

Descripción macroscópica del patrón de osificación fetal en alpacas (*Vicugna pacos*)

Macroscopic description of the fetal ossification pattern in alpacas (*Vicugna pacos*)

Joel Iván Pacheco^{1*}, Víctor Manuel Velez¹, Wilber Garcia¹, María Vasquez-Cachay², Celso Zapata³, Daniel Lombardo^{4,5}

RESUMEN

El conocimiento del desarrollo embrionario y fetal es de suma importancia para poder establecer parámetros de desarrollo normal, la salud del feto y para identificar periodos críticos en la curva de crecimiento. Uno de estos procesos es el patrón de osificación. El presente estudio describe el patrón de osificación en embriones y fetos de alpaca utilizando las técnicas de radiología y diafanización. Se utilizaron 17 alpacas hembra preñadas para la colección de embriones y fetos de variada edad (32, 45, 60, 90, 118, 150, 165, 190, 220 y 280 días). Los especímenes fueron pesados, medidos y radiografiados, y posteriormente fijados en formol tamponado al 10% para ser sometidos al

¹ Grupo de Investigación en Sanidad y Ganadería altoandina-PROSAGAL-Estación IVITA Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Cusco, Perú

² Grupo de Investigación en Fisiología y Fisiopatología de Animales de Trópico y Altura, Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

⁴ Cátedra de Histología y Embriología, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina

⁵ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

* E-mail: jpachecoc@unmsm.edu.pe

Proyecto financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Postgrado (VRIP)-UNMSM (Código A20081481, RR: 01686-R-20)

Recibido: 26 de julio de 2022

Aceptado para publicación: 2 de febrero de 2023

Publicado: 28 de abril de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

proceso de diafanización en hidróxido de potasio y finalmente teñidos con Rojo de Alizarina. La descripción de los especímenes indica que en embriones de 32 y 45 días no existen estructuras mineralizadas; sin embargo, se pueden ver estructuras radiopacas e indicios de mineralización a los 60 días, indicando que la osificación se estaría iniciando entre los 45 y 60 días de gestación. Los huesos del cráneo y de la caja torácica son los primeros en osificarse. La osificación se presenta de manera consecutiva en la columna vertebral, miembros torácicos y pélvicos, llegando a un estado avanzado de osificación en el último tercio de gestación.

Palabras clave: osificación, gestación, alpacas, diafanización

ABSTRACT

Knowledge of embryonic and foetal development is extremely important in order to establish normal development parameters, the health of the foetus, and to identify critical periods in the growth curve. One of these processes is the pattern of ossification. The present study describes the ossification pattern in alpaca embryos and foetuses using radiology and diaphanization techniques. Seventeen pregnant female alpacas were used for the collection of embryos and foetuses of various ages (32, 45, 60, 90, 118, 150, 165, 190, 220 and 280 days). The specimens were weighed, measured and radiographed, and later fixed in 10% buffered formalin to be subjected to the diaphanization process in potassium hydroxide and finally stained with Alizarin Red. The description of the specimens indicates that in embryos of 32 and 45 days there are no mineralized structures; however, it can be seen radiopaque structures and signs of mineralization at 60 days, indicating that ossification would be starting between 45 and 60 days of gestation. The bones of the skull and the rib cage are the first to ossify. Ossification occurs consecutively in the vertebral column, thoracic and pelvic limbs, reaching an advanced state of ossification in the last third of gestation.

Key words: ossification, gestation, alpacas, diaphanization

INTRODUCCIÓN

El desarrollo fetal incluye la formación del esqueleto mediante la osteogénesis, producida principalmente por la osificación endocondral y mineralización de tejido inicialmente cartilaginoso (Eynard *et al.*, 2008). La aparición de núcleos de osificación es un medio para evaluar el desarrollo fetal y relacionarlo con su edad gestacional. Existen descripciones hechas en fetos humanos mediante radiografía (Pryse-Davis *et al.*, 1974) y ultrasonografía (Gentili *et al.*, 1984). El uso actual de los rayos X en estudios sobre sistemas esqueléticos, respiratorio, gastrointestinal,

urinario y cardiovascular está muy difundido y permiten tener imágenes muy fiables sobre estructuras de organismos vivos; sin embargo, presentan cierto riesgo para las personas expuestas a esta radiación, por lo cual debe reducirse las exposiciones largas e innecesarias (Raudales, 2014).

Una técnica utilizada para describir el proceso de osificación es la diafanización, la cual se basa en procesar los tejidos blandos a fin de transparentarlos para luego realizar tinciones específicas de los huesos (rojo de Alizarina) y cartílagos (azul de Alcían). De esta manera se pueden visualizar y ser utilizados en descripciones del proceso de osifi-

cación fetal (Sandoval *et al.*, 2016), y poder determinar los centros de osificación. Este proceso requiere utilizar especímenes previamente fijados y posteriormente corroídos con hidróxido de potasio (Rivera *et al.*, 2015), ya que los tejidos más duros como huesos y cartílagos no son afectados, y estos especímenes pueden luego ser conservados en glicerina (Romero y Gonzales, 2019).

Los estudios de osificación del feto en los camélidos sudamericanos se encuentran pobremente descritos, habiéndose tomado los modelos de desarrollo embrionario y fetal de otras especies similares como rumiantes y equinos. Sin embargo, se requiere conocer las particularidades del desarrollo fetal de estas especies, así como el patrón de osificación relacionado a la edad gestacional del individuo. Bajo esta premisa, este trabajo de investigación tuvo por objeto describir el patrón de osificación durante el desarrollo embrionario y fetal en alpacas mediante el uso de la radiología y la diafanización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 17 alpacas hembra con condición corporal de 3 a 3.5, que estuvieron al pastoreo en asociación alfalfa-rye grass y suplementadas semanalmente con heno de avena. Las alpacas fueron sometidas a monta natural con machos enteros. El diagnóstico de gestación se realizó a los 20 días del servicio mediante ultrasonido, utilizando un ecógrafo portátil (Tringa Linear, Esaote®, Italia), con un transductor lineal de 5 MHz.

Las alpacas fueron faenadas en el Camal de San Felipe, ubicado en Sicuani, Cusco, en fechas predeterminadas de acuerdo con la edad gestacional de los embriones y fetos a ser evaluados (32, 45, 60, 90, 118, 150, 165, 190, 220 y 280 días). Se extrajeron los embriones o fetos, los que fueron pesados y medidos. Luego se les tomó una placa radiográfica en el Centro Radiológico San Francisco de la Ciudad de Sicuani, Cusco,

Perú, a una potencia de 40 KV y 2.3 Mas (DRGEM® China), donde la lectura se realizó siguiendo las recomendaciones descritas por Han *et al.*, (1997).

El procesamiento de diafanización de las muestras se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal y de Transferencia de Embriones de la Estación Maranganí del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) – Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Se tomaron las medidas de largo de cuerpo (LC), húmero, radio, metacarpo, fémur, tibia, metatarso y largo fronto-occipital (LFO) siguiendo los protocolos descritos por Cerný (1990). Las mediciones se hicieron en la zona radiopaca de la placa radiográfica, haciendo el ajuste de acuerdo con la medida referencial de la placa radiográfica para cada caso. Posteriormente los especímenes fueron fijados en formol tamponado al 10% (Biosix® Argentina) hasta el procesamiento de diafanización.

El proceso de diafanización se inició con la evisceración y retiro de los globos oculares de los especímenes, luego se realizó un lavado con agua destilada por 12 h para eliminar los restos de formol. De allí se colocaron en recipientes con hidróxido de potasio al 7% por 5 días en caso de los embriones y fetos pequeños (hasta los 120 días), y al 10% por 15 días para especímenes de mayor edad. Posteriormente se lavaron con agua destilada por 2 h y se sometieron a tinción de rojo de Alizarina al 0.1% por 6 h. Finalmente, se retiraron los restos en 3 baños de agua destilada de 2 horas por baño (Rivera *et al.*, 2015). Las estructuras teñidas de color rojo se consideran mineralizadas (Mead, 2020).

Para la descripción de los especímenes diafanizados se utilizó un estereoscopio binocular (Leica®, EZ4), una lupa (2X) para especímenes grandes y un negatoscopio para las radiografías. El presente estudio fue autorizado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mediante Constancia de Autorización Ética N.º CEBA-2020-01.

Cuadro 1. Medidas óseas radiográficas de embriones y fetos de alpaca

n	EG (Días)	Peso (g)	LC (cm)	Húmero (cm)	Radio (cm)	Metacarpo (cm)	Fémur (cm)	Tibia (cm)	Metatarso (cm)	LFO (cm)
2	32	0.65	3.2	-	-	-	-	-	-	0.53
1	45	4.56	4.8	-	-	-	-	-	-	0.93
1	60	6.5	5.8	0.19	-	-	0.38	0.30	-	1.41
2	100	123.2	10.9	0.78	0.95	0.64	0.97	0.93	0.71	2.6
1	118	166.4	18.8	1.77	2.02	1.67	2.23	2.12	1.73	4.2
2	150	600	26.6	2.96	3.45	3.13	3.48	3.66	3.26	3.76
3	165	720.1	28.9	2.66	3.18	3.91	3.47	3.58	2.98	5.07
2	190	1250.0	44.75	4.88	5.94	5.89	6.13	6.32	5.96	6.78
2	220	3060.0	46.87	4.97	6.38	6.14	6.31	6.64	6.27	6.82
1	280	5360.0	49	8	9.45	10	9.73	10.26	10	8.36

n: número de animales. EG: edad gestacional; LC: longitud corporal (frente-grupa); LFO: longitud fronto-occipital

RESULTADOS

Los resultados obtenidos utilizando la técnica radiográfica y la diafanización se describen en el Cuadro 1. Asimismo, con los datos obtenidos se construyó una curva de desarrollo (Figura 1).

(A) Edad Gestacional (32 días)

Diafanización

No existe tinción en ninguna estructura. Los miembros están formados, pero aún no se observa separación digital.

Radiografía

No existen zonas radiopacas consistentes con tejido óseo.

(B) Edad Gestacional (45 días)

Diafanización

Se observa en la zona medial de los huesos frontal y maxilar una estructura trabecular similar a la osificación membranosa, pero sin tinción dado que aún no existe mineralización,

pudiendo indicar que se trata de un área preosificatoria. Se observan suturas frontoparietales aún no mineralizadas. No se observa la formación de vértebras en la región cervical, pero su silueta es visible en la región lumbar, sacra y coccígea (Figura 1 A1). No se observan las esternibras pero se pueden observar las costillas formadas mineralizadas. Las extremidades se encuentran formadas, observándose la silueta de huesos largos como húmero, radio, ulna, metacarpos, tibia, fémur y metatarsos. No se observan las falanges.

Radiografía

La imagen radiológica no evidencia la presencia de estructuras similares a huesos con aspecto radiopaco; sin embargo, existe diferencia de densidad de la radiopacidad, sobre todo en la cabeza y región tóraco-abdominal (Fig. 1 A2).

(C) Edad Gestacional (60 días)

Diafanización

No se observan zonas de osificación membranosa en el hueso cigomático (Figura 2 B1). Los huesos: nasal, incisivo y mandíbu-

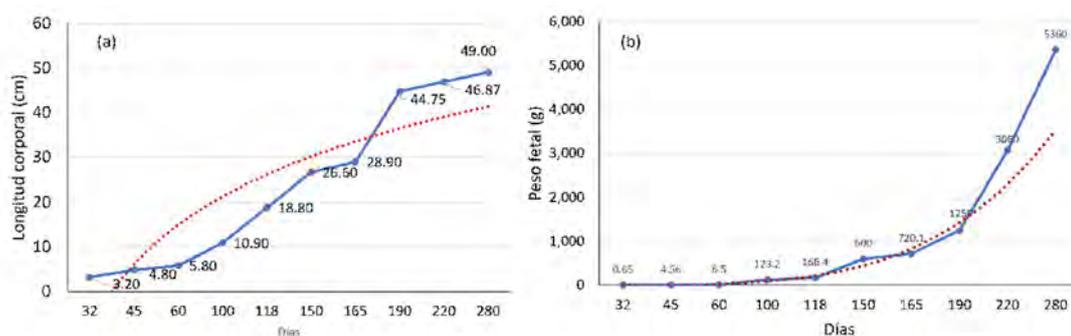


Figura 1. Curvas de crecimiento fetal de alpaca (Línea continua): Longitud corporal (a) y peso fetal (b) en días de edad gestacional, líneas de tendencia (líneas punteadas)

la presentan intensa tinción positiva a Rojo de Alizarina (Figura 2 B3). A lo largo de la columna vertebral se observan núcleos de osificación en la región que corresponde al cuerpo vertebral, desde las vértebras cervicales hasta las vértebras sacras. Las costillas se encuentran intensamente teñidas, en especial los 11 primeros pares, marcándose la zona central de la costilla en relación con sus extremos tanto proximal como distal (Figura 2 B4). No se observa osificación de las esternbras.

En la escápula se presenta mineralización en la porción media y distal, en tanto que, en el húmero, radio, ulna, la mineralización se observa a nivel de la diáfisis. En el metacarpo se observan dos huesos largos unidos con mineralización de la zona central de la diáfisis. La primera y segunda falange de los dedos se encuentran bien delimitadas, pero sin núcleos de osificación. En la tercera falange se observa un punto de mineralización. En el coxal, a nivel del cuello del ilion, se observa mineralización de aspecto trabecular en el cuello, y el isquion y pubis se ven bien delimitados. La mineralización en el fémur y tibia se observa a nivel de la diáfisis (Figura 2 B5). En el metatarso se observan dos huesos largos y solo se observa mineralización en la tercera falange.

Radiografía

La imagen radiográfica revela zonas radiopacas en el cráneo, observándose mayor densidad en la mandíbula, así como a nivel de las costillas. En el miembro torácico se observan estructuras radiopacas que corresponderían al húmero y radio-ulna, pero con poca densidad. En el miembro pélvico existen estructuras de aspecto radiopaco que corresponderían al fémur y tibia. No se observan otras estructuras óseas (Figura 2 B1).

(D) Edad Gestacional (100 días)

Diafanización

En la cabeza se observan núcleos de osificación de aspecto trabecular y de forma triangular a nivel de los huesos frontal, parietal (porción cigomática y petrosa) e interparietal. A nivel del hueso occipital se observan coloreados los cóndilos y el borde superior del agujero magno. Existe una evidente coloración de la órbita ocular y los huesos cigomático, lacrimal, así como de los huesos maxilar e incisivo (Figura 3 C4). El hueso esfenoides presenta un núcleo central de osificación y en el hueso hioides se observa osificación a nivel de las astas.

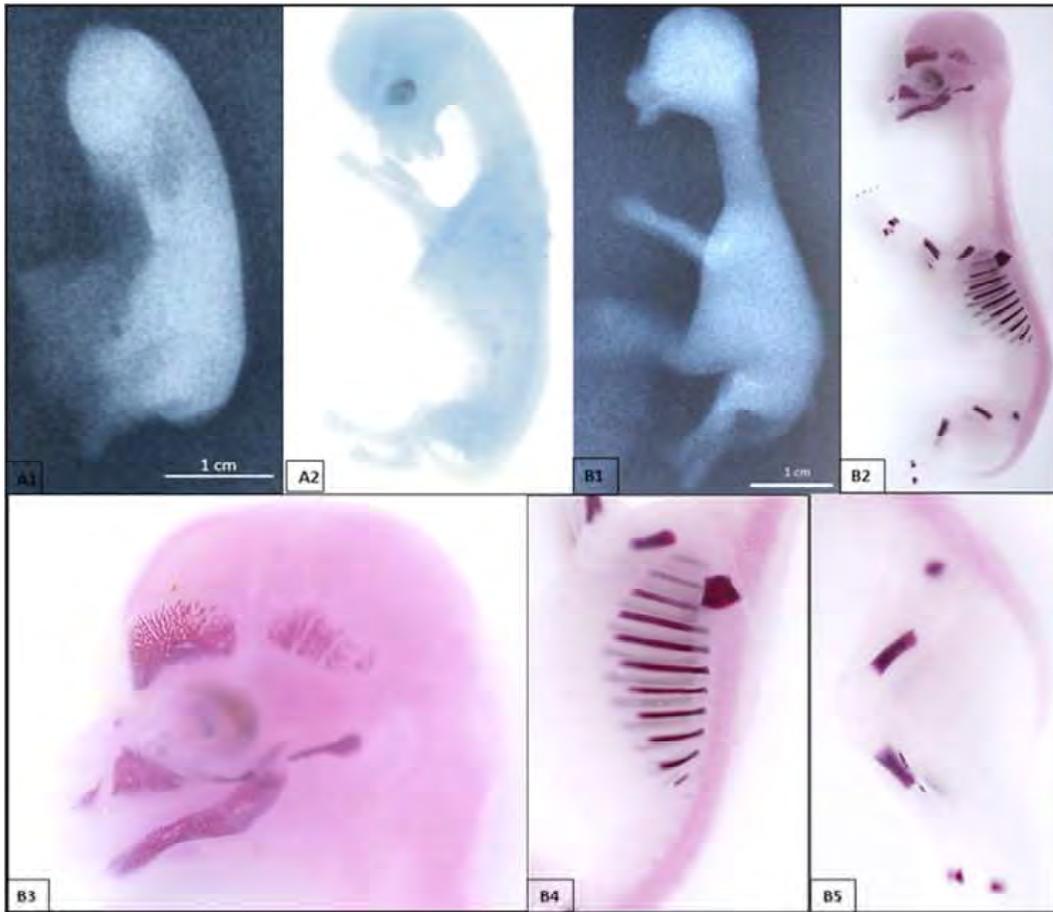


Figura 2. Radiografía y espécimen diafanizado de embrión de 45 (izquierda) y feto (derecha) de 60 días de gestación. A1, radiografía de embrión de 45 días; A2, embrión diafanizado de 45 días, no se observa ninguna estructura teñida con Rojo de Alizarina. B1, radiografía de feto de 60 días; B2, feto de 60 días diafanizado y teñido con Rojo de Alizarina. B3, cabeza de feto de 60 días mostrando mineralización en huesos frontal, parietal, malar y maxilar inferior. B4, feto de 60 días, mineralización de costillas, escapula, húmero y radio-ulna. B5, inicio de mineralización en coxal, fémur y tibia

En las vértebras cervicales existen tres núcleos de osificación por cada vertebra, observándose una porción ventral y dos laterales, aún no unidas entre sí. En las vértebras torácicas, la tinción es más intensa en la porción dorsal, lo cual corresponde a las apófisis espinosas. En forma similar, las vértebras lumbares presentan tres núcleos de osificación, dos laterales y uno ventral. Las vértebras sacras solo presentan un pequeño núcleo de osificación por cada vértebra, en tan-

to que en las vértebras coccígeas solo existen tres núcleos de osificación hasta la C-6, para continuar con solo un núcleo de osificación por vértebra. Las costillas se encuentran completamente osificadas, excepto en las carillas articulares del extremo proximal, mientras que en el extremo distal la mineralización es completa (Figura 3 C2). Se observa las siluetas de las esterneras, pero sin núcleos de mineralización.

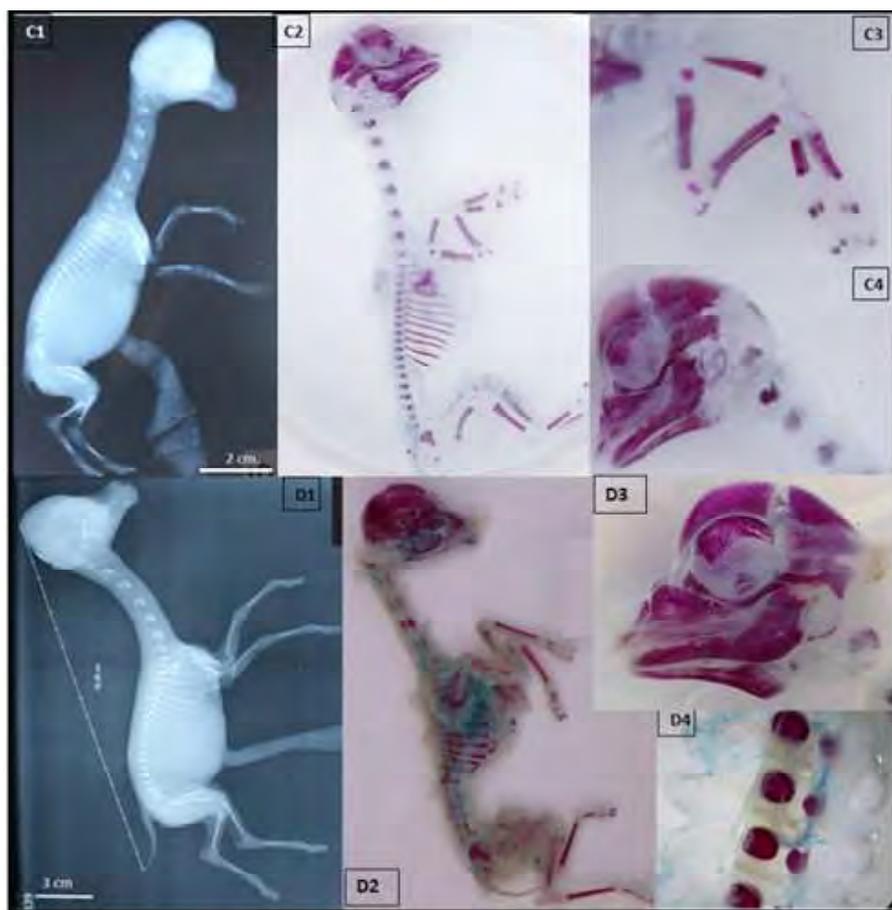


Figura 3. Radiografía y espécimen diafanizado de feto de 100 (arriba) y 118 (abajo) días de gestación. C1, radiografía de feto de 100 días. Obsérvese la similitud de osificación con el espécimen diafanizado y teñido con Rojo de alizarina (C2). C3, detalle de mineralización de huesos del miembro torácico a los 100 días de gestación. C4, huesos del cráneo completando su mineralización, excepto el occipital. D1, radiografía de espécimen de 118 días. Obsérvese la repetición de la osificación con el espécimen diafanizado y teñido con Rojo de Alizarina a la misma edad (D2). D3, detalle de la mineralización en los huesos de la cara en feto de 118 días. D4, núcleos de osificación (mineralización) en vértebras lumbares determinados por tinción con Rojo de Alizarina a los 118 días de gestación

A nivel de la escápula la mineralización es casi completa excepto en la espina de la escápula y la cavidad glenoidea. En el húmero se observa la mineralización completa de la diáfisis y en el extremo proximal un núcleo central. En el radio y ulna la mineralización es casi completa, excepto a nivel de las epífisis proximal y distal, y en el olécranon se evidencia un núcleo de mineralización (Figura 3 C3). En el metacarpo se observan claramente dos huesos largos bien delimitados y mineralizados. Se observa mineralización del

borde proximal de la primera falange y tercera falange, sin observarse núcleos de osificación en la segunda falange.

El hueso coxal presenta dos núcleos de osificación. El más grande corresponde al ala del ilion y el más pequeño se encuentra en la porción media del isquion. El fémur presenta osificación en la diáfisis, así como en el extremo distal a nivel del cóndilo medial. La rótula también tiene un pequeño núcleo de osificación. La tibia presenta la diáfisis mine-

ralizada y un pequeño núcleo de osificación en la epífisis proximal, que corresponde a la tuberosidad tibial. Existe un núcleo de osificación en el calcáneo. Los metatarsianos se encuentran osificados en su porción diafisaria y se observan bien delimitados. Se observa osificación casi completa de la primera y tercera falange.

Radiografía

La radiografía (Figura 3 C1) muestra claramente la presencia de huesos de aspecto radiopacos en la bóveda craneana, pero en forma ligera los huesos que conforman el rostro del feto. Las vértebras cervicales hasta las coccígeas se observan con aspecto de «collar de perlas». Las costillas también son radiopacas sin que se puedan observar las esternebrias. En el miembro torácico, la escápula no se observa muy marcada, posiblemente por su forma aplanada, pero los huesos largos (húmero, radio-ulna y metacarpos) muestran una silueta definida, así como la primera y tercera falange. El miembro pélvico muestra un hueso coxal con solo dos núcleos de osificación, en el ala del ilion y en el isquion. Los huesos largos (fémur, tibia y metatarsos) muestran una silueta definida y forma característica, así como un núcleo de osificación en la tercera falange. Todo en concordancia con el espécimen diafanizado

(E) Edad Gestacional (118 días)

Diafanización

En la cabeza, las suturas óseas son zonas aún no osificadas (Figura 3 D4). Las astas mayores del hioides se encuentran mineralizadas. La columna vertebral se encuentra formada en su totalidad, observándose la silueta de todas las vértebras, pero la osificación solo se encuentra en tres núcleos por vértebra (cuerpo y láminas laterales) desde las cervicales hasta las lumbares (Figura 3 D4). Las vértebras sacras y coccígeas solo presentan un pequeño núcleo de osificación en el cuerpo vertebral, observándose 16 núcleos de osificación que corresponden a 16

vértebras coccígeas. Las costillas (12 pares) se encuentran osificadas en su totalidad; el esternón se encuentra completamente formado y se observan seis núcleos de osificación, uno en cada esternebra.

En el miembro torácico, la escápula se encuentra casi completamente osificada, excepto en la cara articular y el acromion. Todos los huesos largos presentan intensa coloración en la región de la diáfisis. Se observan puntos de osificación en las epífisis y en el olécranon. Existen dos huesos largos que aún no se fusionaron para dar lugar al metacarpo. Las falanges están completamente osificadas. El coxal presenta dos núcleos de osificación evidentemente separados, correspondiendo al ilion y el isquion (Figura 3 D4). El pubis y el acetábulo no presentan osificación. El fémur, tibia y metatarsos presentan osificación diafisaria, mientras que pequeños puntos de osificación se ven en el calcáneo, rótula y cabeza del fémur. Las tres falanges se encuentran mineralizadas.

Radiografía

Presenta una imagen radiopaca muy delimitada de la bóveda craneana (Figura 3 D1), siendo evidente una mayor densidad ósea en la órbita ocular y bordes óseos del hueso occipital. También es visible el borde superior de la mandíbula. Las vértebras son visibles, observándose dos núcleos de osificación de diferentes densidades en las vértebras cervicales, mientras que en las vértebras torácicas y lumbares ya es posible observar las apófisis espinosas. Las vértebras sacras y coccígeas solo presentan un núcleo de osificación. Las costillas se encuentran completamente osificadas.

La escápula presenta una silueta de aspecto triangular, con dos ramas de mayor densidad ósea, que corresponden a los bordes craneal y caudal. Los huesos largos (húmero, radio, ulna y metacarpos) muestran una silueta definida y con sus formas características. Se observan las tres falanges, pero aún no se observan núcleos de osificación en

los huesos carpianos. El área de osificación del ala del ilion y el isquion aumentaron de tamaño con respecto a la edad anterior. Los huesos largos (fémur, tibia y metatarsos) presentan osificación diafisaria. Aún no se observa imagen radiopaca de la rótula ni las tres falanges radiopacas en los huesos tarsianos.

(F) Edad Gestacional (150 días)

Diafanización

A nivel de la cabeza, aún queda sin mineralizar las suturas y apófisis, así como las porciones laterales del hueso occipital, las que articulan con la porción escamosa del temporal, el mismo que se encuentra bien osificado, excepto la porción petrosa. Los huesos de la cara se encuentran completos. En la órbita ocular pueden observarse suturas de los huesos que la forman dándole un aspecto «fragmentado». En la mandíbula es posible observar ensanchamientos y surcos en donde se estarían formando los alveolos dentarios. Las vértebras se encuentran casi completamente osificadas, pudiéndose observar las porciones del arco y las apófisis espinosas vertebrales con una tinción aún tenue, menos intensa que el cuerpo y las láminas laterales, dando cuenta de su progresiva osificación. Las costillas están completamente osificadas y el área de osificación de las esternebras ha aumentado respecto a la descripción de los 118 días.

En la escápula aún se observa una tinción tenue a nivel del acromion y la cara articular de la cavidad glenoidea (Figura 4 E2). El húmero, radio, ulna y los dos metatarsos se encuentran intensamente teñidos en su porción diafisaria, las epífisis presentan tinción tenue en toda su extensión, las falanges se encuentran completamente osificadas. El coxal presenta tres porciones claramente osificadas, siendo las alas y cuerpo del ilion, el cuerpo del isquion y el pubis, que presenta un pequeño punto de osificación en el borde caudal. Existe un anillo de minera-

lización en el borde del acetábulo. El fémur, tibia y metatarsos se encuentran osificados, pero con una marcada diferencia de tinción entre la región de la diáfisis y las epífisis. Se observan núcleos más intensos de osificación en la cabeza del fémur, las trócleas, la epífisis tibial, la rótula, los huesos metatarsianos y los sesamoideos. El calcáneo muestra un pequeño núcleo de osificación central. Las falanges se encuentran completamente osificadas.

Radiografía

Las radiografías muestran un avance significativo del proceso de osificación (Figura 4 E1). El cráneo se encuentra en un estado de osificación muy avanzado. Todos los huesos de la bóveda craneana se muestran de aspecto radiopaco, así como el maxilar e incisivo. Además, se puede observar en la mandíbula la aparición de estructuras que corresponden a los dientes incisivos y molares, de aspecto radiopaco denso. Las vértebras tienen una apariencia radiopaca más consistente, donde las cervicales hasta las coccígeas son fácilmente distinguibles. Las costillas muestran una estructura radiopaca densa, así mismo se pueden observar seis esternebras.

En el miembro torácico, la escápula es fácilmente distinguible. Los huesos largos (húmero, radio-ulna, metacarpos) presentan una silueta muy definida y característica, de aspecto más denso. Las tres falanges están osificadas. En el miembro pélvico, las porciones iliaca e isquiática se encuentran ocupando la mayor parte de sus respectivos huesos, sin tener contacto aún. La porción púbica aún no presenta osificación. Los huesos largos (fémur, tibia, metatarsos) presentan osificación diafisaria y epifisaria. Existe un núcleo de osificación en la aún incipiente rótula con una imagen muy tenue, mientras que un núcleo radiopaco denso se observa en el calcáneo. Las tres falanges se encuentran osificadas.

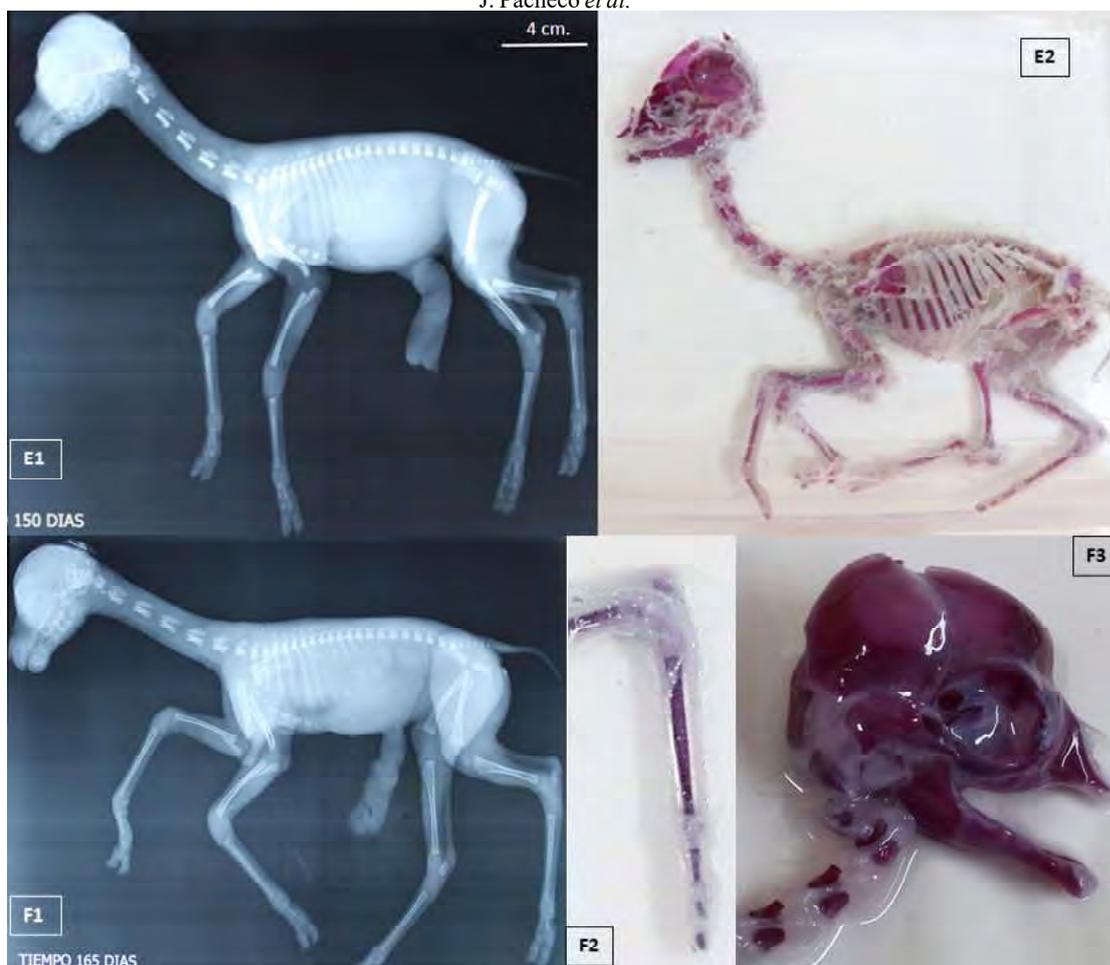


Figura 4. Radiografía de fetos de 150 (E1) y 165 (F1) días de gestación. E2, espécimen de feto de 150 días diafanizado y teñido con Rojo de alizarina. Obsérvese la similitud de osificación con el espécimen radiografiado de la misma edad (E1). F2, detalle de mineralización de huesos del miembro pélvico a los 165 días de gestación. F3, huesos del cráneo completando su mineralización, pudiendo observarse la formación de alveolos incisivos en el maxilar inferior, lo cual concuerda con la radiografía de la misma edad

(G) Edad Gestacional (165 días)

Diafanización

Estos especímenes presentaron características similares a aquellos con edad gestacional de 150 días, con desarrollo avanzado de los huesos de la bóveda craneana, estando los huesos frontal, temporales, occipital y parietales completamente teñidos (Figura 4 F3), evidenciando mineralización completa, excepto en sus bordes articulares. Las vértebras se observan formadas, pero

aún no completamente mineralizadas, habiendo tres puntos de osificación en cada vértebra. Las costillas y el esternón se observan mineralizados, observándose las zonas articulares no teñidas. Las esterneras tienen aspecto fragmentado, puesto que los núcleos de osificación están separados y existe uno por cada esternebra. Los miembros anteriores y posteriores se observan claramente diferenciados, cada hueso es fácilmente distinguible (Figura 4 F2), en tanto que las escápulas presentan la forma semi triangular característica de la especie.

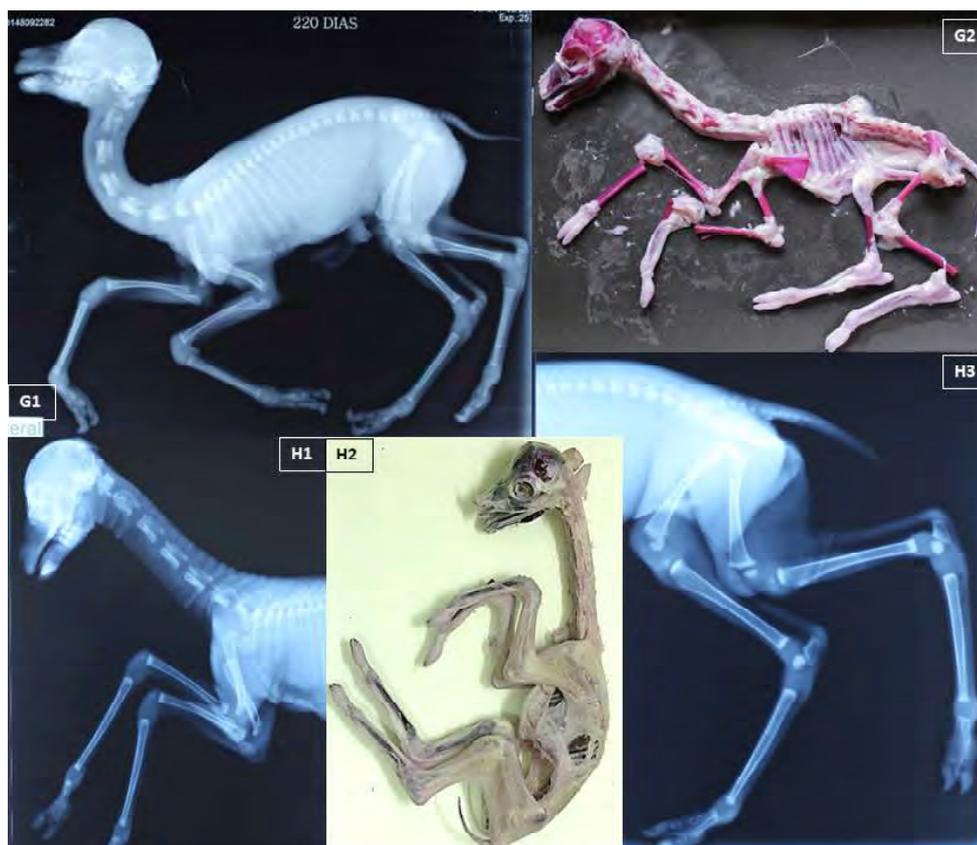


Figura 5. G1, radiografía de feto de 220 días. Nótese el desarrollo de alveolos dentarios. G2, Feto de 220 días diafanizado y mostrando mineralización marcada por tinción de Rojo de Alizarina, concordante con la radiografía de la misma edad. Se retiró parte de la musculatura para observar los huesos. H1, Radiografía anterior (cabeza, cuello, miembro torácico y parrilla costal) de feto a los 280 días con evidente desarrollo dentario. H2, feto de 280 días diafanizado. Por el volumen muscular no es posible observar claramente la tinción ósea con Rojo de Alizarina, pero se observa osificación completa de huesos de la cabeza. H3, Radiografía posterior (columna lumbar, sacra, miembros posteriores y cola) de feto a los 280 días de edad. Obsérvese los núcleos de osificación en el calcáneo

Radiografía

Las imágenes radiográficas son muy similares a lo descrito para la edad de 150 días. No hay desarrollo evidente de las estructuras en proceso de osificación. Se observa mineralización de casi todos los huesos de la bóveda craneana, así como de los huesos de la cara y de la base del cráneo. Las vértebras se observan radiopacas, pero aun separadas entre sí. Las costillas presentan un aspecto macizo en toda su extensión, excepto a la zona que corresponde a los cartí-

lagos costo esternales. Las esternibras se diferencian y el núcleo ha aumentado de tamaño respecto a los 150 días (Figura 4 F1).

La escápula y la mayoría de los huesos largos se encuentran osificados en su totalidad. Se puede ver núcleos de osificación en las articulaciones, correspondiendo al olécranon y calcáneo. Las falanges se observan completas. El hueso púbico está casi completo, encontrándose una imagen consistente, sobre todo en la región del ilion e isquion. El pubis aún se observa poco desa-

rollado. Los huesos largos se observan con una silueta definida. Las falanges se observan completas, pero aun separadas en sus zonas epifisarias.

(H) Edad Gestacional (220 días)

Diafanización

El feto se observa completamente formado, la masa muscular tiene mayor volumen frente a edades anteriores por lo que el proceso de diafanización no logró transparentar completamente el espécimen; sin embargo, luego de la tinción con rojo de Alizarina se observan los huesos intensamente teñidos, sobre todo los que no están cubiertos de paquetes musculares (Figura 5 G2). Los huesos del cráneo se ven completos, se observa tinción intensa en las piezas dentales, así como los huesos que conforman el hioides. Las vértebras se observan completas, tanto en el cuerpo vertebral como en las principales apófisis. Se pueden ver las vértebras sacras por separado.

El ilion, isquion y pubis se observan teñidos en su totalidad, excepto en la zona de la sínfisis púbica. Los huesos de los miembros torácicos y pélvicos están completos, se delimita la separación entre los huesos carpianos y tarsianos. Los huesos metatarsianos y metacarpianos aún no se encuentran fusionados. Las tres falanges se encuentran completamente osificadas, y se pueden observar puntos de osificación en los sesamoideos.

Radiografía

En las radiografías se puede observar claramente un estado muy avanzado de osificación del cráneo, con zonas más densas en los huesos de la base del cráneo y las orbitas oculares. De la misma forma, los dientes incisivos y los molares y premolares superiores e inferiores son evidentemente radiopacos (Figura 5 G4). Las vértebras se encuentran osificadas casi en su totalidad, observándose incluso las apófisis espinosas torácicas y lumbares de aspecto radiopaco.

Las vértebras sacras aun no presentan fusión, y las coccígeas presentan un solo núcleo de osificación por cada vértebra. La silueta escapular es claramente distinguible en toda su extensión.

La zona cortical de los huesos largos (húmero, radio-ulna, metacarpos) presenta una mayor densidad, evidenciando la presencia de un espacio medular. Esto también se observa en la primera falange, mientras que la segunda y tercera falange son de aspecto macizo; no pudiéndose observar osificación en los huesos carpianos ni en los sesamoideos. El ilion y el isquion se encuentran osificados por separado, y aún no se observa aspecto radiopaco en la porción correspondiente al pubis.

Los huesos largos (fémur, tibia, metatarsos) también presentan mayor densidad hacia las zonas corticales, dejando una porción medular menos densa, lo cual indica la presencia de un espacio medular. El calcáneo se encuentra bien osificado, no así la rótula, de la cual se observa una tenue silueta aun no osificada. Las falanges se encuentran completamente osificadas, existiendo una zona medular en la primera falange. No se observan núcleos de osificación de aspecto radiopaco en los huesos carpianos, tarsianos y sesamoideos.

(I) Edad gestacional (280 días)

Diafanización

La aplicación de esta técnica en un feto de esta edad y con un peso de 5360 g trajo como inconveniente que la cubierta muscular estuviese demasiado gruesa (Figura 5 H2), para lo cual se tuvo que eliminar manualmente varios paquetes musculares. De esta manera, se pudo facilitar el proceso de aclaramiento. Luego de la tinción se pudo observar una intensa coloración en la mayoría de los huesos craneales, incluyendo a los huesos hioideos. Las vértebras se observan completas, desde las cervicales hasta las coccígeas. Las costillas y esternones se encuentran casi

completas, la escápula muestra la forma característica de la especie. Asimismo, se pudo observar núcleos de osificación de forma semi esférica en las zonas diafisarias de todos los huesos largos. La pelvis se observa completa, excepto en la región de la sínfisis púbica y las carillas articulares con el hueso sacro. Se observa inicio de mineralización en los huesos metatarsianos y metacarpianos.

Radiografía

La imagen radiológica de este espécimen tuvo que ser realizado en dos placas, dado su gran tamaño. Se observa una imagen completamente osificada. Los huesos de aspecto radiopaco muestran una silueta bien definida, de aspecto macizo. La forma de la mayoría de los huesos es prácticamente la descrita para la especie. Es evidente el grado de desarrollo de los dientes incisivos y los premolares (superiores e inferiores) (Figura 5 H1). Las vértebras muestran su silueta completa, incluyendo las apófisis espinosas. Los bordes diafisarios proximal y distal de los huesos largos se encuentran intensamente radiopacos, delimitando la diferencia con las regiones epifisarias, donde es evidente la presencia de un núcleo de osificación de aspecto redondeado, así como en el calcáneo (Figura 5 H3).

DISCUSIÓN

En embriones de 32 días se observó la formación de los miembros torácicos y pélvicos, pero aún no se visualiza la separación digital, similar a lo descrito por Castro *et al.* (2018) en embriones de alpaca, quienes describen la presencia de los dedos entre 30 a 39 días. Los embriones de 32 y 45 días se encontraban aún en etapa muy temprana de desarrollo, por lo que solo estuvieron en la solución de hidróxido de potasio por 5 d, luego de lo cual los especímenes estuvieron muy friables, debiendo realizarse un lavado con agua destilada y una fijación en alcohol 90° por 2 h, como lo recomienda Coronado (2014)

para poder seguir el proceso. No se llegó a observar estructuras teñidas, por lo que se asume la ausencia de mineralización que indique osificación en esta edad, tal como fue observado en fetos ovinos (Cerný, 1990).

En ovejas, Wenham (1980) describió que a los 34 días no se encuentran elementos esqueléticos detectables mediante radiografía, pero a los 41 días pueden observarse ciertos elementos radiopacos en el tórax y miembros anteriores y posteriores, de forma similar a lo observado en alpacas en este trabajo. A los 45 días no hubo estructuras radiopacas, pero a los 60 días ya son visibles ciertos núcleos radiopacos en huesos largos de los miembros anteriores y posteriores y las costillas, lo cual se confirma con la tinción de dichas estructuras con el Rojo de Alizarina, indicando la mineralización de estos (Vigliano *et al.*, 2014).

A los 45 días, el embrión se encuentra en proceso de formación, observándose la separación de los dedos, similar a lo reportado en fetos bovinos de 45 días de edad gestacional (Trujillo *et al.*, 2011); sin embargo, en fetos humanos, la aparición de los miembros es mucho más temprano (28 días), diferencia que se debería al mayor tiempo de gestación de las alpacas (Moore *et al.*, 2002). En general, en este espécimen no se observaron zonas positivas a la tinción de Rojo de Alizarina, indicando que aún no se presentó la mineralización. Asimismo, tampoco se observan estructuras radiopacas en las radiografías, ya que se requiere que los huesos incrementen su densidad gracias a una mineralización gradual (Cerný, 1990).

En fetos de 60 días se observan centros de osificación en huesos largos de los miembros torácico y pélvico, además de un núcleo de osificación en el ilion, siendo similar a lo reportado en cabras, donde los huesos largos del miembro pélvico y el ilion se observan a los 68 días (Parmar *et al.*, 2009), considerando que en la gestación solo dura 5 meses en la cabra, mientras que en la alpaca es de 11

meses (Sumar, 1996); se pudo observar mineralización de las falanges, siendo primero la tercera falange, luego la primera y posteriormente la segunda falange, este patrón de osificación fue observado también en fetos ovinos (Cerný, 1990). La mandíbula presenta mineralización, siendo uno de los huesos tempranamente osificados, de manera similar a lo descrito en ovejas, donde se describe la aparición de centros de osificación mandibular a los 49 días (Ahmed y Mahmood, 2011).

En los especímenes de 100 días es posible observar núcleos de osificación en todas las vértebras y en varios huesos de la cabeza, este patrón de osificación fue descrito también en fetos ovinos por Wenham (1980) a partir de los 48 días, siendo algo más tardío en alpacas, lo cual se puede deber al mayor tiempo de gestación en esta especie (Sumar, 1996). Los huesos del cráneo, así como las costillas se desarrollan más tempranamente que los huesos de las extremidades en general, tal como se puede observar en especímenes de 60 a 100 días y luego en adelante. Esta tasa específica de crecimiento fue descrita también en fetos de venado rojo (*Cervus elaphus*) en donde las costillas y el cráneo se encuentra en avanzado estado de osificación (Wenham *et al.*, 1986), lo cual podría deberse a la necesidad de proteger, tempranamente, órganos vitales como el encéfalo y órganos torácicos, tal como lo sugiere Anzelmo (2015) para el caso del neurocráneo.

A partir de los 118 días en adelante se observa el incremento del área mineralizada en las diáfisis de los huesos largos de los miembros torácicos y pélvicos, lo cual se relaciona al tipo de osificación endocondral (Eynard *et al.*, 2008), donde ocurre el cambio gradual en la composición de los proteoglicanos responsables de la formación del cartílago, tal como fue descrito en bovinos por Buckwalter y Rosenberg (1983). Este desarrollo es gradual a medida que avanza la edad gestacional (Wenham, 1980).

En especímenes de 150 y 165 días es posible observar el desarrollo de mayor número de huesos que presentan mineralización, especialmente en la diáfisis (Trujillo *et al.*, 2011). Asimismo, se observa un núcleo de osificación en el calcáneo, siendo este hueso referencial en la descripción de la osificación fetal en humanos, donde aparece a las 26 semanas (168 días aproximadamente), determinado mediante ecografía transabdominal (Gentili *et al.*, 1984). Se puede observar un incremento gradual y proporcional en la longitud de los huesos largos; sin embargo, el mayor incremento ocurre entre los 220 a 280 días de gestación, lo cual estaría indicando que en esos días se estaría produciendo el mayor desarrollo óseo y fetal en general, similar a lo descrito en ovinos (Mufti *et al.*, 2000); además que este crecimiento está muy relacionado a la edad gestacional, como fue descrito en ovinos, principalmente los metatarsos (Santucci *et al.*, 1993).

A los 150 días se pudo observar la presencia del desarrollo dentario. Los incisivos en formación tienen aspecto radiopaco, mientras que, a nivel de los alveolos premolares se observa la formación de tres premolares, tanto superiores e inferiores y de silueta cónica. En fetos de caballo es posible observar la presencia de tejido dental entre 138 a 140 días y recién a los 146 días se puede ver las cúspides mineralizadas (Soana, 1999).

En los especímenes de 220 y 280 días de edad gestacional, se puede observar un grado muy avanzado de osificación. Las dos técnicas utilizadas revelaron las formas óseas de los huesos más representativos, tales como la escápula y el coxal, los cuales presentan la misma forma de huesos de especímenes adultos, tal como lo describen Izeta *et al.* (2012). Se puede observar las epífisis de los huesos largos en grado avanzado de osificación, lo cual ha sido descrito también en otras especies por Prummel (1987), quien también indica que los huesos como la ulna-radio, metatarsales y metacarpales, aún se encuentran separados, tal como se pudo comprobar en este estudio en fetos de alpaca, donde este

proceso posiblemente ocurre después del nacimiento. Esto posiblemente se fundamenta en que se trata de modificaciones orientadas a mejorar la locomoción de estas especies en espacios abiertos a gran velocidad (Polly, 2007). La fusión de los huesos tarsales y carpales no ocurre en la vida fetal, debiendo terminar su fusión después del nacimiento, tal como fue descrito para cérvidos (Purdue, 1983).

Tal como se observa en la Figura 1, las curvas de largo corporal y peso fetal se comportan de manera ascendente; sin embargo, no muestran una proyección continua, demostrando que el mayor incremento de ambos parámetros sucede en el último tercio de gestación, diferente a lo descrito para otras especies como ovinos y caprinos (Sivachelvan *et al.*, 1995) y en el venado rojo (Wenham *et al.*, 1986).

En términos generales, ambas técnicas permiten observar un patrón de osificación heterocrónico similar; sin embargo, algunas zonas determinadas como mineralizadas mediante la técnica de la diafanización no produjeron imágenes radiopacas consistentes con osificación determinado mediante radiografía, por cuanto estas dos técnicas son complementarias entre sí.

CONCLUSIONES

- Las técnicas de radiografía y diafanización permitieron observar la formación del esqueleto en estadios tempranos del desarrollo fetal de la alpaca.
- La presencia de estructuras osificadas determinadas por radiografía y diafanización se observan a los 60 días, mientras que, a los 45 días, no existen estructuras mineralizadas, por cuanto el proceso de osificación estaría iniciándose entre estas edades gestacionales en la alpaca.

- A partir de los 220 y 280 días de gestación, correspondiendo al tercer tercio de gestación, la mayoría de los huesos presentan marcada mineralización y las formas óseas son compatibles con huesos propios de la especie.
- Ambas técnicas utilizadas son complementarias entre sí para efectos de descripción del patrón de osificación heterocrónica en alpacas.

LITERATURA CITADA

1. **Ahmed NS, Mahmood SK. 2011.** Development of mandible in indigenous sheep fetuses. *Iraqi J Vet Sci* 25: 99-106
2. **Anzelmo M. 2015.** Cambios morfológicos en el neurocráneo humano durante la ontogenia. Tesis Doctoral. Argentina: Univ. Nacional de La Plata. 188 p.
3. **Buckwalter JA, Rosenberg L. 1983.** Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. *Coll Relat Res* 3: 489-504. doi: 10.1016/s0174-173x(83)80028-4
4. **Castro A, Díaz MC, Mendoza-Torres GJ, Llerena-Zavala CA, Ghezzi MD, Barbeito CG. 2018.** Morphology of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos in the first third of pregnancy. *Reprod Domest Anim* 53: 655-666. doi: 10.1111/rda.13155
5. **Cerný H. 1990.** Topographical picture of digit ossification in the sheep in the late embryonic and early foetal period of development. *Acta Vet Brno* 59: 91-99. doi: 10.2754/avb199059030091
6. **Coronado J. 2014.** Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea. Tesis de Magister. Cundinamarca, Colombia: Univ. Nacional de Colombia. 115 p.
7. **Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. 2008.** Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. 4° ed. Buenos Aires, Argentina: Ed Médica Panamericana. 696 p.

8. **Gentili P, Trasimeni A, Giorlandino C. 1984.** Fetal ossification centers as predictors of gestational age in normal and abnormal pregnancies. *J Ultras Med* 3: 193-197. doi: 10.7863/jum.1984.-3.5.193
9. **Han CM, Hurd CD, Kurklis L. 1997.** Diagnóstico por imagen: guía práctica de radiografía y ecografía. Madrid, España: Harcourt Brace. 267 p.
10. **Izeta AD, Labarca R, Srur G. 2012.** Guía osteométrica de camélidos sudamericanos. Argentina: Univ. Nacional de Córdoba. 150 p.
11. **Mead TJ. 2020.** Alizarin red and alcian blue preparations to visualize the skeleton. Ch 17. In: Suneel A (ed). *ADAMTS Proteases: methods and protocols*. Humana Press. 297 p.
12. **Moore KL, Persaud TV, Shiota K. 2002.** Atlas colorido de embriología clínica. 2° ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 284 p.
13. **Mufti AM, Wani GM, Wani NA, Buchoo BA, Khan MZ. 2000.** Prenatal development of ovine fetus. *Small Ruminant Res* 38: 87-89. doi: 10.1016/S0921-4488(00)00139-5
14. **Parmar VK, Patel KB, Desai MC, Mistry JN, Chaudhary Sandhya S. 2009.** Radiographic study on first appearance of ossification centers of bones in the goatly fetuses: the pelvic limb. *Ind J Field Vet* 4: 6-10.
15. **Polly PD. 2007.** Limbs in mammalian evolution. In: *Fins into limbs: evolution, development and transformation*. Chicago, USA: University of Chicago Press. p 245-268.
16. **Prummel W. 1987.** Atlas for identification of foetal skeletal elements of cattle, horse, sheep and pig Part. 2. *Archaeozoologia* 1: 11-42.
17. **Purdue JR. 1983.** Epiphyseal closure in White-Tailed deer. *J Wildlife Manage* 47: 1207-1213.
18. **Pryse-Davies J, Smitham JH, Napier KA. 1974.** Factors influencing development of secondary ossification centres in the fetus and newborn. A postmortem radiological study. *Arch Dis Child* 49: 425-431. doi: 10.1136/adc.-49.6.425
19. **Raudales IR. 2014.** Imágenes diagnósticas: conceptos y generalidades. *Rev Fac Cien Med* 11: 35-43.
20. **Rivera GA, García A, Moreno FA. 2015.** Técnica de diafanización con alizarina para el estudio óseo. *Rev Colomb Salud Libre* 10: 109-115.
21. **Romero OJ, Gonzales KA. 2019.** Optimización de la técnica de diafanización y tinción de Piovesana (2014), aplicada para el pez *Gymnocorimbus ternetzi*. *Bol Cient Inst Cienc Básicas Ing* 13: 41-46.
22. **Sandoval D, Téllez J, García A, Rivera G, Moreno S, Moreno F. 2016.** Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de literatura. *Universitas Médica* 57: 1-22.
23. **Santucci VL, Kuller JA, Battelli AF, Laifer SA, Edelstone DI. 1993.** Fetal metatarsal length: an accurate predictor of gestational age and weight in the ovine fetus. *Gynecol Obstet Inves* 35: 76-79. doi: 10.1159/000292669
24. **Sivachelvan MN, Ghali Ali M, Chibuzo GA. 1995.** Foetal age estimation in sheep and goats. *Small Ruminant Res* 19: 69-76. doi: 10.1016/0921-4488-(95)00709-1
25. **Soana S, Gnudi G, Bertoni G. 1999.** The teeth of the horse: evolution and anatomo-morphological and radiographic study of their development in the foetus. *Anat Histol Embryol* 28: 273-280. doi: 10.1046/j.1439-0264.1999.00204.x
26. **Sumar J. 1996.** Reproduction en llamas and alpacas. *Anim Reprod Sci* 42: 405-415. doi: 10.1016/0378-4320(96)01538-2
27. **Trujillo HAG, Alberto MLV, Braga MPB, Will SEAL, Salvadori MLB, Ambrosio CE, Miglino MA. 2011.** Ossificação endocondral em embriões e fetos de bovinos. *Arq Bras Med Vet Zoo* 63: 799-804. doi: 10.1590/S0102-09352-011000400002

28. **Vigliano FA, Gerbasi JR, Piovesana M. 2014.** Diafanización: una técnica que permite la visualización diferencial del cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces. *Rev Arg Histotecnol* 25: 10-14.
29. **Wenham G 1980.** A Radiographic study of early skeletal development in foetal-sheep. *J Agr Sci-Cambridge* 96: 39-44. doi: 10.1017/S0021859600031853
30. **Wenham G, Adam CL, Moir CE. 1986.** A radiographic study of skeletal growth and development in fetal red deer. *Brit Vet J* 142: 336-349. doi: 10.1016/0007-1935(86)90029-1