

Aportaciones al estudio osteocronológico en un ejemplar de *Testudo hermanni*

Alba Prieto¹, Albert Martínez-Silvestre², Joaquim Soler², David Bretones¹, Eudald Pascual¹ & Josep Mari¹

¹ Escola Mestral. 08980 Sant Feliu de Llobregat. Barcelona.

² CRARC (Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya). 08783 Masquefa. Barcelona. C.e.: crarc@amasquefa.com

Fecha de aceptación: 21 de noviembre de 2012.

Key words: *Testudo hermanni*, Hermann's tortoise, skeletochronology.

Existen diversos métodos para la determinación de la edad de las tortugas. El más fiable es el que se obtiene a partir del seguimiento de individuos recién eclosionados mediante el método de captura-marcado-recaptura (Zug, 1991). En ausencia de esta posibilidad, también existen métodos basados en el estudio de los marcadores de crecimiento, entre los que cabe destacar las técnicas basadas en el análisis de los escudos epidérmicos (esclerocronología) y del crecimiento óseo (osteocronología)

La esclerocronología se fundamenta en las señales externas que proporcionan los escudos córneos del caparazón, cuyo desarrollo responde a cambios estacionales. Según este método, el ciclo de crecimiento del escudo en condiciones de clima templado (en el que hay un único periodo de crecimiento anual) se puede asociar a un año (Zug, 1991). Éste es el método habitualmente utilizado en el caso de ejemplares vivos (juveniles y subadultos) en estudios poblacionales, y su eficacia se ha evaluado específicamente en la tortuga mediterránea (Bertolero *et al.*, 2005). Sin embargo es un método poco preciso en la datación de animales longevos y debe usarse con cautela incluso en subadultos (Pare & Lentini, 2010).

La esqueletocronología se fundamenta en que los reptiles presentan bandas de crecimiento cíclico en la mayor parte de sus huesos (Castanet, 1994). Los elementos del esqueleto crecen a medida que se va depositando hueso en su

superficie externa. Este crecimiento responde a cambios estacionales, por lo que presenta un patrón periódico que se observa en una sección de hueso con la alternancia de capas claras y oscuras. Las zonas claras se forman en períodos de crecimiento rápido, y las oscuras (Líneas de Parada de Crecimiento [LPC]) corresponden a períodos de crecimiento lento o de no crecimiento. En el periostio, una zona clara y una oscura consecutivas conforman un ciclo de crecimiento óseo completo, denominado Marcas de Crecimiento Esquelético (MCE) (Zug, 1991). La periodicidad anual de estas marcas se establece frecuentemente en los animales salvajes, por lo que constituye un buen criterio de edad. Por último, esta técnica precisa de porciones de huesos largos, por lo que la realización en sí misma implica un animal muerto recientemente o fósil (Ehret, 2007), o una amputación accidental o debida a una biopsia clínica.

En este artículo presentamos un caso de cálculo de edad mediante esqueletocronología en un individuo de edad muy avanzada de tortuga mediterránea occidental (*Testudo hermanni hermanni*). En él se han probado distintos tipos de tinción y procesado a fin de calcular con la mayor exactitud posible la edad del individuo.

El ejemplar examinado era una hembra de edad avanzada, a la que se le asignó, por datos históricos de los propietarios, tamaño, peso, aspecto general y detalles como el aspecto

ocular, textura de la piel y crecimiento de las uñas y pico, una edad superior a 70 años. El ejemplar murió en el transcurso de la hibernación de 2008.

A partir del estudio de necropsia, se extrajeron los fémures y húmeros, y se aplicaron las técnicas osteocronológicas en el húmero y fémur derechos. Del húmero se obtuvieron cuatro muestras, tres de ellas gruesas (4 mm). Respecto a las muestras gruesas, dos de ellas se sometieron al proceso de descalcificación y, posteriormente, se incluyeron en parafina para observarlas con microscopía tradicional (tinción de hematoxilina / eosina). Una tercera muestra se destinó a microscopía óptica sin descalcificar (tinción con azul de toluidina y tricrómica). La cuarta muestra (muestra delgada; < 4 mm) se destinó a la técnica de abrasión y montaje con bálsamo del Canadá (Prieto, 2009). Del fémur se obtuvieron tres muestras que se mantuvieron en formol al 10% en recipientes individuales hasta el momento de procesarlos, montándose posteriormente en metil-metacrilato para ser observados mediante microscopía electrónica de rastreo (Manzanares *et al.*, 1997).

Se determinó la edad de la tortuga sobre microfotografías ampliadas de cortes transversales de los huesos y siguiendo detalladamente las líneas observadas. Posteriormente, se realizó una intravalidación y datación de la muestra seleccionada aplicando métodos dendrológicos (datación cruzada y Skeleton Plot, extrapolado de los utilizados en botánica y gestión forestal), teniendo en cuenta que las tortugas que viven en zonas donde el clima es templado tienen una única fase de crecimiento anual. La datación cruzada permite detectar y corregir la falta de sincronización entre las series de anillos (Campelo *et al.*, 2007). El método de datación cruzada incluye: el recuento de anillos en

diferentes radios de una misma muestra, la datación de los mismos, la medición del grosor de las zonas de crecimiento entre anillos y, finalmente, la elaboración de un gráfico Skeleton Plot para cada radio (Stokes & Smiley, 1968; Holmes, 1983). Posteriormente, se comparan los gráficos obtenidos, identificando las zonas de cada radio más adecuadas para el recuento (Gutierrez, 2008).

En la Tabla 1 y Figura 1 se observan e ilustran, respectivamente, los resultados obtenidos mediante todos los métodos de tinción y observación utilizados en este caso:

- 1) Desgaste (abrasión) sobre hueso sin descalcificar montado en agua (Figura 1A), montado en bálsamo del Canadá (Figura 1B), montado y observado con luz polarizada (Figura 1C).
- 2) Tinción con hematoxilina / eosina sobre hueso previamente descalcificado e incluido en parafina (Figura 1D).
- 3) Tinción tricrómica sobre hueso sin descalcificar (Figura 1E).
- 4) Tinción con azul de toluidina sobre hueso sin descalcificar (Figura 1F).
- 5) Observación al MER con electrones retrodispersados (Figura 1G).
- 6) Observación al microscopio de Nomarski (Figura 1H).

Se llevó a cabo el recuento de líneas sobre microfotografías ampliadas de los tres mejores métodos. De éstos, el que permitió la observación más nítida de las marcas de crecimiento fue la tinción con azul de toluidina sobre hueso sin descalcificar, contándose un número de líneas que oscilaba entre 74 y 77. Por este motivo, este método fue el seleccionado para aplicar la datación cruzada y el Skeleton Plot. Como el hueso de las tortugas tiene un crecimiento desde dentro hacia fuera (Castanet & Cheylan,

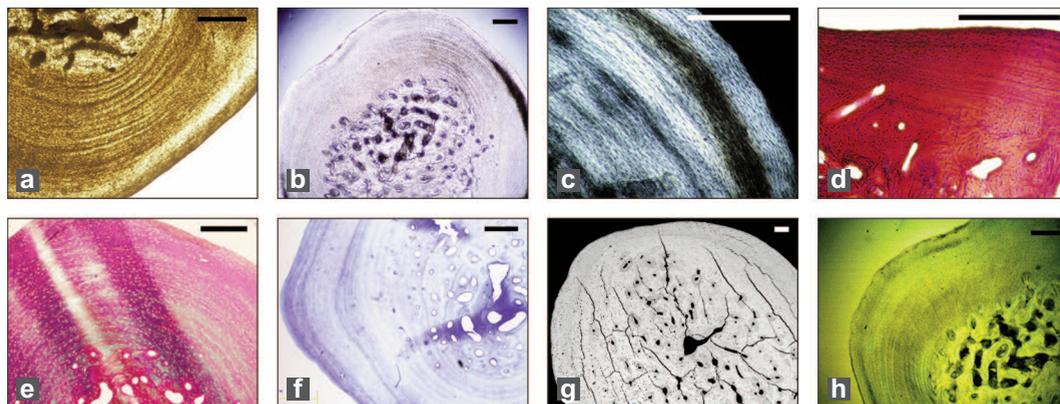


Figura 1. Microfotografías comparativas de los distintos métodos utilizados en la datación de *T. hermanni*. (a) Desgaste (abrasión) sobre hueso sin descalcificar montado en agua. (b) Montado en bálsamo del Canadá. (c) Montado y observado con luz polarizada. (d) Tinción con hematoxilina-eosina sobre hueso previamente descalcificado e incluido en parafina. (e) Tinción tricrómica sobre hueso sin descalcificar. (f) Tinción con azul de toluidina sobre hueso sin descalcificar. (g) Observación al MES (Microscopio Electrónico de Scanning) con electrones retrodispersados. (h) Observación al microscopio de interferencia de Nomarski. Barra = 300 micrómetros. Fotografías: David Bretones: A, B, C, D, E, F, G; Alba Prieto: H.

1979), también es posible datar el último anillo si, como en este caso, se conoce el año que murió, lo que permite datar el resto de anillos. La datación cruzada, ajustada mediante el Skeleton Plot, permitió estimar la edad de la tortuga en 75 años.

Los reptiles presentan marcas de crecimiento cíclico en la mayor parte de sus huesos. Hasta el momento, la mayoría de estudios constatan que la osteocronología es un método efectivo para la determinación de la edad de reptiles jóvenes. Así, los límites de

Tabla 1. Valoración de los métodos de observación en función de las dificultades de procesado y conteo, así como la edad final estimada.

Método	Dificultad procesado	Dificultad conteo	Edad calculada
Bálsamo Canadá	Baja	Alta. Contraste poco acusado por la ampliación de lectura. No diferenciación clara de los anillos.	73 - 78
Hematoxilina / eosina	Alta	Muy alta. La descalcificación afecta a la posterior tinción e interpretación de las distintas bandas, especialmente en un animal de tanta edad.	IMPOSIBLE
Tricrómica	Media	Media. Escasa diferenciación de anillos de crecimiento. Artefactos comunes.	70 - 72
Azul Toluidina	Media	Baja. Diferenciación adecuada y nítida de anillos de crecimiento.	75
MER	Muy alta	Muy alta. Elevada posibilidad de confusión con artefactos.	IMPOSIBLE
Nomarski	Alta	Alta. Sensación de relieve que produce falsos positivos respecto a las verdaderas bandas de crecimiento.	IMPOSIBLE

longevidad en reptiles usando este método se ha probado en saurios de hasta 25 años (Castilla & Castanet, 1986) y quelonios de hasta 56 años (Curtin *et al.*, 2009).

Para determinar la edad mediante el método de osteocronología se cuentan y se miden las MCE periósticas, teniendo en cuenta que cada una equivale a un año en tortugas de zonas templadas (Zug, 1991). El recuento de las MCE endósticas no es un método fiable ya que éstas presentan un crecimiento acíclico (Zug, 1991). Por otra parte, en estudios llevados a cabo con diferentes especies de tortugas se constata que las LPC observadas en secciones de varios huesos planos (mandíbula y placas del caparazón) son menos numerosas que en las de los huesos largos (húmero y fémur) debido al fenómeno de reabsorción y, además, su recuento es más difícil (Castanet & Cheylan, 1979).

Las zonas claras son anchas, opacas y ricas en células y vasos sanguíneos, mientras que las oscuras son más estrechas y pobres en células. Así pues, las células tienden a agruparse al comienzo de cada zona clara y su concentración va disminuyendo progresivamente en dirección a la LPC adyacente. Esta repartición diferencial acentúa la expresión del fenómeno de crecimiento cíclico. Las microfotografías muestran que la mineralización de las diferentes zonas es prácticamente equivalente, mientras que la distribución heterogénea de las células puede inducir a pensar que hay variaciones que no se traducen en el estado real de la mineralización (Castanet & Cheylan, 1979).

Sin embargo, la osteocronología puede presentar los siguientes problemas: la pérdida de alguna LPC o MCE por reabsorción o remodelación, la presencia de LPCs discontinuas e irregulares (no visibles en todas las partes de un mismo corte de hueso) y la presencia de MCEs irregulares, compactas y no visibles (Zug, 1991).

También puede afectar al resultado final la tinción empleada, siendo necesario y aconsejable emplear varios métodos en cada caso para poder contrastarlos posteriormente entre ellos. Asimismo, hay que tener en cuenta que la determinación de la edad mediante esta metodología siempre será por defecto, es decir, el número de marcas de crecimiento óseo siempre será igual o inferior a la edad real de la tortuga, pero en ningún caso puede ser superior. Otro posible sesgo en el cálculo consiste en la adjudicación de un anillo por año, para lo cual se tiene que calibrar ese dato en cada caso y para cada especie mediante la bibliografía existente. También hay que tener en cuenta que con la edad aumenta la dificultad de datar con exactitud, debido al aumento de la ocurrencia de los procesos de remodelación y reabsorción ósea.

En nuestro caso y por los motivos señalados, fue necesario corroborar los resultados con la aplicación de los métodos empleados en la dendrocronología forestal, una de las disciplinas más desarrollada en el campo de la datación. El método de la datación cruzada permitió determinar con más precisión la longevidad de la tortuga. Este estudio sugiere, por tanto, la ampliación del margen de seguridad y fiabilidad de esta técnica en una tortuga de edad avanzada.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos a la Dra. E. Gutiérrez (Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona), a la Dra. M. Durfort (Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona) y a la Dra. C. Manzanares (Unidad de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona) sus aportaciones bibliográficas y su colaboración en la obtención y análisis del material utilizado. Por último, deseamos agradecer al revisor del artículo sus importantes aportaciones al manuscrito original.

REFERENCIAS

- Bertolero, A., Carretero, M.A. & Llorente, G.A. 2005. An assessment of the reliability of growth rings counts for age determination in the Hermann's Tortoise *Testudo hermanni*. *Amphibia-Reptilia*, 26: 17-23.
- Campelo, F., Gutiérrez, E. Ribas, M., Nabais, C. & Freitas, H. 2007. Relationships between climate and double rings in *Quercus ilex* from northeast Spain. *Canadian Journal of Forest Research*, 37: 1915-1923.
- Castanet, J. & Cheylan, M. 1979. Les marques de croissance des os et des écailles comme indicateur de l'âge chez *Testudo hermanni* et *Testudo Graeca* (Reptilia. Chelonia. Testudinidae). *Canadian Journal of Zoology*, 57: 1649-1665.
- Castanet J. 1994. Age estimation and longevity in reptiles. *Gerontology*. 40: 174-92.
- Castilla, A.M. & Castanet, J. 1986. Growth, age and longevity of *Lacerta lepida* assessed by skeletochronology. 331-336. In: Rócek, Z. (ed.), *Studies in Herpetology (Proceedings of the Third Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica)*. Charles University. Prague.
- Curtin, A.J.; Zug, G.R. & Spotila, J.R. 2009. Longevity and growth strategies of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in two American deserts. *Journal of Arid Environments*, 73: 463-471.
- Gutiérrez, E. 2008. La dendrocronología: métodos y aplicaciones. 303-315. In: Nieto, X & Cau, M.A. (eds.), *Arqueología náutica mediterránea*. Centre d'Arqueologia Subaquàtica de Catalunya. Barcelona.
- Ehret, D. 2007. Skeletochronology: a method for determining the individual age and growth of modern and fossil tortoises (reptilia: testudines). *Bulletin of the Florida Museum of Natural History*, 47: 49-72.
- Holmes, R.L. 1983. Computer assisted quality control in tree-ring dating and measurements. *Tree-ring Bulletin*, 43: 68-78
- Manzanares, M.C., Calero, M.I., Franch, J., Jiménez, M.P. & Serra, I. 1997. Optimisation of a scheduled study for undecalcified samples. *Microscopy and Analysis*, 11: 31-33.
- Pare, J. & Lentini, A. 2010. Reptile geriatrics. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13: 15-25.
- Prieto, A. 2009. *Osteocronología aplicada a la tortuga mediterránea II*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. <http://issuu.com/escolamestral/docs/osteocronologia2_tr_complet_br?mode=window&backgroundcolor=%23222222>. [Consulta: 17 octubre 2012]
- Stokes, M.A. & Smiley, T.L. 1968. *An introduction to tree-ring dating*. University of Chicago Press. Chicago, Illinois.
- Zug, G. R. 1991. Age determination in turtles. *Herpetological Circular*, 20: 1-28.