

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

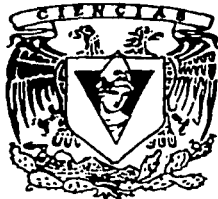
14

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTRUCTURA, COMPOSICION QUIMICA Y ANILLOS DE
CRECIMIENTO DE LA UÑA DE *Kinosternon integrum* POR
MICROSCOPIA DE LUZ Y MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
BARRIDO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
DENISE / ARROYO LAMBAER

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE REYES GASGA
CODIRECTORA: BIOL. JUANA MARGARITA GARZA CASTRO



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

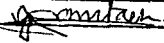
PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Denise Arroyo Lamber

FECHA: Octubre 7, 2003.

FIRMA: ausencia 

A Carol, a mi Abuelo, a Paco y a Leonardo.

A mi mamá por enseñarme a luchar por lo que quiero, a mi papá por enseñarme a soñar, a mis hermanos Alets y Josium por estar siempre conmigo y por hacerme sonreír.

A mis otros hermanos, los Fresnos, en especial a Puity, Callín y Sofía; A Sandra, Nora, Alejandro, Brenda, Aytzín, Erika y Fanny.



A mis abuelos y Sr. Castro

Agradecimientos:

A la Biól. J. Margarita Garza Castro por estar siempre dispuesta a ayudarme y dirigir este trabajo, a la Biól. Adriana González Hernández por su apoyo y revisión de este trabajo. A Sergio Martínez por estar siempre conmigo, por enseñarme y ayudarme tanto en el campo (a tomar datos y a sobrevivir a la lluvia). Al Dr. Victor Hugo Reynoso por su disposición y por dedicarle tanto tiempo a este trabajo, como si fuera para uno de sus queridos alumnitos.

Al Dr. José Reyes Gasga por su dirección, pero sobre todo por ayudarme y recibirme en su laboratorio cuando más lo necesitaba, a Pedro Mexía por enseñarme tantas cosas, mucho más de lo que imaginé, a Carlos Flores por su ayuda constante, y su gran paciencia, a Roberto Hernández y a las muchachas del laboratorio de microscopia electrónica. A Carlos Magaña y Jacqueline Cañetas por todas esas horas "enchufados" en el microscopio.

Al Dr. Fausto Méndez y sus alumnos (Norma, Martha, Belem y Norberto) del IB por prestarme su espacio, tiempo y conocimientos.

A Ana Isabel Bieler y Alejandro Martínez M. del Laboratorio de Microcine de la facultad, quienes amablemente me proporcionaron imágenes e información sobre microscopia.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Larisa, Victor y Nicole por todo su apoyo y amistad incondicional. A Reynis, Paty, Daniel, Israel, Horacio, Jessica, Adrián, Rodrigo, Carmen, Mónica, Jenny, Adris, César y Migue por hacer de esa época de mi vida algo tan especial.

A Lorena, Oscar y Gerardo por hacer que el regreso a la escuela después de tantos meses fuera de lo mejor y por hacerme feliz.

A Israel, Lorenita, Brendis, Lorenita, Wendy, Albertito, Carlitos y J.J. porque sé que siguen ahí.

En especial a mi familia por todo su apoyo y paciencia en mis ratos de mal humor (casi nunca), por servirme de inspiración y por ser lo que más quiero y admiro.



Índice

	Pág.
Resumen	1
1. Introducción	2
1.2 Antecedentes	2
1.2.1 Uñas	2
1.2.2 Técnicas para determinar edad en tortugas	4
1.2.3 Microscopia	10
1.2.4 <i>Kinosternon integrum</i>	11
1.3 Justificación	13
1.4 Hipótesis	13
1.5 Objetivos	14
2. Descripción del área de colecta	15
3. Equipo técnico ó de medición	17
3.1 Microscopio de luz	17
3.1.1 Sistemas iluminación	18
3.2 Microscopio electrónico de barrido	21
3.3 Microanálisis por rayos-X (EDS)	24

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Método	28
4.1 Trabajo de campo	28
4.2 Trabajo de laboratorio (preparación muestras)	31
5. Resultados	37
5.1 Análisis de parámetros morfométricos y anillos de crecimiento en plastrón	37
5.2 Análisis de la estructura de la uña por microscopia	49
5.2.1 Microscopia de luz	49
5.2.2 Microscopia electrónica de barrido	66
5.2.3 Microanálisis por rayos-X	70
6. Discusión	86
Conclusiones	91
Literatura citada	92
Anexo	97

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5

Resumen

Con base en un técnica sencilla que no requiere sacrificar organismos ni causarles mayor estrés, se obtuvieron cortes de las uñas de *Kinosternon integrum*. Los cortes fueron observados por Microscopia de Luz y Microscopia Electrónica de Barrido, obteniéndose la estructura de la uña y su composición química por medio del microanálisis por dispersión de energía de rayos X característicos.

La terminación de la falange es en forma de v. Está rodeada de queratina, por debajo de la cual se encuentra la capa germinativa y luego el hueso, observándose tres estructuras.

El microanálisis indicó que la queratina está formada de C, O, N, H y S y el hueso de C, O, Ca, P y Si, tal como se esperaba. Con ayuda de las concentraciones del Ca y P, se obtuvo un fosfato de calcio, probablemente hidroxiapatita.

No se observaron anillos de crecimiento en uñas, ni tampoco en la parte de hueso. La única estructura queratinizada que presentó anillos de crecimiento fueron la láminas del plastrón. Se relacionó el tamaño, largo, ancho y alto de caparazón, largo y ancho de plastrón y largo y ancho de la cabeza contra anillos de crecimiento. Se obtuvo una relación estrecha entre ancho y alto del caparazón y el número de anillos. El coeficiente de correlación para ancho del caparazón contra anillos de crecimiento en plastrón fue $r = 0.75$, $p < 0.05$ y para alto del caparazón fue $r = 0.90$, $p < 0.05$, entonces puede decirse que a medida que aumenta ancho y alto, también aumenta el número de anillos. Por otra parte el coeficiente de correlación de largo del caparazón contra anillos fue $r = 0.36$ para machos y de $r = 0.74$ para hembras, y largo plastrón contra anillos fue $r = 0.30$ para machos y 0.61 para hembras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Introducción

Existe poca información acerca de la estructura, la composición y los anillos de crecimiento en uñas de tortugas de agua dulce. Esta información es muy generalizada para reptiles en cuanto a la estructura de las uñas, pero no hay nada en cuanto a su composición química.

Con los anillos de crecimiento en uñas, podría aproximarse o determinarse la edad de un reptil (Zug, 1991). Una técnica ideal para la determinación de edad podría ser aquella que no cause estrés o mortalidad para los individuos, especialmente viejos, que sea válida para todas las clases de tallas y edades, y esté basada en una estructura claramente reconocible, que es permanente a través de la vida del individuo. El uso de uñas podría satisfacer éstos requerimientos para la estimación de edad en tortugas (Thomas, et al. 1997).

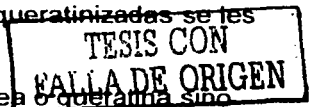
La relevancia de la determinación de edad no sólo reside en la necesidad de conocer cuanto vive un organismo, sino también la edad de importantes eventos de vida (Zug, 1993). La determinación de edad de los individuos es importante para obtener información acerca de mortalidad, longevidad y otros aspectos de historias de vida y dinámica de poblaciones tales como edad a la que se alcanza la madurez sexual, rangos de crecimiento, etc. (Russell, et al. 1996).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Uñas

En el extremo de los dedos de los amniotas encontramos estructuras dérmicas queratinizadas llamadas garras o uñas, que crecen continuamente hacia fuera a partir de una capa germinativa, y su extremo distal es asiento de desgaste continuo. Por debajo de la uña o del extremo de la uña se encuentra una capa más blanca y menos córnea, que forma el tejido subungular (Romer y Parsons, 1987). A estos elementos terminales que portan estructuras queratinizadas se les llama falange ungual (Romer, 1997).

En este estudio el término "uña" no sólo abarca la parte córnea o queratina sino



Zug (1991) sugiere que, ya que las uñas crecen continuamente a través de la vida y además el crecimiento está afectado por factores ambientales, podría esperarse la formación de capas de crecimiento estacionales. En el estudio realizado por Thomas et al. (1997), se determinó la edad en *Trachemys scripta* y *Deirochelys reticularia* por medio del conteo de anillos de crecimiento en uñas. Se estudiaron tortugas de edad conocida así como de edad no conocida, capturados en Savannah River al sur de California. Desde 1967 todas las tortugas capturadas, incluyendo crías, han sido marcadas, estimándose sus edades por conteo de anillos en plastrón.

Los anillos de crecimiento fueron descritos como líneas concéntricas translúcidas rodeando continuamente en la mayor parte del corte. Los cortes mostraban zonas translúcidas angostas separadas por zonas anchas opacas, y ésta secuencia se repetía desde la región central (subunguis) hasta la extremidad distal (Fig. 1.1).

La uña crece por formación de nuevas capas junto al subunguis, empujando progresivamente las capas más viejas hacia la periferia. El 47% de estimación de edad estuvo en concordancia con las edades conocidas.



Fig. 1.1 Anillos de crecimiento en la uña de *Trachemys scripta* (Tomado de Thomas et al. 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La relación de correspondencia entre la edad real y la estimada por cortes de uñas para *T. scripta* y *D. reticularia* sugieren que los anillos de crecimiento en uña pueden ser usados para una estimación exacta de edad en individuos jóvenes de dichas especies. La presencia de cerca de 14 distintos anillos de crecimiento sugiere que su formación continúa más allá de la edad a la cual se alcanza la madurez, si la tortuga crece lentamente. Esto puede ser una ventaja sobre técnicas de determinación de edad basadas en el conteo de líneas de crecimiento en plastrón por la dificultad para reconocer zonas de crecimiento en tortugas maduras.

La técnica para estimar la edad por medio de la uñas proporciona un método sencillo con un número de ventajas sobre otras estructuras utilizadas para aproximar la edad de tortugas; por ejemplo, los anillos en uñas pueden no ser expuestos al grado de desgaste ambiental que ocurre en los escudos plastrales (por lo menos en algunos hábitats) y puede proporcionar un registro de edad más precisa. Las uñas están presentes en especies que no tienen escudos plastrales tales como las tortugas de concha blanda (*Trionyx* y *Apalone*), y las garras permiten muestreo no destructivo de poblaciones de tortugas.

1.2.2 Técnicas para determinar edad en tortugas

De acuerdo con Zug (1991), la determinación de edad en tortugas se puede realizar por diversas técnicas:

-Muestras de edad conocida

- Marca-recaptura
- Criando en cautiverio

-Medidas de talla como sustituto de edad

- Longitud y masa del cuerpo
- Masa de lentes del ojo

-Marcas de crecimiento para la determinación de edad

- Zonas de crecimiento en escudos
- Garras



- Esqueletocronología
- Estimación de edad a través de modificación de estructuras
 - Desgaste de escudos
 - Cambios esqueléticos
 - Cambios en coloración

La técnica marca-recaptura es el único método para determinar exactamente la edad actual de los individuos. Con esta técnica puede determinarse la edad sólo con el seguimiento de un organismo desde su nacimiento al tiempo en que se determina su edad o hasta su muerte. Generalmente, estos estudios empiezan con la captura de organismos juveniles y adultos, los cuales se marcan y liberan. Con una correcta planeación, los nidos pueden ser localizados y señalados para así marcar las crías antes de que se dispersen. De esta forma los datos merísticos pueden seguirse en la siguiente temporada conforme aumenta la edad y las historias de vida dependen de la repetición de las recapturas.

Cuando se cría en cautiverio, también se da un seguimiento del animal desde su nacimiento hasta su muerte. Los huevos son recogidos cuando son depositados e incubados artificialmente o las crías son colectadas al momento que emergen del nido. Se mantienen en condiciones totalmente artificiales o en encierros semi-naturales y de igual forma son marcados registrándose diferentes clases de edades, tallas, etc. El principal problema con esta técnica es el clima que modifica y los datos de tallas e historias de vida ya que los animales en cautiverio, podrían, por ejemplo, alcanzar la madurez sexual en diferentes tiempos que en la naturaleza.

Para las medidas de talla como sustitutos de edad, se emplea la longitud y la masa del cuerpo: mientras una tortuga crece, su longitud y masa incrementan en forma directamente proporcional a su edad. Esta asociación directa del incremento de la talla con la edad puede permitir la sustitución de una medida del cuerpo por la edad en aquellas situaciones donde no hay otra forma para obtener una estimación de la edad real. Si la talla y la edad están relacionadas, una fórmula o tabla de crecimiento puede ser usada para estimar las edades de todos los individuos de la población.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También se puede usar el peso de la masa de lentes, ya que los lentes del ojo crecen continuamente, pero este crecimiento no es continuo a lo largo de la vida del animal. Debido a su posición única, los lentes experimentan un pequeño desgaste y constantemente ganan masa incrementando en diámetro. Este método como estimador de edad es poco probado en reptiles, siendo más bien utilizada en mamíferos. La masa de los lentes puede ser analizada de la misma forma que las medidas de talla del cuerpo. Sin embargo, la clave en estudios en mamíferos ha sido el desarrollo de curvas de masa-edad; a partir de esta curva, la edad de un animal puede ser estimada una vez que se determina la masa de sus lentes.

Las marcas de crecimiento como estimadores de edad se usan en zonas de crecimiento como son los escudos. Los escudos epidérmicos proveen un registro externo visible de las secuencias de crecimiento de los individuos, ya que el crecimiento del escudo responde a cambios estacionales produciéndose un nuevo escudo durante cada temporada de crecimiento. Esta periodicidad puede ser usada como mecanismo estimador de edad. La mayoría de estudios sobre crecimiento de escudos han sido en tortugas de zonas templadas y se asume que se forma un escudo por año, por consiguiente el número de escudos es igual a los años de vida (Fig.1.2). Sexton (1959) fue uno de los primeros en utilizar los anillos de crecimiento en plastrón para estudios demográficos en *Chrysemys* (Fig. 1.3).

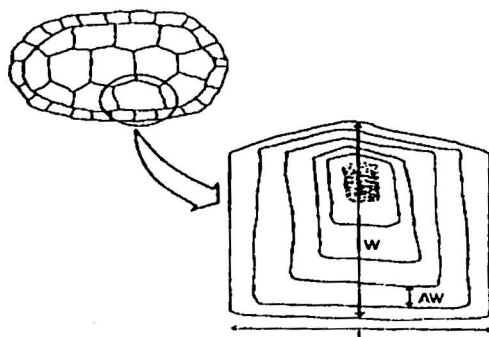


Fig. 1.2 Marcas de crecimiento en caparazón (Tomado de Germano, 1988).

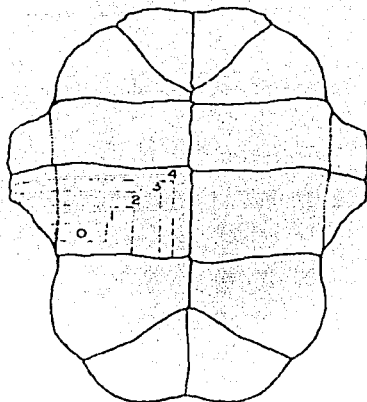


Fig. 1.3 Marcas de crecimiento en plastrón lámina derecha (Tomado de Sexton, 1959).

La estimación de edad puede complicarse debido a modificaciones estructurales, como por ejemplo el desgaste de escudos. Existen algunas especies de tortugas que no mudan sus escudos y están sujetos a constante abrasión y desgaste que causa la pérdida gradual de los primeros escudos y eventualmente de todas las marcas de crecimiento.

Otro método es por cambios esqueléticos. Cada elemento esquelético o unidad esquelética cambia en forma, estructura o talla mientras el animal crece o envejece. La morfología específica en esta secuencia de cambios puede estar asociada con eventos fisiológicos/endocrinos, por ejemplo utilizar el alcance de la madurez sexual como estimador de edad.

Finalmente los cambios en coloración, en donde los patrones son frecuentemente distinto en los diferentes estadios de vida de una tortuga y ofrecen diferente información para la determinación de edad y sexo. Todavía ninguno de estos cambios específicos ha sido asociado con datos de edad, sin embargo, si han sido asociados con datos de sexo y clases de tallas. El color y los cambios en patrones ocurren usualmente cuando los individuos están activos reproductivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una de las técnicas más usadas para la estimación de edad en reptiles es la esqueletocronología. Esta técnica deriva sus estimaciones de edad en el crecimiento cíclico del esqueleto (Parham y Zug, 1997). Un elemento esquelético crece a través del depósito de nuevo hueso en su superficie exterior. Este crecimiento periostio responde a cambios estacionales y produce capas en el hueso que muestra periodos de crecimiento y periodos donde no hay crecimiento. El uso de esta técnica requiere tortugas muertas, pero en otros reptiles, las capas de periostio han sido encontradas en falanges. En tortugas sólo húmero, fémur y huesecillos escleróticos demuestran diferentes capas periostias y permiten su conteo. La preparación histológica requiere descalcificación, los cortes pueden obtenerse con navaja de afeitar (no recomendable), con criotomo o con microtomo convencional, y se tiñen con hematoxilina de Ehrlich ó Harris. Para la estimación de la edad, las marcas de crecimiento son contadas y medidas, ya que cada ciclo de crecimiento se supone representa un intervalo de tiempo específico y no variable, por ejemplo, un año en tortugas de zonas templadas (Zug, 1991).

En un estudio realizado por Zug y Rand (1987), en donde se aplica la técnica de esqueletocronología en iguana verde (*Iguana iguana*) se reportan tres supuestos básicos: 1) hay un periodo de crecimiento activo, seguido por un periodo de detención, dejando marcas cíclicas distinguibles en el hueso; 2) cada una de estas marcas indican un año de crecimiento; 3) donde estas marcas se han perdido debido a la "remodelación" del hueso, el número de anillos perdidos puede ser estimado a partir de la cantidad y dimensión de las marcas que quedan.

La determinación de edad por esqueletocronología ha sido confiable en anfibios y reptiles que habitan en áreas que presentan una drástica variación estacional y climática. La alternancia de estaciones induce el crecimiento discontinuo a lo largo de la vida de un individuo y puede ser observado por líneas de detención de crecimiento (Guarino, 1998). La periodicidad en el crecimiento es revelado en la histología del hueso con zonas anchas y menos densas asociadas a periodos de crecimiento rápido, y zonas angostas y más densas llamadas annuli (Fig. 1.4) asociadas con periodos de disminución de crecimiento (sensu Peabody, 1961). Estos últimos periodos están manifestados en capas distintivas de incremento de

densidad conocidas como Líneas de Detención de Crecimiento (LDG) (Castanet, 1978; Wake y Castanet, 1995; Guarino, 1998; Duarte y Carrera, 2000) y en algunas especies este ciclo ocurre una vez al año (Russell, et al. 1996).

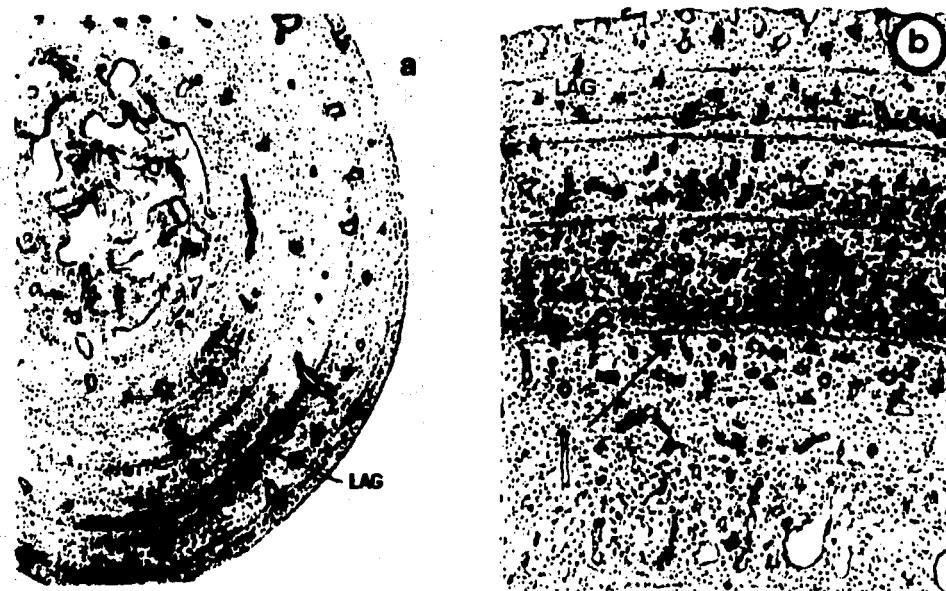


Fig. 1.4 a) Corte de húmero de *Testudo hermanni*, teñido con hematoxilina de Ehrlich, donde se observan LDG's (x 33). b) Corte de fémur de *Geochelone gigante* teñido, se obtuvieron LDGs en hueso vascularizado. (x 55) (Tomado de Castanet, 1994).

En las técnicas de esqueletocronología, aplicadas exitosamente para la determinación de edad en tortugas, es necesario sacrificar al animal; en cambio con la técnica usada por Thomas, las uñas son removidas fácilmente sin requerir el sacrificio de la tortuga y la preparación de las uñas no requiere de técnicas ni equipos complejos. Las técnicas para la preparación, cortes y observación no requieren preservación, descalcificación, tinción ni otras técnicas. Se observó que no es necesario remover las uñas desde su base, ya que los anillos más fácilmente leídos se encuentran en secciones tomadas cerca de la mitad de la uña. Las uñas que son removidas desde su base no vuelven a crecer.

1.2.3 Microscopia

La microscopia ha sido una herramienta de gran utilidad en la observación de líneas o marcas de crecimiento. La microscopia de luz podría decirse que es fundamental para la observación en técnicas de determinación de edad como son esqueletocronología (Castanet, 1981; Nouria et al., 1982; Castanet 1986; Castanet, 1994; Bjorndal et al., 1998; Heather y Gregory, 1998; Duarte y Cabrera, 2000; de Buffrénil y Castanet, 2000), así como el conteo de marcas de crecimiento en estructuras queratinizadas como caparazón (Germano, 1992) y uñas (Thomas et al., 1997). Un buen ejemplo para ilustrar el uso y la importancia de la microscopia son los trabajos realizados por Germano (1992) y Castanet (1994); Germano (1992), usó microscopia de luz, para realizar observaciones de fragmentos o secciones de caparazón y hueso para determinar edad en *Gopherus agassizii* y así establecer longevidad y relación entre edad y talla (Fig. 1.5). Castanet (1994) mediante el uso de microscopia de luz (luz reflejada y transmitida), reconoció tres categorías de marcas de crecimiento en huesos de reptiles similares en otros vertebrados. Primero, las capas opacas corresponden a un periodo de crecimiento rápido; son negras al observarse por luz transmitida y blancas en luz reflejada; luego, los "anulli" o anillos son las capas angostas adyacentes a las capas opacas y corresponden a un periodo de crecimiento lento; son blancas en luz transmitida y negras en luz reflejada; finalmente, las líneas de detención de crecimiento (LDG), representan detención temporal de crecimiento local o general, siempre son muy delgadas, más translúcidas y bajo luz polarizada aparecen como estructuras brillantes.

La microscopia electrónica es menos usada. Castanet (1981) realizó un estudio de líneas cimentantes en hueso basando sus observaciones en el microscopio electrónico de transmisión.

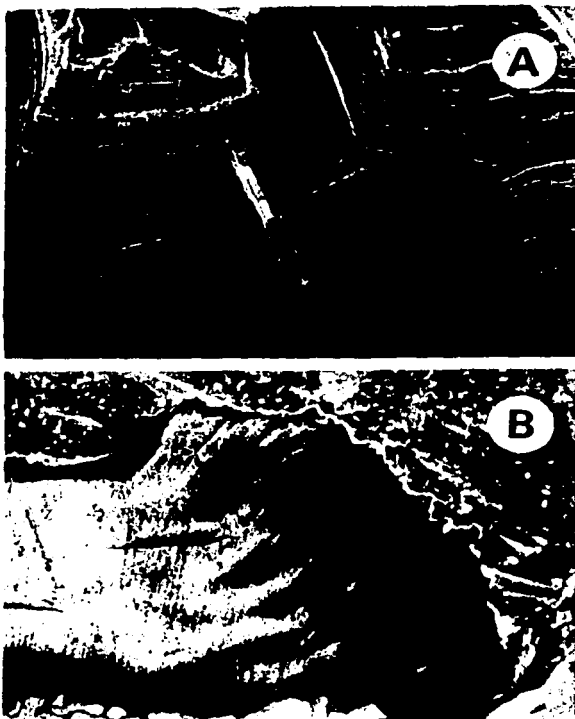


Fig. 1.5 Caparazón de *Gopherus agassizii* A) Escudos epidérmicos B) Cuando se observa por microscopia de luz (x 40), se revelan líneas de crecimiento adicionales (Tomado de Germano, 1992).

1.2.4 *Kinostemon integrum*

Kinostemon integrum o tortuga de agua (Fig. 1.6), llega a medir 250 mm o más. El caparazón es oval, y el plastrón presenta dos escudos llamados chamelas que permiten movimientos para que el plastron se cierre cuando la cabeza y los miembros del animal se esconden o retraen en el interior. La cabeza es larga con un hocico pronunciado. La coloración del caparazón es café oscuro, el plastron y el puente son amarillos con las uniones negras. La parte dorsal y los lados de la cabeza son café grisáceos con motas claras. El color de las extremidades anteriores y posteriores es café gris. La mandíbula es amarilla presentando barras pequeñas oscuras, los machos presentan con pico córneo y con barras y tiene hasta seis papilas (pequeña protuberancia parecida a barbas) en el mentón. La

cola también tiene papilas. El caparazón cuenta con 11 escudos marginales (Ernst y Barbour, 1989; Ramírez-Bautista, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 1.6 *Kinosternon integrum*. Puede observarse el color del caparazón, un hocico pronunciado, así como el tamaño de las uñas (Fotografía de Pedro Arias).

Habita en selva baja caducifolia, vegetación riparia, en los alrededores y cuerpos de agua, charcos, pozos, e inclusive en arroyos donde hay basura. Son diurnas y acuáticas. Se alimentan de semillas, hierba, arácnidos, frutos y algunos moluscos. Son ovíparas y al menos en Nuevo Urecho, Michoacán tienen más de una camada al año (González, 1999).

Tiene una distribución bastante amplia en ambientes húmedos de México, desde el norte de Sonora por todo el Pacífico hasta Oaxaca, entrando a la parte central de México y al estado de Veracruz (Ramírez-Bautista, 1994).

1.3 Justificación

Es necesario tener más información de uñas de tortugas en cuanto a su composición, estructura y anillos o marcas de crecimiento, aportando para la aplicación en las técnicas de determinación de edad. Existen varios trabajos acerca de estimación de edad en tortugas marinas, pero el número se reduce cuando se habla de tortugas de agua dulce y más aún cuando se habla de estimación de edad por medio de anillos de crecimiento en uña en tortugas de agua dulce. Existe un trabajo de estimación de edad usando uñas para dos especies de tortugas de agua dulce, *Trachemys scripta* y *Deirochelys reticularia*. Probar esta técnica en otra tortuga como es *Kinosternon integrum* resulta de gran importancia ya que probablemente está bajo diferentes condiciones pero además pertenece a un grupo taxonómico diferente. Al conocerse o aproximarse la edad de los organismos, pueden estimarse factores como por ejemplo, a que edad alcanzan la madurez sexual. La importancia de este estudio también reside en el uso de una técnica sencilla que no requiere sacrificar animales ni causarles mayor estrés.

El estudio por microscopia electrónica de barrido (MEB) y la obtención de la composición química por espectroscopia de dispersión de energía de los rayos X característicos generados (EDS) son una de las pocas técnicas que se han usado en este tema.

1.4 Hipótesis

La estructura y composición química de la uña de *Kinosternon integrum* puede estudiarse tanto por microscopia de luz como por microscopia electrónica de barrido. Con una técnica de preparación sencilla y estos dos tipos de microscopia podrán observarse anillos de crecimiento en uñas; ya que algunas estructuras queratinizadas, como son la cubierta de caparazón o plastrón, presentan marcas de crecimiento, se esperaría encontrar anillos de crecimiento en otras estructuras queratinizadas como las uñas.

Con base en que los anillos de crecimiento en uña pueden tomarse como estimadores de edad, y que cada anillo representa un año de vida, puede decirse que existe relación entre los anillos de crecimiento y medidas morfométricas, como por ejemplo largo caparazón y largo plastrón. Existe relación entre la edad y la talla corporal, teniendo una relación directamente proporcional: a mayor edad, mayor tamaño corporal, los organismos más grandes serán los más viejos.

1.5 Objetivos

- Realizar una comparación entre anillos de crecimiento en plastrón y parámetros morfométricos
- Mostrar la estructura de la uña de *Kinosternon integrum*
- Obtener su composición química a través del análisis químico por rayos X (EDS)
- Observar anillos de crecimiento y realizar estimación de edad por medio de su conteo

2. Descripción del área de recolecta

Las tortugas se recolectaron en el municipio de Nuevo Urecho, (Fig. 2) que se localiza a 130 km al suroeste de Morelia, Michoacán (coordenadas geográficas 19° 16' 35" de Latitud Norte y 101° 47' 17" y 101° 56' 43" de longitud Oeste). Este municipio presenta una superficie de 236 Km², colinda al norte con el municipio de Taretan y una parte de Santa Clara del Cobre, al sur con la Huacana, al oeste con Ario de Rosales y al oeste con Gabriel Zamora. Se encuentra en las faldas de la Sierra Inauguran que es el parteaguas de la Depresión del Balsas. La variación altitudinal de Nuevo Urecho va de 460 a 2320 m. (INEGI, 1990; Com. Pers. Arias, 1996; citados por González, 1999).

Hidrografía

Lo accidentado del terreno permite la formación de una cuenca que escurre de las partes altas del oeste, sur y norte, formando pequeños arroyos que van tomando diferentes nombres conforme pasan por las diferentes comunidades. Dentro de los ríos principales están: Tomendán o río de la parota, El salado y Tepenahua, los cuales se unen con el Río Cajones que a su vez es afluente del Tepalcatepec, lo que ubica al municipio en una de las cuencas de mayor importancia a nivel nacional en la generación de energía eléctrica, la Cuenca del Balsas-Tepaltepec. Existen otros arroyos que escurren al Río Cajones, algunos de ellos permanentes y otros sólo aparecen durante la época de lluvias, algunos arroyos, escurren hacia el sur para desembocar en la presa de Zicuירán. Muchos otros escurrimientos se presentan en forma de manantiales, lo que ha permitido emplearlos como fuentes de agua potable. Entre los principales manantiales están: Los Otales, El mirador, La Tijana y los de Ichachico (Arias, 1992; citado por González, 1999).

Clima

A grandes rasgos podemos mencionar que los climas presentes en el municipio pertenecen a los grupos Aw'O(w)i que son cálidos subhúmedos con lluvias en verano y agrupa a los subtipos menos húmedos. La precipitación del mes más seco es menor de 60 mm³, con una temperatura media anual de 28.4 °C, y con

una oscilación de entre 5 y 7 °C y una precipitación media anual de 891 mm. Otro tipo de clima que se presenta, pertenece al grupo de los C que corresponde a los climas templados subhúmedos con lluvias en verano (García, 1977).

Un tercer tipo de clima es el BS1 (H')w (w)(i)g, correspondiente a los semisecos cálidos y muy cálidos con lluvias en verano, de precipitación invernal menor de 5% con una temperatura media anual de 27.5°C y una precipitación anual de 739.4 mm (Arias, 1992).

Vegetación

Los tipos de vegetación más representativos en el territorio municipal son: Bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque de encino y bosque mixto de pino-encino, según clasificación de Rzedowski (1978), además se consideraron pastizal introducido, vegetación riparia, cultivos, tanto temporales como permanentes y vegetación secundaria (González, 1999).



Fig. 2 Municipio de Nuevo Urecho, Michoacán.

3. Equipo técnico ó de medición

3.1 Microscopio de luz

Un microscopio es un instrumento que incrementa la resolución por encima del ojo humano (cerca de $150\text{ }\mu\text{m}$ entre dos puntos o líneas). Un microscopio compuesto está constituido por dos o más sistemas de lentes. Algunos microscopios compuestos tienen sólo el mínimo: un objetivo más un ocular (Rochow y Tucker 1994).

En términos generales, el microscopio consta de dos componentes: el óptico y el mecánico. Dentro del componente mecánico encontramos el sistema del mismo nombre que abarca el armazón y sostén del sistema óptico. El componente óptico consta de dos sistemas: el sistema óptico propiamente dicho que incluye objetivos, oculares y condensadores; y el sistema de iluminación.

En cuanto a los objetivos podemos decir que la lente frontal es plano convexa y es la que da la amplificación. Detrás de ésta hay otras lentes para corregir aberraciones ya sean esféricas, cromáticas, etc. En cuanto a la formación de imagen, el objetivo produce una imagen real invertida y amplificada del sujeto.

Los oculares constan mínimo de dos lentes, uno cerca de la imagen primaria formada por el objetivo (lente colectora o de campo) y otra está por encima de esta y es la que transmite la imagen al ojo (lente ocular). Por tanto, el ocular forma una imagen virtual y amplificada de la imagen primaria, lo que ve el ojo es ésta imagen virtual.

El condensador conduce los rayos luminosos procedentes de la fuente luminosa hacia la preparación en la parte enfocada por el objetivo, de modo que el campo visual presenta una iluminación uniforme. Además proporciona al objetivo un cono de luz del tamaño adecuado para la obtención de resultados óptimos en cuanto a la apertura numérica del objetivo. La apertura numérica se puede definir como la propiedad más importante de un objetivo y es la dimensión del cono anular luminoso aceptado por el objetivo. En la parte inferior del condensador está colocado un diafragma iris que controla la apertura numérica del condensador.

El sistema de iluminación está compuesto por una fuente luminosa, un colector o condensador de la lámpara (o un espejo) y un diafragma iris o de campo.

3.1.1 Sistemas de Iluminación (Fig. 3.1)

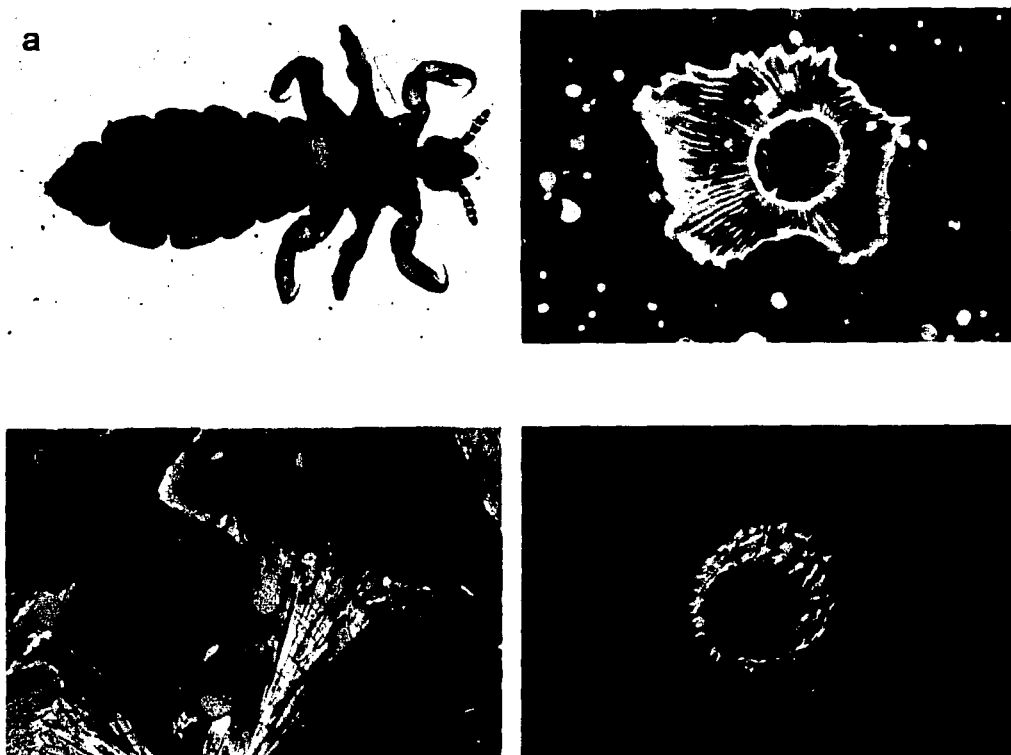
Campo claro.- Este sistema debe su nombre al tipo de imagen que proporciona, en la cual, el objeto resalta sobre un fondo blanco brillante. En su forma más sencilla consta de un condensador transparente, pudiendo ser este el condensador de Abbe o alguna variante de este con cualquier grado de corrección a sus aberraciones. En la mayoría de los casos, los objetivos que se emplean en este sistema son del tipo planático. Los oculares más empleados son los de tipo Huygens. La fuente luminosa es generalmente una lámpara de bajo voltaje; el haz luminoso es reflejado en un espejo plano y enviado al condensador (Arredondo y Martínez, 1978).

Campo oscuro.- Hay muchos objetos que por su transparencia son difíciles de ver con los métodos corrientes de iluminación. En estos casos, es mucho más importante el aumento del contraste entre el objeto y su fondo, que la resolución. En el método de iluminación de campo oscuro se persigue evitar que la luz del condensador llegue al objetivo, de modo que esta falta de luz constituya un fondo oscuro sobre el que resalte el objeto (Casartelli, 1968).

Esta iluminación logra aumentar el contraste entre el fondo y el objeto de una manera muy marcada. Su principio óptico se basa en la formación de un cono hueco de luz cuyo vértice ocurre en el plano del espécimen, que al difractar los rayos luminosos forman las paredes de ese cono. Esta técnica emplea para la formación de la imagen sólo dos rayos difractados por el objeto, por tanto, es bajo el poder de resolución del sistema. El cono hueco formado es de mayor apertura numérica que la del objetivo. Se logra esta iluminación utilizando condensadores parabólicos o cardioides o bien usando el condensador de contraste de fases en posiciones intermedias logradas mediante el giro del revolver de dicho condensador (Arredondo y Martínez, 1978).

Luz polarizada.- Se utiliza para ver actividad óptica de determinados materiales, es decir, sirve para la observación de objetos que cambien el ángulo de polarización de la luz. Su aplicación inmediata es en el ramo de la cristalografía o mineralografía o bien para materiales con orden cristalino que desvíen el plano de luz polarizada; además se produce cromatismo por la interferencia de rayos luminosos plano polarizados. En la marcha de los rayos se intercalan dos agentes polarizantes: un primer polarizador colocado después de la fuente luminosa y debajo del condensador, y un segundo polarizador o analizador colocado después del objetivo y antes del ocular.

Nomarski (contraste diferencial de interferencia).- Se obtiene las interacciones entre dos cursos de luz que previamente fueron polarizados por una placa birrefringente. Se utiliza para objetos de contraste homogéneo, para objetos de escasa diferencia en el índice de refracción. Para este sistema se utilizan objetivos planacromáticos, condensador con prisma de Hollaston (placa birrefringente para separar los haces luminosos), objetivos con otro prisma y un polarizador y un analizador. Los objetos, debido a la polarización y birrefringencia, se ven sin haber sido coloreados con un gran contraste. Se puede además, enfocar diferentes planos y reproducir estas secciones ópticas (Arredondo y Martínez, 1978).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3.1 Sistemas de iluminación, (a) Campo oscuro, (b) Campo claro, (c) Luz polarizada, (d) Contraste diferencial de interferencia (Nomarski) (Fotos: Biol. Ana Isabel Bieler A.).

3.2 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es uno de los más versátiles instrumentos para la examinación y análisis de las características microestructurales de objetos sólidos. La principal razón para el uso del MEB es la alta resolución que puede obtenerse cuando se examinan objetos gruesos. Otra característica importante del MEB es la apariencia en tercera dimensión de la imagen, un resultado directo de la profundidad de campo, así como del efecto sombra-relieve del contraste de los electrones secundarios y retrodispersos que proveen mucha más información acerca del espécimen (Goldstein et al. 1992).

El microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes y datos fisico-químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que traducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor de televisión (Vázquez y Echeverría, 2000). En lugar de observar el objeto por reflexión de fotones se buscan las informaciones de la superficie mediante un pincel delgado de electrones que la barren; pero a diferencia del microscopio fotónico, las partículas utilizadas para formar la imagen o analizar su composición no siempre son de la misma naturaleza (Locquin y Langeron, 1985). La figura 3.2 muestra una comparación del proceso de formación de la imagen entre un microscopio óptico, el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio electrónico de barrido.

Para realizar estas funciones el MEB cuenta con las siguientes partes: a) óptica electrónica, b) cámara del espécimen, c) circuitos de alimentación de la óptica electrónica, de generación de alto voltaje y de producción de barrido, d) detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra, de electrones retrodispersados y otros tipos de electrones, e) dispositivo para observación y registro de las imágenes (Vázquez y Echeverría, 2000).

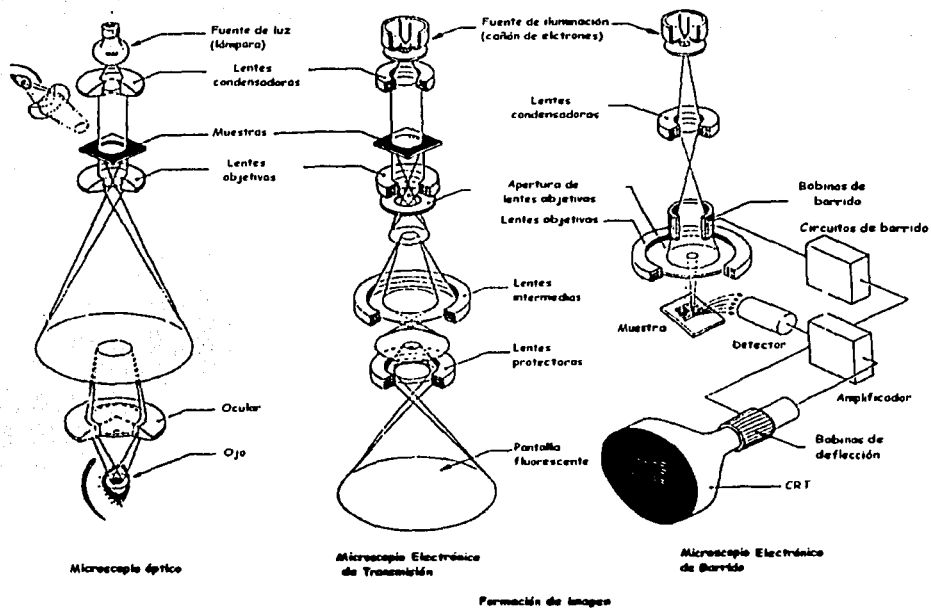


Fig. 3.2 Comparación en el proceso de formación de la imagen entre un microscopio óptico, microscopio electrónico de transmisión y microscopio electrónico de barrido (Tomado de Yacamán y Reyes, 1998).

Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se producen varios tipos de señales, éstas son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos (Yacamán y Reyes Gasga, 1995) (Fig. 3.3).

El principio del microscopio electrónico de barrido, consiste, como en el caso de la televisión, en hacer coincidir punto por punto la superficie de la muestra y de la pantalla fluorescente. Las informaciones son dadas por los electrones secundarios, por los electrones retrodispersados, por los electrones absorbidos y recogidos por captadores apropiados.

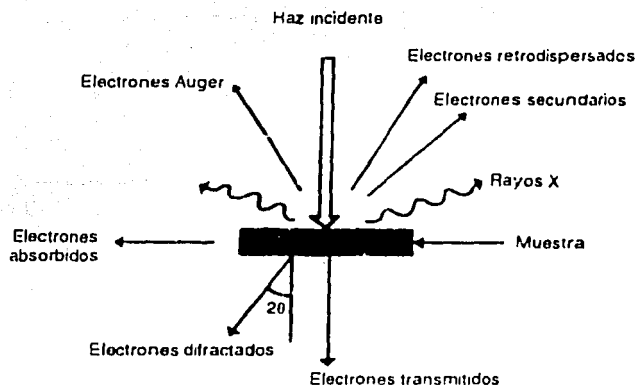


Fig. 3.3 Tipos de señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra (Tomado de Yacamán y Reyes, 1998).

Los electrones secundarios, arrancados de sus órbitas por el bombardeo incidente, no son característicos de la muestra. Permiten formar una imagen completa y no selectiva de tal o cual componente. Una metalización de la superficie del objeto permite mejorar la emisión de electrones equilibrando las tensiones de polarización superficiales y compensando los débiles valores de masa atómica de algunos componentes de la muestra. Los componentes de la emisión secundaria hacen variar el contraste de la imagen. Entre estos componentes, el más importante es el ángulo de incidencia del haz, lo que conduce a la formación de una imagen que da la impresión de relieve, análoga a la que da un microscopio fotónico estereoscópico. El poder de la resolución depende del grosor del haz de barrido y el casi paralelismo de éste asegura una gran profundidad de campo, superior a la del microscopio fotónico para un mismo aumento y con un poder de resolución incomparablemente mayor. El segundo componente está relacionado con la masa atómica de las moléculas bombardeadas, que darán imágenes muy diferentes de los elementos pesados y los ligeros. La imagen de los electrones absorbidos es prácticamente comparable a la de los electrones secundarios más los retrodispersos.

Para metalización de las muestras se deposita una capa de oro, platino, cobre, germanio, o de una aleación oro-paladio o de oro-cobre, que no llegue a sobre pasar los 100 Å. Esta metalización se efectúa directamente sobre la muestra, o tras un recubrimiento previo de carbón, en el caso de que se quiera preservar al máximo la forma, evitando las retracciones. El poder de resolución teórico, tras la metalización es de 200Å a 80 Å (Locquin y Langeron, 1985).

3.3 Microanálisis por rayos-X (Espectro de Dispersión de Rayos X EDS)

El análisis de cualquier muestra comienza por la identificación de los elementos presentes en la misma, es decir, por su análisis cualitativo, salvo si este aspecto es conocido, en cuyo caso el objetivo fundamental es determinar la concentración en la que se encuentran dichos elementos, es decir, su análisis cuantitativo.

El análisis de la muestra puede llevarse a cabo utilizando espectrómetros de dispersión de longitudes de onda (WDS) y de dispersión de energías (EDS). Además, existe un tercer tipo de análisis cualitativo: la imágenes X, en donde el haz electrónico deflectado barre la superficie de la muestra, y la señal que sale del detector se lleva a la pantalla de un osciloscopio en la que se obtiene la distribución espacial de los elementos presentes en la superficie barrida.

En el segundo caso (EDS), la radiación X que emerge de la muestra se recoge en un detector de Si (Li), que opera conectado con un analizador multicanal y un microordenador (Aballe et al. 1996) (Fig. 3.4).

El análisis cualitativo está basado en la capacidad de un sistema espectral para medir líneas de energía características y relacionar aquellas energías con la presencia de elementos específicos. Lo principal es la energía específica de los picos de rayos X característicos para cada elemento. La energía dispersa de rayos X del espectrómetro es una herramienta atractiva para el microanálisis cualitativo (Goldstein et al. 1992).

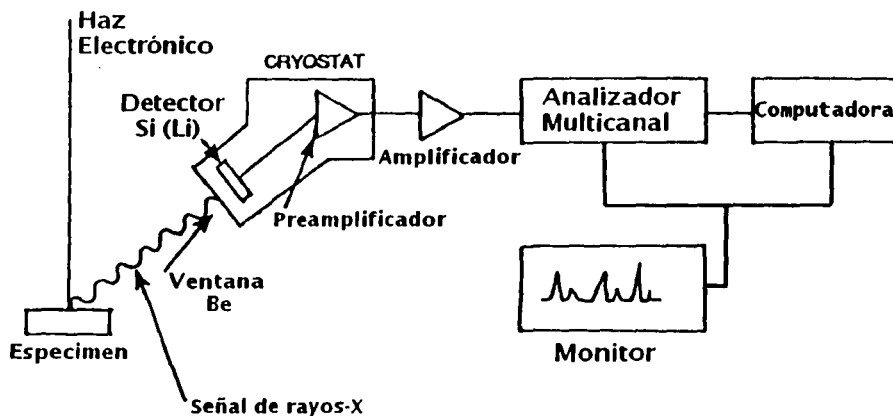


Fig. 3. 4 Principales componentes de un EDS (Tomado de Rochow y Tucker, 1994).

La identificación de los picos se inicia por el más intenso, del que se determina su energía y, por consiguiente, el elemento al que pertenece. A continuación, se deben localizar las restantes líneas de dicho elemento existentes en el espectro, para confirmar su presencia en la muestra.

En el proceso de identificación de un elemento, es de gran ayuda conocer las intensidades relativas de los distintos grupos de líneas. En general, puede establecerse que la intensidad relativa de las dos líneas K es $K\alpha$ (1) y $K\beta$ (0.1), lo que significa que la relación $K\alpha/K\beta$ es aproximadamente 10:1. A su vez, la intensidad relativa del grupo de líneas L es: $L\alpha$ (1), $L\beta_1$ (0.7), $L\beta_2$ (0.2), $L\beta_3$ (0.08), $L\beta_4$ (0.05), $L\gamma_1$ (0.08), $L\gamma_3$ (0.03), $L\delta$ (0.04), y $L\eta$ (0.01), finalmente las líneas M observables tienen la siguiente intensidad relativa: $M\alpha$ (1), $M\beta$ (0.6), $M\gamma$ (0.05) y $M\xi$ (0.06) (Fig. 3.5).

Una vez identificadas todas las líneas importantes de elevada energía del espectro de la región, se pasa a la región de baja energía de éste y se repite el proceso de identificación. A este respecto se deberá tener en cuenta que en esta región, y sobre todo por debajo de 3 keV, la separación de los miembros de las familias K, L ó M es prácticamente imposible, por lo que el número de líneas a examinar será mucho más reducido que en la región >5 keV.

Después de identificar las líneas del espectro que pertenecen a los constituyentes mayoritarios de la muestra, se revisan los picos de menor intensidad, que corresponden a los elementos menores y traza. Dentro de estos, sólo deberán considerarse los que tienen significación estadística: esto es, aquellos cuyas intensidades son tres veces, o más, superiores a la desviación estándar del fondo. Por último, el análisis tiene que considerar los elementos que puedan haber quedado enmascarados por las interferencias. En general, no se presenta ninguna dificultad en la identificación de los elementos mayoritarios de cualquier muestra. Sin embargo, la de algunos elementos minoritarios puede ser problemática, dada la relativa baja resolución de los 130 eV de los EDS (Aballen et al. 1996).

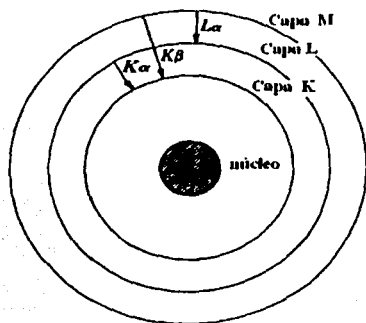


Fig. 3.5 Transición de electrones en un átomo (Tomado de Rochow y Tucker, 1994).

Un ejemplo de espectros de rayos X se muestra en la Figura 3.6. Se trata de un espectro de emisión de una muestra de aluminio al ser excitada por un haz electrónico de 15 keV; aparece un gran pico de emisión de 1.49 keV, que corresponde con la radiación $K\alpha$ del Al. En 2.98 keV se observa un pico S, mucho menor, que resulta ser un pico suma, producido por la llegada simultánea al detector de dos fotones de radiación $K\alpha$, que es interpretada por el equipo como una única radiación de energía doble. Si el operador no advierte el origen anómalo del pico suma S, éste podría ser interpretado como procedente de la

emisión de otro elemento presente en la muestra, por ejemplo, Ag, cuya línea tiene precisamente esa misma energía.

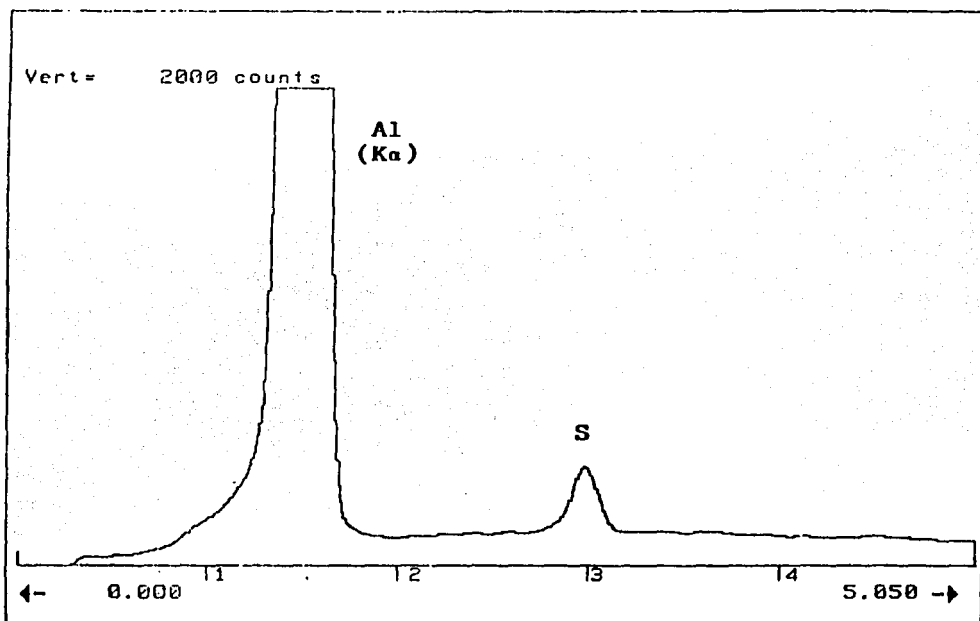


Fig. 3.6 Espectro de una muestra de Al, donde también aparece un pico suma de S (Tomado de Aballe et al, 1996).

Si en lugar del espectro de la Figura 3.6 se obtiene la imagen de electrones secundarios y se le sobrepone la imagen generada por la distribución en el plano de los puntos de donde proviene la señal de rayos X de un elemento dado, se obtiene una imagen de la muestra bajo análisis a la que se le conoce como "mapeo químico". Los mapeos químicos son muy útiles para la identificación de diferentes zonas de la muestra con diferente composición.

FECHA CON
FABRICA DE ORIGEN

4. Método

4.1 Trabajo de campo

Se llevaron a cabo dos salidas de campo en el 2001, la primera del 11 al 15 de mayo, y la segunda del 12 al 16 de julio, obteniéndose 36 tortugas medidas y marcadas. Sin embargo, para este estudio también se tomaron en cuenta los datos de campo obtenidos por la Biol. Margarita Garza y estudiantes del Laboratorio de Vertebrados Terrestres de la Facultad de Ciencias, en los periodos de campo del 25 al 29 de junio, 3 al 7 de julio, 25 al 29 de octubre y 17 al 20 de noviembre de 1997, obteniéndose en total 64 tortugas medidas y marcadas.

Tanto para los datos de 1997 como para los del 2001 se siguió el mismo método en campo. Se colectaron ejemplares manualmente y por medio de una trampa de embudo. Cada organismo capturado se midió, pesó, y se marcó haciendo una muesca en forma rectangular, con ayuda de un pequeño serrucho en los escudos marginales, dividiendo los escudos en derecho e izquierdo y numerándolos del 1 al 11 (Figs. 4.1 y 4.2). También fueron sexados reconociendo el tamaño de la cola, la cual es muy pequeña en hembras y grande en machos (Fig. 4.3). Posteriormente, se llenó una hoja de catálogo, la cual contiene datos merísticos, datos de captura y del colector (ver anexo). Los datos merísticos son, para caparazón: largo, ancho, alto, y que tanto abarca el 1° escudo vertebral; para plastrón: ancho, largo, ancho del puente, longitud gulares, humerales, pectorales, abdominales, femorales y anales. Además, también se midió ancho y largo de la cabeza y largo de la cola. Todas estas longitudes fueron registradas en milímetros utilizando tanto un vernier como una cinta métrica.

En este estudio el término "uña" no sólo abarca la parte córnea o queratina sino también al hueso.

Las uñas fueron removidas desde la base (parte donde termina piel y empieza queratina) con un corta uñas común (Fig. 4.4). En general, se removió la 2ª uña de cualquiera de las dos extremidades anteriores, y en algunas ocasiones, se removieron dos uñas, una de cada extremidad o bien las dos de la misma extremidad. Las uñas fueron depositadas en sobres de papel y engrapadas a la hoja de datos correspondiente.

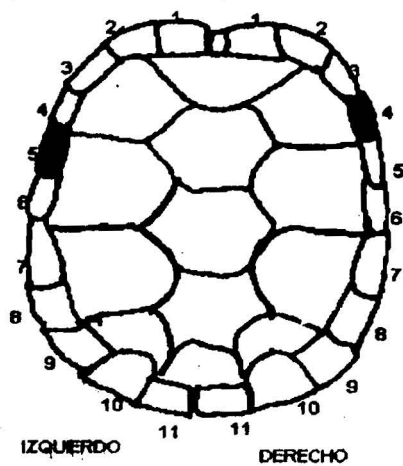


Fig. 4.1 Marcaje de organismos, dividiendo escudos en derecho e izquierdos y numerándolos. (Tomado de Garza y González, 1998).



Fig. 4.2 Marcaje, con un següeta se hace una muesca en los escudos marginales.



Fig. 4.3. Diferencias del tamaño de la cola entre macho (izquierda) y hembra (derecha).



Fig. 4.4 Las uñas fueron cortadas desde su base con un corta uñas común.

HECHO CON
FOLIO DE CEMENTO

Se contaron los anillos o marcas de crecimiento presentes en plastrón, si éstos eran legibles. Se obtuvo el coeficiente de correlación de parámetros morfométricos como largo, ancho y alto caparazón, largo y ancho plastrón y largo y ancho cabeza contra el número de anillos de crecimiento en plastrón.

También se registraron otros aspectos, como por ejemplo, si la tortuga tenía parásitos, la coloración y si presentaba alguna marca en particular, estos con el fin de complementar la información que se tiene de esta especie en esta localidad, así como para estudios posteriores.

Finalmente cada uno de los organismos se liberó exactamente en los sitios donde fueron encontrados.

Para obtener la relación entre morfometría y anillos de crecimiento en plastrón se llevó a cabo un análisis de datos comenzando con una prueba estadística *t* para saber si hembras y machos diferían entre sí para todas las medidas. Posteriormente, se relacionó ancho y alto caparazón, ancho plastrón, y largo cabeza contra anillos de crecimiento para hembras y machos juntos, y largo caparazón, largo plastrón y ancho cabeza contra anillos de crecimiento para hembras y machos por separado.

4.2 Trabajo de laboratorio (preparación muestras)

El análisis de las uñas se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopia del Instituto de Física. En total se realizaron cortes de 20 uñas, 16 de éstas fueron uñas de prueba, es decir, sin hoja de catálogo y las 4 restantes fueron uñas de organismos registrados o con hoja de catálogo. Las uñas fueron preparadas con base en la técnica sugerida por Thomas et al. (1997). Las uñas fueron incluidas en un polímero acrílico de uso odontológico, y para hacer los cortes se utilizó una cortadora con cuchilla de diamante (Cuto 1 Jean Wirtz). Se hicieron cortes transversales de 0.75 mm (Fig. 4.5). Los cortes fueron pulidos con lijas de agua en una pulidora Buehler Miniment. Para empezar a pulir el corte, primero se usó una lija 1200, la cual es más gruesa y áspera y ayuda a eliminar las líneas que quedan al cortar, luego se usó una lija 4000 que es más fina. Finalmente se pulió con paño, usándose sólo agua destilada y en algunas ocasiones, alúmina para obtener pulido espejo.

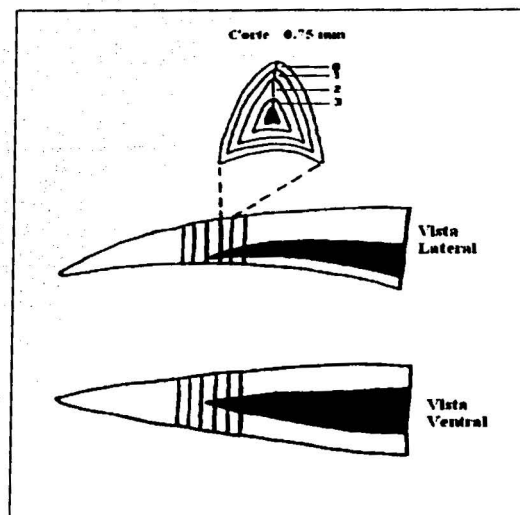


Fig. 4.5 Vista lateral y ventral de la uña. Cortes de .75 mm. (Tomado de Thomas et al. 1997).

Al principio los cortes fueron observados por microscopia de luz (microscopio Axiathec de Zeiss) (Fig. 4.6), con varios tipos de iluminación, como son campo claro, campo oscuro, luz polarizada y contraste diferencial de interferencia (Nomarski). Algunos cortes fueron atacados con ácido fosfórico en diferentes concentraciones, con el fin de revelar las diferentes estructuras en la uña, así como anillos o marcas de crecimiento. Para esto se siguió el mismo proceso. El corte se pulió y en seguida se le agregó el ácido haciendo pruebas de tiempo, ya sea de segundos o minutos según la concentración. En general siempre se usó ácido fosfórico al 10%, 20% y 80% (Cuadro 1). Se fueron tomando fotografías en el microscopio óptico entre periodos de ataque y con diferentes sistemas de iluminación.

Con la idea de ver las muestras a mayor magnificación, y por lo tanto, con mayor detalle en las estructuras, se realizaron observaciones con microscopia electrónica de barrido. Las muestras fueron cubiertas con una capa de oro o carbón y también se dejaron sin recubrir dependiendo del modo de funcionamiento o vacío del microscopio. Se observaron en un microscopio JEOL 5200 y LV-JEOL 5600 (Fig. 4.6) equipado con EDS (NORAN) y se obtuvieron fotografías o imágenes en papel térmico.

Con el fin de revelar u observar algo más en la estructura, se probó la técnica de tinción hematoxilina-eosina, pero esta vez los cortes fueron más delgados de (0.5 a 0.25 mm. y hasta 150µm) y el proceso fue el mismo. La uña se incluyó en acrílico, se cortó, se pulió adelgazándose lo más posible, y finalmente se tiñó siguiendo el tren de tinción OH 100%, OH 96%, OH 70%, OH 50%, agua destilada, hematoxilina, agua destilada, OH 50%, OH 70%, eosina, OH 90% y OH 100%. Algunos cortes fueron atacados con ácido fosfórico antes de ser teñidos, y también fueron observados por microscopia de luz en diferentes sistemas de iluminación, así como por microscopia electrónica de barrido. La tinción resultó ser una herramienta importante al menos para hueso, aunque no se observaron líneas o marcas de crecimiento, fue de gran utilidad para contrastar estructura de las uñas.

Para algunos cortes se probó una técnica de preparación usando glutaraldehído, se aplicó al 2.5 % por 24 horas para fijarlos, posteriormente se atacaron con ácido fosfórico para tratar de notar algunos cambios en la estructura de la uña, tanto en hueso como en queratina, y finalmente se tiñeron (Cuadro 1).

Otros cortes e incluso uñas completas fueron usados para realizarse EDS y mapeo, obteniéndose un análisis químico completo. El microanálisis fue de gran utilidad para complementar la información en cuanto a la estructura y composición de la uñas.

Todo el análisis químico se llevó a cabo por medio de los detectores integrados en el microscopio electrónico de barrido. Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se producen varios tipos de señales como son electrones retrodispersados, secundarios, Auger, transmitidos y rayos X característicos (Yacaman y Reyes, 1995). El MEB cuenta con detectores para estos tipos de señales, incluyendo rayos X, y es con este detector con el que se lleva a cabo el análisis químico. Se realizó un análisis cualitativo donde se identifican los elementos que contiene la muestra, y un análisis cuantitativo, o mapeo, en el que se determina la concentración en la que se encuentran dichos elementos. Para obtener el mapeo, se hace un barrido de la muestra o simplemente de una zona, e indica donde y como se encuentran distribuidos los elementos que nos interesan.

Cortes	Tratamiento			Microscopia
	Ácido	Tinción	Otros	
Cortes gruesos (0.75 mm) y cortes delgados (150 μ m) con o sin cubierta de queratina	x	x	x	Microscopia de luz -Campo claro, campo oscuro, luz polarizada y contraste diferencial de interferencia -Luz transmitida (sólo cortes delgados) y Microscopia electrónica de barrido
	Ácido fosfórico al 10, 20 y 80%	x	x	
	x	Hematoxilina-eosina	x	
	Ácido fosfórico al 10, 20 y 80%	Hematoxilina-eosina	x	
	x	x	Glutaraldehído al 2.5%	
	Ácido fosfórico al 10, 20 y 80%	Hematoxilina-eosina	Glutaraldehído al 2.5%	

Tratamiento	
Ácido fosfórico	Para revelar cambios en estructura, en hueso y queratina
Tinción Hematoxilina - Eosina	Para apreciar características estructurales y aumentar contraste entre estructuras
Glutaraldehído	Para fijar tejidos

Cuadro 1. Resumen de tratamientos y microscopia.

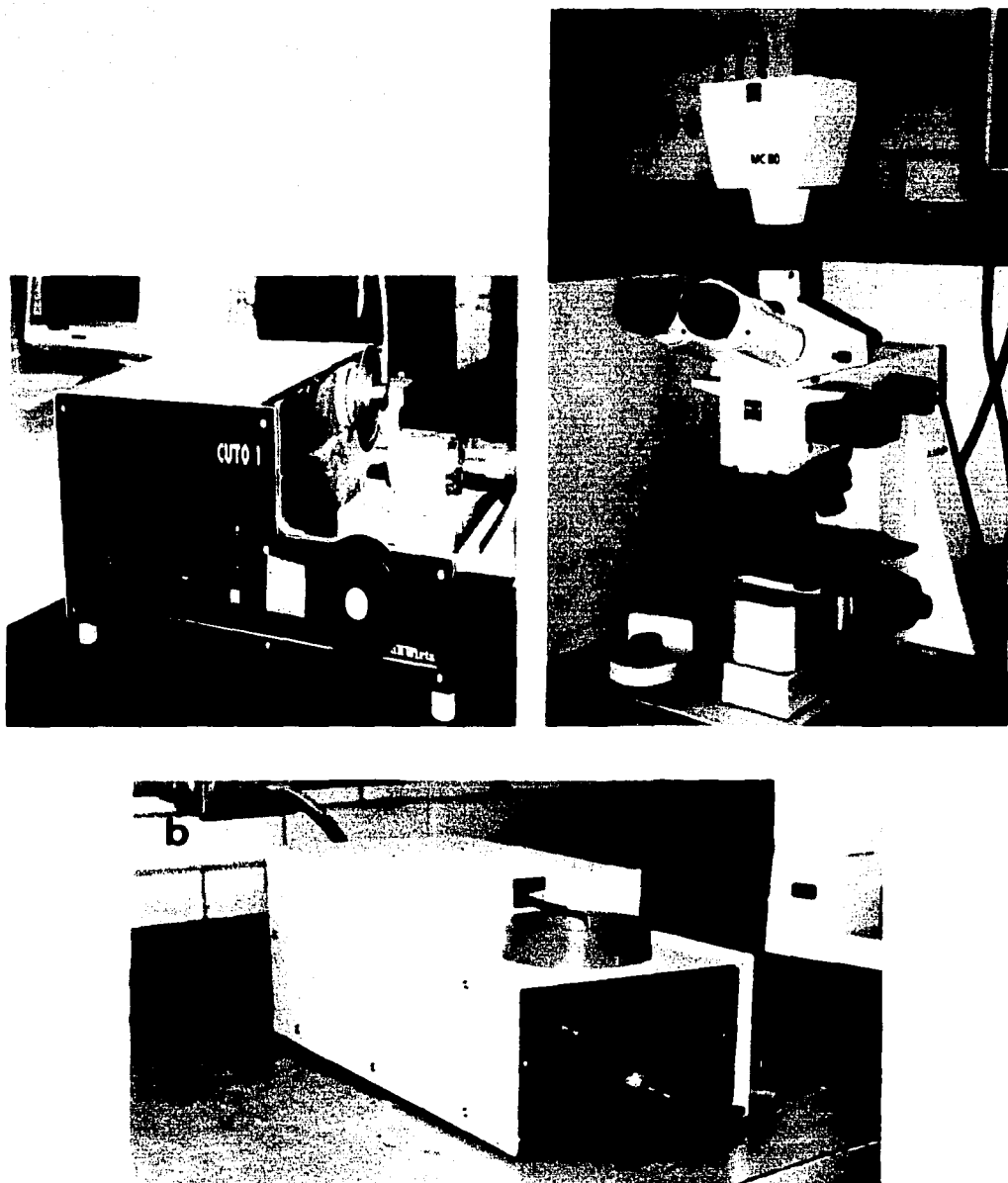
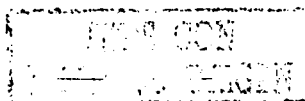


Fig. 4.6 a) Cortadora, b) pulidora, c) microscopio óptico.



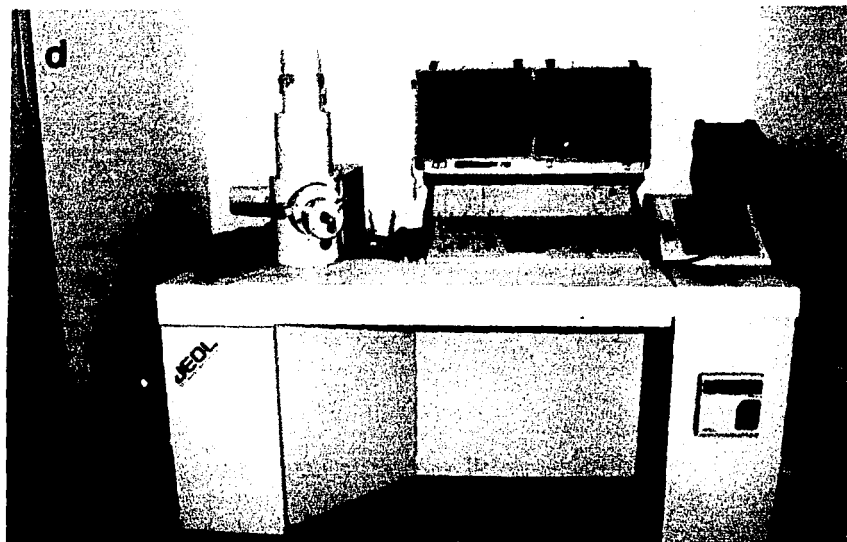


Fig. 4.6 d) microscopio electrónico de barrido JEOL-5200 y e) microscopio electrónico de barrido LV-JEOL 5600.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Resultados

5.1 Análisis de parámetros morfométricos y anillos de crecimiento en plastrón

Se cuenta con un total de 64 organismos capturados o registrados. Treinta y seis de estos fueron capturados durante el trabajo de campo realizado en el 2001, y los 28 restantes fueron capturados durante los trabajos de campo en 1997.

De los 64 datos 38 son machos (59.37%) y 26 hembras (40.62%). Para los machos, el organismo de mayor tamaño presenta las siguientes longitudes: largo caparazón (LC) 195 mm, ancho caparazón (AC) 122 mm, alto caparazón (AIC) 57.5 mm, ancho plastrón (AP) 88.7 mm, largo plastrón (LP) 172 mm, ancho puente (APu): 71 mm, ancho cabeza (ACz) 39 mm, largo cabeza (LCz) 44.5 mm, largo cola (LCo) 31.5 mm, y no se aprecian anillos de crecimiento en plastrón. El de menor tamaño: largo caparazón (LC) 49.8 mm, ancho caparazón (AC) 39.4 mm, alto caparazón (AIC) 17.9 mm, ancho plastrón (AP) 33.2 mm, largo plastrón (LP) 42.9 mm, ancho puente (Apu) 11.9 mm, y no se observan anillos en plastrón.

Por otra parte, para las hembras se encontró que las medidas del individuo de mayor tamaño son: LC 175 mm., AC 91 mm., AIC 65 mm., AP 86 mm., largo LP 155 mm, Apu 45 mm, tampoco se aprecian los anillos de crecimiento en plastrón. Y para la hembra de menor tamaño se tiene: LC 53.3 mm, AC 40mm, AIC 18.9 mm, AP 31.6 mm, LP 45.1 mm, Apu 13.2 mm, tampoco se aprecian anillos en plastrón.

De las 64 tortugas marcadas en campo, sólo 18, 8 machos (21%) y 10 hembras (38%) presentaron marcas o anillos de crecimiento en plastrón (Figs. 5.1 a la 5.3). Al menos en los datos del 2001, se observa que en los organismos de mayor peso, por lo tanto de mayor tamaño corporal, no se aprecian los anillos de crecimiento en plastrón, y es más frecuente encontrar anillos de crecimiento en plastrón visibles, en organismos de menor peso y tamaño. El mayor número de anillos de crecimiento registrados en plastrón fue de 10, y el menor de 3.

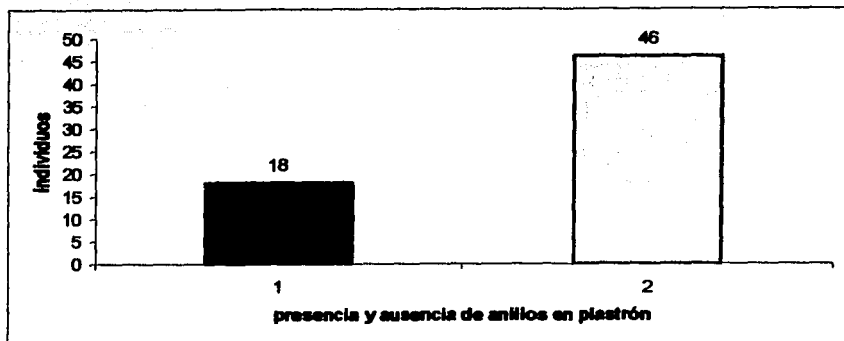


Fig. 5.1 Solo 18 tortugas presentaron anillos de crecimiento en plastrón.

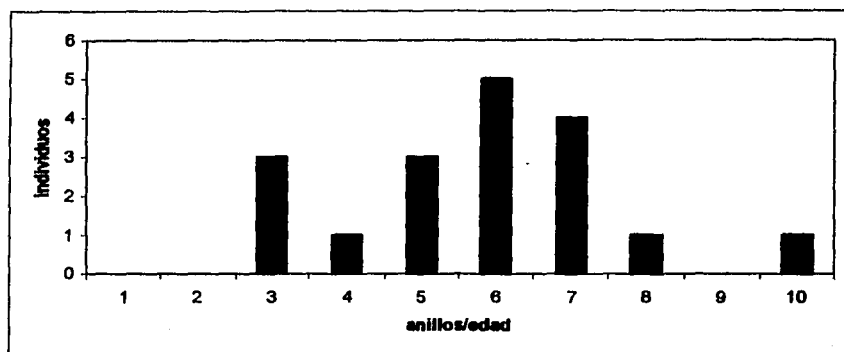


Fig. 5.2 Frecuencia de anillos de crecimiento en plastrón.

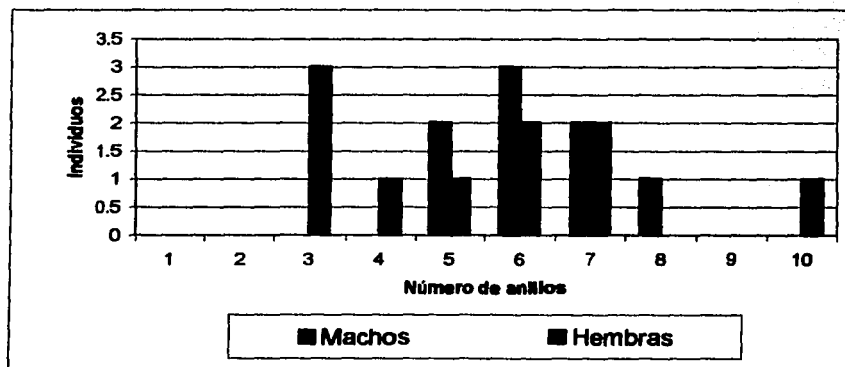


Fig. 5.3 De las 18 tortugas con anillos, 8 fueron machos y 10 hembras.

Los cuadros 2 y 3 muestran los rangos de peso, así como de longitudes que se obtuvieron para los dos muestreos. Podemos observar que para los datos de 1997 el tamaño promedio de LC para machos fue de 158.10 mm y para hembras de 119.9 mm y LP promedio para machos 141.71 mm y 109.18 mm para hembras. Para los datos del 2001 el promedio para LC fue de 165.61 mm para machos y 129.5 para hembras, mientras que para LC fue de 148.66 mm y 122.56 mm para machos y hembras respectivamente.

1997

	Machos			Hembras		
N=28	Rangos	Promedio	Desvest.	Rangos	Promedio	Desvest.
Peso gr.	17.6 - 672	471.34	179.91	20.2-503.5	272.25	182.56
LC mm	49.8 - 180	158.10	29.60	53.3 - 175	119.9	41.34
AC mm	39.4 - 126	97.711	16.975	39.8 - 91.4	75	22.09
AC mm	17.9 - 62.7	54.37	10.23	18.9 - 65	42.6	15.06
LP mm	42.9 - 162	141.71	27.05	45.1 - 155	109.18	39.95
AP mm	33.2 - 114	79.14	16.51	31.6 - 86.8	63.96	20.53
APu mm	11.9 - 68.8	45.40	14.02	11.6 - 62.7	35.5	16.77

Cuadro 2. Rangos de peso y longitudes para los datos de 1997. Para este año, los datos merísticos todavía no incluían medidas de cabeza (ancho y largo) y cola (largo).

N=36	Machos			Hembras		
	Rangos	Promedio	Desvest.	Rangos	Promedio	Desvest.
Peso gr.	297.5-1000	541.35	191.98	60 – 900	342.19	243.80
LC mm	134 – 195	165.61	16.53	71.8 – 173	129.5	32.02
AC mm	89.5 – 122	105.50	8.82	55.9 – 115	87.89	19.67
AC mm	44.6 – 63	54.27	5.77	26.6 – 62.5	46.92	11.50
LP mm	123 – 175	148.66	18.65	63.1 - 172	122.56	34.03
AP mm	49.9 - 110	84.96	10.95	50.7 – 89.9	74.88	14.15
APu mm	45 – 71	59.27	5.95	28.5 – 67.9	50.74	14.27
ACz mm	26.6 – 39.7	33.53	4.61	16.7 – 34.7	25.16	5.80
LCz mm	33 – 58.8	48.11	6.60	21.5 – 50.2	36.60	9.59
LCo mm	13.2 – 42.5	30.4	5.52	8 - 28	16.76	5.76

Cuadro 3. Rangos de peso y longitud para los datos de 2001.

Las Figs. 5.4 y 5.5 muestran los histogramas de frecuencias para largo caparazón (LC) y largo plastrón (LP), para machos y para las hembras se muestran en las Figs. 5.6 y 5.7. En la Fig. 5.4 se observa que los intervalos de clase más frecuentes para LC machos va desde 155 hasta 164 y de 170 a 179 mm.

Para la Fig. 5.5 se observa que el rango más frecuente para LP en machos es de 151 a 155 mm. En cambio para las hembras (Fig. 5.6) el rango con mayor frecuencia LC es de 141 a 145 mm, y LP en la Fig. 5.7 es de 130 a 139 y de 145 a 149 mm. Con esto se ve que en general los machos son de mayor tamaño.

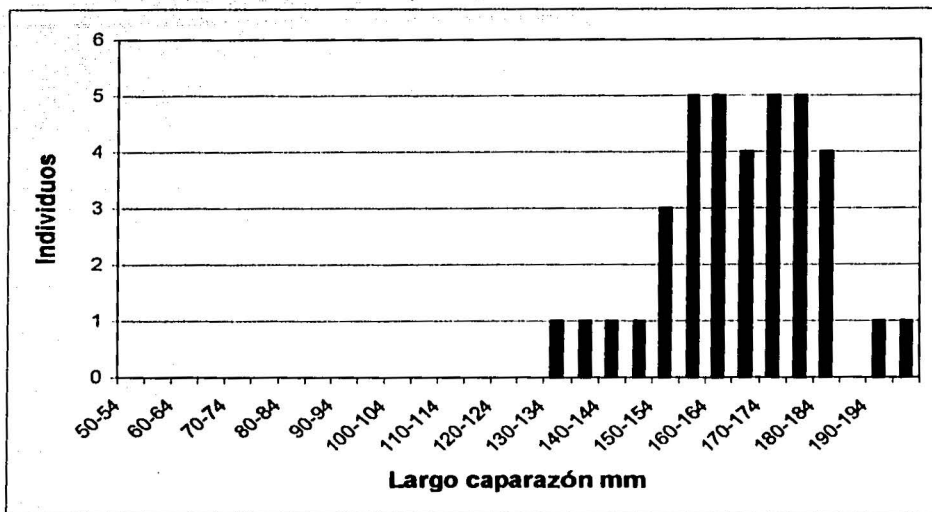


Fig. 5.4 Distribución de frecuencias largo caparazón machos.

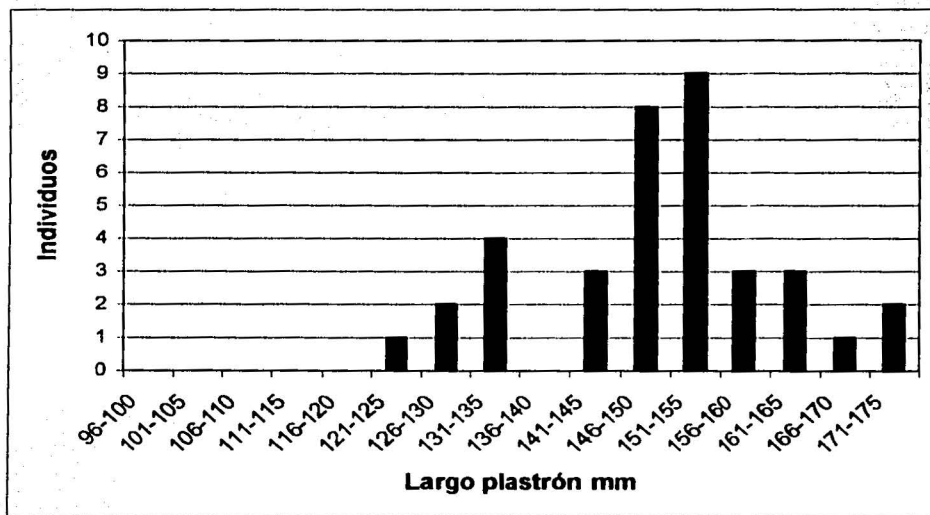


Fig. 5.5 Distribución de frecuencias largo plastrón machos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

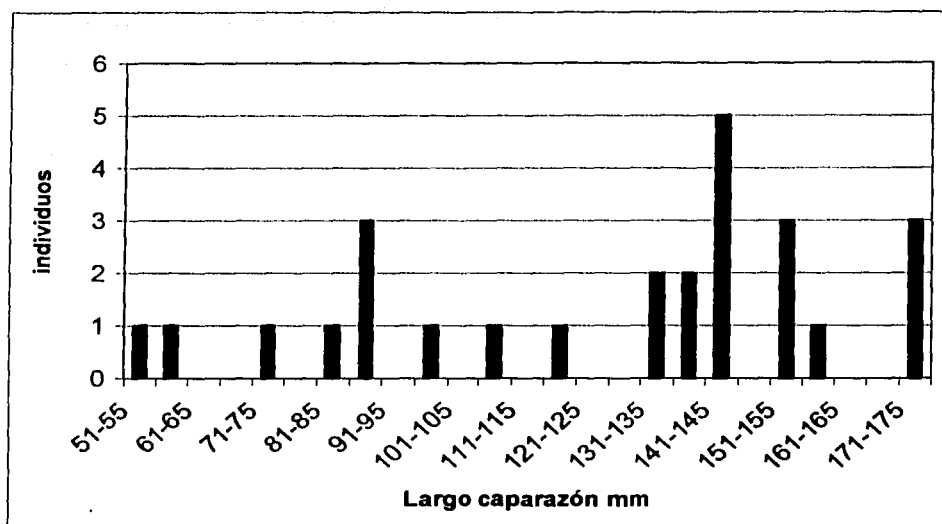


Fig. 5.6 Distribución de frecuencias largo caparazón hembras.

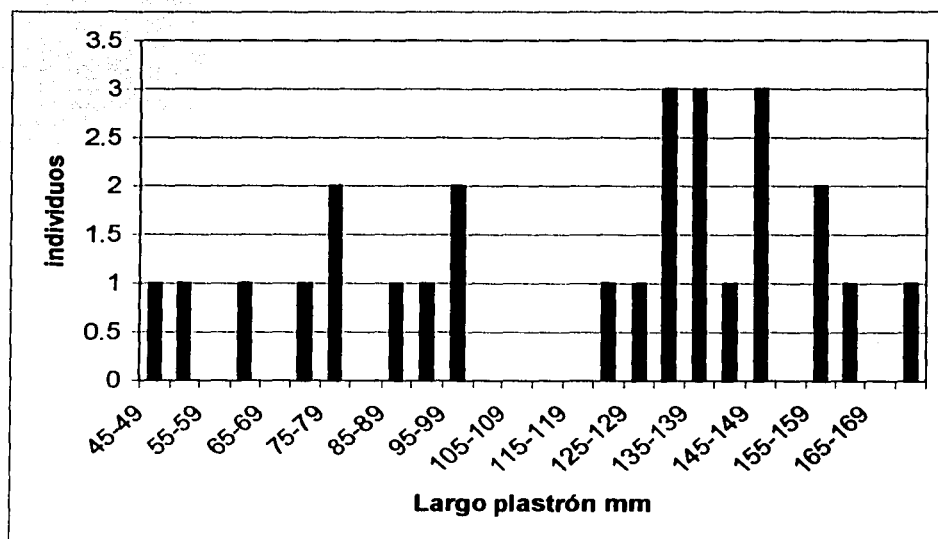


Fig. 5.7 Distribución de frecuencias largo plastrón hembras.

Aunque no se pudieron comparar los anillos de crecimiento en uña y la morfometría de la tortuga para ver si existía alguna relación entre éstos, si se pudo realizar una comparación y establecer correlaciones entre el número de anillos de crecimiento en plastrón y parámetros de tamaño.

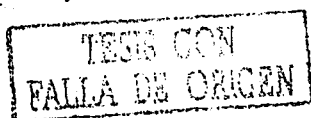
El mayor número de anillos contados fue 10 y el menor 3 (Figs. 5.2 y 5.3).

El coeficiente de correlación indica el grado de asociación entre las medidas de tamaño y anillos de crecimiento en plastrón. Las medidas que se tomaron en cuenta son largo, ancho y alto caparazón, largo y ancho plastrón, y largo y ancho cabeza.

Primero se realizó una prueba estadística (t) para ver si diferían hembras y machos entre si para todas las medidas. Se relacionó para machos y hembras juntos (ya que estos no difieren): ancho y alto caparazón, ancho plastrón y largo cabeza contra anillos de crecimiento en plastrón (Cuadro 4 y Figs. 5.8 a la 5.11). Separados machos de hembras, se relacionó: largo caparazón, largo plastrón y ancho cabeza contra anillos (Cuadro 4 y Figs. 5.12 a la 5.14 machos y 5.15 a la 5.17 hembras).

Machos y Hembras	r	r²
Ancho caparazón	0.75	0.57
Alto caparazón	0.90	0.81
Ancho plastrón	0.53	0.29
Largo cabeza	0.65	0.42
Machos		
Largo caparazón	0.36	0.13
Largo plastrón	0.30	0.09
Ancho cabeza	0.40	0.16
Hembras		
Largo caparazón	0.74	0.55
Largo plastrón	0.61	0.38
Ancho cabeza	0.79	0.63

Cuadro 4. Coeficiente de correlación entre medidas y anillos de crecimiento.



El coeficiente de correlación es positivo, por lo que a medida que aumenta la longitud también aumenta el número de anillos. Sin embargo, esta relación solamente es significativa en las variables ancho y alto caparazón, teniéndose para ancho caparazón $r = 0.75$, $p = 0.0004$ y para alto caparazón $r = 0.90$, $p = 0.0003$.

Basándonos en el coeficiente de correlación de ancho y alto caparazón, se determinó que al menos para estas dos longitudes, se puede establecer la edad en función del tamaño y con ello la distribución de edades (Figs. 5.18 y 5.19). En donde se distinguen claramente los organismos jóvenes de los adultos.

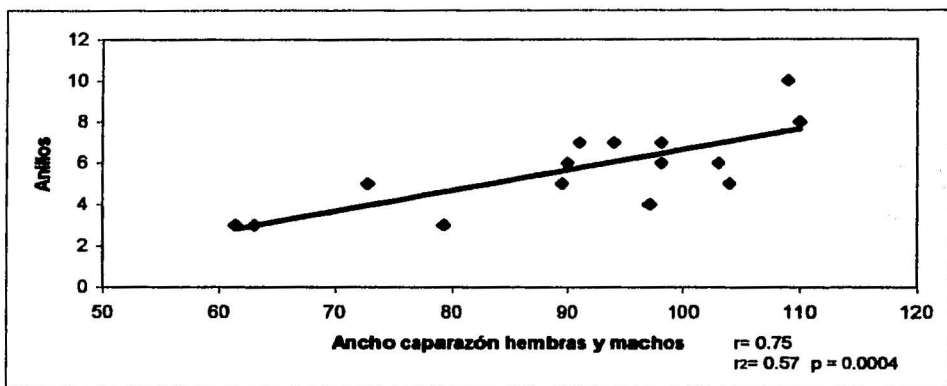


Fig. 5.8 Ancho caparazón vs anillos de crecimiento en plastrón.

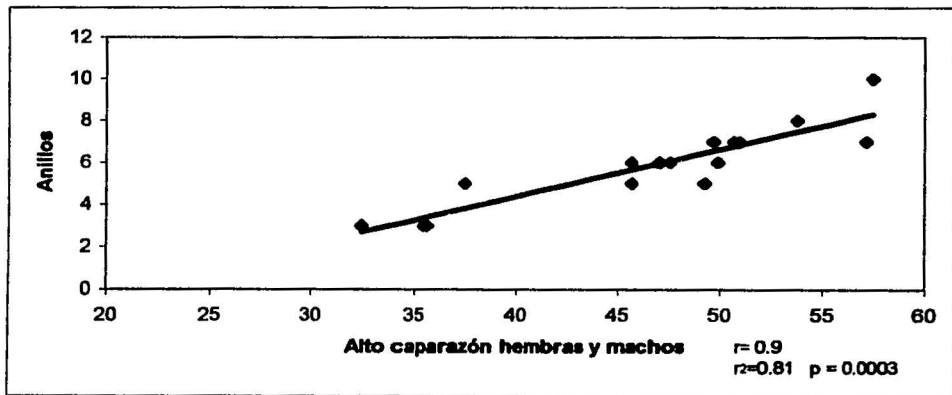


Fig. 5.9 Alto caparazón vs anillos de crecimiento en plastrón.

IMP
PAUL L. SOUTER

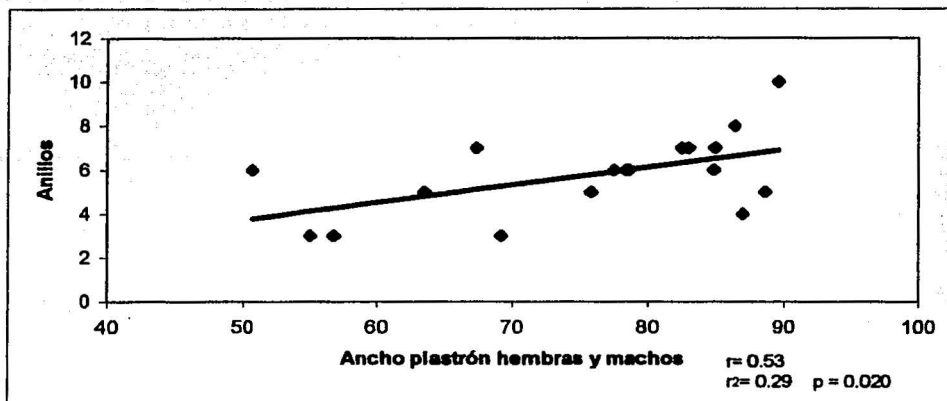


Fig. 5.10 Ancho plastrón vs anillos de crecimiento en plastrón.

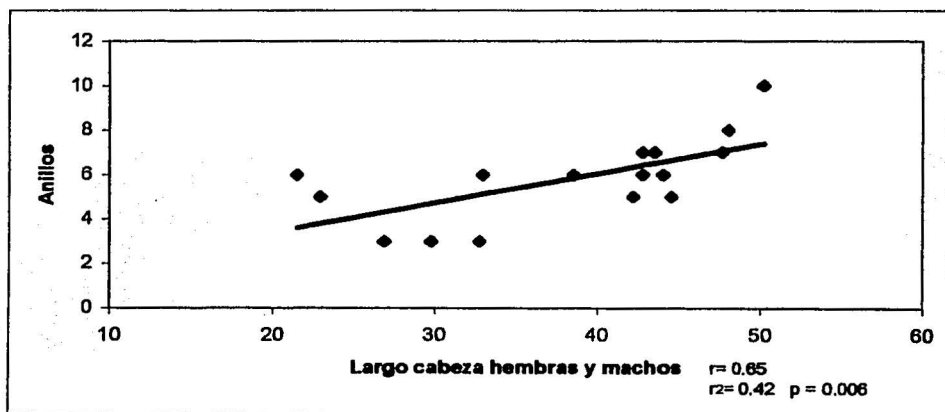


Fig. 5.11 Largo cabeza vs anillos de crecimiento en plastrón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

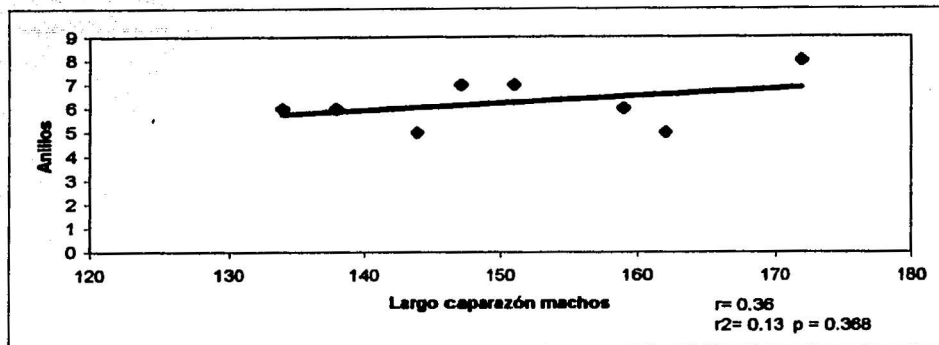


Fig. 5.12 Largo caparazón vs anillos de crecimiento en plastrón.

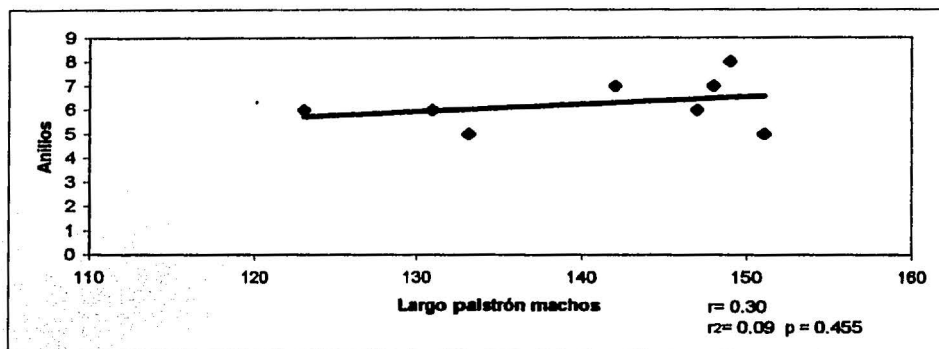


Fig. 5.13 Largo plastrón vs anillos de crecimiento en plastrón.

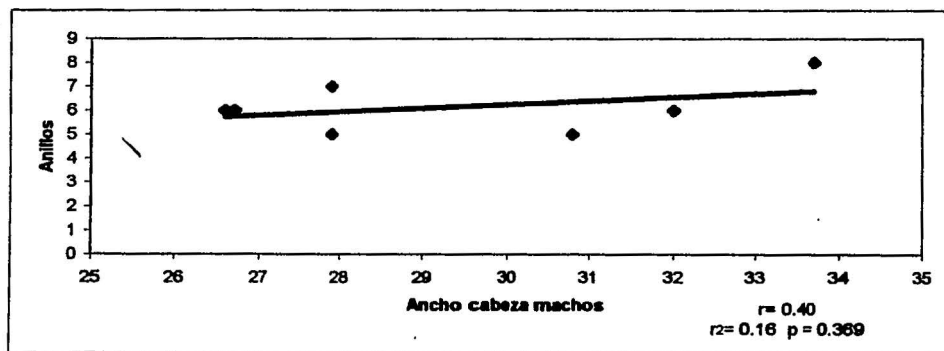


Fig. 5.14 Ancho cabeza vs anillos de crecimiento en plastrón.

76.3 ± 0.7
2010.11.10

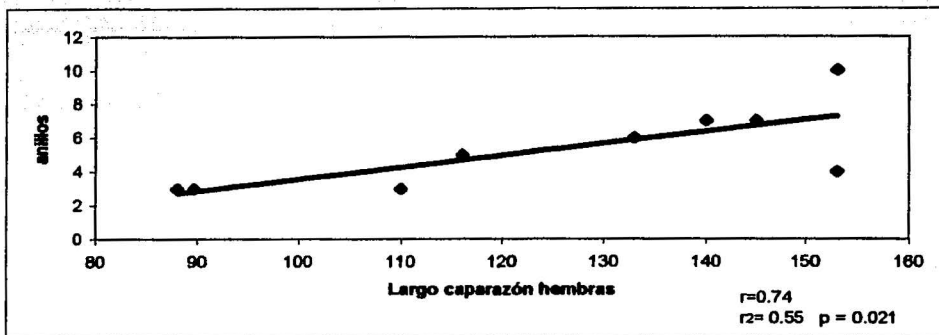


Fig. 5.15 Largo caparazón vs anillos de crecimiento en plastrón.

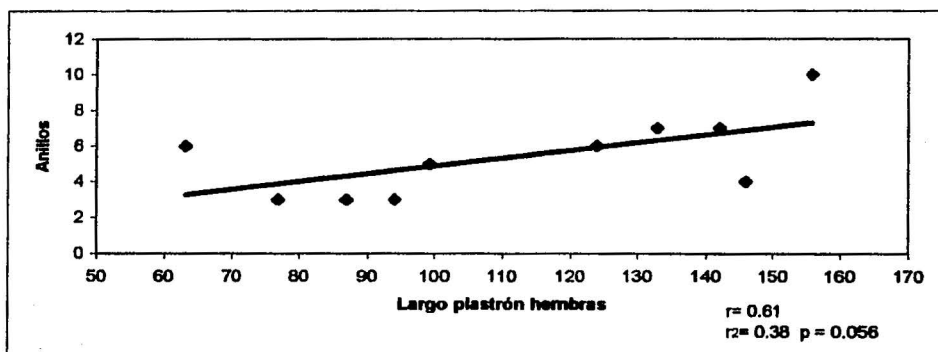


Fig. 5.16 Largo plastrón vs anillos de crecimiento en plastrón.

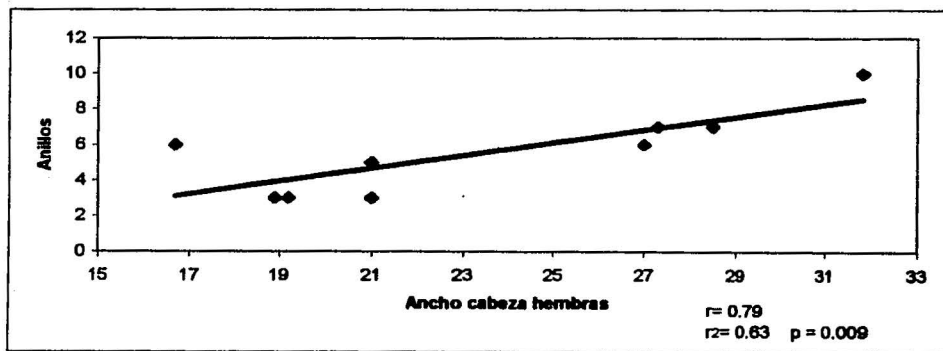
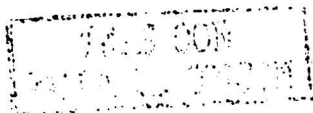


Fig. 5.17 Ancho cabeza vs anillos de crecimiento en plastrón.



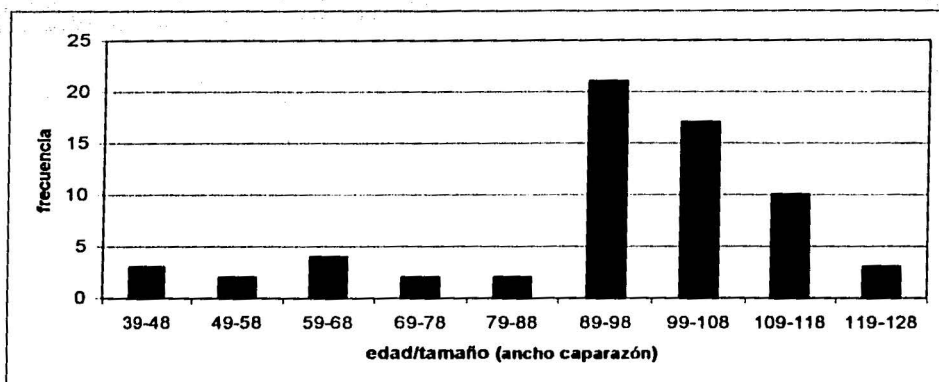


Fig. 5.18 Distribución de frecuencias edad.

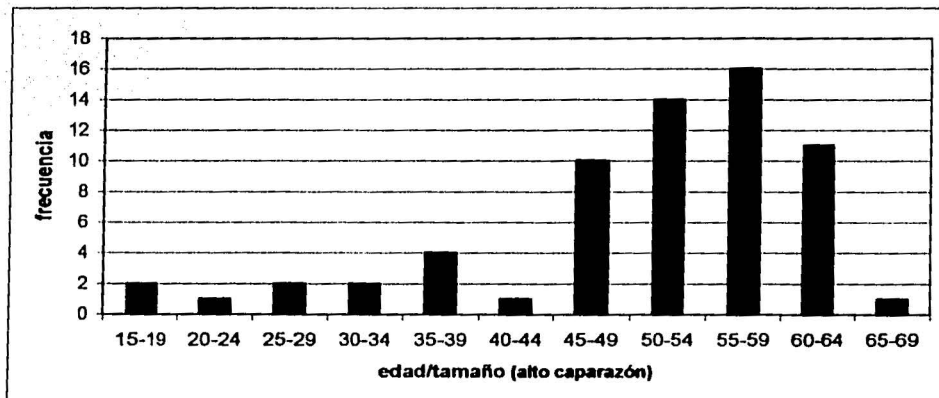


Fig. 5.19 Distribución de frecuencias edad.

5.2 Análisis de la estructura de la uña por microscopia

5.2.1 Microscopia de luz

Observaciones en el microscopio de luz revelaron la estructura de la uña. La Fig. 5.11 muestra como se ven los primeros cortes, hechos desde la base, es decir, desde la parte ancha de la uña. La Fig. 5.11a es un corte de la base, la capa de queratina es muy delgada y el hueso es poroso. Este es un corte de la uña con hoja de catálogo D9 I1-4, en la que no se observan o aprecian los anillos de crecimiento en plastrón, ni tampoco se aprecian anillos en queratina. La Fig. 5.11b es una uña de prueba, también se ve la capa de queratina delgada, pero aquí puede verse una línea gruesa (indicada con "F") que no llega a ser continua y da la apariencia de una fractura. El hueso también es poroso, aunque no tanto como en la Fig. 5.11.

Además se alcanzan a ver líneas que, aunque son débiles, rodean o siguen la forma del hueso. Es importante mencionar que no todas las uñas, presentaron este patrón. Las dos imágenes de la Fig. 5.11 son microscopia de luz reflejada con una magnificación de 5x y se observa la porosidad del hueso y además las formas de éste son un tanto distintas, más ovalada y con una interfase o capa germinativa marcada (Fig. 5.11b).

Con mayor amplificación se observa la queratina en la Fig. 5.12, donde se usan dos diferentes tipos de iluminación para la misma estructura. La Fig. 5.12a es un corte de uña de prueba, no se observan líneas o anillos de crecimiento. Este corte fue atacado con ácido fosfórico y el sistema de iluminación es campo claro, luz reflejada. La Fig. 5.12b se presenta más detalle en queratina, es un corte diferente y adelgazado (150 μm) donde se usó luz transmitida. Puede verse un patrón de puntos a lo largo de la queratina, y además se reconoce el color de ésta.



Fig. 5.11 a) Uña con hoja de catálogo D9 I1-4, la capa de queratina (Q) es muy delgada y el hueso poroso. b) Una uña de prueba más ovalada que la anterior; la capa de queratina también es delgada, pero se observa una línea gruesa que no llega a ser continua y más bien da la apariencia de fractura (F). También se observa cierto patrón de líneas (señalado con una flecha) que rodea la forma del hueso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

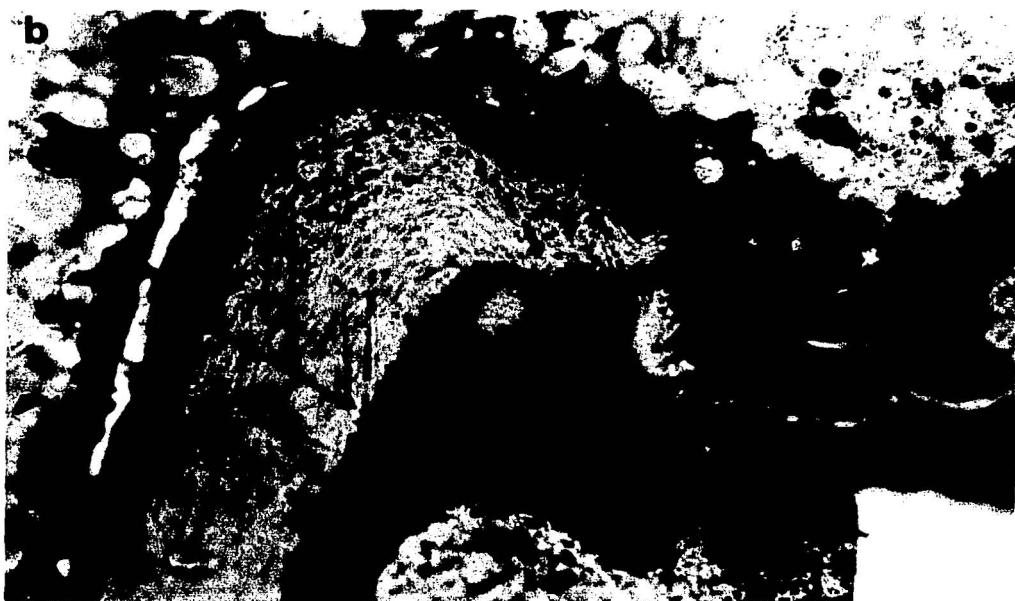
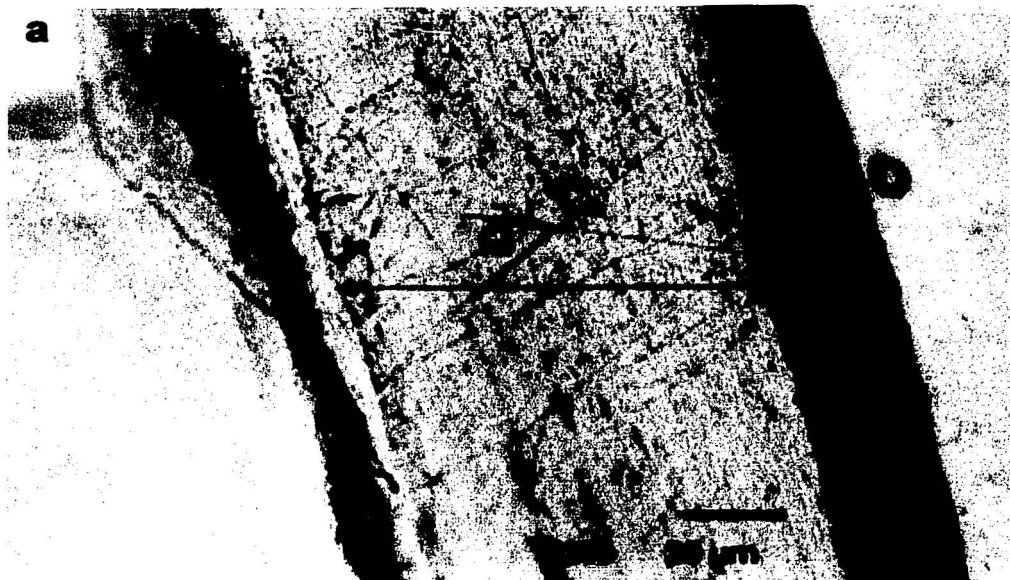


Fig. 5.12 a) Queratina (Q) observada por luz reflejada se observa queratina (marcada con Q); no se alcanzan a distinguir líneas o marcas de crecimiento. b) queratina (corte adelgazado 150 μm) observada por luz transmitida; se observan líneas punteadas a lo largo de la queratina.

En la Fig. 5.13 se tiene la misma imagen pero cambia el tipo de iluminación. En la Fig. 5.13a se empleó luz polarizada y en la 5.13b campo oscuro para observar queratina, y aunque no hay anillos de crecimiento, puede verse claramente una línea o fractura que se distingue con mayor facilidad al observarse con luz polarizada.

Algunos cortes fueron teñidos y pudo notarse la diferencia de estructuras. Un ejemplo de esto es la Fig. 5.14, donde se muestra una uña de prueba la cual no está teñida, se ve la queratina, la interfase y parte del hueso. En la queratina, sólo en algunas zonas se observa un patrón punteado o líneas punteadas. En la Fig. 5.14b la uña ya está teñida y se realza notablemente la porosidad del hueso así como la interfase, pero no se ve más detalle en queratina.

La Fig. 5.15a presenta una uña a la cual se le realizó toda una secuencia de técnicas, incluyendo glutaraldehído y tinción. En campo claro, no se ven anillos de crecimiento ni en hueso ni en queratina, y en la fig. 5.15b la uña se atacó con ácido fosfórico y tampoco se vio ningún cambio. Esto nos hace concluir que la prueba con glutaraldehído no proporciona alguna diferencia. Es necesario volver a mencionar que el ácido fosfórico solo actúa en hueso.

En la Fig. 5.16, la tinción junto con el sistema de iluminación producen un contraste importante porque se aprecian claramente las tres estructuras de la uña: hueso, capa germinativa (a partir de la cual crece la queratina) y queratina. Cuando el corte es teñido y se observa por campo oscuro se aprecia mejor la capa germinativa (ver Fig. 5.16a); puede verse donde termina el hueso y donde empieza la queratina. En cambio cuando se observa por campo claro y no se tiñe (Fig. 5.16b), la capa germinativa se ve muy oscura pero sin detalles. En la Fig. 5.17a sin teñir se pierde mucho detalle en cuanto a esta estructura, solamente se ve algo de porosidad en hueso. En la fig. 5.17b se observa a mayor acercamiento y teñido, y se reconoce la estructura del hueso, se observa claramente el sistema Haversiano. Histológicamente, las membranas de huesos son compactas y laminares en estructura, aunque penetrados por canales de Havers que van a transportar vasos nutrientes (Romer, 1997).

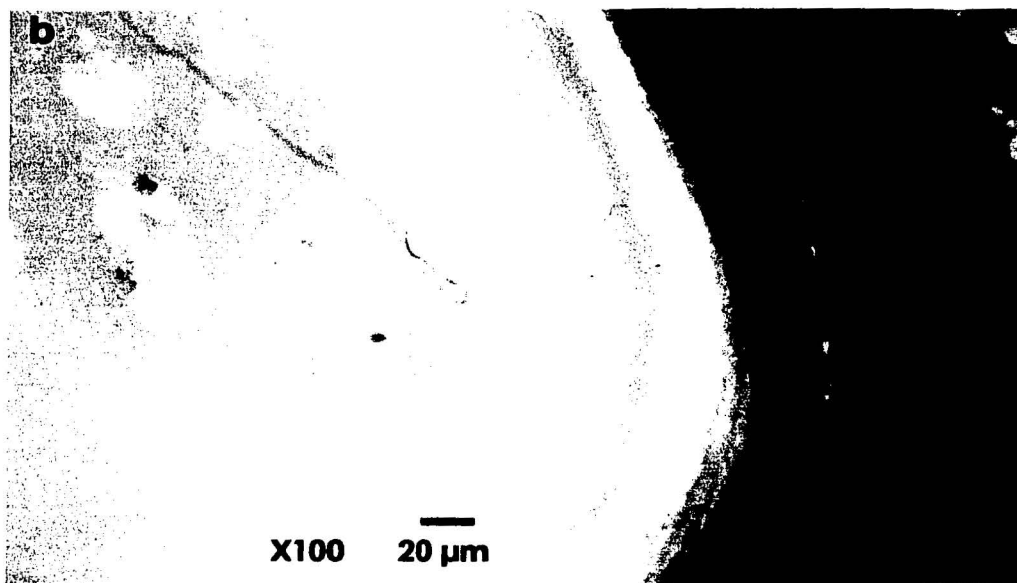
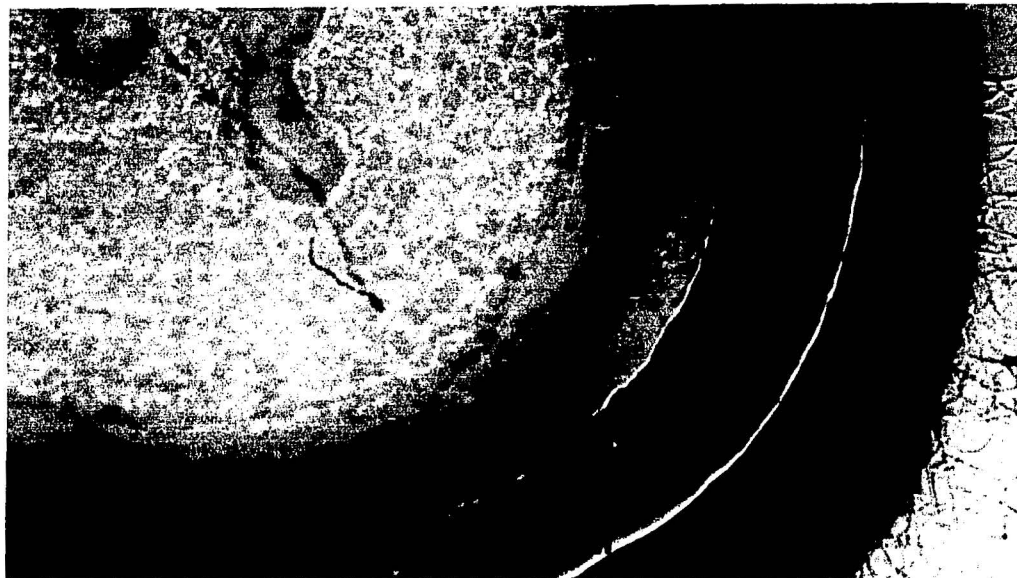


Fig. 5.13 Queratina y hueso observados por diferentes tipos de iluminación a) por luz polarizada y b) por campo oscuro. Este corte fue atacado con ácido fosfórico. No se observan líneas de crecimiento pero se distingue una fractura con luz polarizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

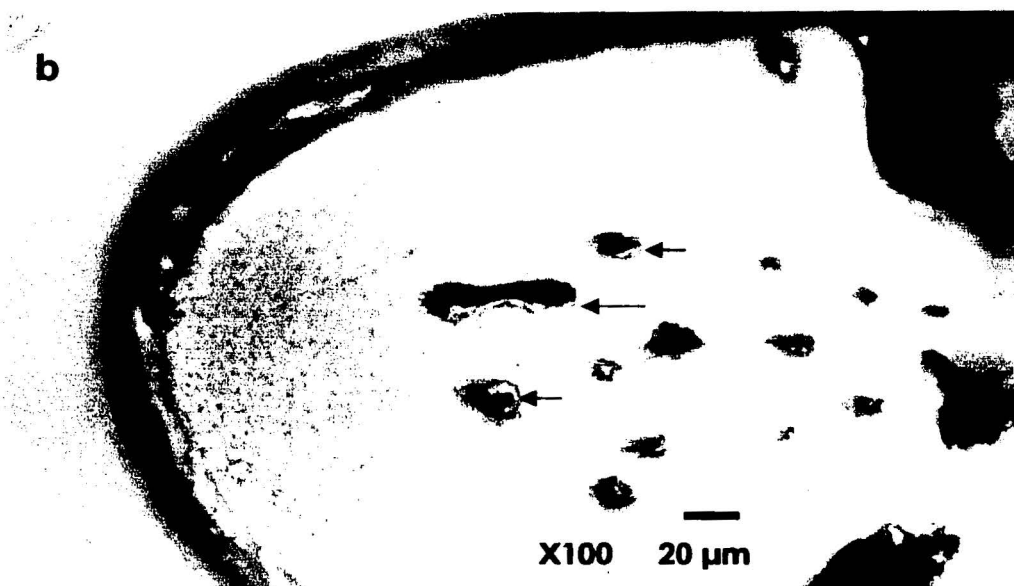


Fig. 5.14 Uña de prueba. a) Se observa hueso, interfase o capa germinativa y queratina en la que se alcanzan a ver patrones de líneas punteada (señaladas con una flecha). b) mismo corte después de ser teñido; se observa la porosidad o vascularización del hueso (señalada con flechas) y se distingue claramente la capa que separa el hueso y la queratina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

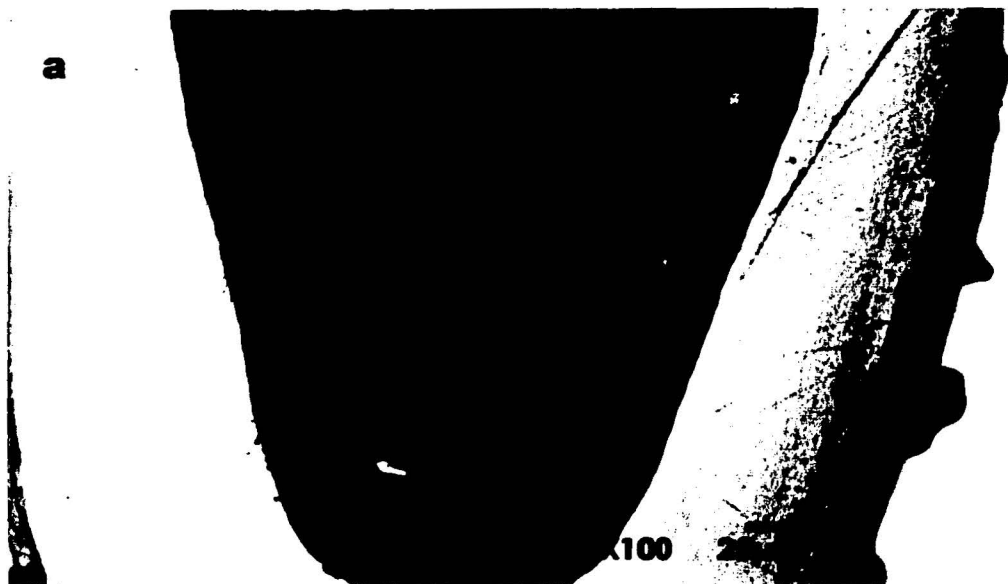


Fig. 5.15 a) Corte tratado con glutaraldehído en campo claro y teñido; no se observan anillos ni en queratina ni en hueso. b) atacado con ácido fosfórico, tampoco se observan anillos.

ESTO CON
FALLA DE ORIGEN

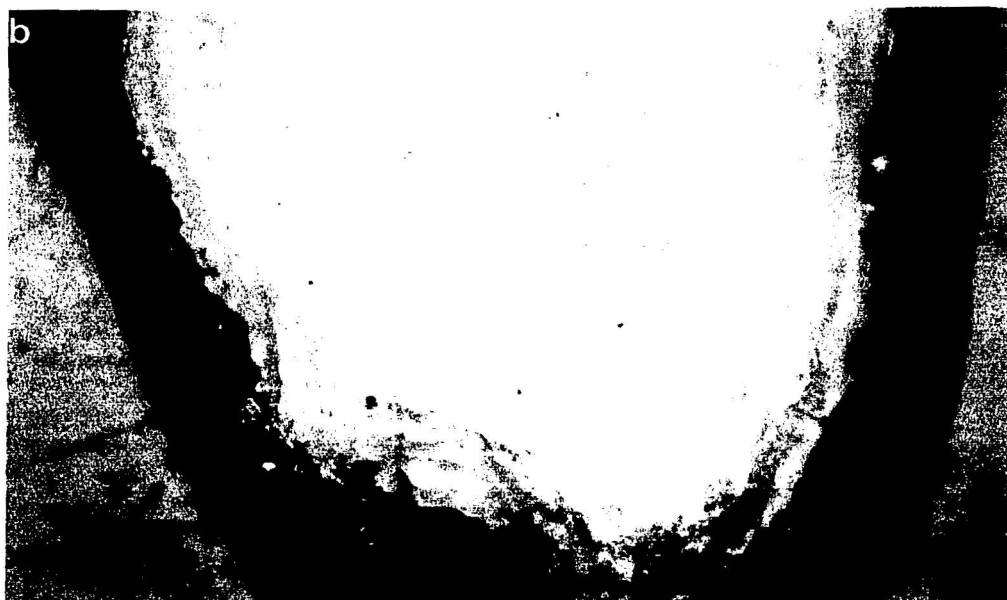
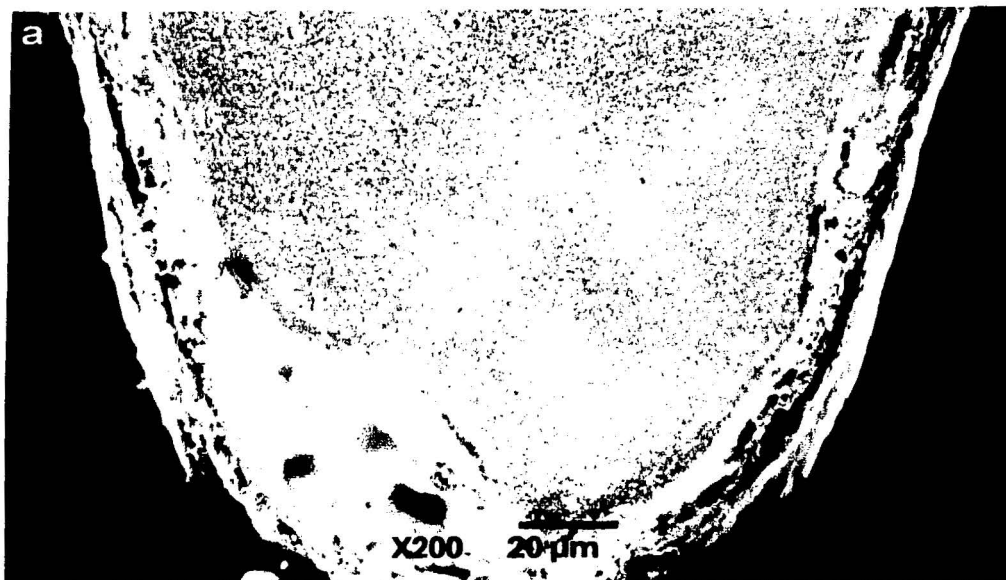


Fig. 5.16 a) Corte teñido observado por campo oscuro, se distinguen claramente las estructuras de la uña: hueso, interfase o capa germinativa y queratina. b) el corte no está teñido y es observado por campo claro, se pierde un poco el contraste, las estructuras no se observan tan claramente.

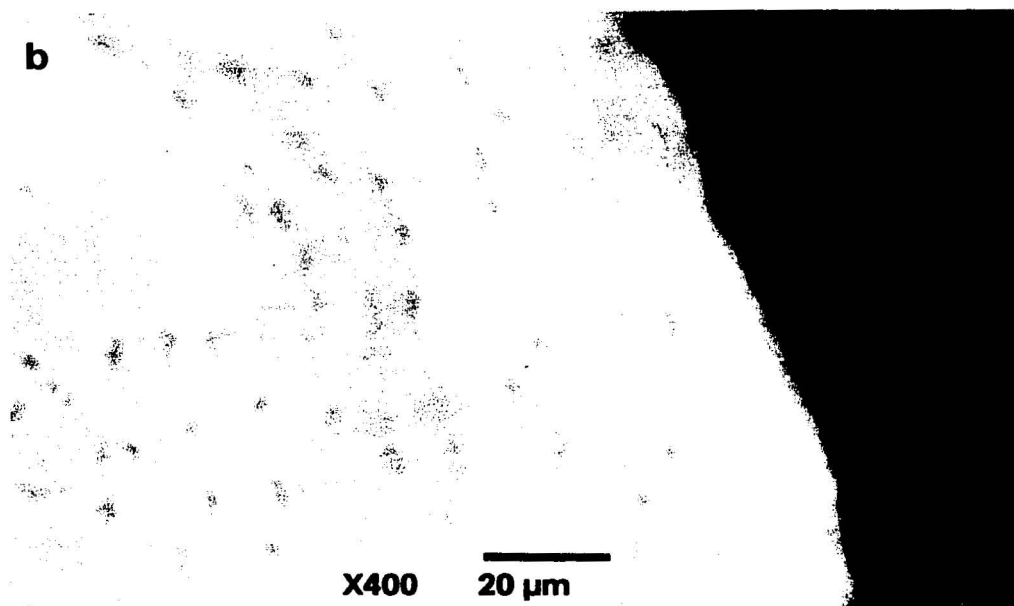
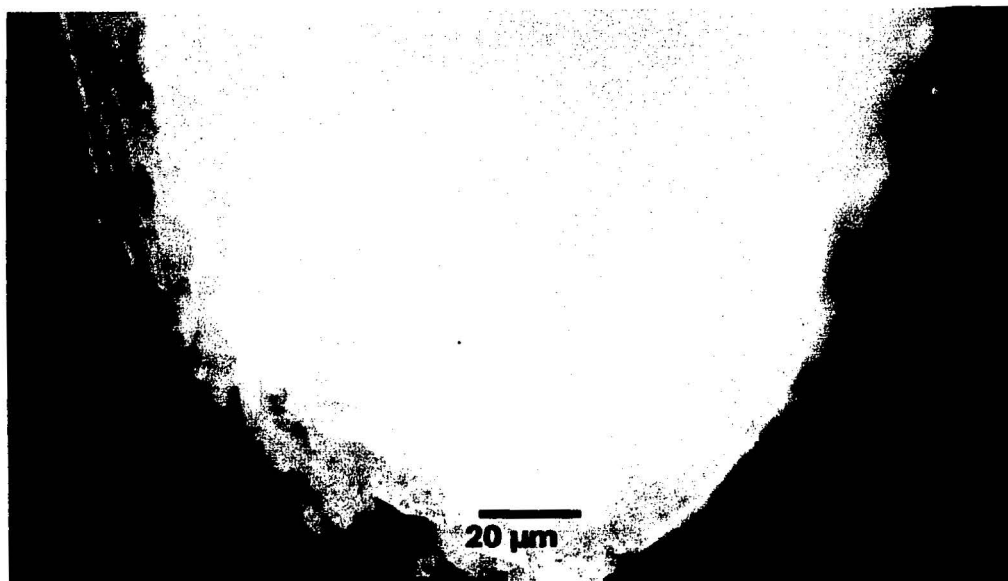


Fig. 5.17 a) Corte sin tinción, se pierde detalle en cuanto a la capa germinativa, aunque en hueso si se alcanza a observar estructura. b) aumento de (a) con tinción y se reconoce la estructura del hueso, el sistema de Havers.

La Fig. 5.18a es una imagen en campo claro (luz reflejada), de un corte grueso. Se aprecia la porosidad del hueso, la interfase o capa germinativa y la queratina sin mucho detalle. En la Fig. 5.18b se observa otro corte pero adelgazado a 150 μm y teñido. En él se aprecian mejor ciertos detalles tanto de hueso como de queratina al observarse con luz transmitida.

Al ser el corte tan delgado, la luz pasa a través de él resaltando detalles importantes como la porosidad y sistema Haversiano en hueso. Además se observa un patrón de líneas punteadas o líneas discontinuas a todo lo largo de la queratina. Otro ejemplo de esto se da en la Fig. 5.19a y 5.19b, donde es el mismo corte primero grueso (5.19a) y luego adelgazado (5.19b). En la primera se observa con campo claro (luz reflejada) y en la segunda con luz transmitida en la que se aprecia mucho más la porosidad del hueso aunque no hay más detalle en queratina. El mismo corte fue atacado, teñido y observado por luz transmitida (Fig. 5.20), donde se observan las diferencias entre cortes gruesos y adelgazados, y teñidos o sin teñir. Finalmente en la Fig. 5.21 se puede ver el corte completo, es una imagen compuesta de tres partes. Es así como se ve un corte después de ser adelgazado, atacado con ácido fosfórico y teñido; el hueso es muy poroso y no hay anillos de crecimiento en queratina.

La Fig. 22 muestra un corte de la base (Fig. 5.22a) mostrando la capa de queratina delgada al igual que la capa germinativa; y un corte de la punta o el final de la uña (Fig. 5.22b). En este corte puede observarse como el hueso se va reduciendo, mientras que la queratina se va haciendo más gruesa. La tinción de estos dos cortes ayuda a resaltar éstas estructuras. En este caso sólo se ven algunas líneas que no llegan a ser continuas y podrían interpretarse como grietas. Las Figs. 5.23 y 5.24 muestran la conformación o las diferentes formas que presentó el hueso en los diferentes cortes o uñas. Las Figs. 5.23a y 5.23b son cortes de diferentes uñas, y en la parte del hueso se observan claramente las distintas formas que presentó el hueso. Por ejemplo, en la mitad derecha de las imágenes (que corresponde a la parte baja de la uña) el área de hueso es diferente para cada uno de los cortes. Las Figs. 5.24a y 5.24b son observadas con luz transmitida y a mayor amplificación, y aunque son diferentes cortes tienen algo en común y es la porosidad o el patrón de porosidad del hueso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

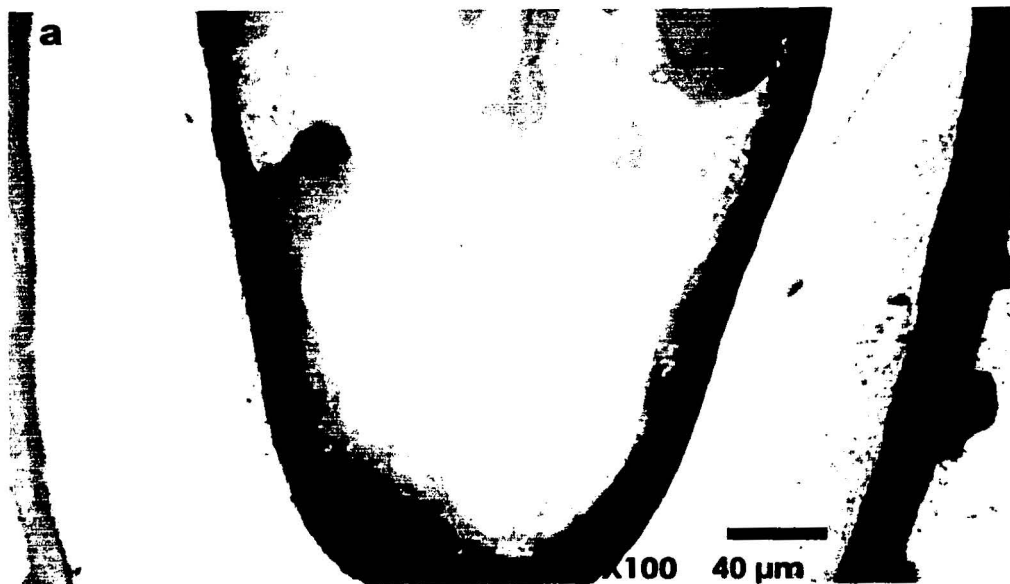


Fig. 5.18 a) Corte grueso observado en luz reflejada; se reconoce capa de queratina gruesa, el hueso algo poroso y la capa germinativa contrastando en negro. b) otro corte, adelgazado y teñido; en queratina se observa cierto patrón de líneas punteadas, en hueso porosidad y además sistema Haversiano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

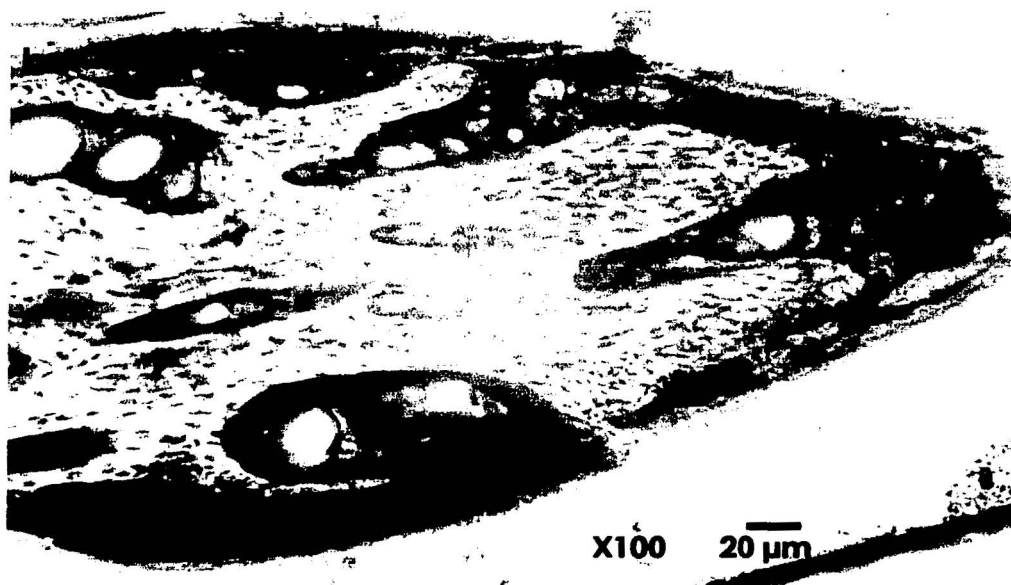


Fig. 5.19 a) Corte grueso observado en luz reflejada; la parte de hueso se ve poroso. b) mismo corte pero adelgazado y en luz transmitida, la parte de hueso se ve más poroso y se distingue mejor el sistema de Havers. No se distinguen líneas o marcas de crecimiento, ni en hueso ni en queratina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

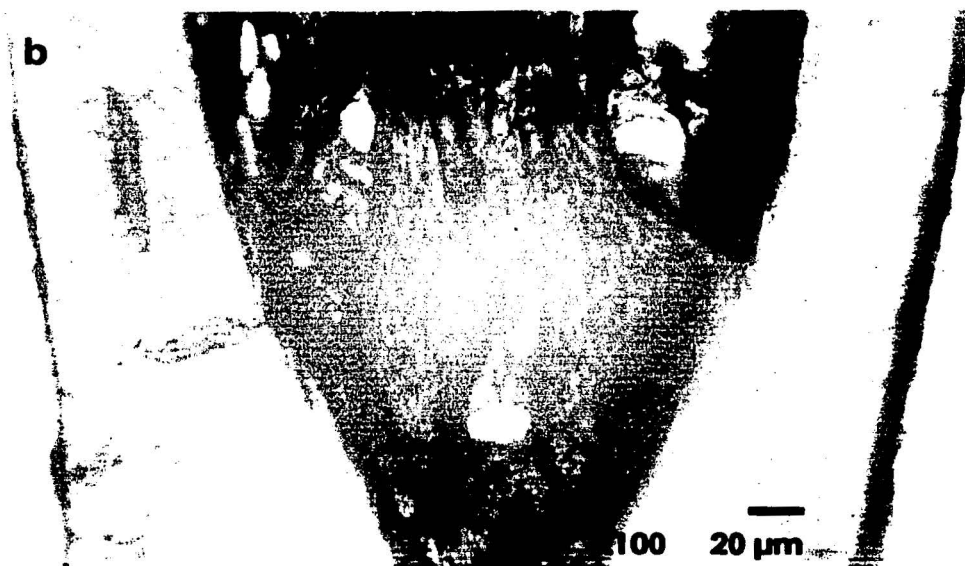


Fig. 5.20 Mismo corte (Fig. 5.19 b) adelgazado, sin tinción (a) y teñido (b); con tinción aumenta contraste en las estructuras. No se observan anillos o marcas de crecimiento ni en queratina ni en hueso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 5.21 Corte completo de la uña con hoja de catálogo D8 I1-5, donde se tiene registrado que cuenta con 10 anillos de crecimiento en plastrón, sin embargo no se observan anillos, líneas o marcas de crecimiento en queratina ni en hueso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

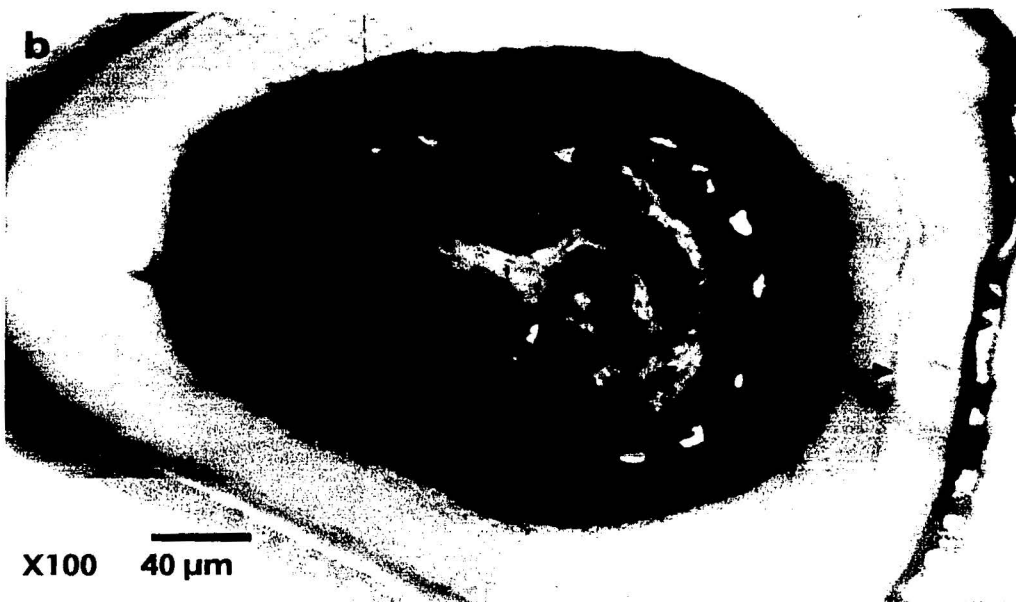
a**X50** 50 μm**b****X100** 40 μm

Fig. 5.22 Diferentes cortes en la misma uña. a) corte de la base con la capa de queratina delgada y con algunas líneas no continuas con aspecto de grietas; la tinción aumenta contraste en las estructuras. b) corte del final de la uña, se observan la capa germinativa y queratina mucho más gruesa, las grietas son señaladas con flechas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 5.23 Cortes de uñas diferentes, teñidos y observados por luz transmitida. Se observan los diferentes tipos de formación del hueso, los patrones de porosidad en hueso son diferentes, también se observa el sistema de Havers.

THE O.C.I.
FALLA DE ORIGEN

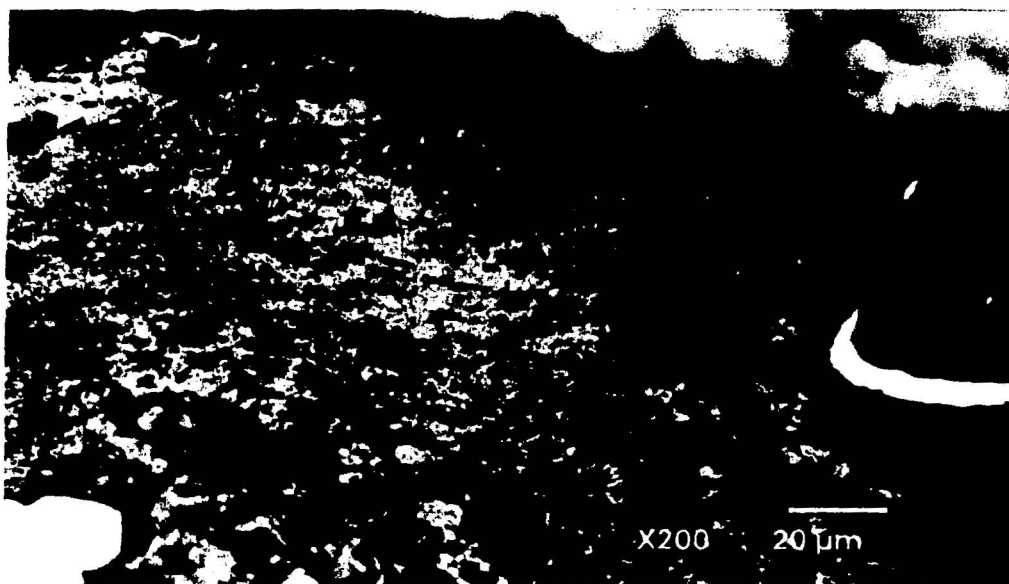


Fig. 5.24 a) Corte adelgazado, teñido, observado por luz transmitida, se aprecia la porosidad del hueso y sistema Haversiano b) corte adelgazado, teñido, solo se observa la parte de hueso y en ningún caso se ven marcas o líneas de crecimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2 Microscopia electrónica de barrido

En la Fig. 5.25a. se observa un corte del final de la uña mostrando la capa de queratina gruesa. Esto es de gran interés porque en esta zona se ve un patrón o arreglo de líneas, pero cuando se amplifica esta zona (Fig. 5.25b), puede verse que las líneas son discontinuas a lo largo de la queratina dando la apariencia de grietas y no de LDC. Estas grietas o fracturas son diferentes, siendo algunas más gruesas o más prolongadas que las otras. Otro aspecto importante es que no se distingue la capa germinativa o interfase sin reconocerse donde empieza o termina el hueso y la queratina. Es necesario mencionar que este corte no fue tratado, no se atacó con ácido, tiñó, ó adelgazó. Nótese también las estructuras que presenta la interfase hueso-queratina.

Las líneas discontinuas en queratina son mostradas otra vez en la Fig. 5.26 que a mayor acercamiento son grietas. En la Fig. 5.26a se ve una secuencia paralela entre grietas que se da a lo ancho de la capa de queratina, y la Fig. 5.26b muestra una de estas grietas a una magnificación superior, donde podría decirse que parece una resquebrajadura que difícilmente podría interpretarse como capa o marca de crecimiento.

Cuando los cortes o las muestras se observaron a menor magnificación, no se apreciaron muchos detalles y solo sobresalió la porosidad del hueso como se ve en las Figs. 5.27a y 5.27b. Compárese esta Fig. con los detalles de la Fig. 5.21 en microscopia de luz. Entonces puede decirse que la microscopia electrónica de barrido no aporta más información, al menos para el hueso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

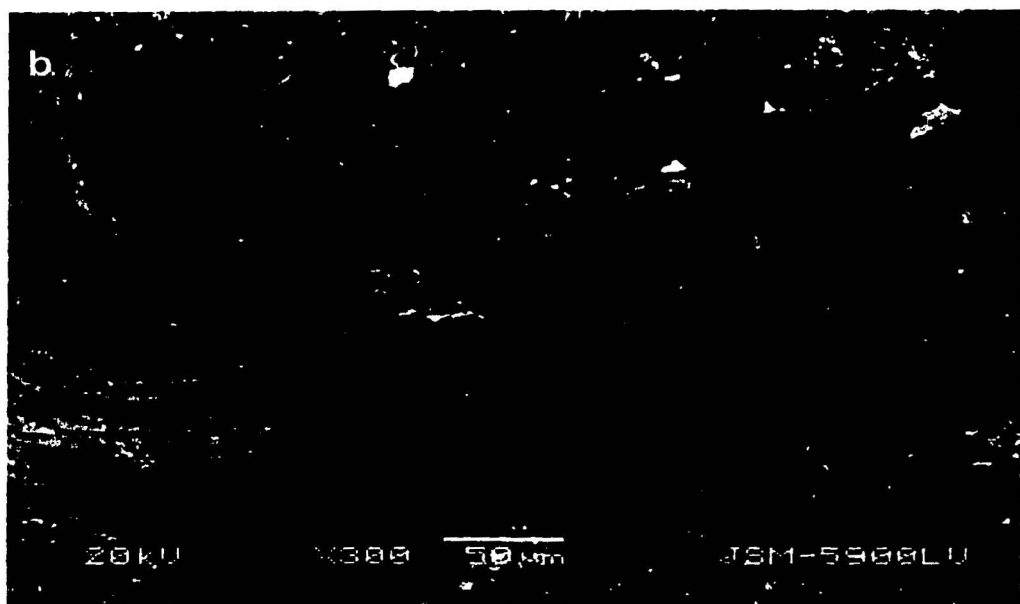


Fig. 5.25 a) Corte de la parte final de la uña, la capa de queratina es gruesa y se observan claramente líneas gruesas que no son continuas, pero cuando esta misma zona se ve a mayor ampliación (b) se reconoce que las líneas son una especie de grietas que van a todo lo largo de la queratina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

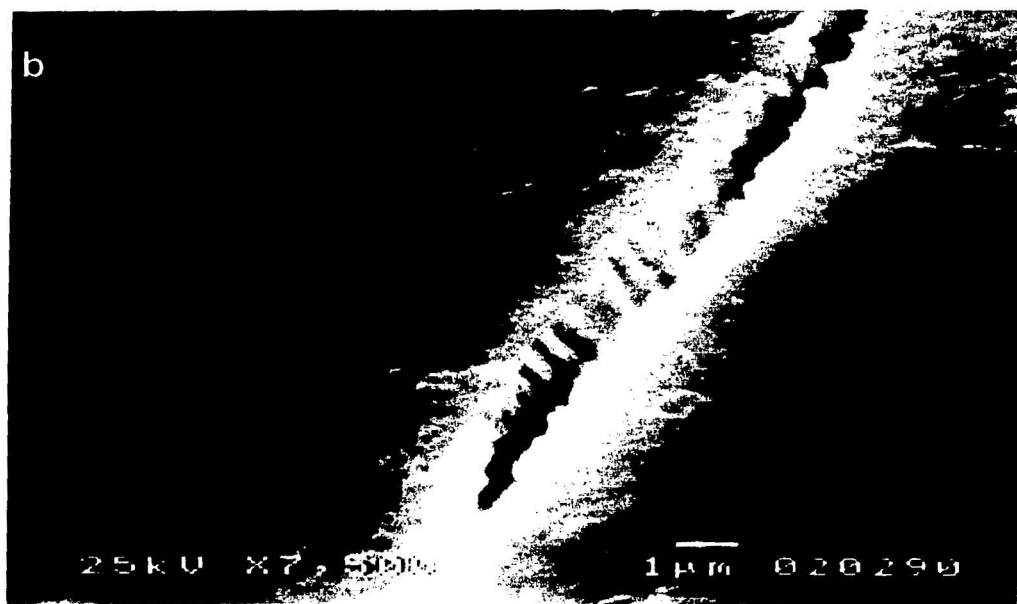


Fig. 5.26 En esta figura la queratina es observada a mayor amplificación, reconociéndose claramente las grietas. a) las grietas se ven de diferentes tamaños y espesores, b) una de las grietas se observa a mayor amplificación, obteniéndose una imagen clara de ésta.

TOBIS CON
PALLA DE OTTON

a



b

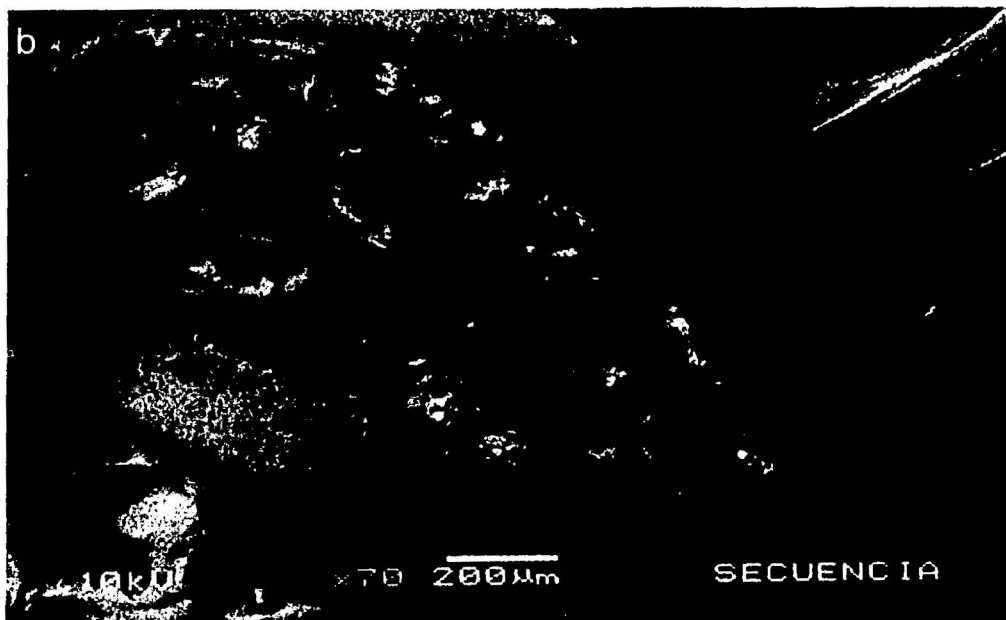


Fig. 5.27 Es el mismo corte que se presentó en microscopia de luz Fig. 5.21. a) se observa la capa de queratina gruesa y la porosidad del hueso, b) también sobresale la porosidad del hueso, pero en ningún caso se observan anillos o líneas de crecimiento, ni en hueso ni en queratina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la Fig. 5.28a (Fig. 5.11b en microscopia de luz) se puede ver cortes cubiertos con una capa de oro mostrando una forma muy porosa del hueso, pero sin marcas de crecimiento. En la queratina tampoco se observan anillos de crecimiento sólo una fractura que es mostrada a mayor magnificación en la Fig. 5.28b. En estas figuras también se observan zonas fibrosas, probablemente colágena, las cuales son mostradas en la Fig. 5.29a en la mitad izquierda de la imagen también se ve a lo largo de la imagen una fibra. La Fig. 5.29b es de gran interés ya que probablemente es la mejor imagen para observar las tres estructuras que componen la uña. De adentro hacia afuera: hueso algo poroso y diferenciándose dos zonas, una clara y una oscura, luego sigue la capa germinativa o interfase fibrosa y finalmente la queratina con ese arreglo paralelo de grietas o líneas discontinuas a lo ancho.

5.2.3 Microanálisis por rayos X

En la Fig. 5.30 se muestra una uña sin queratina y de ésta se obtuvo el microanálisis mostrado en la Fig. 5.31, donde se observan picos de C, O, P, Ca, S, Si, Al, Mg y Na entre otros. El C y O en grandes porcentajes, y la relación Ca y P arriba del 2%, lo cual nos da algún fosfato de calcio, o bien, hidroxiapatita, el cual forma parte de dientes, huesos. La hidroxiapatita natural contiene además trazas de Al, Mg, Si. La estructura de la hidroxiapatita es una celda unitaria hexagonal (Ca 1 y Ca 2).

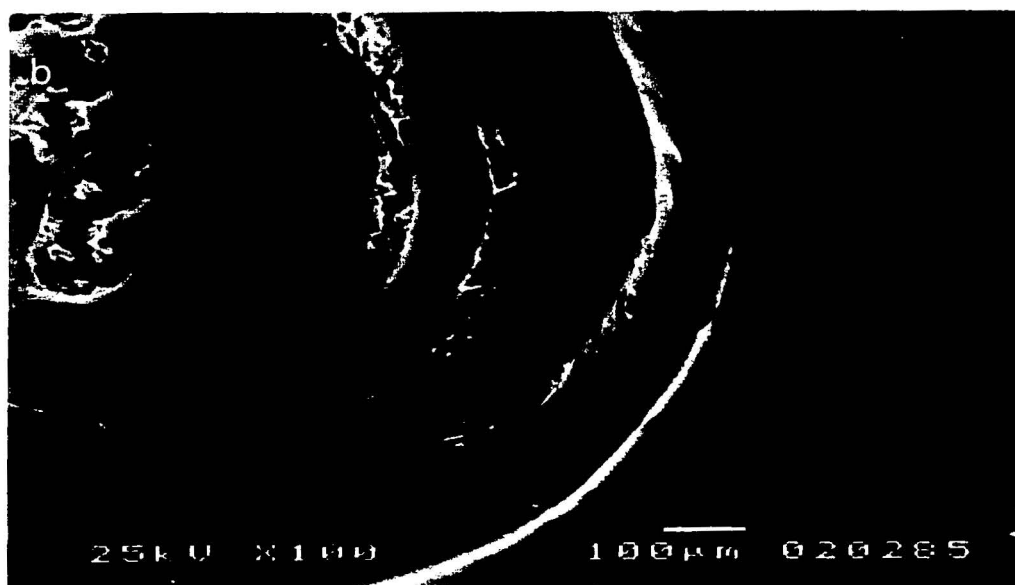
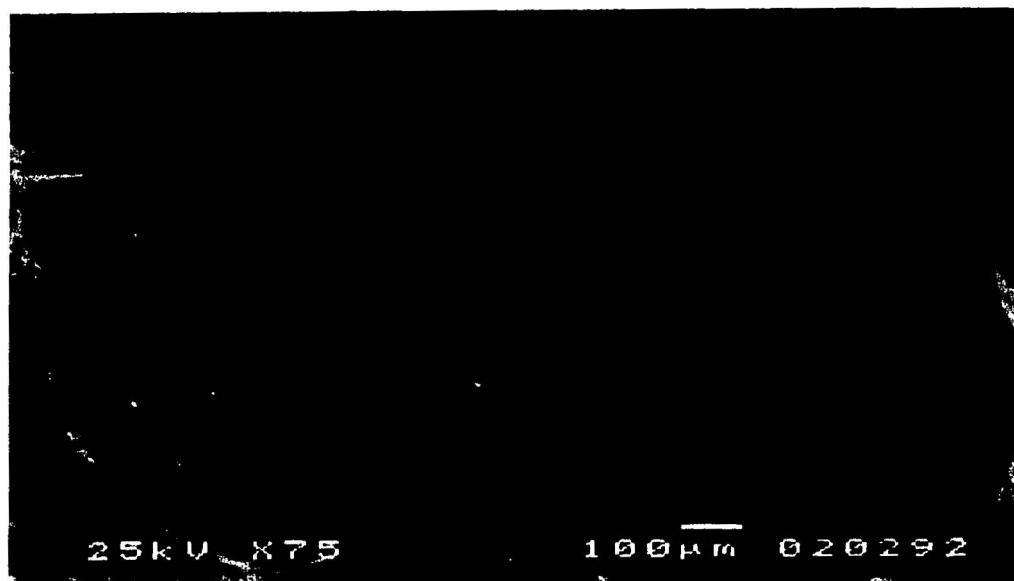


Fig. 5.28 Se observa el mismo corte que se mostró en la figura 5.11b en la sección de microcopia de luz. a) se reconoce la parte de hueso poroso, la interfase o capa germinativa y en la capa de queratina se observa la fractura o grieta; b) la fractura se muestra a mayor amplificación, también se aprecia una parte del hueso (poroso).

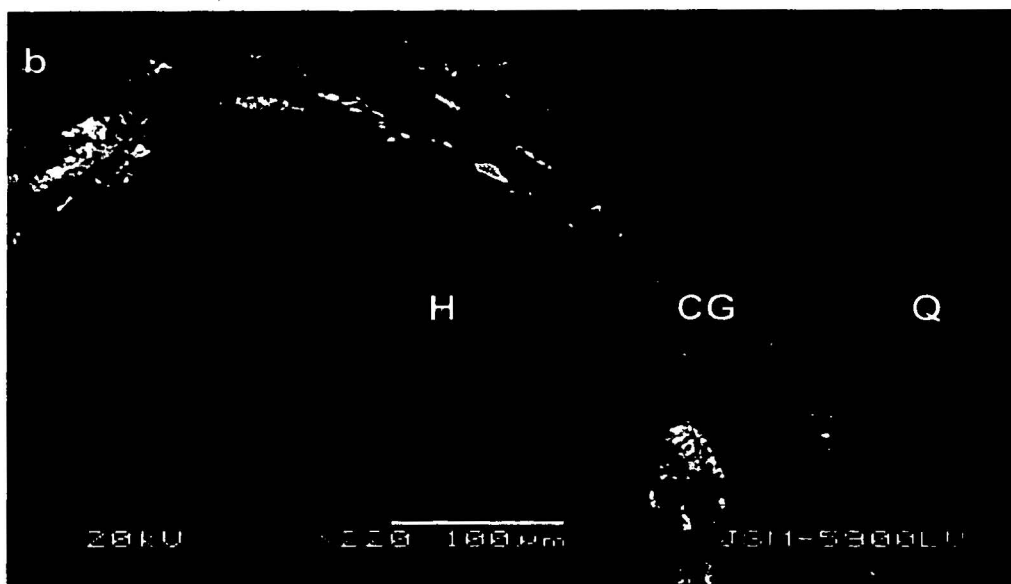


Fig. 5.29 a) En la parte superior de la imagen se muestra hueso poroso y en la inferior en la queratina se observa una fibra probablemente de colágena que proviene de la capa germinativa. b) corte donde se observa claramente la estructura de la uña, de adentro hacia fuera: Hueso, Capa Germinativa y Queratina con ese arreglo de grietas que van a lo ancho y largo de esta.



Fig. 5.30 Uña completa sin queratina, sólo la parte de hueso.

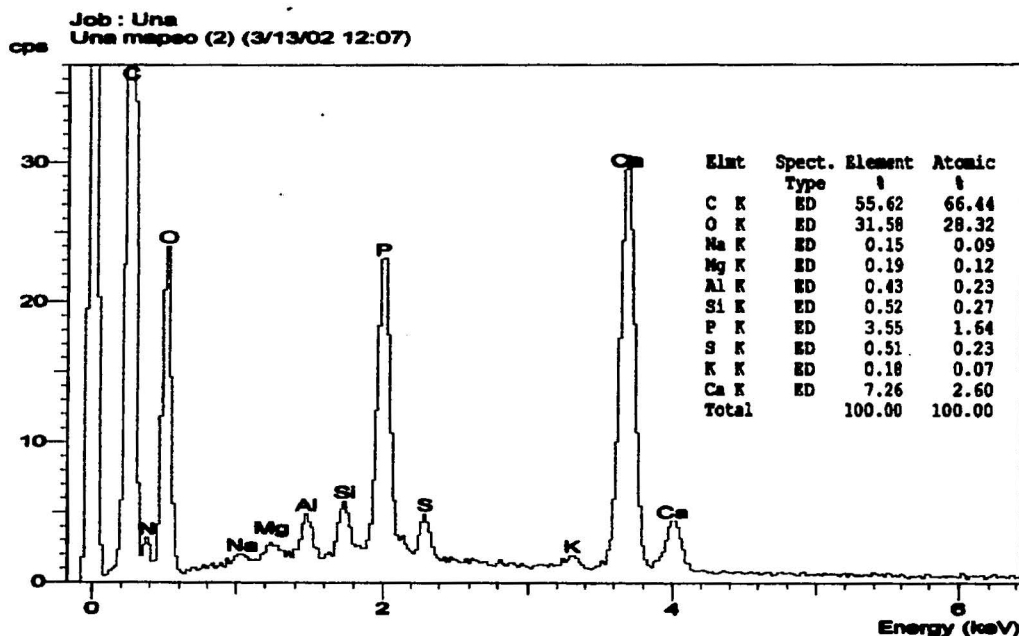


Fig. 5.31 Microanálisis que corresponde a la fig. 5.30, el cual da picos de C, O, P, Ca, y picos menores de Si, S, Al, Mg, Na, N, K. teniendo probablemente hidroxiapatita por la relación Ca-P.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el mapeo químico de la Fig. 5.32 se escogieron los elementos cuyos picos fueron los más altos del espectro (Fig. 5.31). En la Fig. 5.32a se tiene la imagen normal de electrones secundarios, tal como se ve en el MEB la zona de la muestra a la cual se le hace el mapeo. En las Figs. 5.32b a 5.32f se presenta los mapeos para C, Ca, P, O y Mg respectivamente. El Ca y P se encuentran en la misma zona del corte en hueso, lo que nos da hidroxiapatita, el C y O están repartidos en toda la zona y el Mg es un elemento traza y está distribuido de manera uniforme a lo largo de la zona. Esto nos indica que en esta zona la uña está compuesta de material inorgánico (hidroxiapatita) mezclado con material orgánico (probablemente colágena).

Se escogió el corte presentado en la Fig. 5.25a (corte final de la uña, donde la mayoría del material es queratina) para hacer otro análisis químico, el cual se muestra en la figura 5.33. La figura 5.33b muestra el espectro resultando picos de C, O, y S; el material de queratina está compuesto de O 88%, S 8%, lo que indica que el S proviene de esta región.

El análisis en hueso se muestra en la Fig. 5.34. En la Fig. 5.34a se señalan las dos zonas de análisis en el corte y los espectros aparecen en las figuras 5.34b y 5.34c y un espectro comparativo en la figura 5.34d, es decir, un espectro que reúne los dos anteriores. Para la zona 1 (Fig. 5.34b) puede verse que la concentración de S se reduce mucho, sin embargo hay un pico pequeño. El C y O prevalecen 77.62%, luego el Ca con 16.6%. En la zona 2, el porcentaje de O es de 56.33%, Ca 23.78%, y P 19.35%, en esta zona aumentan considerablemente los picos para Ca y P, y la relación entre estos elementos es mayor.

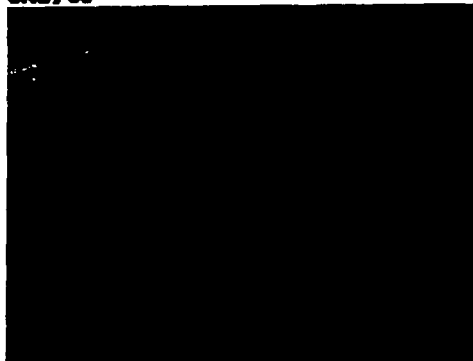
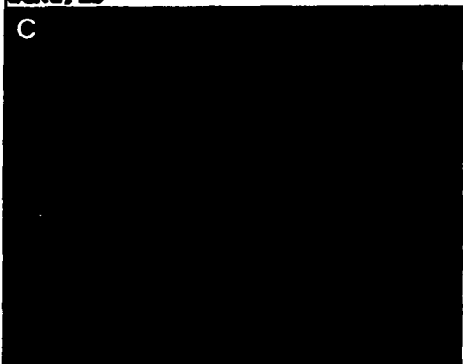
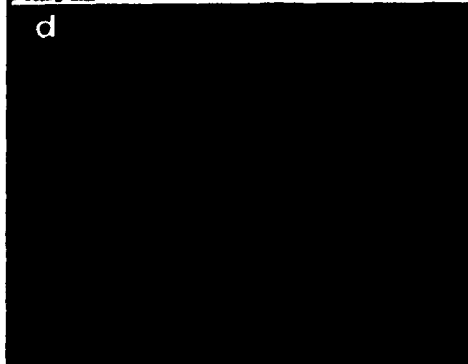
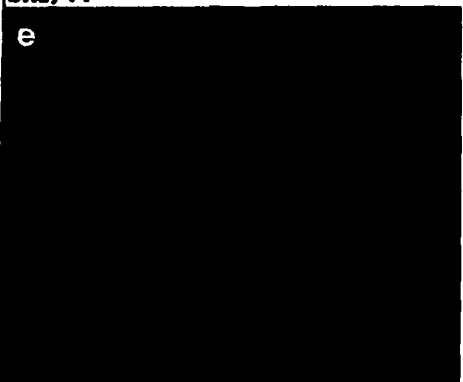
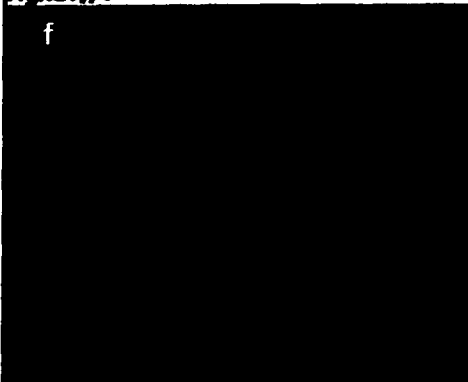
BSE. 255**CKa. 38****CaKa. 28****PKa. 22****OKa. 14****MgKa. 7**

Fig. 5.32 Mapeo para una zona del hueso. a) imagen normal de electrones secundarios, tal como se ve en el MEB, b) mapeo para C, c) para Ca, d) para P, e) para O y f) para Mg. Se observa que el Ca y P provienen de la misma zona indicando que está compuesto de hidroxiapatita.



b Job : Una
Una sin pulir 1 (2/15/02 13:19)

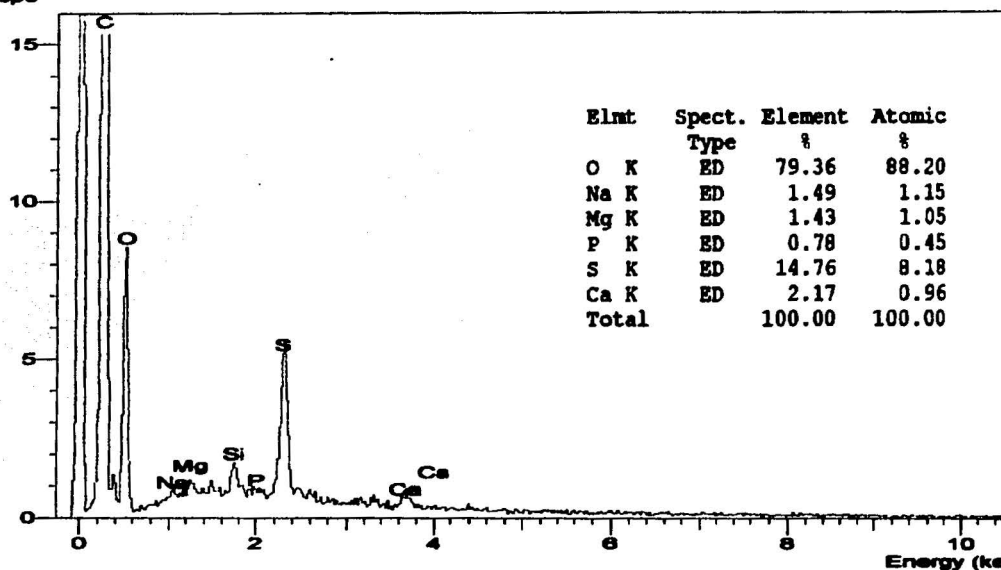
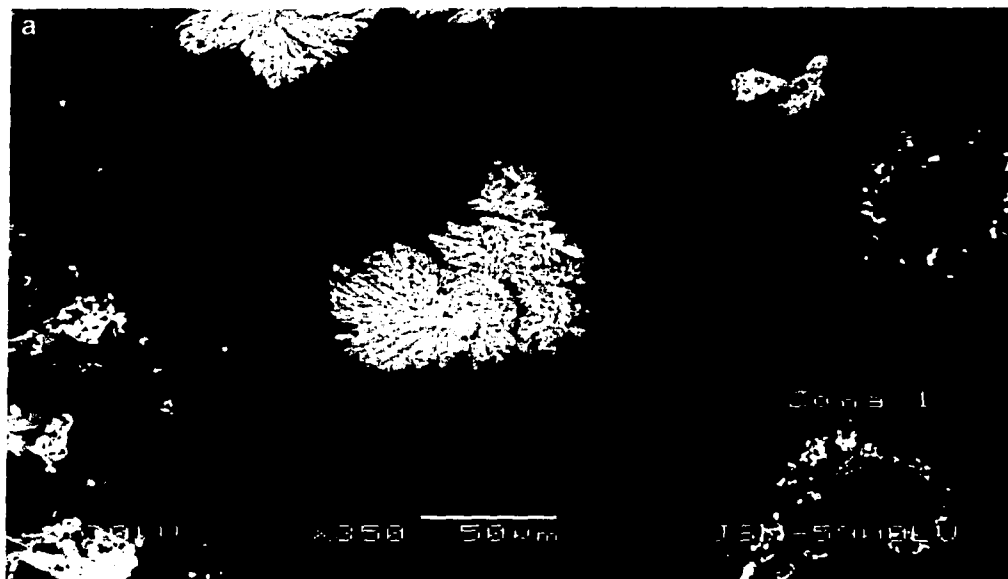


Fig. 5.33 a) Corte en la parte final de la uña (mostrado en la figura 5.25 a), al cual se le realizó microanálisis (b) picos de C, O, S, Si, Ca, P, Mg y Na observados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



(b) Job : Una
Una sin cubierta 1 (2/15/02 12:09)

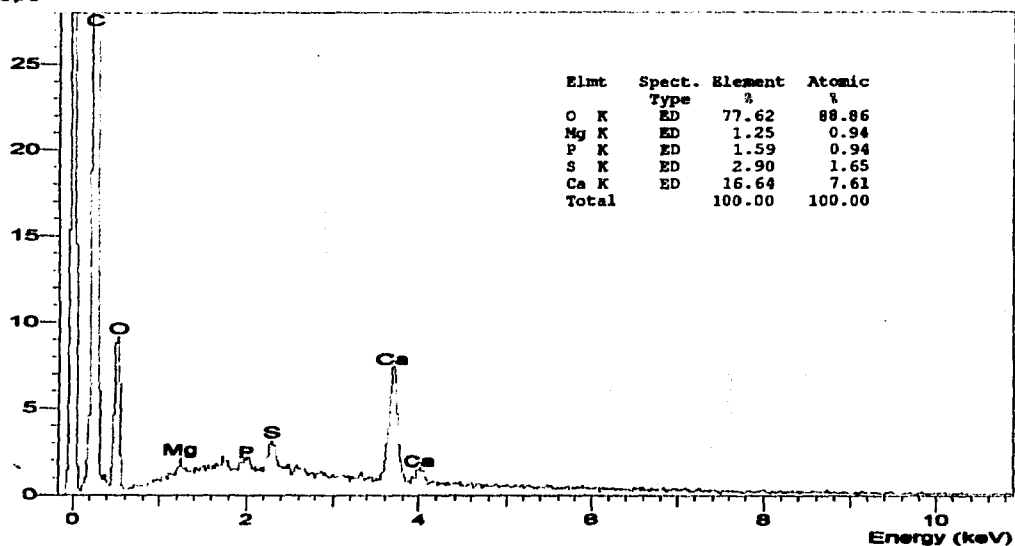
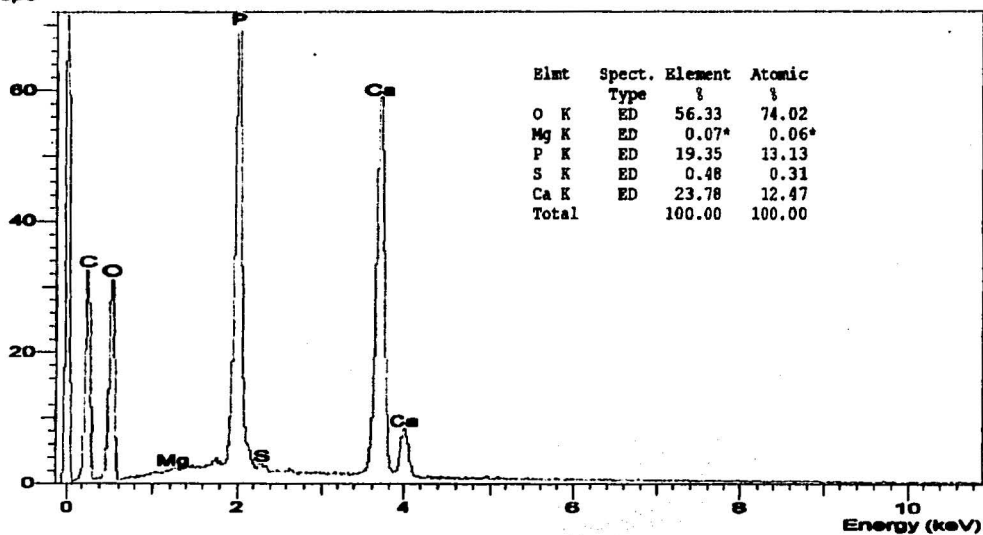


Fig. 5.34 a) Corte en donde se señalan dos zonas donde se realizó otro microanálisis b) espectro de la zona 1, mostrando picos para C, O, Ca, S, Mg y P.

(c) Job : Una
Una sin cubierta 2 (2/15/02 12:13)



(d)

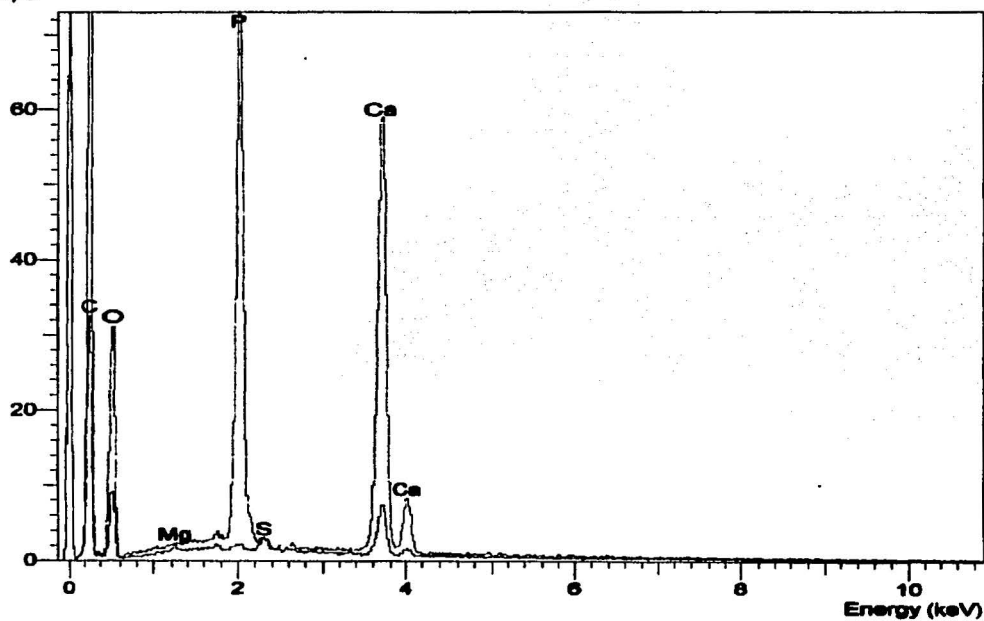


Fig. 5.34 c) espectro para la zona 2 observándose picos de C, O, P, Ca, S y Mg.
d) comparación de los espectros zona 1 (azul) y zona 2 (rojo).

Otro mapeo químico en la zona del hueso se presenta en la Fig. 5.35. La imagen normal de electrones secundarios se muestra en la Fig. 5.35a, mientras que los mapeos para C, Ca, P, O y Si se muestran en las Fig. 5.35b a la 5.35f respectivamente. Este mapeo nos comprueba una vez más la relación Ca-P, que nos da hidroxiapatita. El C aparece uniforme en toda la zona, lo que nos hace pensar que la razón de ello es la cubierta de C con la que se recubrió la muestra. Nótese que el Si se encuentra en la zona de la interfase hueso queratina. La figura 5.36 es un mapeo de la zona baja del corte presentado en la figura 5.21 en microscopia de luz y 5.27 en microscopia electrónica de barrido, los elementos no varían, O, Ca, P, Si, Al (Fig. 5.36b a la Fig. 5.36f); en la Fig. 5.36e para Si, se nota gran concentración en interfase, y es posible que esta concentración resulte del proceso de pulido de las muestras, es decir, por el uso del de lijas con carburo de silicio. En otra zona del mismo corte (Fig. 5.21 y 5.27) se obtuvo un mapeo comparativo entre hueso y queratina y el resultado se muestra en la Fig. 5.37. La Fig. 5.37a presenta el mapeo para el C, 5.37b para O y se nota que están repartidos de manera uniforme en toda la zona, tanto hueso como queratina; en las Fig. 5.37c y 5.37d se observa que Ca y P están presentes en hueso, y Si en interfase (Fig. 5.37f) y finalmente la figura 5.37e indica que el S está presente en queratina.

Otro análisis químico se realizó en el corte presentado en la Fig. 5.29b, y se repartió en tres zonas (Fig. 5.38): la zona 1 en queratina, zona 2 y 3 en hueso (se analizaron dos zonas en hueso ya que se distinguen dos áreas, una clara de mayor amplitud zona 2 y una oscura zona 3). El espectro de la zona 1 corresponde a la figura 5.38b que presenta picos de C, O, y S (25.78%), y uno muy pequeño para Na. Los espectros de las zonas 2 y 3 aparecen en las Fig. 5.38c y 5.38d respectivamente, donde se observan los mismos elementos, sin embargo la diferencia de estas dos zonas son el tamaño de los picos y la concentración de dichos elementos, como por ejemplo, el Si en la zona 2 es mayor considerablemente con respecto al Ca y P, en cambio en la zona 3 no es tan marcada esta condición, es decir, el pico de Si es ligeramente más alto con respecto al Ca y P.

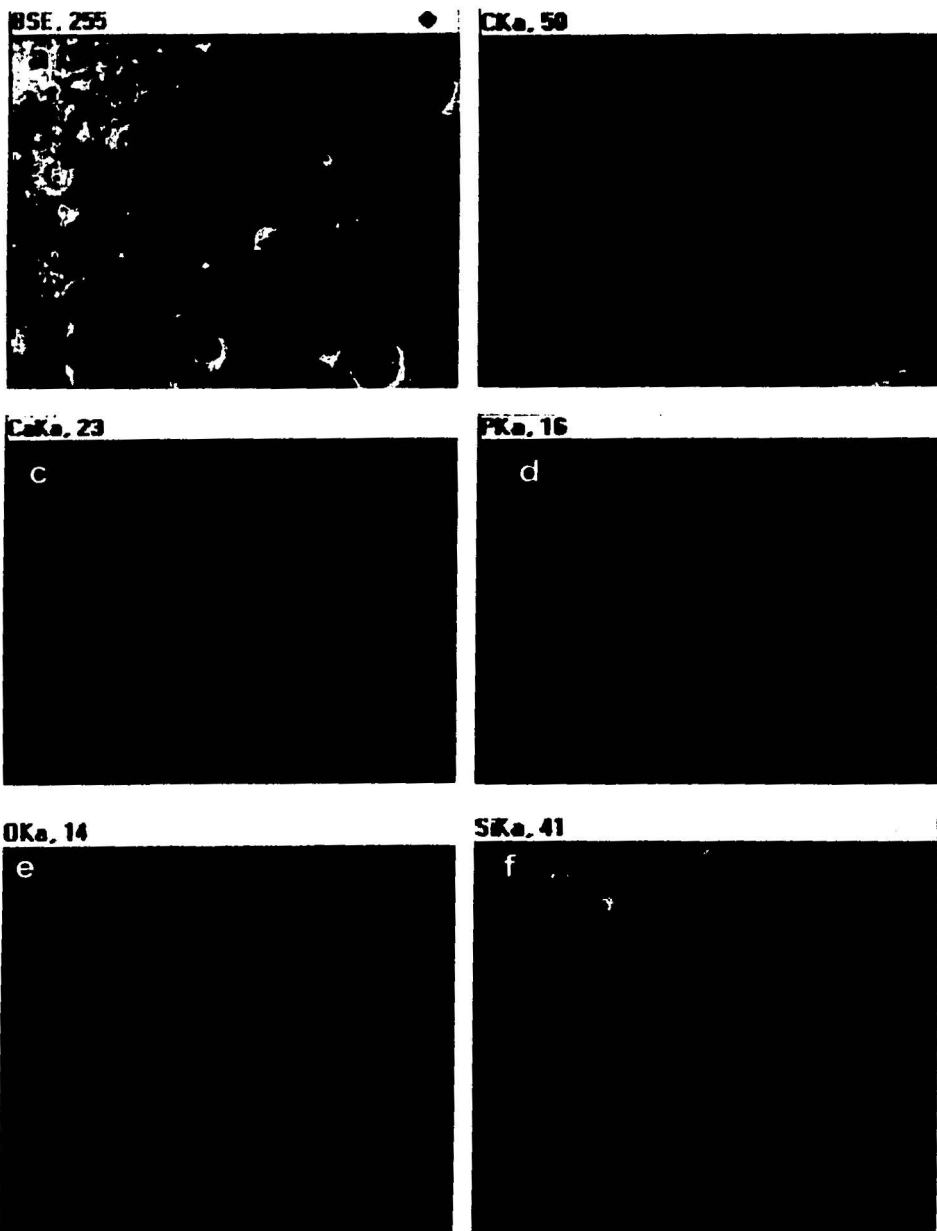


Fig. 5. 35 Mapeo en una zona de hueso porosa. a) imagen normal de electrones secundarios, b) mapeo para C, c) para Ca, d) para P, e) para O y f) para Si. Se observa la relación Ca-P.

TESIS CON
MAYOR DE DIGNIDAD

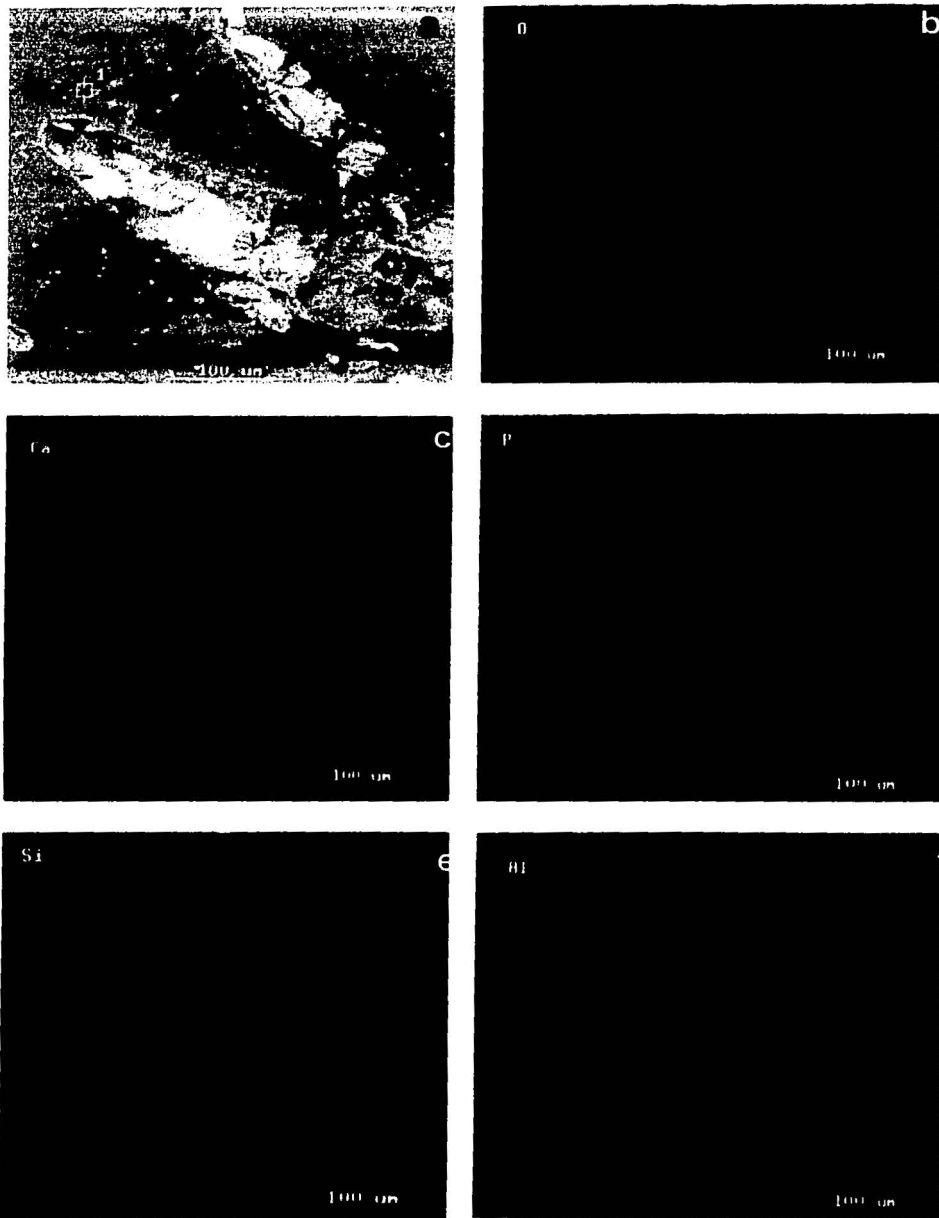


Fig. 5.36 Mapeo para zona baja del corte mostrando hueso y parte de capa germinativa. a) imagen normal de electrones secundarios, b) mapeo para O, c) para Ca, d) para P, e) para Si, y f) para Al. Obteniendo lo mismo que en los mapeos anteriores, la relación Ca-P y además Si en la zona de interfase o capa germinativa.

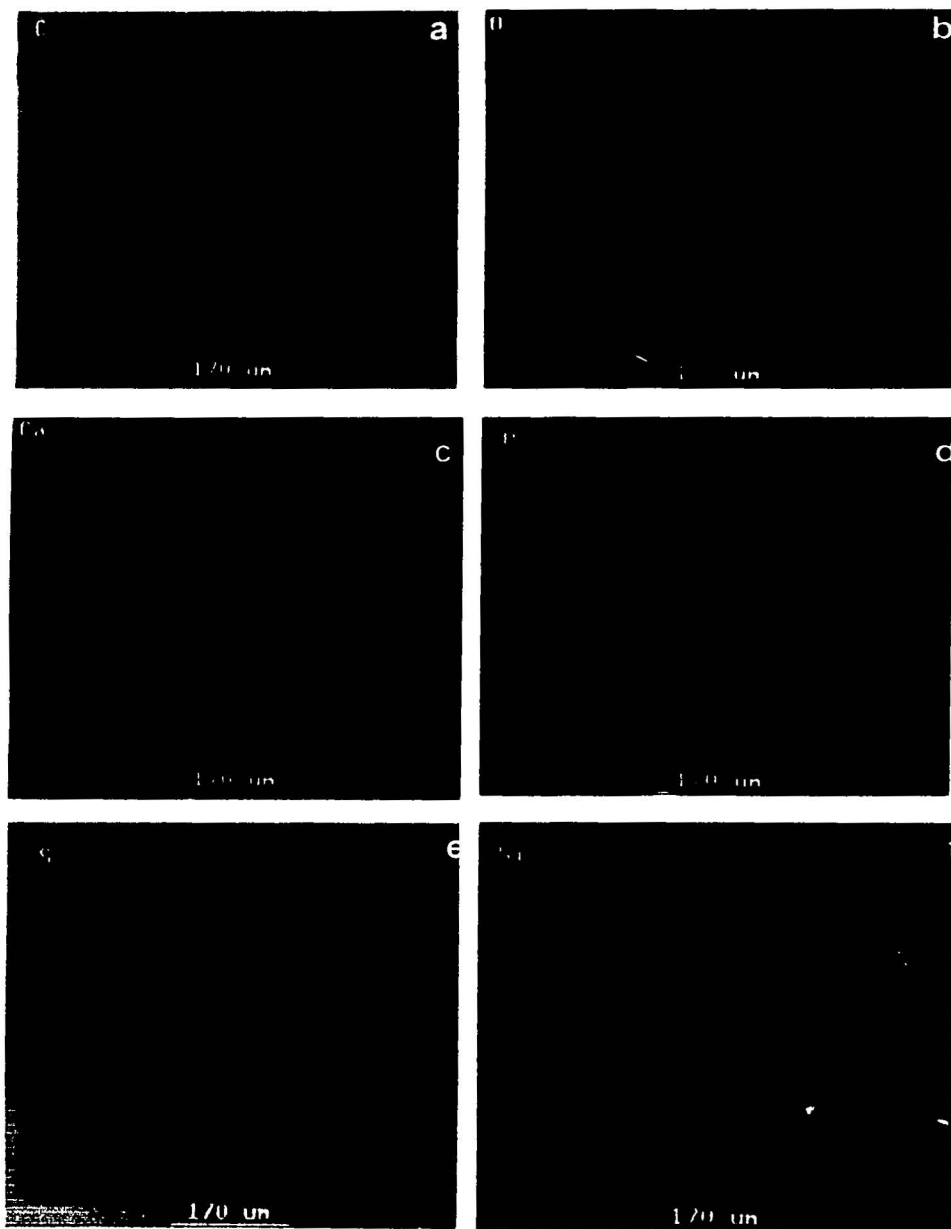


Fig. 5.37 Mapeo para zona superior del corte mostrando queratina y parte de hueso. a) mapeo para C, b) para O, c) para Ca, d) para P, e) para S, f) para Si. Se observa que el S prevalece en queratina y también se observa la relación Ca-P.



b Job : Una
Una con cubierta 1 (2/15/02 12:31)

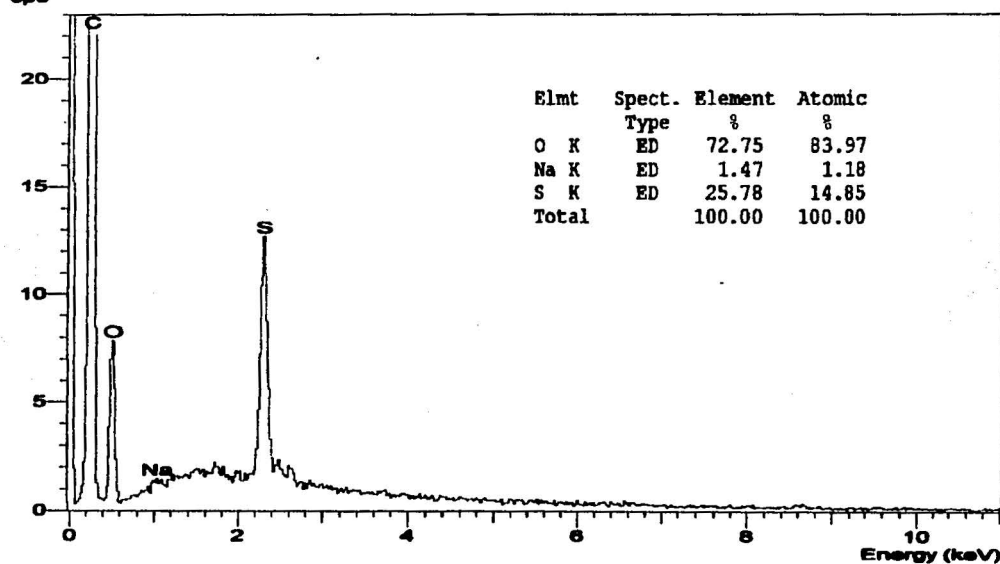
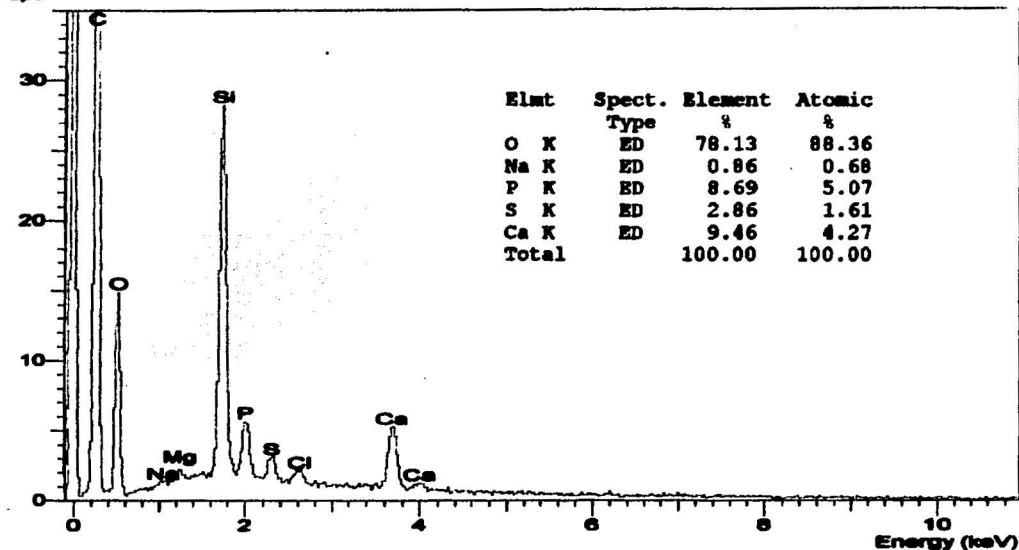


Fig. 5.38 a) Microanálisis en tres zonas del corte (mostrado en la fig. 5.29b), b) espectro para la zona 1 en queratina con picos para C, O, S y Na.

c Job : Una
(2/15/02 12:34)



d Job : Una
(2/15/02 12:38)

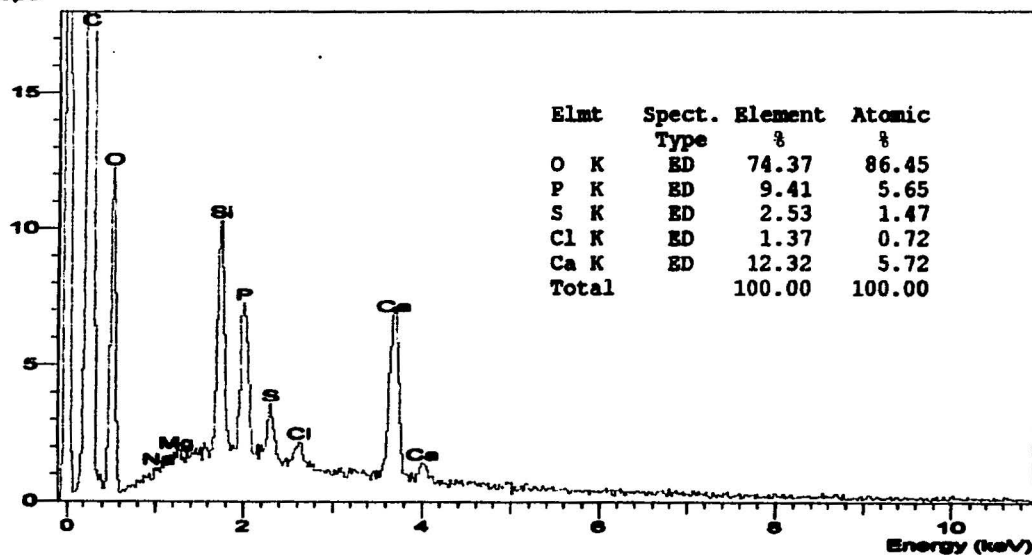


Fig. 5.38 c) Espectro para la zona 2 en hueso (zona clara) con picos para C, O, Si, Ca, P, S, Cl, Mg y Na, d) espectro para la zona 3 en hueso (zona oscura) observándose los mismos picos que en la zona 2.

Después de observar y analizar estas imágenes se tiene que, en queratina, no se observaron anillos de crecimiento o diferentes zonas que puedan interpretarse como capas o líneas de crecimiento, pero si hay cuarteaduras o grietas que no llegan a ser continuas. Éstas son de diferentes longitudes y algunas llegan a ser más anchas. En algunas uñas se distinguen dos zonas en cuanto al color o tono, se observan zonas claras y oscuras (ámbar claro y oscuro). En cuanto al hueso, tampoco se observaron líneas o marcas de crecimiento, sin embargo, se tienen imágenes interesantes de la estructura se reconoce claramente el sistema Haversiano y puede decirse que es poroso.

6. Discusión

Anillos de crecimiento en plastrón

Para el caparazón la ausencia de anillos o líneas de crecimiento podría explicarse por el desgaste, o la forma de crecimiento de los escudos. Sin embargo, en los escudos del plastrón si están presentes dichos anillos o líneas de crecimiento; aunque no en todos los organismos que fueron capturados y marcados se presentaron dichas marcas: de los 64 individuos, se tiene que sólo 18 presentaron las marcas. Además se vio que en los organismos de mayor tamaño no se observaban anillos, y para algunos se tenía que el plastrón era totalmente liso, sin líneas probablemente debido al desgaste, o bien, nunca presentaron líneas. En otros casos, como por ejemplo en organismos de menor tamaño o medianos, el plastrón tenía algunas marcas pero no eran claras, estaban muy encimadas y además eran demasiado oscuras, lo que las hacía ilegibles.

Esto nos hace pensar en varias razones por las cuales se pueden o no presentar marcas de crecimiento en el plastrón. Una de éstas podría ser el desgaste al que están sometidas las láminas del plastrón, siendo el desgaste en mayor o menor grado dependiendo tal vez del peso y tamaño del organismo. Por otra parte también se podría pensar en la competencia entre individuos, teniendo como resultado, para algunos organismos, condiciones favorables (disponibilidad de alimento y agua) o mayor oportunidad y por lo tanto no presentar periodos de decline o de crecimiento muy lento, teniendo crecimiento continuo, y como consecuencia no presentar marcas de crecimiento.

Además de la disponibilidad de alimento, otros factores como son el clima, factores ambientales, la estacionalidad y el sexo, están estrechamente relacionados con el crecimiento y por lo tanto con el registro de marcas de crecimiento en tejidos duros, ya sea en hueso o en estructuras queratinizadas.

Los rangos de crecimiento en reptiles varían, y las variaciones ocurren en zonas templadas y en zonas tropicales. Diferencias estacionales en rangos de crecimiento han sido observados para muchas especies de zonas tropical. Las

diferencias parecen estar relacionadas a condiciones ambientales (Andrews, 1982).

En el municipio de Nuevo Urecho la estacionalidad no es tan marcada, por ejemplo, la época seca no es lo suficiente ya que aún en esta época siempre hay cuerpos de agua. El clima y la estacionalidad están estrechamente relacionados con la disponibilidad de alimento y agua y con esto podría pensarse en un crecimiento continuo, al menos en algunos individuos, y así la carencia de marcas de crecimiento en el plastrón.

En cuanto a la relación entre medidas morfométricas y anillos de crecimiento en plastrón, se esperaba que largo del caparazón y largo del plastrón estuvieran más relacionadas con el número de anillos, sin embargo, se obtuvo que, sólo ancho y alto del caparazón estuvieron estrechamente relacionados con el número de anillos en plastrón (ancho, $r = 0.75$, $p = 0.0004$ y alto, $r = 0.90$, $p = 0.0003$). Para el resto de las medidas el coeficiente de correlación es positivo pero no hay una relación estrecha y además no es significativo. En función del tamaño (ancho y alto caparazón) se estableció una distribución de edad. Se distinguen claramente dos clases o grupos de tamaño, y con base en éstos podemos separar a los organismos juveniles (pequeños) de los adultos (grandes). Puede decirse que es poco confiable determinar la edad basándonos sólo en el conteo de anillos de crecimiento en plastrón.

Estructura y composición química de la uña por microscopia

La parte final de la falange está envuelta por queratina, y por debajo de esta se encuentra la capa germinativa, entonces, la uña está compuesta por 3 estructuras, la primera de adentro hacia fuera sería el hueso, (terminación de la falange, en forma de V), en seguida viene la capa a partir de la cual va a crecer la queratina, la capa germinativa, y finalmente la queratina es la capa exterior.

La uña o garra del cocodrilo es como un dedal que cubre completamente la falange distal, mientras que la garra de los gatos o ratones es una estructura quillada restringida o limitada por la superficie dorsal y lateral de la falange terminal (Hamrick, 2001).

En cuanto a composición química de la uña se tienen que el microanálisis de la queratina reveló C, O, N, H, y S.

La queratina es una proteína fibrosa que difiere de la fibroína de la seda en que contiene casi todos los aminoácidos conocidos. Tiene alto contenido en cistina y su contenido de histidina, metionina y triptofano es en cambio bajo (Manssur y Harrow, 1973).

Del microanálisis de hueso se obtuvo lo que de algún modo se esperaba: C, O, Ca, P, Si. Con ayuda del mapeo y las concentraciones registradas para Ca y P, se vio que había una relación 2 a 1 por lo que se trata de un fosfato de calcio, probablemente hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$).

La sustancia inorgánica del hueso está formada por depósitos submicroscópicos de un tipo de fosfato cálcico, muy parecido pero no idéntico al mineral hidroxiapatita. El mineral del hueso se deposita probablemente al principio en forma de fosfato cálcico amorfo y más tarde se reordena para formar hidroxiapatita cristalina. En su fase final, el fosfato cálcico está presente en forma de delgadas plaquitas o cristales en forma de palillos delgados. El mineral del hueso contiene cantidades apreciables de un ion citrato $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y de ion carbonato CO_3 . El lugar donde reside el carbonato es todavía materia en discusión: puede situarse sobre la superficie de los cristales o bien puede sustituir al PO_4 en la estructura del cristal o de ambas maneras a la vez. El magnesio y el sodio, que son constituyentes normales de los líquidos corporales, también están presentes en el mineral del hueso que hasta cierto punto es un depósito de almacenamiento de estos elementos (Fawcett, 1994).

La preparación de la muestra así como la observación, es decir, el tipo de iluminación empleado, fueron muy importantes para identificar estructuras y las diferencias o contrastes entre éstas. Los cortes gruesos sólo se observaron a través de luz reflejada, por campo claro, campo oscuro, luz polarizada y Nomarski, y cada tipo de iluminación proporcionó cierta información para las diferentes estructuras. Por ejemplo, la queratina y, en algunas ocasiones, la capa germinativa se observaron mejor por luz polarizada. En el estudio realizado por Thomas et al. (1997) se empleó este tipo de iluminación para resaltar los anillos de crecimiento en la queratina de la uña de *Trachemys scripta* y *Deirochelys*

reticularia. Al adelgazar los cortes y observarlos por luz transmitida se notó un mayor aporte en cuanto a detalle en las estructuras. El microscopio de luz es el adecuado para el estudio de la uñas, pero los cortes debieron ser lo suficiente delgados para que pasara la luz, y de esta forma, pudieran ser observados por luz transmitida.

La tinción también resultó ser de gran utilidad, al menos en hueso, aumentó el contraste y ayudó a distinguir o diferenciar la capa germinativa. En cuanto a la aplicación de ácido, en este caso ácido fosfórico, puede decirse que sólo se observaron cambios en hueso, no se registró ningún cambio cuando se aplicó en queratina. Debido a su estructura molecular, las proteínas fibrosas son muy insolubles en solventes comunes como agua, solución salina diluida, solventes orgánicos, ácidos y álcalis diluidos.

La principal aportación del MEB en este caso es el microanálisis, que reveló la composición química de cada estructura.

Puede decirse que con microscopia de luz se obtuvo mayor información en cuanto a estructura que con MEB, ya que muestra contraste y detalle en hueso y queratina, pero el MEB aporta el microanálisis y mapeo.

Anillos de crecimiento en uña

Como menciona Zug (1991), el crecimiento está regido por factores ambientales y podría padecer periodos de crecimiento rápido, muy lento o nada de crecimiento, y la alternancia de estos periodos puede producir diferentes capas en hueso y en queratina.

La técnica utilizada, al menos para esta especie, no reveló anillos o capas de crecimiento en uña, ni en hueso, ni en la parte queratinizada. Además es necesario mencionar que tampoco se vieron marcas al usarse alternativas como el ácido o glutaraldehído. Con este último, no se observó ningún cambio, ya que esta técnica es usada para fijar tejidos, es decir, para interrumpir procesos del metabolismo celular y así conservar las estructuras celulares y tisulares. Además, la fijación debe iniciarse lo más pronto posible para evitar la autólisis, y las uñas se

cortaron mucho tiempo antes de probarse dicha técnica, por lo cual no se observó ningún cambio o diferencia al menos en hueso.

Al menos para hueso, Zug (1991) sugiere que en tortugas sólo humero, fémur y algunos huesecillos muestran distintas capas de crecimiento, y que no todos los elementos esqueléticos poseen marcas distintivas que puedan ser contadas y medidas. Las capas de crecimiento son irregulares, indistintas o ausentes en la periferia del hueso de caparazón, en la vértebra cervical central, penúltimas falanges y ulna, y que aún en huesos largos como humero y fémur, donde son más evidentes estas capas, se presentan problemas para la observación y conteo por la remodelación y reabsorción del hueso, provocando por ejemplo líneas irregulares, discontinuas o encimadas.

En cuanto a estructuras queratinizadas, las capas de crecimiento o anillos de crecimiento no están presentes ni en caparazón ni en uñas. Para las uñas podría explicarse o justificarse por el desgaste al que están sometidas, es decir, la tasa de desgaste es mayor a la tasa de crecimiento de nuevas capas. Todo el tiempo están desgastándose y creciendo nuevas capas, o bien, los únicos registros de crecimiento o marcas de crecimiento son grietas que no llegan a ser líneas continuas y no pueden interpretarse como líneas de crecimiento, o simplemente nunca quedan registradas las marcas de crecimiento en esta estructura.

En el estudio realizado por Thomas et al. (1997) se observó que algunos de los cortes de tortugas más grandes en *Trachemys scripta* y *Deirochelys reticularia* fueron ilegibles. Entonces, basándose en su tamaño, sugirió que se trataba de individuos de mayor edad. Con esto supone que la dificultad en el conteo de las capas en uñas, al menos en individuos que se supone son de mayor edad, puede deberse a tres razones. La primera es que las capas se vuelven más y más angostas al disminuir el crecimiento de las tortugas, la segunda es que el desgaste ambiental puede eventualmente remover las capas externas, y la última es que las capas pueden ser tapadas por un incremento en la cantidad de melanina en las uñas conforme va creciendo la tortuga, especialmente en el macho melanístico *T. scripta*.

Conclusiones

- Sólo existe una relación estrecha entre ancho y alto caparazón y el número de anillos de crecimiento en plastrón, por lo que puede establecerse una relación directamente proporcional entre estas dos variables, puede decirse que entre más anillos de crecimiento en plastrón, la tortuga es de mayor tamaño. Sin embargo, es poco confiable determinar la edad basándonos sólo en el conteo de anillos de crecimiento en plastrón y en el tamaño.
- Un aspecto muy importante es que se utilizó una técnica sencilla, no fue necesario sacrificar organismos para remover las uñas, pero sobre todo es sencilla porque no se requiere gran esfuerzo en la preparación ni en el corte de las uñas. y aunque en esta especie no se observaron anillos de crecimiento en uña, es necesario probar dicha técnica en otras especies de tortugas de agua dulce, como por ejemplo en aquellas que están sometidas a una estacionalidad marcada.
- La microscopia fue de gran utilidad para observar la estructura de la uña y obtener su composición química. Se reconocieron 3 estructuras, de dentro hacia fuera: hueso, capa germinativa, queratina; además se obtuvo la composición química dando resultados semejantes a la uña de mamíferos. La capa de queratina presenta material orgánico y alto contenido en azufre (~10% atm). El hueso también presenta material orgánico, pero el material inorgánico es mayoritario y corresponde a hidroxapatita con impurezas de Al, Na, Mg y Si, aunque también presenta trazos de S. La interfase queratina-hueso presenta un alto porcentaje de material orgánico con precipitados de Si.
- No se observaron anillos de crecimiento en queratina, pero si se observaron líneas discontinuas que dan apariencia de grietas que, aunque se presentaron a lo largo de la capa de queratina, no pueden interpretarse como líneas de crecimiento. En hueso tampoco se observaron marcas de crecimiento, el hueso es muy poroso y por esta razón resulta difícil la observación de éstas.

Literatura citada

Aballe, M., J. López Ruiz, J.M. Badía y P. Odeva. 1996. Microscopia electrónica de barrido y microanálisis por rayos X. Editorial Rueda y Consejo superior de Investigadores Científicos, Madrid.

Andrews, R. M. 1982. Patterns of growth in reptiles. En C. Gans y F. H. Pough (eds.), Biology of the Reptilia, Vol. 13, Physiology pp.273-320. Academic Press, New York.

Arias, Ch. P. 1992. Urecho, lugar situado en Tierra Caliente. H. Ayuntamiento de Nuevo Urecho Michoacán. 15 p.

Arredondo, A. y A. Martínez. 1978. La microscopia óptica en el estudio de los protozoarios de vida libre. Tesis Licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias.

Bjorndal, K.A., A.B. Bolten, R. Avery Bennett, E.R. Jacobson, T.J. Wronski, J. Valeski y P.J. Eliazar. 1998. Age and growth in sea turtles: limitations of skeletochronology for demographic studies. Copeia 1998(1):23-30.

Casartelli, J.D. 1968. Microscopia Teórico-Práctica. Ediciones Urmo, España. 182 p.

Castanet, J. 1978. Les marques de croissance osseuse comme indicateurs de l'age chez le lézrds. Acta zool. (Stockh) 59 :35-48.

Castanet, J. 1981. Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. Arch. Biol. 92: 1-24.

Castanet, J. y E. Roche. 1981. Détermination de l'âge chez le lézard des murailles, *Lacerta muralis* (Laurenti, 1768) au moyen de la squeletteochronologie. Revue suisse Zool. 88(1) :215-226.

Castanet, J. 1986-1987. La squeletteochronologie chez les reptiles III. Application. Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris. 3^e Serie. Vol. 8 :157-172.

Castanet, J. 1994. Age estimation and longevity in reptiles. Gerontology 40:174-192.

De Buffrénil, V. y J. Castanet. 2000. Age estimation by skeletochronology in the Nile Monitor (*Varanus niloticus*), a highly exploited species. Journal of herpetol. 34(3):414-424.

Duarte, C. y M. Cabrera. 2000. Testing skeletochronology in Black Tegu lizards (*Tupinambis merianae*) of known age. Herpetological review. 31(4) 224-226.

Ernst, C.H. y R.H. Barbour. 1989. Turtles of the world. Washington, D.C., Smithsonian Inst. Xii 313 p.

Fawcett, D.W. 1994. Tratado de Histología. Undécima edición. Edit. Interamericana - McGraw-Hill. 1026 p.

García, E. 1977. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 2^a edición. Instituto de Geografía. UNAM, México. 252 p.

Garza, C. M. y A. González. 1998. Algunos aspectos de la ecología de *Kinostemon integrum*. Resumen en cartel. V Reunión Nacional de Herpetología, Jalapa, Veracruz del 11 al 14 de noviembre de 1998.

Germano, D. J. 1988. Age and growth histories of desert tortoises using scute annuli. Copeia 4:914-920.

Germano, D. J. 1992. Longevity and age-size relationships of populations of desert tortoises. Copeia 2:367-374.

Goldstein, J., D.E. Newbury, P. Echlin, D.C. Joy, A.D. Roming Jr., C.E. Lyman, C. Fiori y E. Lifshin. 1992. Scanning electron microscopy and X- ray microanalysis. Plenum Press, Nueva York y Londres. 820 p.

González, H. A. J. 1999. Estudio de los anfibios y reptiles del Municipio de Nuevo Urecho, Michoacán. Tesis Profesional. ENEP Iztacala. 99 p.

Guarino, F., Andreone, F. 1998. Growth and longevity by skeletochronological analysis in *Mantidactylus mycrotympanum*, a rain-forest anuran from Southern Madagascar. *Copeia*(1): 194-198.

Hamrick, M. W. 2001. Development and evolution of the mammalian limb: adaptative deiversification of nails, hovves, and claws. *Evol. and develop.* 3:5,355-363.

Heather, L.W. y P.T. Gregory. 1998. Determining the age of grater snakes (*Thamnophis spp.*) by means of skeletochronology. *Can. J. Zool.* 76:288-294.

Kusano, T., K. Fukuyama y N. Miyashita. 1995. Age determination of the stream frog, *Rana sakuraii*, by skeletochronology. *Journal of Herpetol.* 29 (4):625-628.

Locquin, M. y M. Langeron. 1985. Manual de microscopia. Editorial Labor, Barcelona. 373 p.

Manssur, A. y B. Harrow. 1973. Bioquímica básica. Décima edición. Edit. Interamericana. 725 p.

Nouira, S., M.E. Maury, J. Castanet y R. Barbault. 1982. Détermination squelettochronologique de l'âge dans une population de *Cophosaurus texanus* (Sauria, Iguanidae). *Amphibia-Reptilia* 3 :213-219.

Parham, J. y Zug, G. 1997. Age and growth of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) of coastal Georgia: an assessment of skeletochronological age-estimates. Bull. Mar. Sci. 61(2):287-304.

Peabody, F. 1961. Annual growth zones in vertebrates (living and fossil). J. Morphol. 108:11-62.

Ramírez-Bautista, A. 1994. Manual y claves ilustradas de los anfibios y reptiles de la región de Chamela, Jalisco, México. Cuad. 23 Inst. Biol. UNAM. 127 p.

Retana, G. O. 1996. Manejo de una trampa para tortugas de agua dulce: (Reptilia: Chelonia). Cuaderno N° 21 del Taller de Fauna Silvestre y Acuática del Neoártico y Neotropico. Editado en el Laboratorio de Vertebrados Terrestres, Facultad de Ciencias, UNAM.

Rochow, T.G. y P.A. Tucker. 1994. An introduction to microscopy by means of light, electrons, X-rays, or ultrasound. Second Edition. Plenum press, New York. 367 p.

Romer, A. S. 1997. Osteology of the reptilia. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida. 772 p.

Romer, A. S. y T. S. Parsons. 1987. Anatomía Comparada. Quinta Edición. Edit. Interamericana. México. 428 p.

Russell, A., L. Power. 1996. Growth and age of Alberta long-toed salamanders (*Ambystoma macrodactylum krausei*): a comparison of two methods of estimation. Can. J. Zool. 74: 379-412.

Sexton, O.J. 1959. A method of estimating the age of painted turtles for use in demographic studies. Ecology 40(4): 716-718.

Thomas, B., W. Beckman, K. Thompson, K.A. Buhlmann, J. Whitfield Gibbons y D.L. Moll. 1997. Estimation of age for *Trachemys scripta* and *Deirochelys reticularia* by counting annual growth layers in claws. *Copeia*. 1997(4) 842-845.

Vázquez, N. G. y O. Echeverría. 2000. Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Fondo de Cultura Económica. México. 168 p.

Wake, D. y J. Castanet. 1995. A skeletochronological study of growth and age in relation to adult size in *Batrachoseps attenuatus*. *Journal of Herpetol.* 29 (1):60-65.

Yacamán, M.J. y J. Reyes Gasga. 1998. Microscopia electrónica una visión del microcosmos. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Fondo de Cultura Económica. México. 143 p.

Zug, G. R. y A. S. Rand. 1987. Estimation of age in nesting female *Iguana iguana*: testing skeletochronology in a tropical lizard. *Amphibia-Reptilia* 8:237-250.

Zug, G. 1991. Age determination in turtles. *Society for the study of amphibians and reptiles. Herpetological Circulars* 20:1-28.

Zug, G. 1993. *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles.* Academic Press, New York. 527 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo

Orden Chelonida
Suborden Cryptodira
Familia Kinosternidae
Kinosternon integrum

HOJA DE CATÁLOGO				
México	Nuevo Urecho, Michoacán		Fecha:	
Cuerpo de agua	Tipo de río	Altitud	Nº de catálogo	Marca
Profundidad	Ancho: m.	Largo: m.		
DATOS DE CAPTURA				
sexo	Peso gr.	Hora	Tipo	Lugar
DATOS MERISTICOS				
Caparazón	mm.	Plastron	mm.	
I Largo		V Ancho		
II Ancho		VI Largo		
III Alto		VII Ancho puente		
IV 1er escudo vertebral		VIII Gulares		
		IX Humerales		
		X Pectorales		
		XI Abdominales		
		XII Femorales		
		XIII Anales		

Caparazón

Cabeza

Plastron

Cola

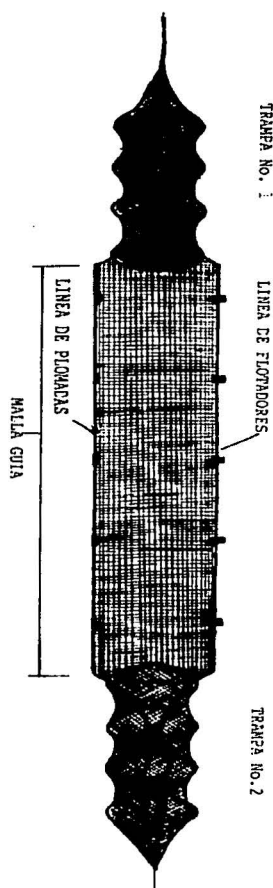
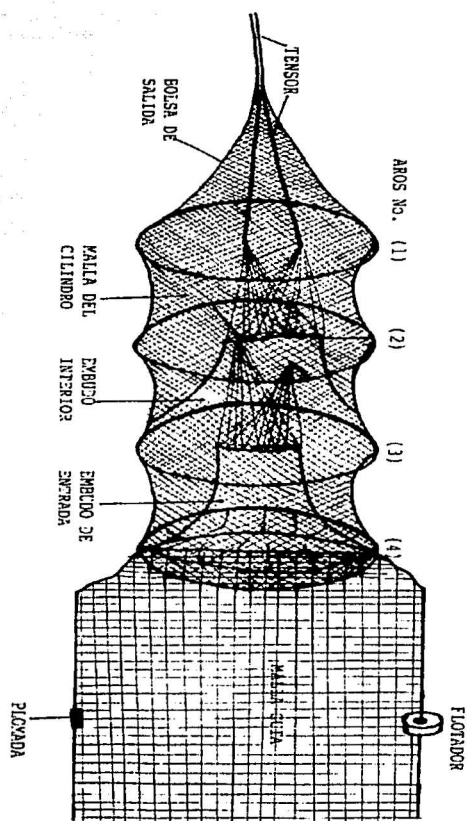
Ancho de la cabeza	mm.	Largo de la cabeza	mm.	Largo de la cola	mm.
Color	Marca		Anillos de crecimiento		
Parásitos	Muestra de uña.	Muestra de sangre	Contenido estomacal		
DATOS DEL COLECTOR					
Capturó	Preparó	Determinó	Depositado en:		

Hoja de catálogo. Diseño de José Hernández, Laboratorio de Vertebrados Terrestres, Facultad de Ciencias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Descripción trampa

La trampa es una malla cilíndrica de hilo nylon negro de un milímetro de grosor con una luz de malla de 1.5 centímetros, el cilindro tiene una longitud de 90 centímetros y esta soportado en cuatro arcos de fibra de vidrio de 50 centímetros de diámetro a una distancia uno de otro de 30 centímetros. Cada aro tiene un número según su posición, el aro número uno es el que se encuentra unido a una bolsa de salida y del tensor; en dirección hacia la entrada de la trampa, le siguen el aro dos, tres y cuatro. Alrededor del aro cuatro, se une una malla en forma de embudo dirigida hacia el interior del cilindro, que constituye el mecanismo de captura conduciendo a la tortuga dentro del cilindro quedando atrapada, este embudo facilita la entrada de la tortuga, y por su tensión y su efecto físico no permite la salida del animal. Para garantizar su captura se localiza otro embudo que se une a la circunferencia del aro tres y que de igual forma solo favorece el paso hacia adentro del cilindro, entre los aros uno y dos, y en caso de que el organismo quiera retroceder, se encontrara con las barreras que forman los extremos angostos de los embudos que evitan su salida, estos embudos terminan en ramas de hilos y no permiten que la tortuga encuentre el paso, además de estar tensos por un cordel que los acciona y que a su vez cierra la bolsa de salida para sacar la tortuga capturada. A éste cordel de hilo se le llama tensor primario, los tensores secundarios son unos cordeles de hilo nylon que se desprenden del aro dos y sujetan los embudos tensándolos lateralmente. El cilindro de malla tiene una longitud de 9 metros y una altura de un metro; además tiene una línea superior de flotadores, un flotador cada 50 centímetros, y una línea inferior de plomadas, la cual debe tocar el fondo o piso, cada plomada tiene la misma separación que los flotadores. Esta malla forma una barrera que impide el paso de la tortuga por lo que tiende a seguir la malla que la conducirá a una de las dos trampas dependiendo la dirección que tome (Retana, 1996).



Trampa de embudo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN