo una serie coronal para Colágeno II (**Figura 24**), logrando el mismo resultado que en la serie coronal para histología de cartílago descrita en la **Figuras 15 y 16**. *Nothoprocta perdicaria*: Dos series coronales para Colágeno II, HH32 (**Figura 25**) y HH34 (**Figura 26**), muestran el mismo patrón de *Nothoprocta* señalado en las **Figuras 19 y 20**, destacando una vez más el gran tamaño del intermedium por sobre la tibia con un pericondrio separado.

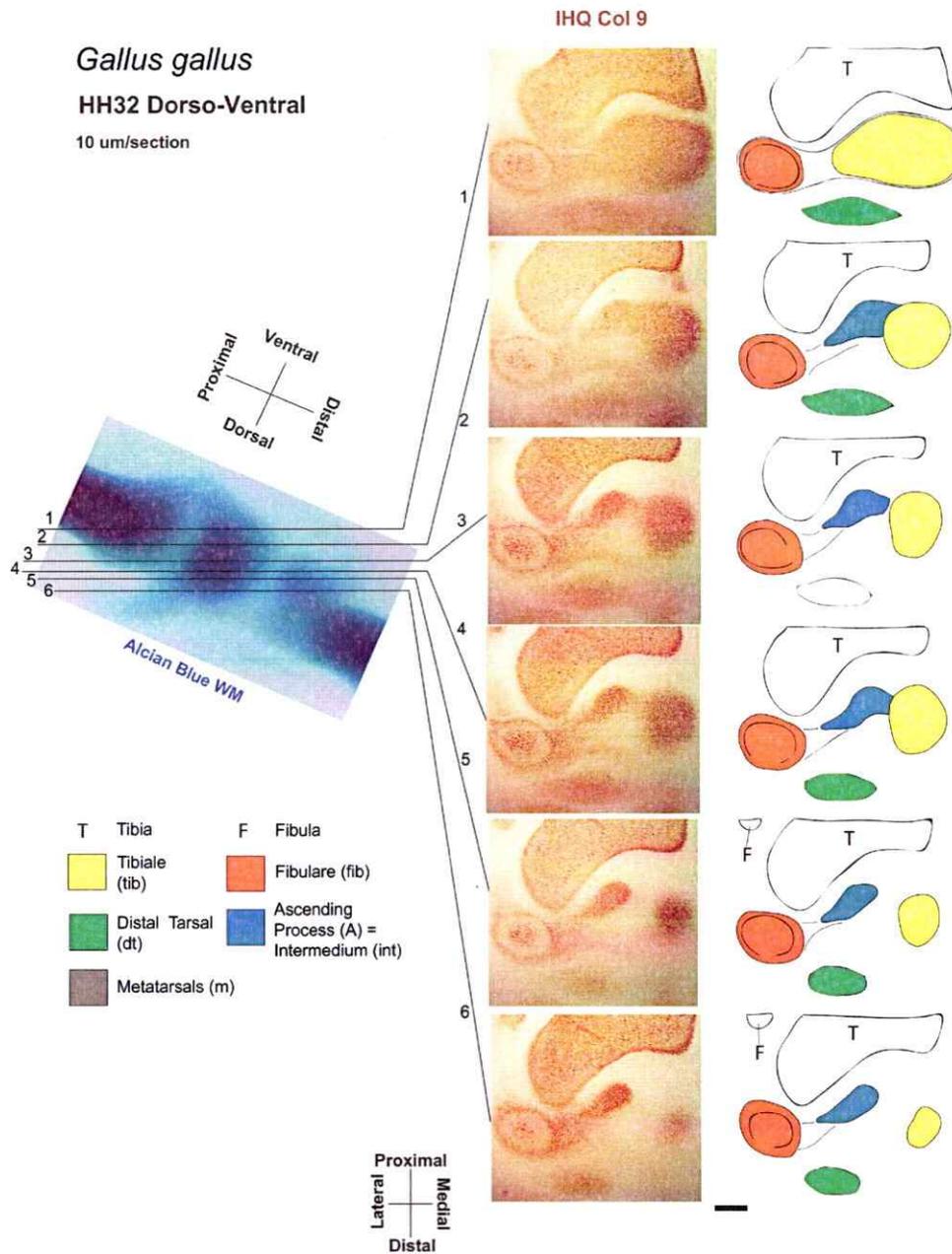


Figura 21. Inmunohistoquímica para Colágeno IX en cortes, serie 1 dorso-ventral HH 32 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Desde el plano 2 al 5 se muestran, de medial a lateral, 3 focos de maduración de cartilago pertenecientes al tibiale, intermedium y fibulare. Barra = 100µm.

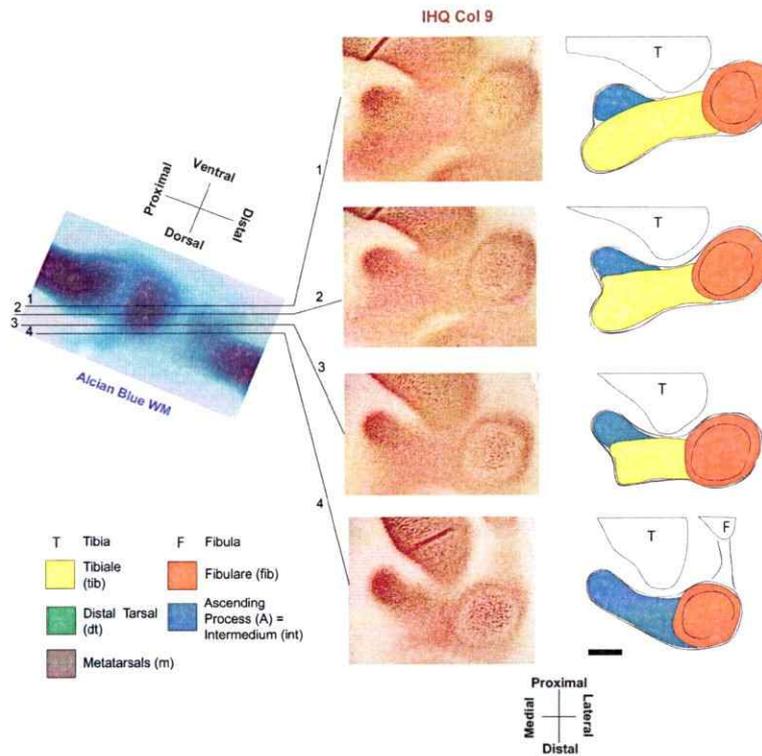


Figura 22. Inmunohistoquímica para Colágeno IX en cortes, serie 2 dorso-ventral HH 32 *Gallus gallus*. Secciones de 10 micrones de espesor. Desde el plano 2 al 4 se muestran nuevamente, de medial a lateral, 3 focos de maduración de cartilago pertenecientes al tibiale, intermedium y fibulare. Barra = 100µm.

Gallus gallus

HH32 Sagital

12 µm/section

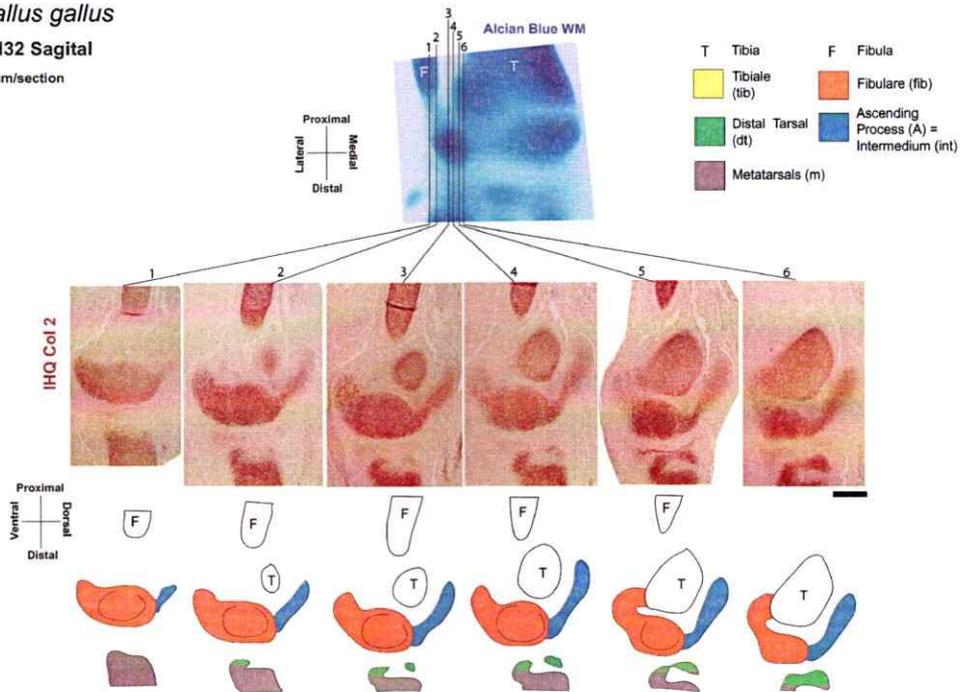


Figura 23. Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes, serie sagital (latero-medial) HH 32 *Gallus gallus*. Secciones de 12 micrones de espesor. Se observa la extensión del intermedium por dorsal sobre la tibia y su contacto con el fibulare, el cual también presenta un proceso pero por ventral a la tibia, los cuales en conjunto conformarán el cap articular lateral del tarso proximal una vez fusionado. Barra = 100µm.

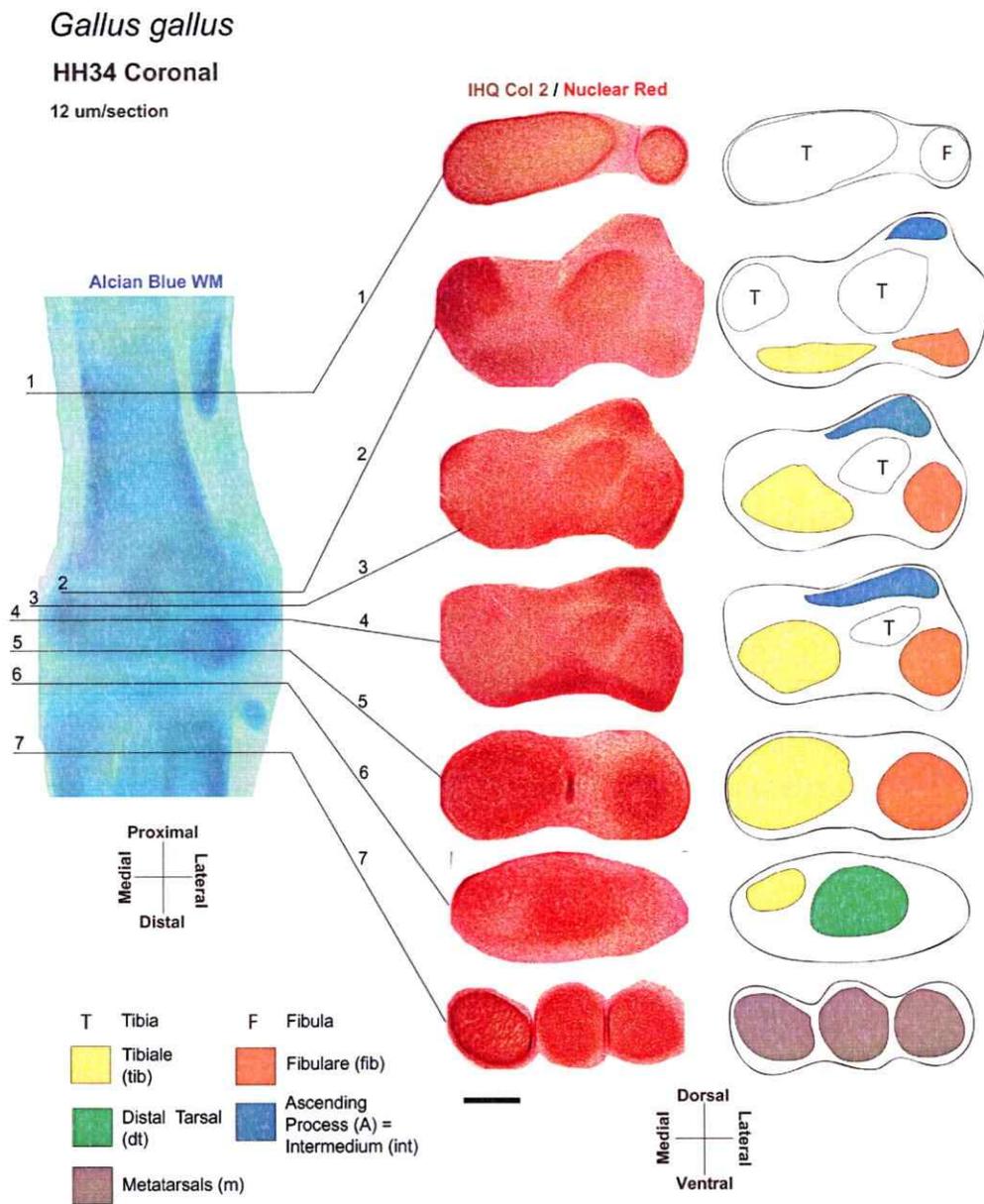


Figura 24. Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 34 *Gallus gallus*. Secciones de 12 micrones de espesor. Se observan las tres condensaciones independientes (planos 3 y 4) y el intermedium en posición dorsal a la tibia (planos 2-4). Barra = 100 μ m

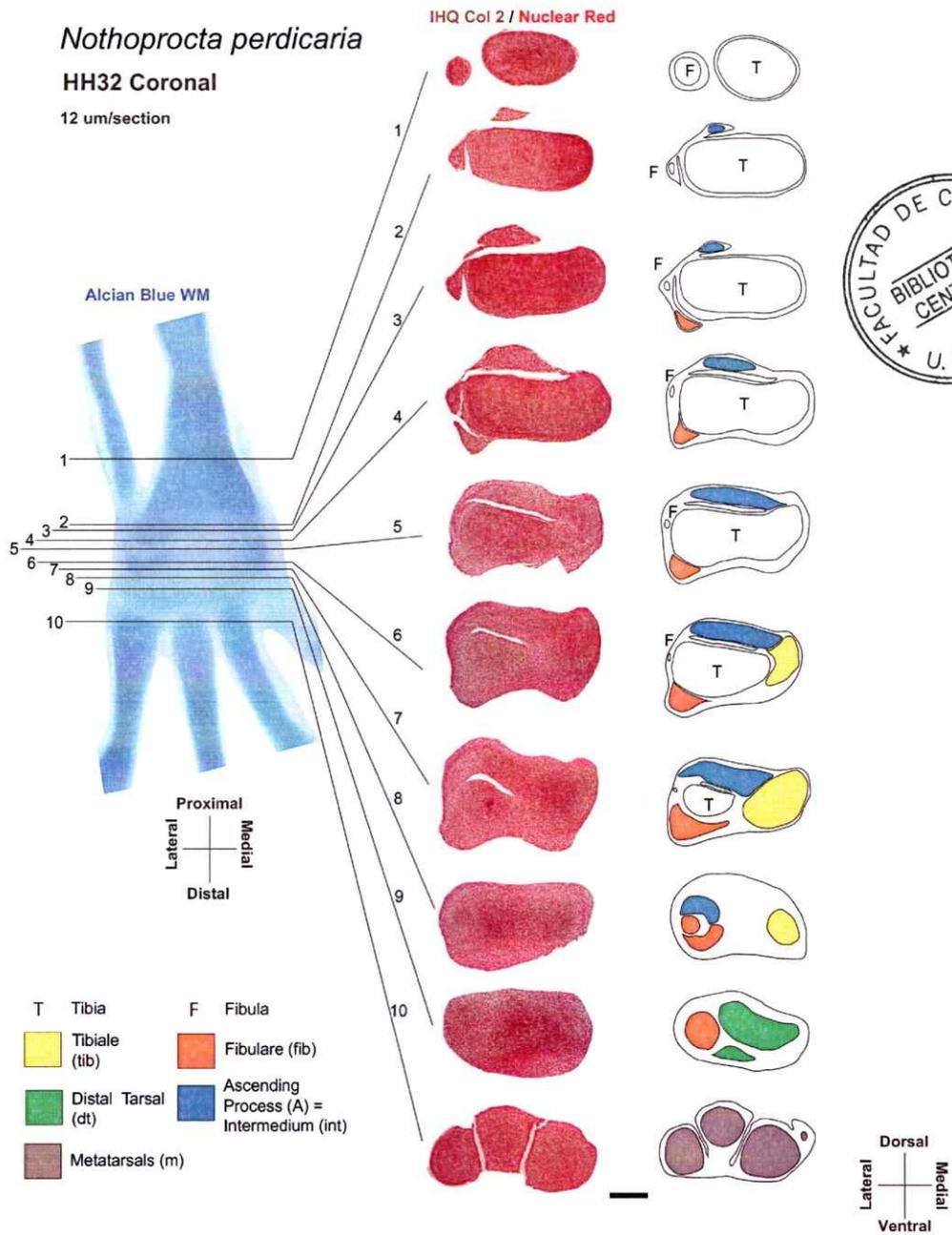


Figura 25. Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 32 *Nothoprocta perdicaria*. Secciones de 12 micrones de espesor. Desde el plano 2 al 9 se muestra la extensión del intermedium por sobre la tibia y en contacto con el tibiale y mas distal con el fibulare (planos 6-8). Barra = 100µm.

Nothoprocta perdicaria

HH34 Coronal

12 um/section

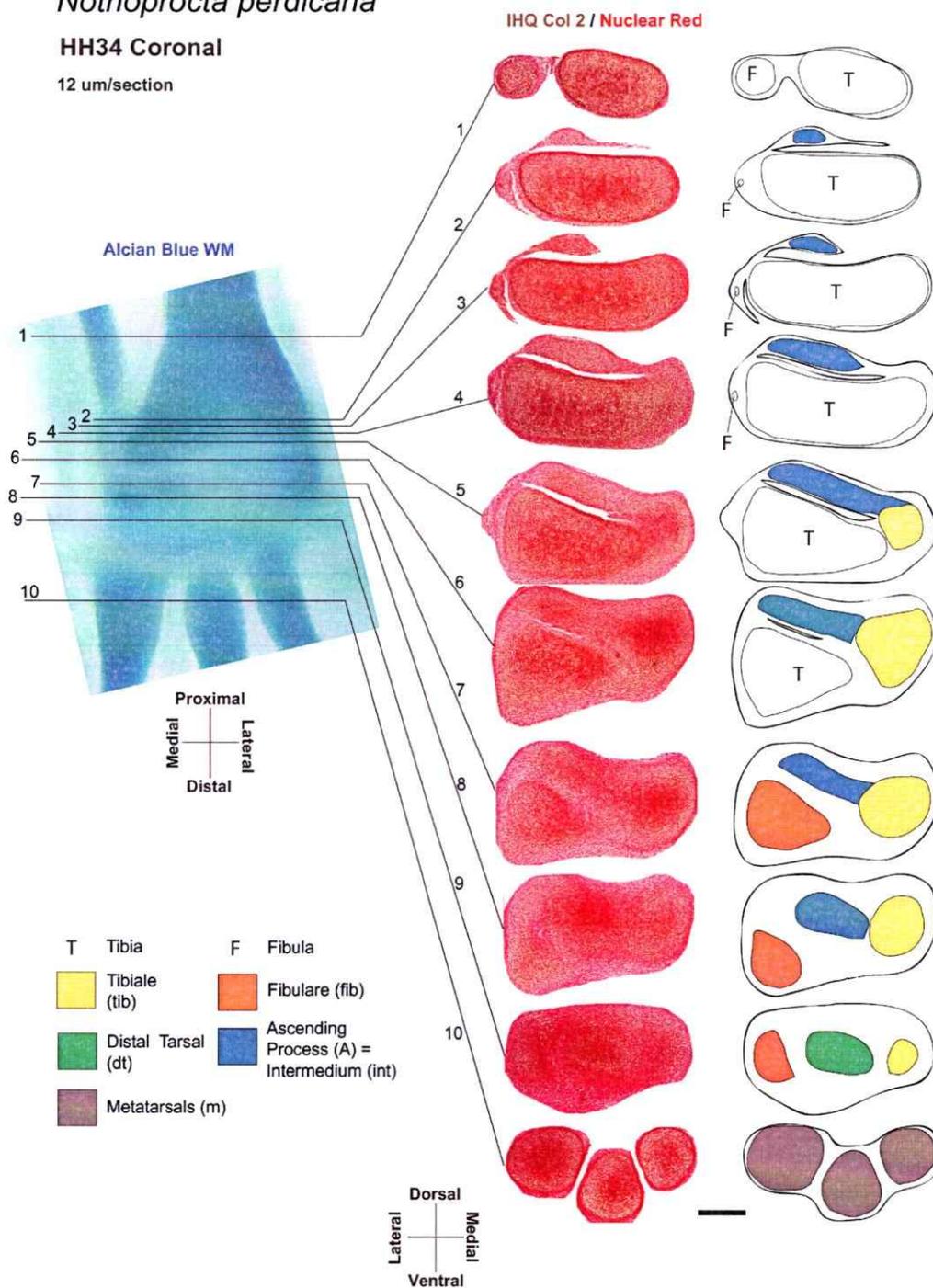


Figura 26. Inmunohistoquímica para Colágeno II en cortes más tinción Nuclear Red, serie coronal HH 34 *Nothoprocta perdicaria*. Secciones de 12 micrones de espesor. Desde el plano 2 al 6 se muestra la extensión del intermedium por sobre la tibia y en contacto con el tibiale y más distal con el fibulare (planos 5-9). Barra = 100µm

3. Inmunofluorescencia whole-mount para colágeno II y IX:

Se obtuvieron preparaciones fluorescentes whole-mount, para Colágeno II y IX, de patas enteras de embriones tempranos de *Coturnix japonica* entre HH29-30 y HH36-37 aproximadamente (**Figuras 27-30**). De las series ontogenéticas obtenidas para ambos colágenos (Colágeno II, **Figura 27** y Colágeno IX, **Figura 28**) se observa el mismo patrón de las series ontogenéticas con Alcian Blue mostradas en las **Figuras 5-10**. Es decir, la presencia de tres focos de expresión de Colágeno II (**Figura 27**) en HH29-30 que corresponden a las posiciones anatómicas del tibiale, intermedium y fibulare que progresivamente se van fusionando entre HH32-34 para en HH36-37 conformar el tarso proximal ya fusionado en un gran cartilago compuesto.

Nuevamente el ensayo para Colágeno IX (**Figura 28**) señala tres focos de diferenciación de cartilago (como lo mostrado en *Gallus* en las **Figuras 21 y 22**), en donde interesantemente se marcó el comienzo de la maduración del fibulare e intermedium entre HH29-30 y posteriormente el tibiale en HH31, manteniendo el marcaje focal de maduración en las posiciones relativas de estas tres condensaciones iniciales ya cuando el tarso proximal se fusiona en HH36-37: teniendo un foco a nivel medial (que proviene del tibiale) un foco en el "proceso ascendente" (que proviene de la condensación del intermedium) y un foco a nivel lateral (que proviene de la condensación del fibulare).

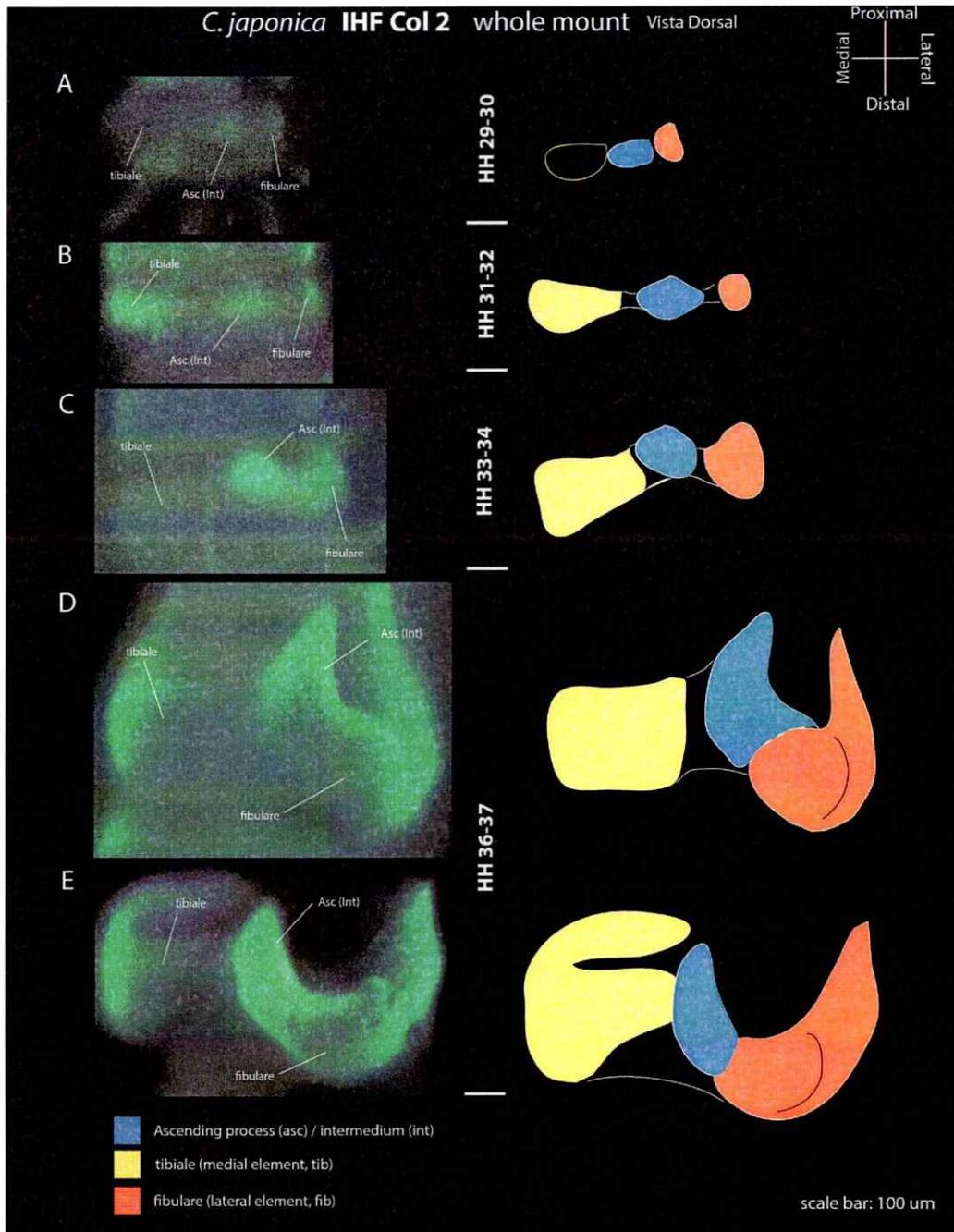


Figura 27. Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno II, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. Similar a lo presentado en las Figuras 6-11, en esta serie ontogenética de *Coturnix* (A HH29-30; B HH31-32; C HH33-34; D HH36-37 vista dorsal; E HH36-37 vista dorso-lateral) se observa la formación del tarso proximal a partir de tres condensaciones según la marca fluorescente para colágeno II (tibiale (amarillo), intermedium (azul) y fibulare (naranja)). Nuevamente se observa una correspondencia entre el intermedium y el proceso ascendente y la fusión del tarso proximal en HH36-37. Abreviaciones: Asc (int) = intermedium / proceso ascendente. Barra (A-E) = 100 μ m.

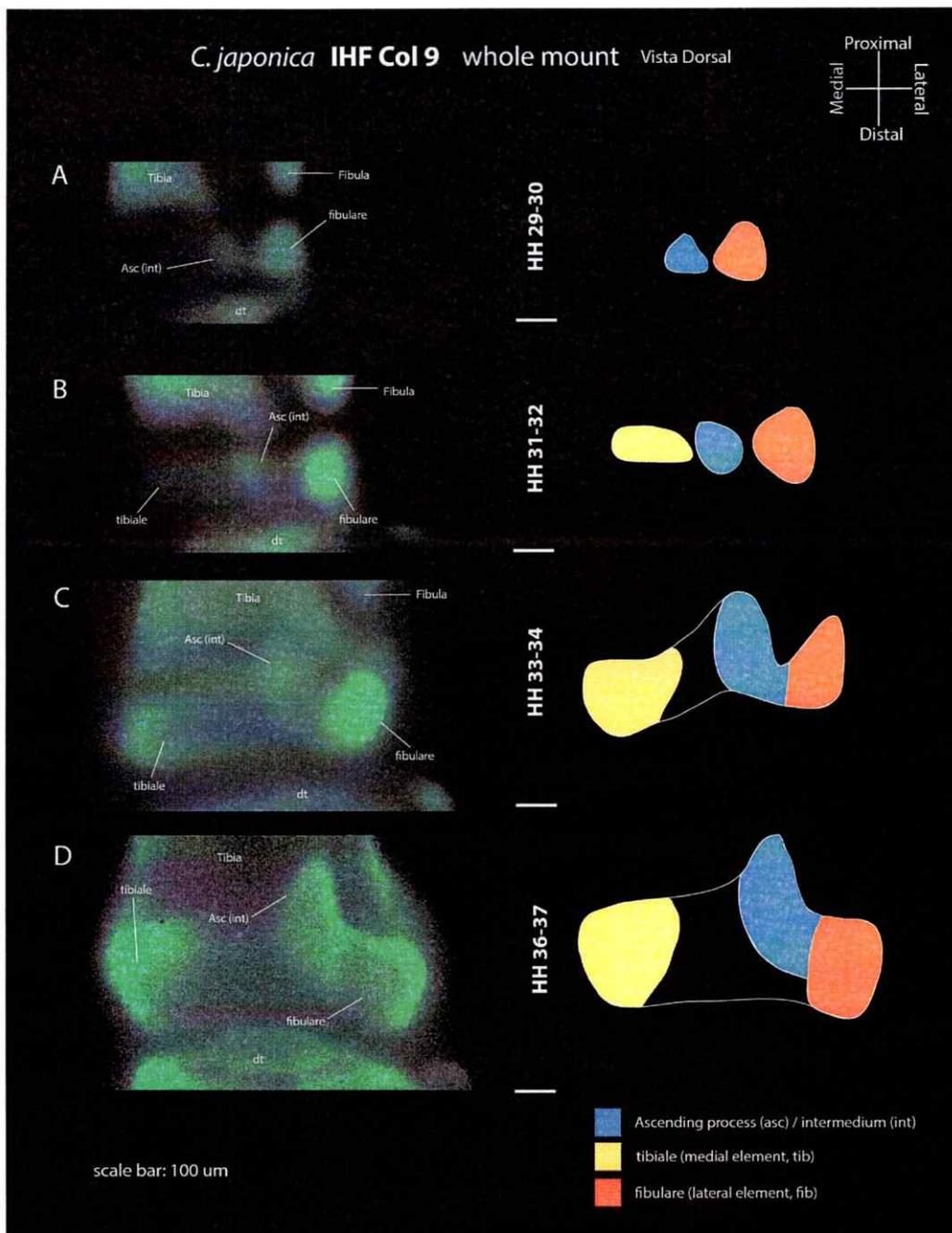


Figura 28. Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno IX, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. A HH29-30; B HH31-32; C HH33-34; D HH36-37. Se mantiene el patrón observado en la Figura 28, con la novedad que se evidencia los tiempos de maduración de las condensaciones proximales, que se muestran entre (A) y (B) en donde el tibiale aparece como condensación madura después del intermedium y fibulare. Una vez más se corresponde el intermedium con el proceso ascendente y en (D) ya tenemos al tarso proximal fusionado. Abreviaciones: Asc (int) = intermedium / proceso ascendente. Barra (A-E) = 100μm.

Con estos resultados se demuestra, una vez más, que el llamado "proceso ascendente" surge en la ontogenia como una condensación de cartílago independiente y que corresponde al intermedium.

Adicionalmente se procesaron preparados whole-mount para los dos colágenos bajo microscopía Spin-disc/confocal de fluorescencia, con la finalidad de describir con mejor resolución la conformación tridimensional del tarso proximal durante la ontogenia. Los resultados obtenidos para Colágeno II en la **Figura 29** entre HH30-31, muestran a nivel lateral la separación que existen entre el intermedium y el fibulare, destacando también, lo próximo de ambas condensaciones pero siempre como estructuras separadas.

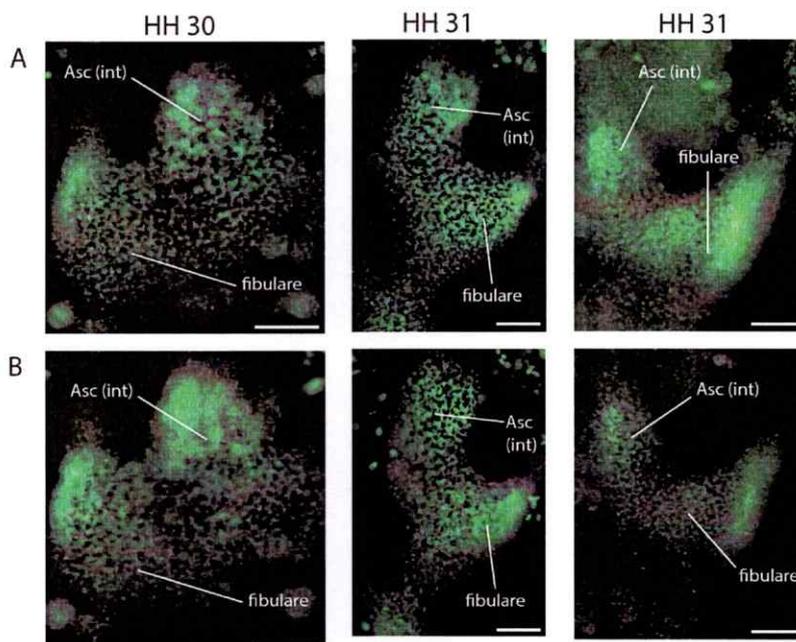


Figura 29. Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno II bajo microscopía confocal spin-disc, tarso lateral *Coturnix japonica*. Todas las imágenes aquí mostradas son parte de stacks de fotografías en el eje Z, donde se eligió una para cada estadio la cual fue procesada vía deconvolución en 2D. (A-B) se observan para HH30 y HH31 la proximidad y conformación de las condensaciones del fibulare e intermedium. Abreviaciones: Asc(int) = intermedium/proceso ascendente. Barra (A-B) = 100µm.

En la **Figura 30**, para colágeno IX, se procesaron cuatro estadios parecidos a los mostrados anteriormente (**Figura 28**), obteniéndose imágenes deconvolucionadas (es decir, se quitó el ruido de la fluorescencia circundante a la muestra), confirmándose el mismo patrón de maduración descrito entre HH29-HH30 / HH36-HH37, es decir que primero aparecen tres focos de cartílago (fibulare / intermedium / tibiale) los cuales se fusionan formando un solo cartílago en el tarso proximal y que el intermedium da origen al "proceso ascendente".

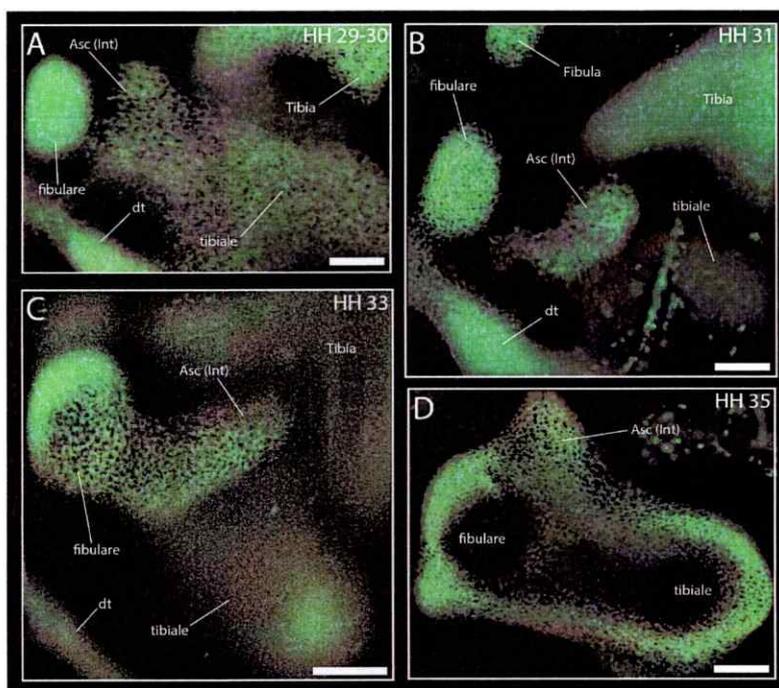


Figura 30. Inmunofluorescencia Whole-Mount para Colágeno IX bajo microscopía confocal spin-disc, serie ontogenética temprana *Coturnix japonica*. Todas las imágenes aquí mostradas son parte de stacks de fotografías en el eje Z, donde se eligió una para cada estadio la cual fue procesada vía deconvolución en 2D. (A) HH29-30 muestra las tres condensaciones del tarso proximal en formación, siendo más madura la del fibulare y recién conformándose la del intermedium y tibiale. (B) HH31, ya se observan las tres condensaciones proximales en formación, siendo más madura la del fibulare y tibiale. (C) HH33 se empiezan a fusionar las tres condensaciones proximales y el intermedium adquiere la forma del proceso ascendente. (D) Fusión tripartita del tarso proximal, en donde destaca la forma de capuchón articular ahuecado de esta estructura que articula con la tibia. Abreviaciones: Asc(int) = intermedium/proceso ascendente; dt=distales tarsales. Barra (A-D) = 100µm.

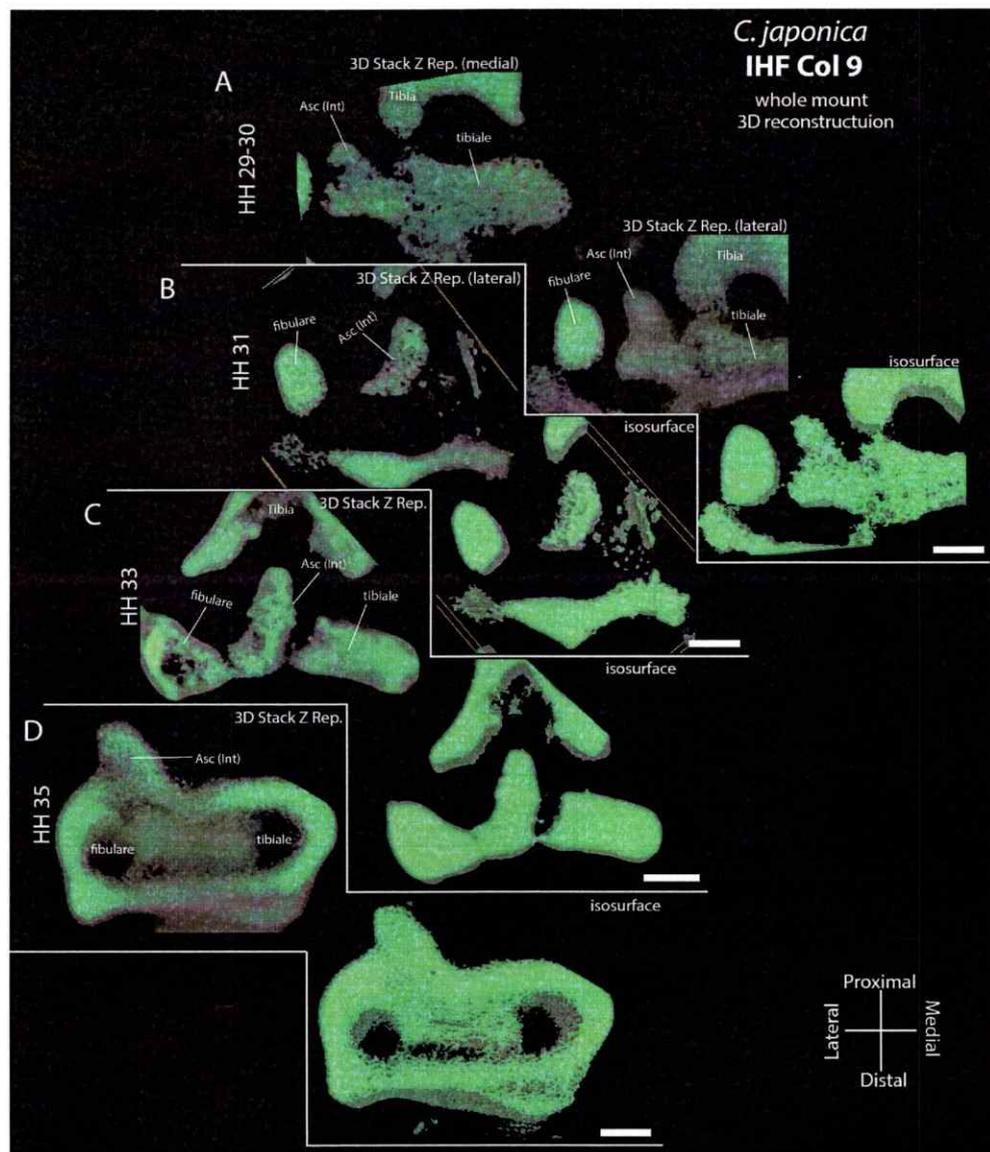


Figura 31. Reconstrucciones 3D y diagramas de isocuperficies para los estadios mostrados en la Fig. 31, Serie ontogénica de *C. japonica*. (A-D) se muestra claramente la formación del tarso proximal a partir de la maduración de tres condensaciones de cartílago. En (A), se agrega la zona medial completa del tarso proximal. En (C) solo se muestra la región lateral del tarso. Barra (A-D) = 100 μ m.

Finalmente se representaron tridimensionalmente los stacks de fotos obtenidos (**Figura 31**), complementándolo con un diagrama de isosuperficies (proporcionado por el programa Cell Sens [®]). Señalando cualitativamente en las zonas de intensidad de fluorescencia los 3 focos de maduración de cartílago.

4. Series Ontogenéticas del tarso proximal aviano:

II. Secuencias de Osificación.

Finalmente, se lograron tinciones con Rojo de Alizarina para describir la osificación del tarso proximal en *Nothoprocta perdicaria* (Figura 32), *Gallus gallus* (Figuras 33), *Coturnix japónica* (Figura 34) y *Vanellus chilensis* (Figura 35). Estos resultados complementan al amplio registro del estudio de McGowan (1985). En *Gallus* (Figura 32) se presentan 3 estadios, en HH42 (E16) se observa lo mismo que en *Nothoprocta*, comenzando a osificarse el compuesto tarso proximal por la punta del proceso ascendente, posteriormente en estadio post-hatchling (post-eclosión, ó P0) se sigue extendiendo hacia distal la osificación del proceso ascendente, apareciendo en paralelo las osificaciones medial y lateral. En P14 (ó 14 días post-eclosión) tenemos la misma situación que en P0 con un crecimiento de las tres osificaciones dentro del cartílago compuesto del tarso proximal. Para *Nothoprocta* (Figura 33) se muestra que en día 14 de incubación (E14, equivalente a HH40) el cartílago compuesto del tarso proximal comienza a osificarse en la punta de lo que fue la condensación intermedia (ahora "proceso ascendente"), posteriormente en día 22/pre-hatchling (justo antes de la eclosión) esta osificación se ha extendido hacia distal colonizando la base del cartílago compuesto, en donde paralelamente aparece un centro de osificación lateral y otro medial. Se observa que la osificación del proceso ascendente está más próxima al centro de osificación lateral.

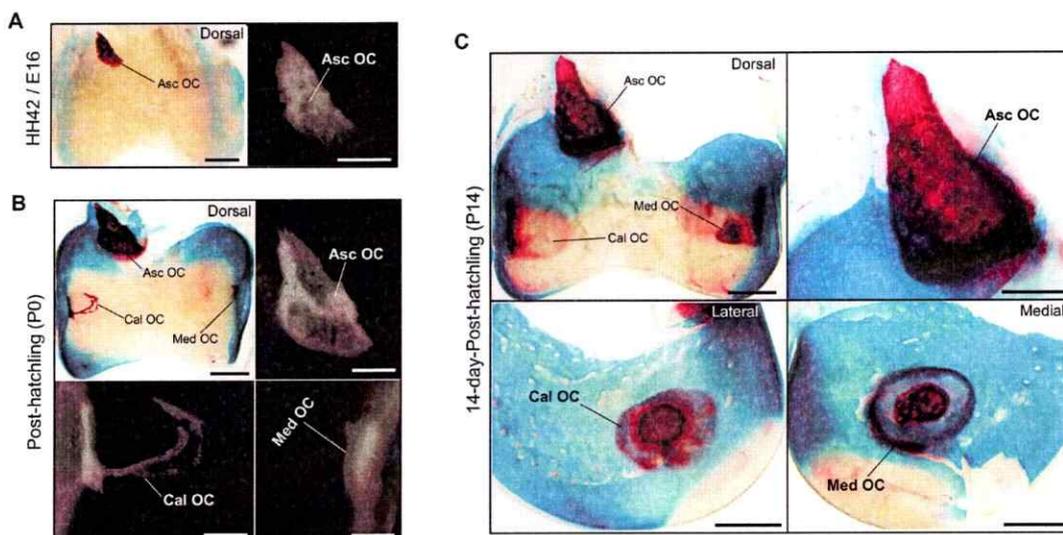


Figura 32. Tinción Whole Mount Rojo de Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Gallus gallus*. (A) HH42 o embrión de 16 días de incubación en donde se observa el comienzo de la osificación del tarso en la punta del "proceso ascendente". (B) Posthatching P0 en donde se muestran las tres osificaciones proximales tarsales, apareciendo la lateral y la medial. (C) Juvenil de 14 días posteclosión (P14) en donde se muestran las tres osificaciones extendiéndose por una matriz común de cartilago. Abreviaciones: Med OC=centro de osificación medial, Asc OC=centro de osificación del proceso ascendente, Cal OC=centro de osificación lateral o del calcáneo. Barras (A) = 500 μ m, (B) = 1 mm, Zoom = 500 μ m; (C) = 1 mm, Zoom = 1 mm.

En *Coturnix* (Figura 34) se presenta la misma situación que *Gallus*, donde en E14 (HH42) empieza la osificación en el proceso ascendente y ya en P0 (post-eclosión) encontramos las osificaciones medial y lateral bien extendidas en conjunto con la del proceso ascendente. Destacar también que se observa una cuarta osificación que corresponde a la posición anatómica de los tarsales distales. En *Vanellus* (Figura 35) se obtuvo el tarso proximal de un juvenil el cual, si bien es ontogenéticamente más avanzado que los presentados en las figuras anteriores, da cuenta de que aún se conservan las tres osificaciones del tarso proximal como lo mostrado en las Figuras 32-34. Incluyendo además una cuarta osificación de los distales tarsales como en el P0 de *Coturnix*.

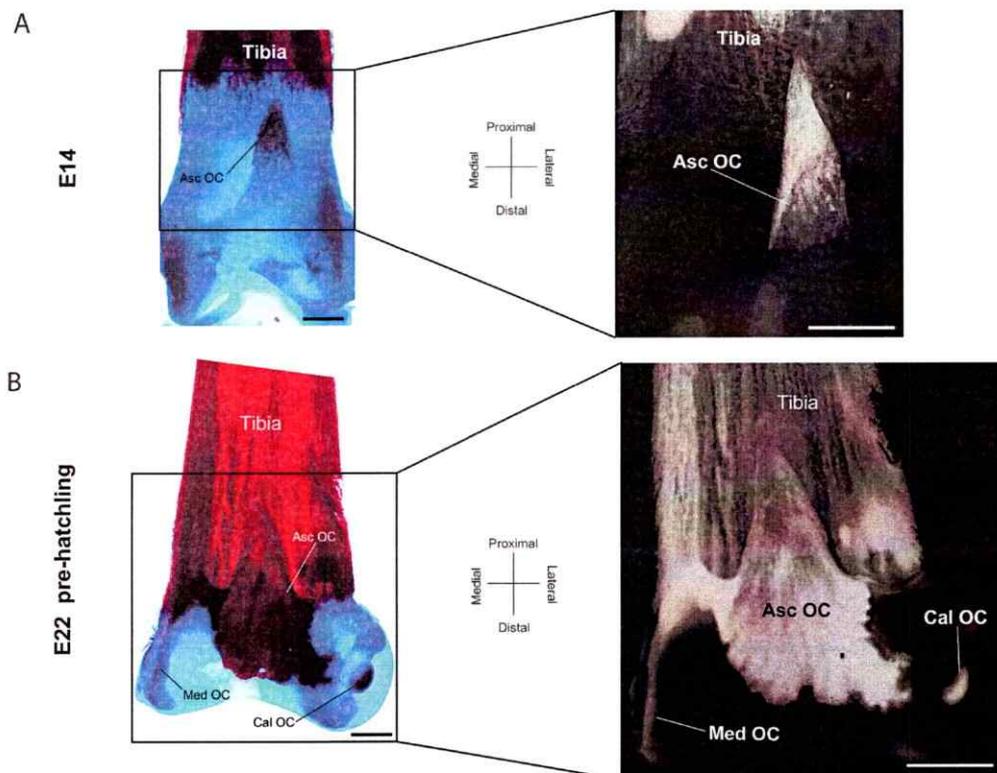


Figura 33. Tinción Whole Mount Rojo de Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Nothoprocta perdicaria*. (A) HH40 o embrión de 14 días de incubación en donde se observa el comienzo de la osificación del tarso en la punta del "proceso ascendente". (B) Embrión de 22 días de incubación o Prehatching en donde se muestran las tres osificaciones proximales tarsales, apareciendo la lateral y en menor medida la medial. Notar la extensión de la osificación del proceso ascendente la cual abarca casi un tercio del tarso proximal, acercándose a contactar la osificación lateral o del calcáneo. Abreviaciones: Med OC=centro de osificación medial, Asc OC=centro de osificación del proceso ascendente, Cal OC=centro de osificación lateral o del calcáneo. Barra (A)= 500 μ m, (B) = 1 mm.

Por lo tanto, como lo describió McGowan (1985), en todos los estadios más tardíos descritos en esta sección encontramos, tres centros de osificación en el tarso proximal. El primero aparece en la porción más proximal del proceso ascendente, posteriormente (de uno a varios días, dependiendo de la especie) y de manera casi simultánea aparecen los centros de osificación en posición medial y lateral.

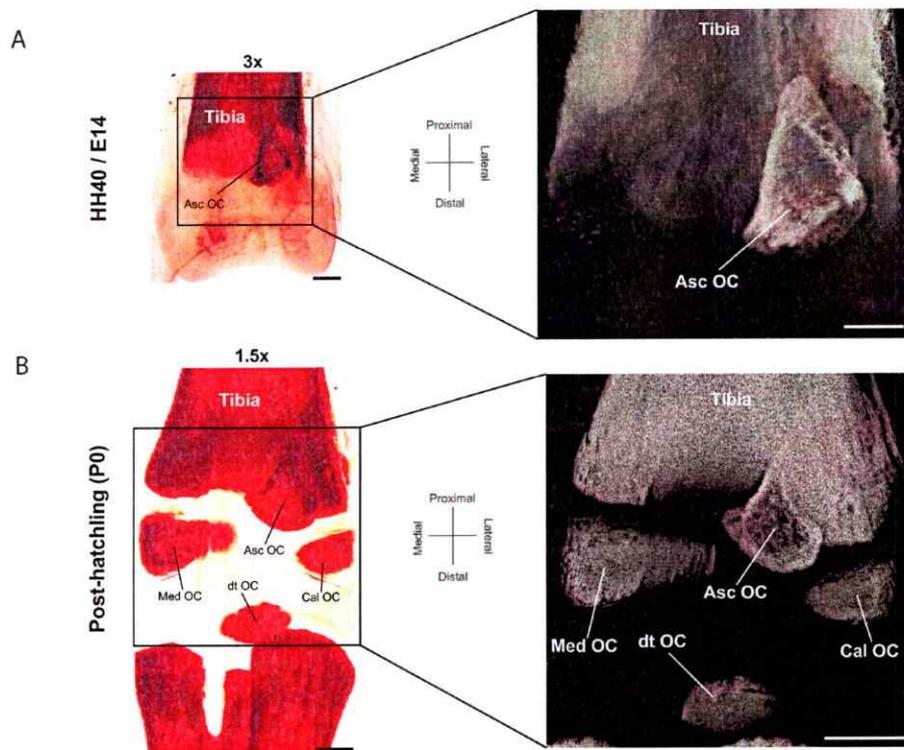


Figura 34. Tinción Whole Mount Alizarina para caracterizar el inicio de la osificación en el tarso proximal en *Coturnix japonica*. (A) HH40 o embrión de 14 días de incubación en donde se observa el comienzo de la osificación del tarso en la punta del "proceso ascendente". (B) Posthatching en donde se muestran las tres osificaciones proximales tarsales, apareciendo la lateral y medial; mas una única osificación distal. Abreviaciones: Med OC=centro de osificación medial, Asc OC=centro de osificación del proceso ascendente, Cal OC=centro de osificación lateral o del calcáneo, dtOC= centro osificación tarsal distal. Barra (A)= 500 μ m, (B) = 1 mm.

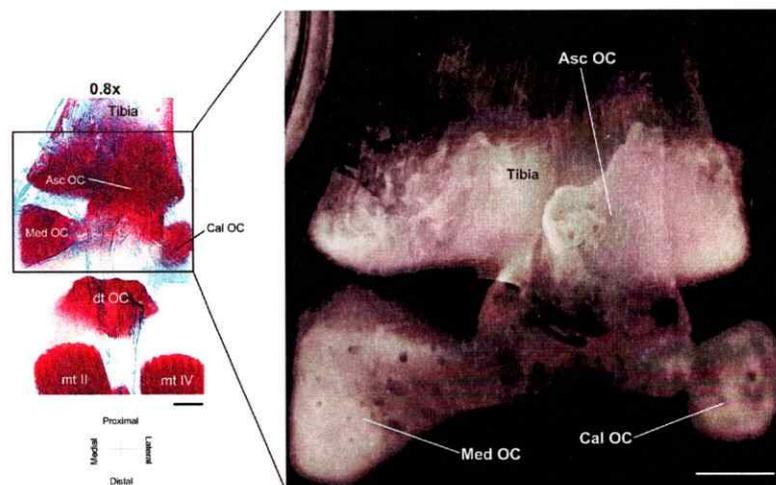


Figura 35. Tinción Whole Mount Rojo de Alizarina para caracterizar la osificación en el tarso proximal en *Vanellus chilensis*. Se muestra la evidencia de los tres centros de osificación proximales, más un único centro distal en la posición de los elementos tarsales distales. Abreviaciones: Med OC=centro de osificación medial, Asc OC=centro de osificación del proceso ascendente, Cal OC=centro de osificación lateral o del calcáneo, dtOC= centro osificación tarsal distal, mt=metatarso. Barra = 1 cm.

El centro de osificación en la posición del proceso ascendente fue el que describió Morse para inferir que se trataba de un Intermedium (como hueso) por su posición anatómica. Además podemos sugerir que la "identidad" del astrágalo como hueso compuesto proveniente de sólo un centro de osificación, se ha perdido en aves, existiendo una aparente reversión a presentar dos centros de osificación, los cuales surgen en las posiciones anatómicas de los cartílagos tibiale e intermedium respectivamente.

DISCUSIÓN

1. Similitudes de ontogenias tarsales en Aves.

Al seguir comparativamente todas las ontogenias tarsales, podemos señalar lo siguiente: (a) que entre los estadios HH29-31 estas aparecen independientemente o "de novo". (b) que la condensación intermedia corresponde al proceso ascendente aviano, creciendo y extendiéndose próximo-dorsalmente por la parte más distal de la tibia, la cual en paralelo se va fusionando tardíamente (estadio HH36-37) con las otras dos condensaciones proximales, produciéndose una *fusión tripartita* generando un único elemento cartilaginoso en el tarso proximal.

Así, aplicando el criterio de las posiciones relativas de Peabody (1951) respecto a la proximidad y articulación de los elementos tarsales con los zeugopodiales, podemos referirnos a las condensaciones cartilaginosas del tarso proximal de la siguiente manera: *fibulare* a la próximo-lateral (distal a la fíbula, que es la primera en aparecer en la ontogenia, constituyendo el eje primario (Burke & Feduccia, 1997)); *intermedium* a la intermedia y *tibiale* a la próximo-medial (Figura 36).

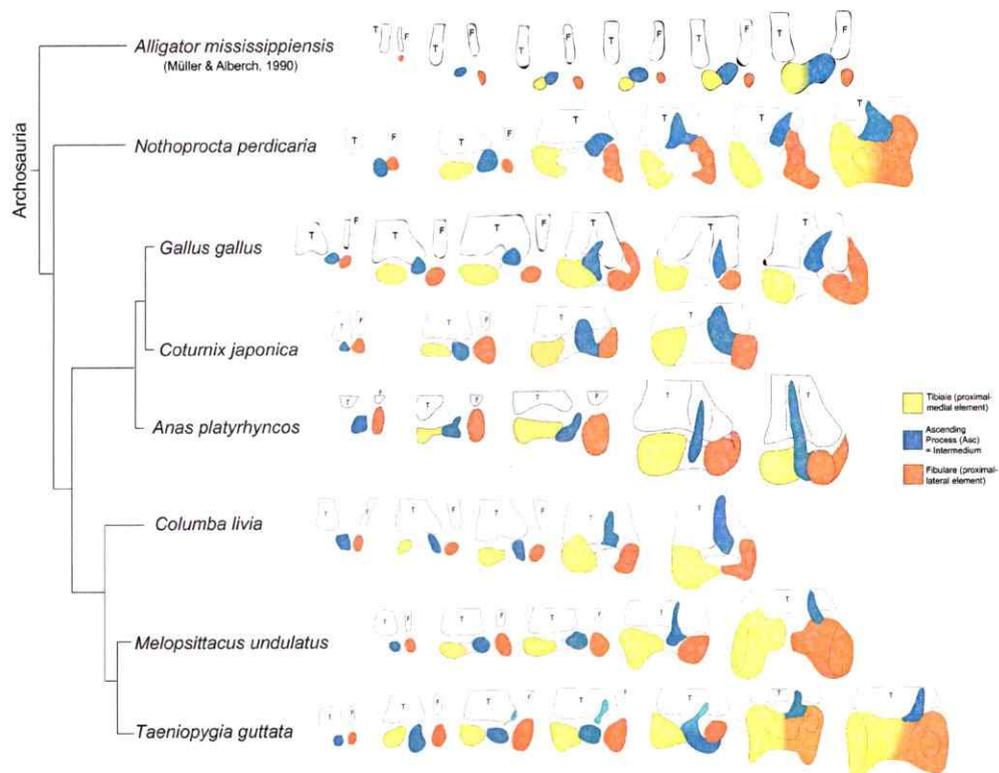


Figura 36. Resumen comparativo entre las ontogenias tarsales tempranas de especies de Aves utilizadas en este estudio. En las siete ontogenias descritas en esta tesis, ocurre el mismo patrón de desarrollo, constituyéndose el tarso proximal a partir de la fusión de tres condensaciones proximales, que aparecen de lateral a medial: fibulare (naranja), intermedium (azul) y tibiale (amarillo). Siendo el intermedium quien conforma el llamado proceso ascendente. Se utiliza la ontogenia del tarso de *Alligator mississippiensis* como outgroup en esta comparación, teniendo el mismo patrón del desarrollo en cuando a la aparición de las condensaciones proximales en posiciones anatómicas parecidas, generándose eso sí, una condensación medial compuesta (tibiale/intermedium) separada de una lateral (fibulare).

Tanto el tibiale como el fibulare habían sido descritos en estudios embriológicos en aves (Hinhcliffe, 1977; Burke & Feduccia, 1997; Lansdown, 1970) con la novedad que en este trabajo muestra claramente la existencia de un intermedium embrionario. Por lo tanto la hipótesis de Morse (1880) estaría correcta, es decir que el proceso ascendente del tarso aviano corresponde a un intermedium modificado.

Respecto a la aparición del astrágalo durante la ontogenia tarsal de Aves, su identificación plantea un desafío. Los datos entregados apuntan a que este hueso ha perdido su identidad "Amniota", es decir, en Aves no se está originando a partir de una única osificación endocondral dentro de un cartílago medial compuesto de tibiale+intermedium, separado del fibulare/calcáneo. Sino más bien, tibiale intermedium y fibulare permanecen separados hasta estadios tardíos, para luego unirse en un sólo cartílago proximal compuesto, en el cual aparecen tres osificaciones en las posiciones relativas a estos tres cartílagos, desviándose (de Beer, 1940) de la tendencia evolutiva general de tener solo 2 osificaciones proximales dentro de Reptilia y Amniotos. Existe al menos una reversión parcial (Collin & Miglietta, 2008) que recuerda las tres osificaciones separadas del tarso proximal que constituyen el tibiale, intermedium y fibulare como huesos en Tetrápodos No-Amniotos como Urodelos.

Interesantemente, McGowan (1985) describe que dentro de la mayoría de aves Paleognatas (familias Strutionidae, Apterygidae, Dromaiidae, excepto Tinamidae) existe la tendencia de que la osificación del "proceso ascendente"/intermedium crece hacia distal y se fusiona con la osificación medial/tibiale. En cambio, en aves Neognatas, se fusiona primero con la osificación lateral (calcáneo/fibulare). Este autor lo describe como una heterotopía del desarrollo, es decir existe un cambio en el

lugar donde ocurre la fusión de las osificaciones, en donde para todos los grupos es el mismo resultado, la osificación completa del tarso proximal, descrita históricamente como astrágalo calcáneo, que posteriormente pasa a conformar el tibiotarso cuando se fusiona con la tibia.

Es importante señalar que aparentemente el proceso de osificación del tarso es filogenéticamente plástico debido a que aves Paleognatas, representantes de la familia Tinamidae, presentan el proceso de osificación del tarso en la misma posición que en Neognatas. Confirmando que en todos los casos (vistos por este autor y en este estudio) se conservan las mismas tres osificaciones y que solo ocurren cambios secundarios en el modo como se fusionan.

Así podemos mostrar gráficamente la ontogenia completa del tarso aviano en las Figuras 37-38 incluyendo tanto la formación de cartílago (Figura 37), como la aparición de las osificaciones (Figura 38). Señalando claramente la modificación que presenta la formación del astrágalo como hueso, el cual pierde parcialmente "su identidad tipo-amnioto". Adicionalmente, para complementar estos resultados, resumimos en la Figura 39 los principales estudios embriológicos del tarso en aves y como confirmamos la hipótesis de Morse en nuestro trabajo.

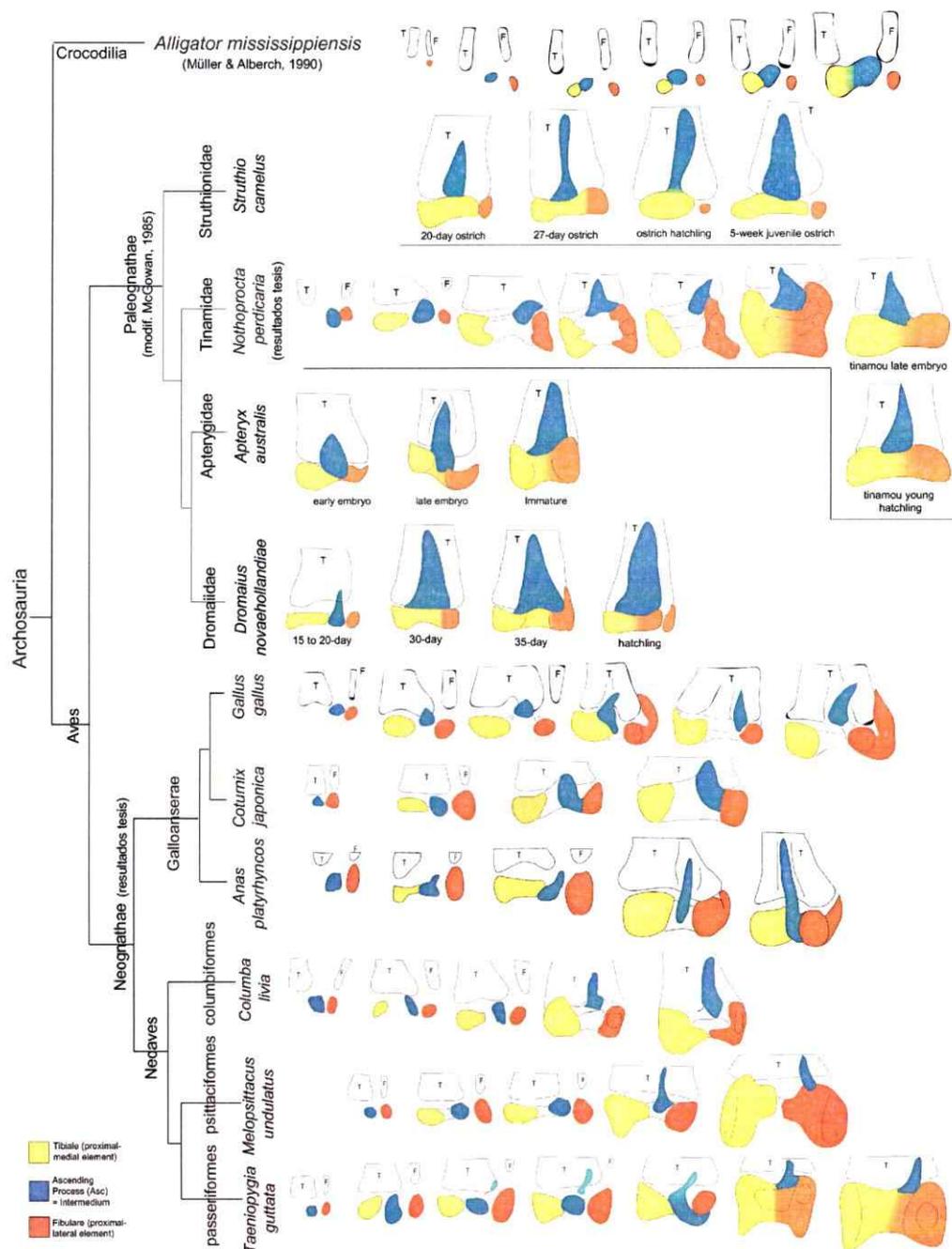


Figura 37. Resumen general extendido de las ontogenias tarsales tempranas en Aves, incluyendo a la revisión de McGowan (1985) en Paleognathae. Se muestran mayoritariamente las etapas de condrogénesis, incluyendo en paleognathas parte de la osificación del tarso. En esta comparación se propone que paleognathas presentan los mismos tipos de condensaciones de cartilago que forman al tarso proximal, es decir, una medial/tibiale, una intermedia/intermedium que da origen al proceso ascendente y una lateral/fibulare. Nuevamente utilizamos como outgroup para esta comparación, la ontogenia del tarso en *Alligator*.

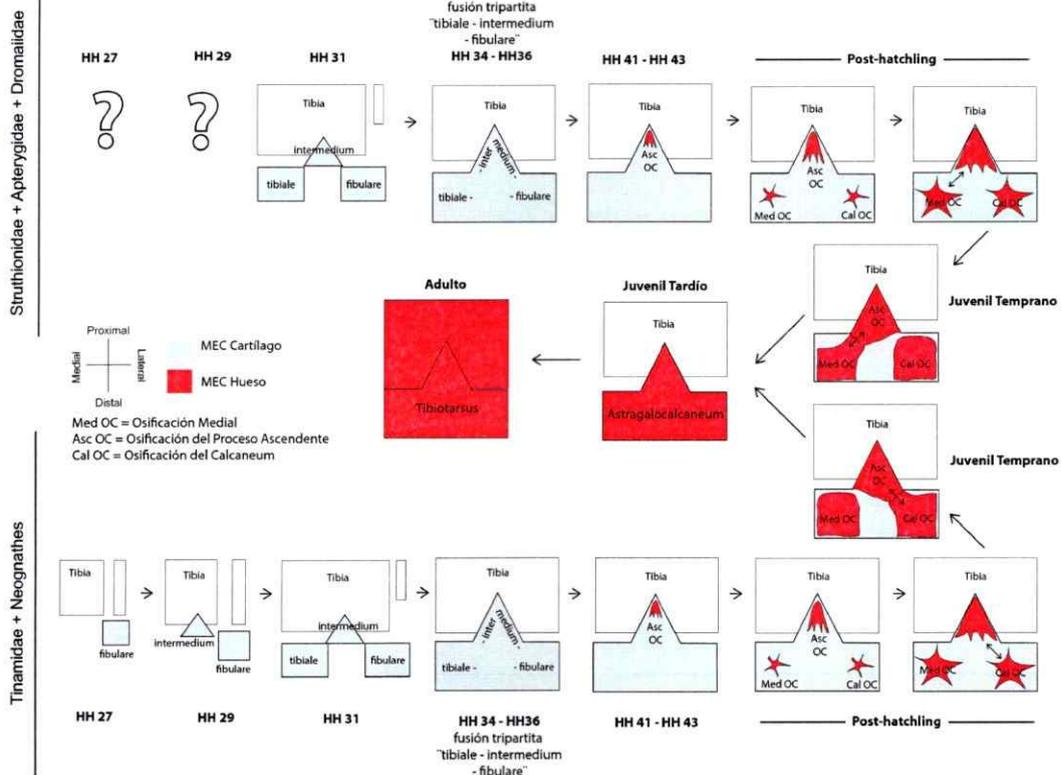


Figura 38. Resumen de las ontogenias completas del tarso aviano, incluyendo las etapas de condrogénesis y osteogénesis. Se complementa a lo obtenido en este trabajo con lo revisado por McGowan (1985) para paleognatas. Se describe la formación del tarso proximal, desde HH27 hasta juvenil/adulto. A partir del fibulare, intermedium y tibiale se forma la fusión tripartita que posteriormente presenta tres centros de osificación en las mismas posiciones anatómicas de estos cartílagos. Se grafica que el intermedium da origen al proceso ascendente. Los signos de interrogación indican que no existe información hasta el momento para esos estadios tempranos del desarrollo (HH27-29) en las familias de paleognatas señaladas. Notar que el desarrollo del tarso en tinamidae se describe completamente por primera vez y es muy parecido a lo que ocurre en todas las neognatas estudiadas.

2. Comparación con representantes fósiles de Theropoda.

Gegenbaur (1878) y posteriormente Schaeffer (1941) señalan que en reptiles, el astrágalo surge de la fusión cartilaginosa del tibiale con el intermedium, presentando solo una osificación. La evidencia fósil para Archosauria, grupo que da origen a las aves, (Figura 2) señala que aparecen dos centros de osificación en el tarso proximal, uno medial que origina al astrágalo y uno lateral que corresponde al calcáneo (fibulare)

No encontrándose aparentemente una tercera osificación como en el tarso proximal aviano.

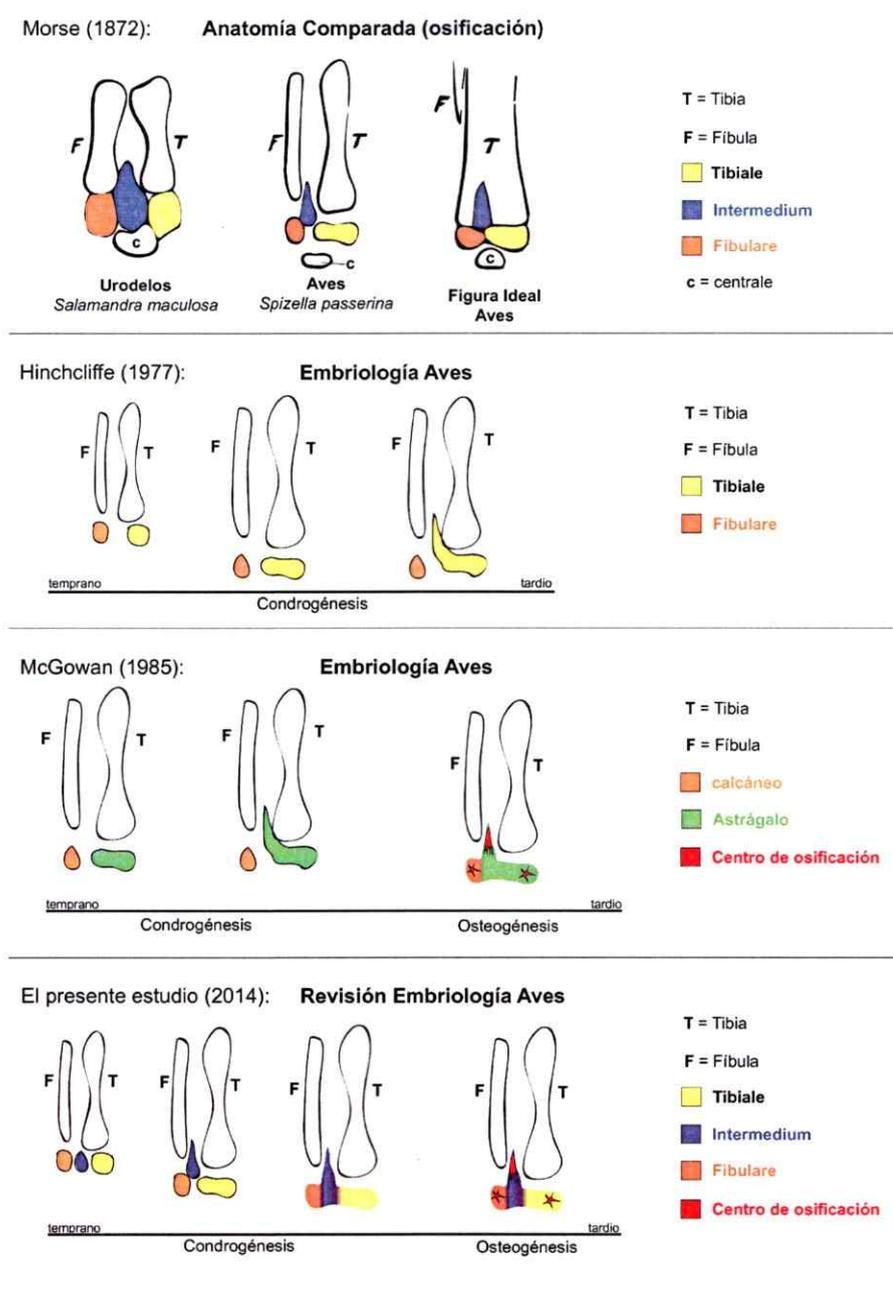


Figura 39. Resumen de los estudios embriológicos del tarso en aves más los resultados de esta tesis. Confirmamos la hipótesis de Morse (1872) encontrando un intermedium que posteriormente constituye el proceso ascendente. Además confirmamos que existen 3 cartílagos en el tarso proximal, correspondiendo al tibiale, intermedium y fibulare, distinto a lo descrito por Hinchcliffe y McGowan. También confirmamos los tres centros de osificación del tarso como lo señalado por McGowan, pero ahora bajo un nuevo marco empírico.

En Dinosaurios Terópodos encontramos que aun el tarso proximal aún no se fusiona a la tibia en los adultos (no se forma un tibiotarso), y en varios taxa (Revisados por Welles & Long (1974) en detalle) existen sólo dos osificaciones, manteniendo la condición original para Archosauria, con el astrágalo en la parte medial y el calcáneo en la parte lateral. El astrágalo presenta su característico proceso ascendente, el cual se ha descrito históricamente en los estudios paleontológicos como un crecimiento en dirección proximo-dorsal del astrágalo por sobre la tibia (Carrol, 1988; Romer, 1957; Welles & Long 1974). Welles (1983) en *Dilophosaurus* describe en la base del proceso ascendente una sutura adicional, la cual se extiende por todo el cuerpo del astrágalo hasta la sutura de este con el calcáneo. Sugiriendo la presencia de dos centros de osificación en el astrágalo de *Dilophosaurus*. Si comparamos esta evidencia fósil con los datos que nos entrega la osificación del tarso en aves, podemos sugerir que el centro de osificación observado en el proceso ascendente en *Dilophosaurus* es el mismo al visto en embriones tardíos de aves, en la misma posición anatómica (Figura 40).

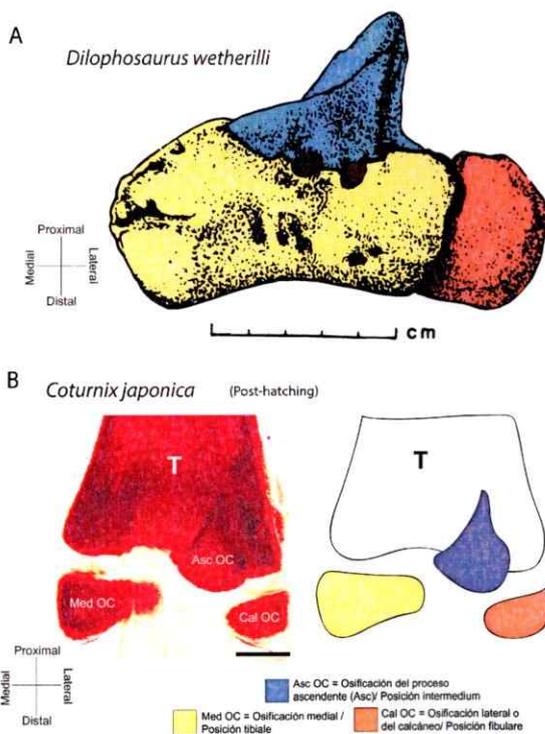


Figura 40. Comparación de la osificación del tarso en *Coturnix japonica* con *Dilophosaurus*. (A) En *Dilophosaurus wetherilli* se destacan las líneas de sutura descritas por Welles (1983) en donde se ha ilustrado de acuerdo a las posiciones relativas de las supuestas tres osificaciones, tomando como ejemplo (B) en donde se vuelve a mostrar la osificación del tarso en un embrión post-hatching de *Coturnix*. Notar la similitud en las posiciones relativas de las osificaciones del tarso. Barra (B) = 1 mm.

3. Comparación con ontogenia temprana de Alligator, indicios de la conformación del tarso en Archosauria. Comparación de ontogenia temprana del tarso entre Amniotos y Anfibios actuales.

Schaeffer (1941) en su extenso trabajo señala lo siguiente:

"The degree of resemblance between the embryonic tarsi of amphibians and reptiles and mammals is great enough to permit identification of homologous elements. While these anlagen remain separate in the adult amphibian, there is, of course, considerable fusion (and elimination) before the adult reptilian (and mammalian) stage is reached" (pág. 425).

"The position here taken is that the astragalus of reptiles and mammals is really a compound bone phylogenetically, composed of the intermedium, a proximal centrale, and possibly the tibiale. This is based mainly on embryological evidence and on the lack of any really contradictory paleontological evidence. The constant position of the foramen for the perforating artery between the fibulare and the intermedium in the amphibians, and between the calcaneum and the astragalus in the reptiles, does represent paleontological evidence that the fibulare and the intermedium are present as the calcaneum and part of the astragalus, respectively. It is not evidence, however, in the case of the astragalus, that only the intermedium is present" (pág 428).

Por lo tanto, con la evidencia mostrada hasta el momento y discutida, podemos realizar una comparación general entre las ontogenias tarsales de aves y los demás representantes amniotos.

Si tenemos en cuenta la imagen general de la formación del tarso proximal aviano y hacemos el ejercicio de compararlo con la secuencia ontogenética del tarso de cocodrilo *Alligator mississippiensis* hecha por Müller y Alberch (1990), notamos el mismo patrón de la aparición de las condensaciones proximales, es decir, primero aparece el fibulare, después el intermedium y posteriormente el cartilago próximo-medial o tibiale. La idéntica posición anatómica y secuencia de aparición de las condensaciones entre *Alligator* y Aves indica que el intermedium aún se conserva en Aves, contrario a lo descrito por Hinchliffe (1977).

Si seguimos realizando el mismo ejercicio sugerido en el párrafo anterior, y comparamos la ontogenia del tarso proximal de Crocodylia con representantes de Squamata como los del género *Liolaemus* (Fabrezzi et al, 2007) encontramos el mismo patrón temprano en la ontogenia: primero aparece la condensación del fibulare, luego la del intermedium y posteriormente la medial o tibiale. Al igual que *Alligator*, se fusionan la medial con la intermedia para conformar un único cartilago el cual presenta un centro de osificación que da origen al astrágalo. La condensación lateral se mantiene independiente presentando un centro de osificación a partir del cual se genera el calcáneo.

Otro representante de Squamata, el Gekko *Gonatodes albogularis*, presenta el mismo patrón que *Liolaemus*, agregando eso sí, una condensación central que se une a la intermedia y medial para formar el cartílago compuesto medial de donde surgirá el astrágalo (Leal et al, 2010). Esto es muy parecido a lo que ocurre en embriones tempranos de *Sphenodon* (Rhynchocephalia; Howes & Swinnerton, 1901) y en especies de tortugas (Testudines) donde Burke y Alberch (1985) describen que el cartílago que origina al astrágalo lo constituyen tres condensaciones, una medial (o tibiale/centrale 1 según los autores), una intermedia (intermedium) y una central (centrale 4 según los autores). Interesantemente, en tortugas se conserva el mismo patrón de aparición de las condensaciones tarsales que hemos revisado hasta el momento en los otros reptiles.

En mamíferos no es tan nutrida la literatura sobre el desarrollo tarsal. Dejando de lado las imprecisiones y correcciones posteriores, el trabajo de Holmgren (1933), ha sido hasta el momento el más completo en cuanto a registrar la ontogenia tarsal de un mamífero. Este autor describe para *Mus musculus* al menos tres condensaciones proximales, descritas en orden de aparición, como fibulare, intermedium, y centrale. Pero que siguen la secuencia ontogenética de aparición de estas condensaciones según el patrón descrito para otros amniotos (incluido Aves), esto es: c. lateral, c. intermedia y c. medial. La condensación lateral presenta un centro de osificación generando el calcáneo; la intermedia con la medial

(y aparentemente una tercera condensación más centralizada) constituyen un cartílago compuesto que presenta una osificación que da origen al Astrágalo (o Talus para mamíferos), pareciéndose a lo visto en tortugas, *Sphenodon* y geckko. Por lo tanto al menos podemos realizar una comparación general dentro del marco teórico propuesto en esta discusión. Finalmente, si tomamos como out-group en nuestra comparación anfibios actuales, y observamos la ontogenia tarsal en representantes de urodelos adultos (por ejemplo del género *Salamandra*) encontramos que estos aún conservan los tres huesos proximales separados, estos son el tibiale (posición medial), intermedium (posición intermedia) y fibulare (posición lateral), agregando un hueso central antes de la serie tarsal distal. En la ontogenia de tales huesos en *Salamandra* (Shubin y Alberch, 1986), la primera condensación en aparecer es la lateral (ó fibulare), luego la intermedia (o intermedium) y posteriormente la medial (o tibiale). Estas condensaciones no se fusionan nunca y presentan sus propios centros de osificación. Esto también ocurre con el hueso centrale y la serie tarsal distal. Este ejercicio comparativo en donde evidenciamos lo que se conserva y lo que cambia durante la ontogenia tarsal de amniotos y tetrápodos se describe gráficamente en la **Figura 41**, resumiendo lo discutido en estos párrafos.

Morse en sus monografías sobre el tarso en aves (Morse, 1874, 1880) realiza la comparación entre los centros de osificación del tarso de un Urodelo (*Salamandra maculosa*) y de un avestruz

juvenil (**Figura 39**), coincidiendo en sus posiciones relativas los elementos proximales (tibiale, intermedium (proceso ascendente) y fibulare). Si bien se equivocó en designar el centro de osificación de los distales tarsales del avestruz como el centrale de la salamandra, no deja de sorprender la comparación realizada, en donde por lo menos en aves aún se siguen conservando los tres elementos proximales. Hecho que por lo menos, a modo de osificaciones y de manera parcial aparecen en la osificación del tarso de aves.

Finalmente queda claro que lo que ocurre en aves es una particularidad de su linaje, es decir, esta aparente "pérdida de identidad del Astrágalo" es una modificación de la ontogenia de este linaje, en donde claramente su ancestro arcosauriano presentaba en su ontogenia tarsal un cartílago compuesto en la posición próximo-medial del cual aparecía solo una osificación generando finalmente el Astrágalo.

Interesantemente, se observa un paralelismo en la ontogenia tardía del tarso proximal en Sphenodon, Testudines, Squamata y Aves en donde encontramos una fusión completa de las osificaciones proximales, generando un solo hueso compuesto llamado proximal-tarsale o astrágalo calcáneo.

4. Comentario Final: Comparación con representantes fósiles de anfibios no-amniotos, stem-amniotos y amniotos basales.

Los trabajos de O'Keefe et al. (2006) y Meyer & Anderson (2013) dan cuenta de otra problemática dentro de la paleontología que es el número de osificaciones que conformaron el primer astrágalo en el linaje conducente a amniotos. Una de las sinapomorfías de amniota es que presentan un gran hueso en la posición próximo-medial que se origina de una sola osificación y que se le denomina astrágalo (Rieppel, 1993). Sin embargo, a partir de lo descrito por Peabody (1951) en el amnioto basal *Captorhinus*, este hueso aún presentaba evidencia de tres centros de osificación que tardíamente se fusionaron en el desarrollo conformando el astrágalo. Estos centros correspondían a las posiciones relativas del tibiale (elemento medial), intermedium (elemento intermedio) y centrale 4 (elemento de la serie central) encontrados por ejemplo en el temnospóndilo *Acheloma*. Lo que sugeriría que la ontogenia del astrágalo en *Captorhinus* sería de la siguiente manera: aparecerían en el desarrollo primero el fibulare, luego el intermedium y posteriormente el tibiale, junto con la serie central y distal, posteriormente cada elemento cartilaginoso maduraría separadamente, no fusionándose nunca como cartílagos y cada uno presentaría su propio centro de osificación. Solo después de comenzada la osteogénesis en cada elemento tarsal habría ocurrido la fusión del tibiale/intermedium/centrale 4 para constituir el astrágalo, quedando el fibulare (calcáneo) separado en la parte lateral.

Peabody (1951) realizó cortes histológicos en el astrágalo de *Captorhinus* indicando las líneas de sutura entre los tres centros de osificación justamente posicionados en los mismos lugares que los elementos óseos separados de *Acheloma*.

Si observamos el "tramo intermedio" entre *Acheloma* y *Captorhinus* encontraremos representantes del linaje que conduce a amniota, o stem-amniota. *Proterogyrinus* y el antracosaurio *Gephyrostegus* presentan solo una fusión entre dos osificaciones proximales que corresponderían al tibiale e intermedium, quedando el centrale 4 separado. Esto también lo observamos en el microsaurio *Tuditanus* y en los diadectomorfos *Limnoscelis* y *Orobates*. Ya dentro de amniotos captorínidos, *Moradisaurus*, a diferencia de *Captorhinus*, presenta 4 centros de osificación, incluyendo aparentemente un centrale 3 en el complejo del astrágalo, lo que da cuenta que la fusión tardía de estos elementos podría tener variación en el número de osificaciones que conforman este hueso compuesto. En la base de Eureptilia encontramos a *Hylonomus*, el cual presenta los mismos 3 centros de osificación de *Captorhinus* en el astrágalo. En diápsidos basales como *Petrolacosaurus* ya encontramos al astrágalo como una sola osificación. Curiosamente en sinápsidos basales (Mayer y Anderson, 2013) como *Ophiacodon* y el parareptil *Mesosaurus* encontramos también, una sola osificación en el astrágalo.

Por lo que Mayer y Anderson (2013) señalan que por lo menos han ocurrido tres eventos independientes hacia la transición a una sola osificación del astrágalo, en eureptilia,

parareptilia y synapsida. Lo discutido en esta sección se describe gráficamente en la **Figura 42**.

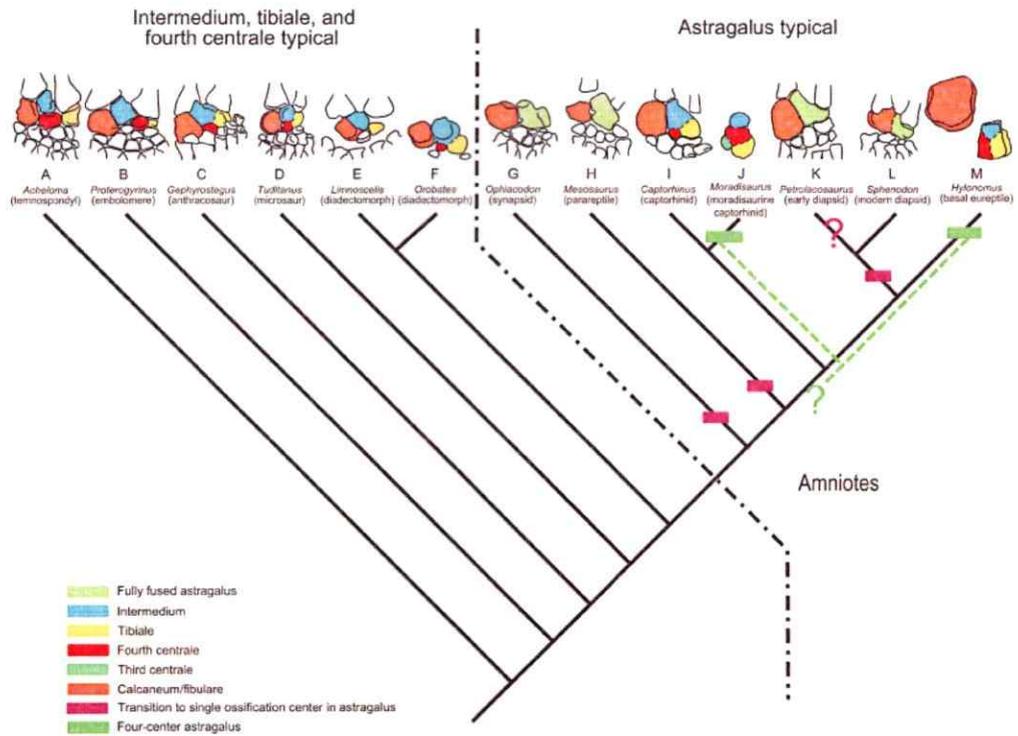


Figura 42. Esquema modificado de Mayer & Anderson (2013). En donde se muestra la configuración del tarso proximal en la transición tetrapodo-stem amnioto-amnioto, dando cuenta del origen compuesto del astrágalo y de 3 eventos (al menos) en la filogenia que muestran una transición hacia una única osificación para este hueso.

CONCLUSIONES

- Esta tesis corresponde al único estudio moderno concluyente sobre la ontogenia temprana del tarso en embriones de Aves previo a los 8 días de incubación (antes de HH34).
- Los resultados muestran que en esta temprana ventana temporal de la ontogenia aparecen tres condensaciones proximales independientes en el tarso: fibulare, intermedium y tibiale. Descartando que la existencia de sólo dos cartílagos proximales como estaba descrito en los trabajos más recientes.
- Por otra parte, damos cuenta de una aparente pérdida de la identidad "tipo amnioto" de la formación del Astrágalo en Aves y la readquisición parcial de tres osificaciones tarsales proximales como en Tetrapodos basales.
- En conclusión, de acuerdo a mis resultados, la evidencia embriológica y paleontológica demuestra que es un poco más compleja la historia ontogenética en Aves. El proceso ascendente como tal no es un proceso, es decir, no es un crecimiento de un elemento previo. Este aparece como una condensación independiente (intermedium) en la etapa de condrogénesis, coexistiendo y fusionándose con un tibiale y un fibulare cartilagosos, presentando posteriormente, 3 centros de osificación en sus posiciones relativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Baumel, J. J. 1979. *Nomina Anatomica Avium: An Annotated Anatomical Dictionary of Birds*. Academic Press: London.
- Burke, A. C. & Alberch, P. 1985. The development and homologies of the chelonian carpus and tarsus. *Journal of Morphology*. 186: 119-131.
- Burke, A. C. & Feduccia, A. 1997. Developmental Patterns and the Identification of Homologies in the Avian Hand. *Science*. 278: 666-668.
- Carroll R. L. 1988. *Vertebrate Paleontology and Evolution*. New York: WH Freeman.
- Carroll, R. L., and R. Holmes. 2007. Evolution of the appendicular skeleton of amphibians; pp. 185-224 in B. K. Hall (ed.), *Fins into Limbs*. University of Chicago Press, Chicago and London.
- Collin, R. & Miglietta, P. 2008. Reversing opinions on Dollo's Law. *Trends in Ecology and Evolution*. 23:602-609.
- de Beer, G. 1940. *Embryos and Ancestors*. Clarendon Press, Oxford.
- Fabrezi, M., Abdala, V., Martínez Oliver, M. I. 2007. Developmental basis of limb homology in lizards. *Anatomical Record*. 290: 900-912.
- Gegenbaur, C. 1878. *Elements of Comparative Anatomy*. McMillian and Co. London.
- Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. 2011. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neurosciences*, 14: 1481-1488.
- Hinchliffe J. R. 1977. The chondrogenetic pattern in chick limb morphogenesis: a problem of development and evolution. In D.-A. Ede, J.-R. Hinchliffe and M. Balls (eds.) "Vertebrate limb and somite morphogenesis". Cambridge University Press: 293-309.
- Holmgren, N. 1933. On the Origin of the Tetrapod Limb. *Acta Zoologica*. 15: 185-295.
- Howes, G.B. & Swinnerton, H.H. 1901. On the development of the skeleton of the Tuatara, *Sphenodon punctuatus*; with remarks on the egg, on the hatching, and on the hatched young. *Transactions of the Zoological Society of London*. 15: 1-86.
- Lansdown, A.B.G. 1970. A study of the normal development of the leg skeleton in the quail (*Coturnix Coturnix japonica*). *Journal of Anatomy*. 106: 147-160.

- Leal F., Tarazona O. A., Ramirez-Pinilla M. P. 2010. Limb Development in the Gekkonid Lizard *Gonatodes albogularis*: A Reconsideration of Homology in the Lizard Carpus and Tarsus. *Journal of Morphology*. 271:1328-1341.
- McGowan C. 1984. Evolutionary relationships of ratites and carinates: Evidence from ontogeny of the tarsus. *Nature* 307: 733-735.
- McGowan C. 1985. Tarsal development in birds: Evidence for homology with the theropod condition. *Journal of Zoology (London) (A)*. 206: 53-67.
- 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* 33:488-492.
- Morse E. S., 1872. On the Tarsus and Carpus of Birds. *Annals of the Lyceum of Natural History of New-York*. 10:141-158.
- Morse E. S., 1880. On the identity of the ascending process of the astragalus in birds with the intermedium. *Anniversary Memoirs of the Boston Society of Natural History*. 1-11.
- Müller G. B, Alberch P. 1990. Ontogeny of the limb skeleton in *Alligator mississippiensis*: developmental invariance and change in the evolution of archosaur limbs. *Journal of Morphology*. 203:151-164.
- O'Keefe, F. R., C. A. Sidor, C. A., H. C. E. Larsson, A. Maga, O. Ide. 2006. Evolution and homology of the astragalus in early amniotes: new fossils, new perspectives. *Journal of Morphology*. 267:415-425.
- Peabody F. E. 1951. The origin of the astragalus of reptiles. *Evolution* 5:339-344.
- Schaeffer, B. 1941. The Morphological and Functional Evolution of the Tarsus in Amphibians and Reptiles. *Bulletin of the American History Museum*. 78: 396-472.
- Shubin, N.H. & Alberch, P. 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evolutionary Biology*. 20:319-387.
- Rieppel O. 1993. Studies on skeleton formation in reptiles. IV. The homology of the reptilian (Amniote) astragalus revisited. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 13:31-47.
- Romer, A. S. 1976. *Osteology of Reptiles*. Chicago Academy Press.
- Welles S. P. & Long R. A. 1974. The Tarsus of Theropod Dinosaurs. *Annals of the South African Museum* 64:191-218.
- Welles S. P. 1983. Two centers of ossification in a theropod astragalus. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 57: 401.