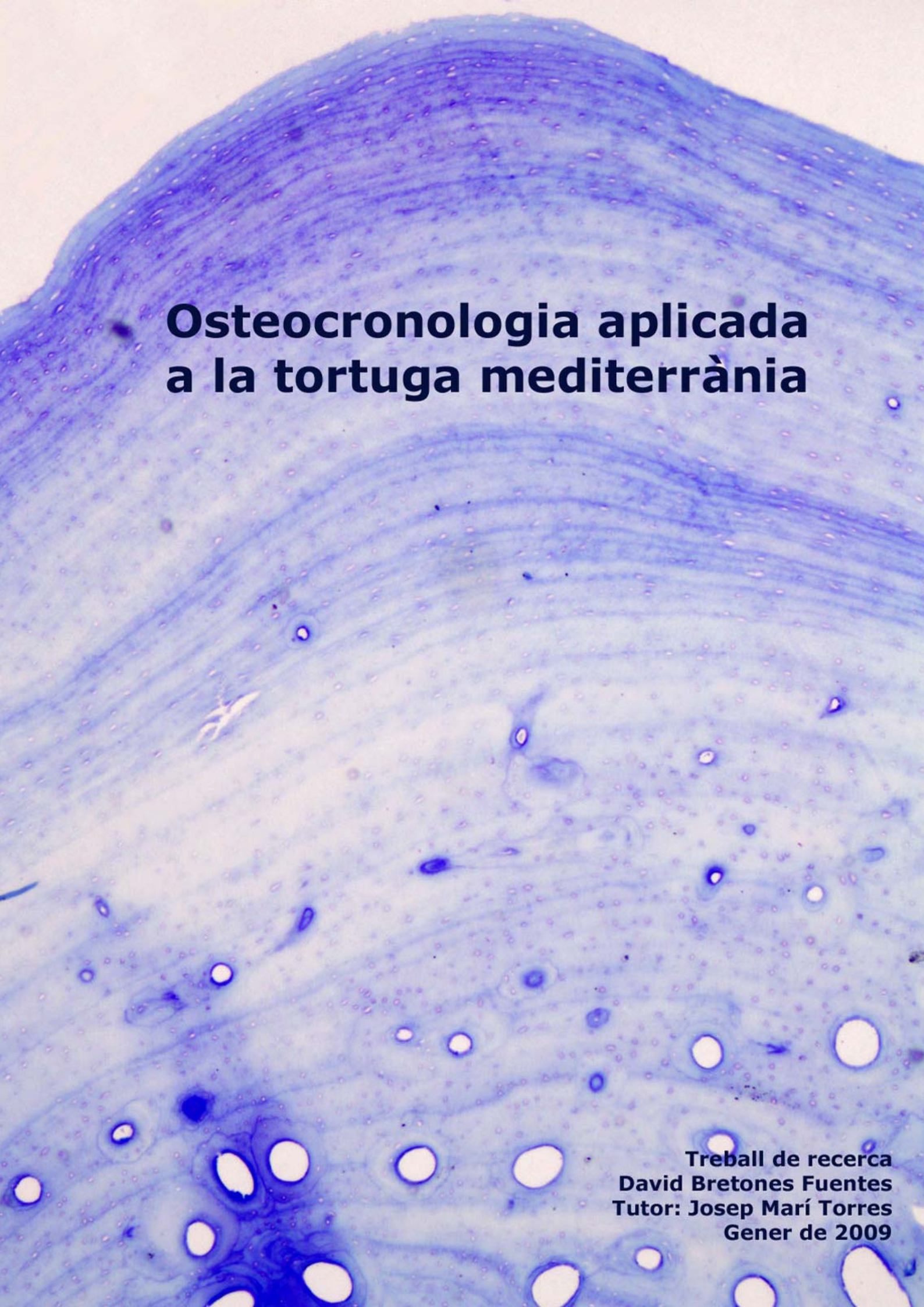

Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània

Treball de recerca
David Bretones Fuentes
Tutor: Josep Marí Torres
Gener de 2009

Índex

Pàg.

Pròleg----3

1. **Introducció**----5

1.1 Éssers de vida curta i éssers de vida llarga----5

1.2 Mètodes biològics per a la determinació de l'edat----7

1.3 L'osteocronologia en tortugues (antecedents)----8

1.4 Material biològic (la tortuga 7492)----9

2. **Obtenció del material fresc**----11

2.1 Descomposició controlada----12

2.2 Neteja ossos llargs----14

3. **Metodologies d'osteocronologia -**----16

3.1 Talls de fèmur ----17

3.1.1 Amb serra de rellotger (a l'Escola)----17

3.1.2 Amb serra odontològica----18

3.2 Mètode 1 (Per abrasió o desgast)----21

3.2.1 Observació al microscopi----21

3.2.2 Resultats----22

3.3 Mètode 2 (Microtomia amb descalcificació)----25

3.3.1 Descalcificació----25

3.3.2 Deshidratació----26

3.3.3 Inclusió en parafina----27

3.3.4 Obtenció dels talls----28

3.3.5 Tinció----29

3.3.6 Resultats----29

3.4 Mètode 3 (Microtomia en sec)----30

3.4.1 Microscopi electrònic de rastreig----30

3.4.1.1 Resultats----31

3.4.2 Microscopi òptic----34

3.4.2.1 Resultats----35

4. **Discusió**----38

5. **Conclusions**----40

6. **Bibliografia**----41

Pròleg

El tema del meu treball de recerca s'inclou en un dels projectes d'investigació de la biologia de la tortuga mediterrània (*Testudo hermanni*) que es porten a terme al *Pati de les tortugues*[1] de l'Escola, amb estreta col·laboració amb el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC). Aquest projecte, relacionat amb la datació de l'edat de les tortugues, es va iniciar el curs passat en un treball de recerca anterior, quan un alumne (Eudald Pascual, 2008), malgrat no era l'objectiu del seu treball[2] es va interessar en conèixer l'edat de les tortugues del Pati. Va preguntar a Joaquim Soler (director tècnic del CRARC) que li va explicar el mètode basat en els anells de creixement anuals que es formen a les plaques còrnies de la closca, però li va advertir que no és un mètode fiable més enllà dels 12 anys. També li va explicar que hi ha altres mètodes, basats en les dimensions i sexe dels animals, però que són molt poc exactes. Malgrat tot, l'Eudald va insistir als responsables del CRARC perquè, aprofitant el seu ull d'experts, aventuressin una edat aproximada per a les dues tortugues més velles. Tant en Joaquim com l'Albert[3] coincidiren en adjudicar uns 50 anys a la tortuga de mida més gran i uns 70-80 a la més vella, afegint que no es podia saber perquè l'únic sistema fiable i exacte per a determinar la longevitat de les tortugues no es pot aplicar a exemplars vius, ja que s'ha de fer a partir d'una preparació microscòpica d'un tall transversal d'os llarg (húmer o fèmur) per observar-ne les línies anuals de creixement.

Precisament, aquesta tortuga més vella (que arrossegava alguns problemes que més endavant s'explicaran) va morir en el decurs de l'última hibernació. El mateix Eudald ho va notificar en l'exposició oral del seu treball de recerca davant el tribunal i alumnes de Batxillerat[4] (entre ells, jo mateix) i va proposar que algú s'animés a portar a terme aquesta tècnica, aprofitant la mort de l'animal, i esbrinar fins a quin punt en Joaquim Soler i l'Albert Martínez havien encertat (o errat) en haver-li suposat una edat d'uns 70 anys. No cal dir que em va entusiasmar la idea i quan en Josep Marí va proposar un treball de recerca sobre longevitat i datació biològica m'hi vaig apuntar ràpidament.

El treball va començar amb l'estudi de la longevitat en general, però cada vegada s'anava concretant més cap a la datació de la tortuga, sobretot després de llegir un parell d'articles molt específics que ens va proporcionar en Joaquim Soler, en els que es detallava aquesta tecnologia, i ens adonàrem de dues coses: d'una banda, no era un

[1] Indret de l'escola amb arbres i un bassal que des de juny de 2003 és instal·lació col·laboradora del DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya).

[2] L'objectiu principal del seu treball de recerca estava relacionat amb les variacions de pes durant el procés d'hibernació de les tortugues.

[3] L'Albert Martínez Silvestre és el responsable científic del CRARC.

[4] A la nostra escola és tradició que els alumnes de 1r de Batxillerat assisteixen a les exposicions dels TR dels de 2n.

mètode tant fàcil com semblava a primera vista; i de l'altra, no s'havia portat a terme en tortugues de més de 20 anys d'edat. Això volia dir que si volíem treure res en clar havíem de ser molt curosos en la metodologia i, evidentment, no en teníem prou amb el laboratori de biologia de l'Escola, necessitàvem consultar experts de diversos àmbits i ens posàrem en contacte amb alguns departaments de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (Biologia Animal, Biologia Cel·lular i Ecologia) i amb la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana (Campus de Bellvitge) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Així doncs, aquest és un treball essencialment metodològic, en el que s'utilitzen diversos sistemes d'osteocronologia amb l'objectiu principal d'esbrinar si algun d'aquests serveix per a la datació de tortugues de més de 20 anys d'edat.

Es comença amb una breu introducció sobre longevitat, per tal de situar la de les tortugues en el marc del conjunt d'éssers vius, es continua amb un petit anàlisi dels mètodes de datació més utilitzats i s'acaba la introducció amb un apartat dedicat a la osteocronologia en tortugues. A partir d'aquí comença la part més experimental del meu treball de recerca.

1. Introducció

1.1 Éssers de vida curta i éssers de vida llarga

La longevitat dels éssers vius depèn del seu pla corporal i de la seva estratègia de vida, en tot això influeixen les condicions ambientals en les que viuen, la comunitat en la que estan, si hi ha més o menys depredadors, etc.

Aquesta longevitat es pot distingir gràcies a les marques, bandes o anells de creixement que presenten alguns organismes els quals són influïts pels factors ambientals que determinen la seva densitat i amplitud; per això les espècies d'indrets polars i temperats tenen un ampli espaiament entre anells; les majors amplituds representen freqüentment mesos càlids, mentre que anells molt propers uns dels altres indiquen mesos freds.
Aquests anells són generalment microscòpics i pel seu estudi es requereix obtenir seccions fines de les estructures rígides en les que s'observin canvis en la densitat òptica dels seus components. El procediment estàndard per el processament d'estructures rígides inclou, entre d'altres, les següents etapes generals: obtenció de la mostra, tractament de l'estructura (neteja i eliminació dels teixits tous), obtenció de seccions fines i la seva elaboració, identificació i recompte dels anells de creixement, anàlisi i interpretació.
En organismes terrestres s'observen els anells de creixement a la fusta dels arbres, a closques, a banyes, a diferents ossos de moltes espècies animals, etc. Aquests anells es formen gairebé sempre en l'estació freda, quan es retarda el creixement manifestant-se la màxima discontinuïtat al reprendre aquell.
En organismes marins es poden distingir els anells en algues vermelles coral·lines, escames, otòlits[5], rajos d'aletes, espines i vèrtebres de peixos, closques de mol·luscs bivalves i crustacis cirrípedes, estatòlits[6] de mol·luscs cefalòpodes, mandíbules de cucs poliquets, exosquelets de coralls, dents de dofins, etc.

Els éssers més vells de la Terra són els arbres. El més vell de tots habita a les muntanyes de Nevada**,** és el *Pinus longaeva* que té, aproximadament, cinc mil anys[7];

[5] Concreció calcària que en nombre variable es troba en els estatocists o bé en l'utricle i el sàcul de l'orella interna dels vertebrats i que, quan canvia de posició a causa de l'arribada d'ones sonores o bé a causa del moviment de la part del cos on són aquests òrgans, sensibilitza determinades cèl·lules sensorials, que transmeten una informació auditiva o de posició als centres nerviosos.
[6] Cadascuna de les vesícules que constitueixen l'òrgan d'equilibri d'alguns invertebrats aquàtics.
[7] Dels exemplars vius el més vell que s'ha trobat en té uns 4600 i el que s'ha datat com a més vell, però ja mort, uns 4900 anys (Pakenham, 2008).

gairebé tots els arbres d'aquesta espècie de més de 4000 anys tenen la major part de la seva estructura morta i únicament mantenen algunes branques vives. Després d'aquest arbre vindrien les gegants sequoies (*Sequoidendron giganteum*) amb uns 4000 anys de vellesa (Strasburger, 2004). I a més distància, amb 1500 anys, el teix (*Taxus baccata*) que és l'espècie europea de més elevada longevitat (Masalles i col, 1988) i algun roure mil·lenari (Strasburger, 2004).

En el regne animal, les esponges són les que viuen més temps, en el cas d'espècies com *Ceratoporella nicholsoni,* que viuen al nord de Jamaica, duren fins a un miler d'anys. Aquesta esponja permet saber els canvis ambientals gràcies a la capacitat que té de fabricar-se un esquelet calcari (Sanz, 2000). Després d'aquest cas extrem, ja passaríem a animals de 100 a 250 anys, entre els que es troben la tridacna (*Tridacna*), un bivalve gegant, i les mateixes tortugues, entre les que destaquen alguns exemplars gegants de les illes Galàpagos (*Geochelone elephantopus*) (Hickman, Roberts i Larson, 1997) i pel que fa a la tortuga mediterrània la longevitat mitjana en condicions naturals és de 20-25 anys amb un màxim observat de 90 anys (Gosàlbez i col, 1987). L'esperança de vida depèn molt de l'indret on viuen (Vetter, 2006). Així, en captivitat, on les condicions d'alimentació i d'entorn són favorables, on no hi ha depredadors, poden sobrepassar els 100 anys (Soler, 2008). És el cas d'un exemplar de tortuga mediterrània que tenien al CRARC de 115 anys[8] (Soler i Martínez, 2005), representant un veritable rècord en aquesta espècie.

Cal fer constar que si es tingués en compte la vida latent, l'ésser viu més vell de tots no es trobaria en cap dels regnes anteriors, sinó en el regne dels moners, un ésser unicel·lular, un bacteri del gènere *Bacillus* d'uns 250 milions d'anys que es va trobar atrapat en un cristall de sal, on havia estat en forma d'espora, en estat latent (Sanz, 2000; Bujosa, 2006).

[8] Aquest exemplar va morir al CRARC l'hivern de 2006 i malauradament, segons ens han comunicat recentment, no portaren a terme una descomposició controlada de l'animal i no s'han pogut recuperar ossos llargs (els 115 anys s'havien calculat a partir de la detallada documentació que havien aportat els seus propietaris).

1.2 Mètodes biològics per a la determinació de l'edat

- Dendrocronologia: També coneguda com datació pels anells dels arbres, és un mètode científic de datació basat en l'anàlisi dels anells que tenen els arbres dins del tronc, visibles a causa de la distinció entre la fusta primerenca produïda a la primavera i la fusta tardana produïda a finals de l'estiu o durant la tardor i que són més marcades quan les variacions anuals de l'ambient són mes rigoroses, per això les espècies que habiten ambients molt constants (arbres tropicals) solen reflectir l'absència de marques. En la majoria de regions del món el patró que es segueix és que per cada any natural es produeix un anell, però en alguns indrets en els que es presenten dues estacions de pluja per any poden originar-se dos anells de creixement anuals (Nabors, 2006). Els factors que influeixen en la seva formació són principalment variacions climàtiques (precipitació pluvial i temperatura de l'aire); a causa d'això es pot saber en les condicions ambientals en les que ha viscut (anells amb poca separació entre ells: ambient fred, anells amb un ampli espaiament entre ells: ambient càlid). En estudis recents s'ha considerat que la presència de dobles anells anuals en regions que generalment no es produeixen, com és el cas del clima mediterrani, pot ser de molta utilitat per a estudis de dendrocronologia climàtica (Campelo, Gutiérrez i col., 2007).

- Datació mitjançant les escames dels peixos: Una manera de determinar l'edat dels peixos és mitjançant les marques de creixement que tenen a les escames, probablement anual i formades en relació amb l'activitat reproductiva (Fig.1).

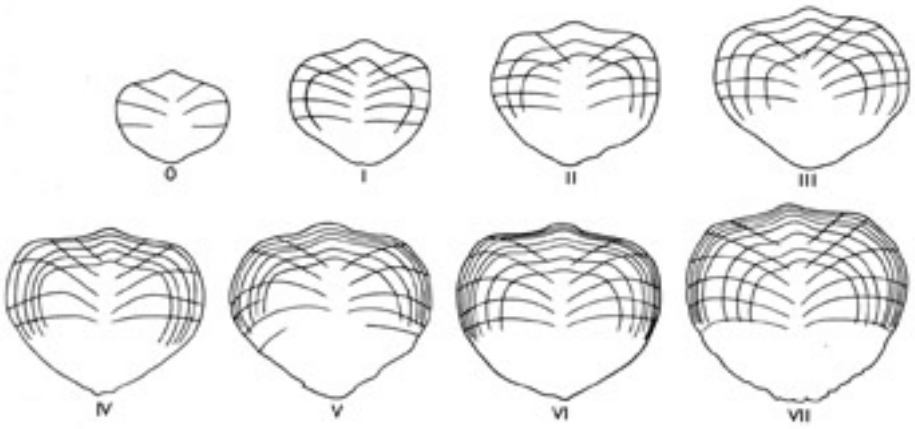

Fig.1 Escames de *Sardina pilchardus*, de 0 a 7 anys complits, amb anells anuals de creixement (Dibuix original de Margalef (1977) amb el text traduït al català).

- Datació de l'edat mitjançant les dents: Les dents dels animals ens permeten saber la seva edat, segons el seu color i mida de la dent, segons si estan buides o si estan desgastades. Inclús potser que el mateix procés no passi al mateix temps a cada dent. Per exemple al cavall se'l pot datar per aquest mètode.

- Datació mitjançant les banyes: En el cas dels cérvols i bisons se'ls pot calcular l'edat mitjançant les ramificacions que tenen a les banyes.

- Datació mitjançant exosquelets de coralls: Agafant com a exemple el corall negre, els anells tenen una periodicitat anual i la seva formació està associada probablement a l'activitat reproductiva (Juárez i Ardisson, 2005).

1.3 L'osteocronologia en tortugues (antecedents)

Els amfibis i els rèptils presenten marques cícliques de creixement en la majoria d'ossos. Aquest mètode de conèixer l'edat a partir d'aquestes formacions cícliques en els ossos ha estat batejat amb el nom d'esqueletocronologia (Castanet i col. 1977) i utilitzat per altres autors (Zug, 1991), nosaltres hem preferit el terme d'osteocronologia, que ve a ser el mateix i que ja ha estat utilitzat en la datació d'edat dels amfibis pel mateix mètode (Fig. 2).

En els amfibis se solen utilitzar els talls transversals d'ossos de les falanges (Fig. 2), mentre que en els rèptils depèn molt del grup que es tracti. En el cas dels ofidis es pot observar per transparència dels ossos plans, mentre que en els quelonis el millor és fer servir talls transversals de diàfisis d'ossos llargs, húmer o fèmur (Castanet i Cheylan, 1979; Zug, 1991).

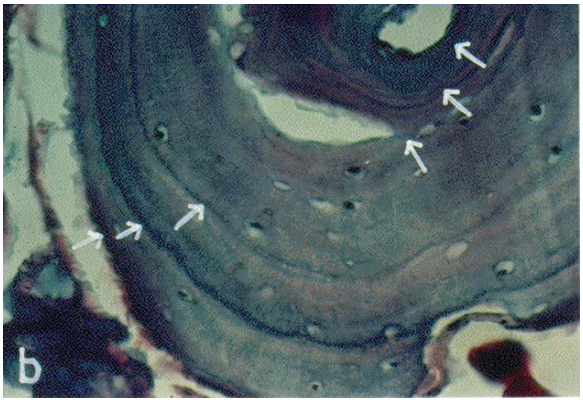

Fig.2 Osteocronologia en amfibis. Tall transversal de diàfisi de falange de *Pleurodema thaul* de 6 anys d'edat. Les línies mostren els períodes d'aturada de creixement (LAG). (Extret de Diaz i Ortiz, 1995).

En el cas dels quelonis, les marques òssies han estat poc estudiades, segurament per la facilitat que ofereix la determinació directa de les marques anuals de creixement a les escames (Castanet i Cheylan, 1979) que, a més, tenen l'avantatge de ser innòcues per

l'animal, però l'inconvenient de no ser fiables per a datar l'edat més enllà d'uns 12 anys en el cas de la tortuga mediterrània (Soler i Martínez, 2005).

Una secció fina de tall d'os mostra un patró on s'alternen zones clares i zones fosques, les clares són més amples i corresponen a períodes de creixement ràpid, les fosques són estretes i corresponen a períodes de creixement lent o sense creixement (hibernació) i s'anomenen LAG[9] o línies d'aturada de creixement. Si les considerem juntes (una zona clara i una zona fosca) comprenen un cicle de creixement complet i s'anomenen MSG[10] o marques de creixement ossi. Per tal d'estimar l'edat, aquestes marques de creixement ossi són contades i sovint mesurades perquè s'assumeix que cada cicle de creixement representa un específic i invariable interval de temps, equivalent a un any en tortugues de zones temperades (Zug, 1991). Aquesta correlació ha estat comprovada amb animals d'edat coneguda (Castanet i Cheylan, 1979).

Els ossos llargs s'han mostrat el millor sistema per a datar l'edat de les tortugues, però inclús en húmers i fèmurs hi ha alguns aspectes problemàtics que poden dificultar el recompte, com reabsorcions i remodelacions de l'os, LAGs discontinues, capes de creixement no visibles, LAG i MSG irregulars i compactació de diverses marques de creixement (Zug, 1991).

Com ja hem explicat al pròleg, el fet que no hi hagi treballs publicats[11] d'osteocronologia amb exemplars de tortuga mediterrània més vells de 20 anys i que tinguéssim l'oportunitat de fer un primer assaig metodològic amb la tortuga que s'acabava de morir, ho trobàrem d'allò més interessant.

Abans de començar, però, dedicarem un petit apartat a la protagonista, la tortuga 7492, que ens ha permès iniciar aquest viatge experimental amb l'estudi *post mortem* dels seus ossos.

1.4 Material biològic (la tortuga 7492)

- Va ser introduïda al Pati de les tortugues de l'Escola fa uns quants anys (procedent del CRARC).
- Ha estat utilitzada (juntament amb tres altres tortugues adultes) en un treball sobre variacions de pes durant el procés d'hibernació que ha durat 3 anys i que inclou tres

[9] "Lines of arrested growth"
[10] "Mark of skeletal growth"
[11] Que sapiguem nosaltres, després de consultar a experts en la matèria, com són els responsables del CRARC.

treballs de recerca de batxillerat anteriors (Alba Vendrell, 2006; Laia Herrerias, 2007; Eudald Pascual, 2008).

- Ha entrat a formar part d'un estudi filogenètic a partir de l'anàlisi de l'ADN mitocondrial, dirigit per Salvador Carranza (Departament de Biologia Animal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona[12]). Se li va treure sang de la cua durant una visita al CRARC el curs passat i el Dr. Carranza ens ha enviat els resultats aquest curs, confirmant que es tracta de la subespècie *hermanni* (*T. h. hermanni*) i de l'haplotip H3 (restringit a Catalunya, Mallorca i Menorca) (Carranza i Roca, 2007) (Figs. 3 i 4).

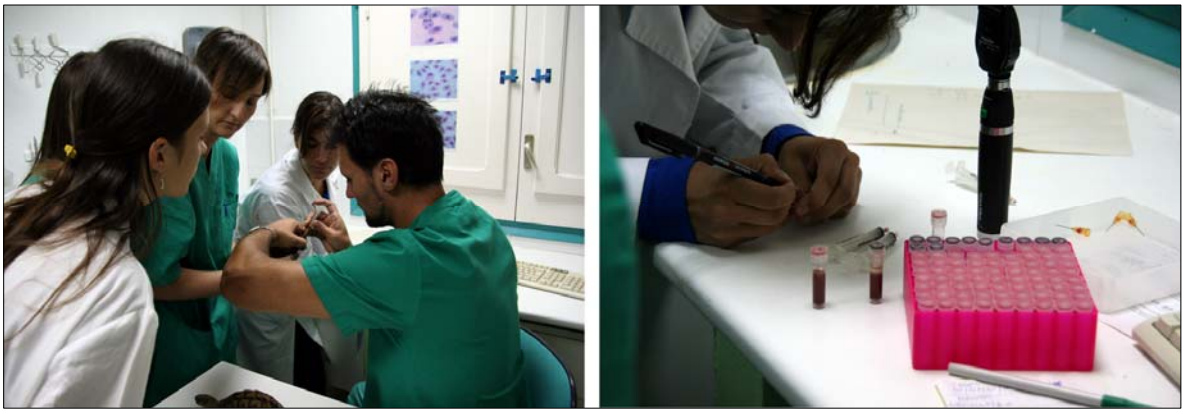

Figura 3. L'Albert Martínez (a l'esquerra) traient sang de la cua d'una de les tortugues, mentre va explicant tot el procés al grup de joves veterinaris en el laboratori del CRARC. La sang extreta (a la dreta) es posa en recipients heparinitzats, que es marquen amb el codi de cada tortuga i seran enviats al laboratori del Dr. Carranza per a l'anàlisi d'ADN. (Imatges extretes del treball de recerca de l'Eudald Pascual).

- En les revisions periòdiques anuals dels últims anys (per part d'Albert Martínez del CRARC) se li va constatar un empitjorament d'un problema ocular (dipòsits de colesterol), que en l'últim any ja li provocava una ceguesa de més del 75%. El seguiment d'aquest procés està recollit en treballs de recerca anteriors (Laia Herrerias, 2007; Eudald Pascual, 2008).

[12] Actualment està treballant a l'Institut de Biologia Evolutiva del CSIC (Centre Superior d'Investigacions Científiques).

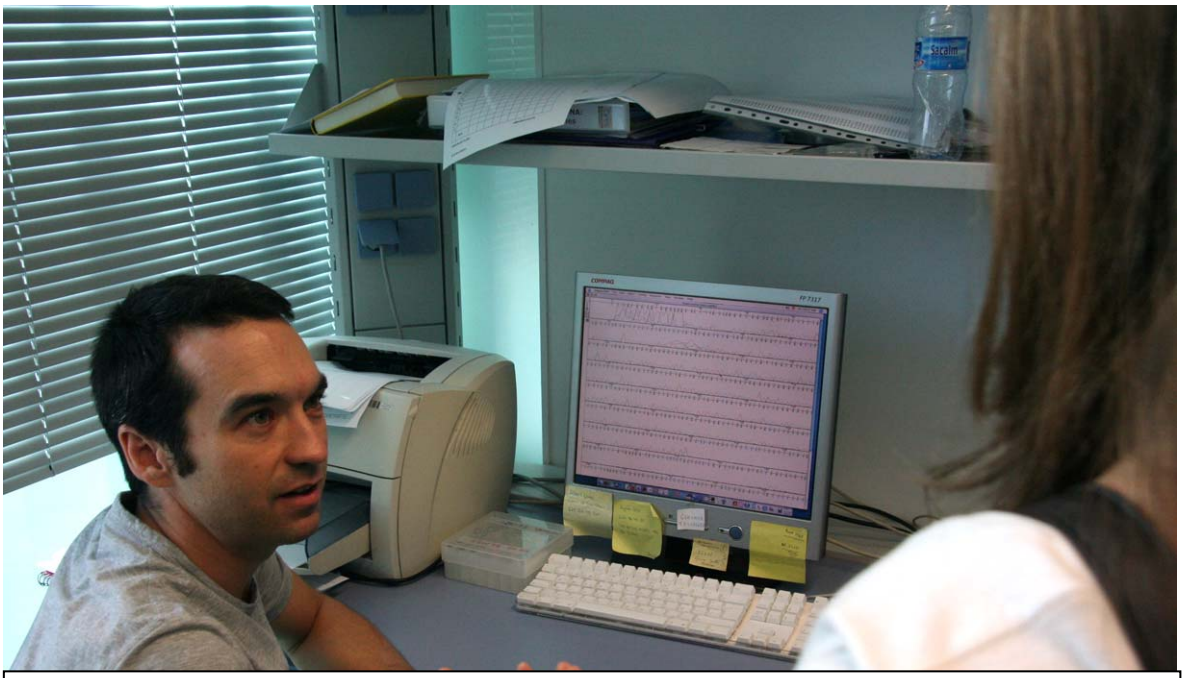

Figura 4. El Dr. Salvador Carranza explicant-nos els seus estudis de filogènia d'amfibis i rèptils (entre ells la nostra tortuga) a partir de l'anàlisi d'ADN mitocondrial de mostres de sang dels animals, en el seu despatx de l'Institut de Biologia Evolutiva del CSIC (Centre Superior d'Investigacions Científiques).

A partir de juliol de 2007 es va constatar una baixada en els registres de pes d'aquest animal que va provocar que comencés el procés d'hibernació amb un pes inferior al d'anys anteriors (Eudald Pascual, 2008).

2. Obtenció del material fresc

La mort de la tortuga no es va determinar de forma immediata perquè es va produir durant el procés d'hibernació. L'Eudald, que continuava durant uns mesos prenent les dades de pes de les tortugues mentre hibernaven, es va adonar a partir d'un cert moment que aquesta tortuga no seguia la mateixa pauta que les altres tres (durant tres anys les quatre tortugues havien respost de la mateixa manera) i a la següent sessió (les pesades es feien un cop per setmana) s'hi va fixar més bé i va observar que a la tortuga li sortia una mica de líquid fosc per la part anterior i en observar-la millor es va adonar que estava morta.

Es va notificar al CRARC i la tortuga es va guardar al congelador de la nevera del laboratori de biologia (embolicada amb para film) fins que es decidís què es feia amb ella.

2.1. Descomposició controlada

La tortuga va romandre al congelador fins que es va decidir deixar-la en algun lloc per començar el procés de descomposició i poder obtenir els fèmurs. Per començar aquest procés es va deixar la tortuga al terrat de l'Escola protegida dins d'una gàbia per tal d'evitar que un possible depredador fes malbé la mostra. També es posaren un parell de pedres grans per augmentar-ne l'estabilitat davant d'una eventual ventada (Fig. 5).

Fig.5 Tortuga seguint un procés de descomposició controlada al terrat de l'Escola. La gàbia (perforada per evitar inundació en cas de pluja) li feia de protecció contra possibles animals; les pedres eren per evitar que una forta ventada se l'emportés.

Al cap d'una setmana es va comprovar l'estat avançat de la descomposició (afavorit per la calor dels dies d'estiu) i es va poder observar la presència de cucs i mosques verdes (Fig.6). Als 15 dies ja s'havia completat el procés i es va treure l'esquelet de la gàbia (Figura 7) per a portar a terme l'extracció i neteja dels ossos.

Fig.6 Mosca verda (*Lucilia caesar*) de la família Cal·lifòrids. Ésser present en animals en descomposició.

Fig.7 Moment en el que vaig procedir a treure la tortuga de la gàbia, un cop finalitzat el procés de descomposició.

2.2 Neteja ossos llargs

La neteja dels ossos consisteix en treure amb eines de dissecció les restes de carn, tendons o pell seca enganxats als ossos de les extremitats per deixar-los el més nets possibles (Figs. 8 i 9). Aquest procés es va portar a terme en dos dels quatre fèmurs de la tortuga, els anteriors (els altres dos es van deixar intactes). A continuació es van introduir aquests dos fèmurs anteriors en una dissolució aquosa de peròxid d'hidrogen (aigua oxigenada) i posteriorment en alcohol del 70% amb l'objectiu de deixar els ossos ben nets i desinfectats. Després es van deixar assecar i es van guardar en un pot (Fig. 10).
Els altres dos fèmurs (els posteriors) es deixaren intactes, sense treure ni tan sols la pell enganxada (per requeriments que explicarem més endavant), en un pot amb formol.

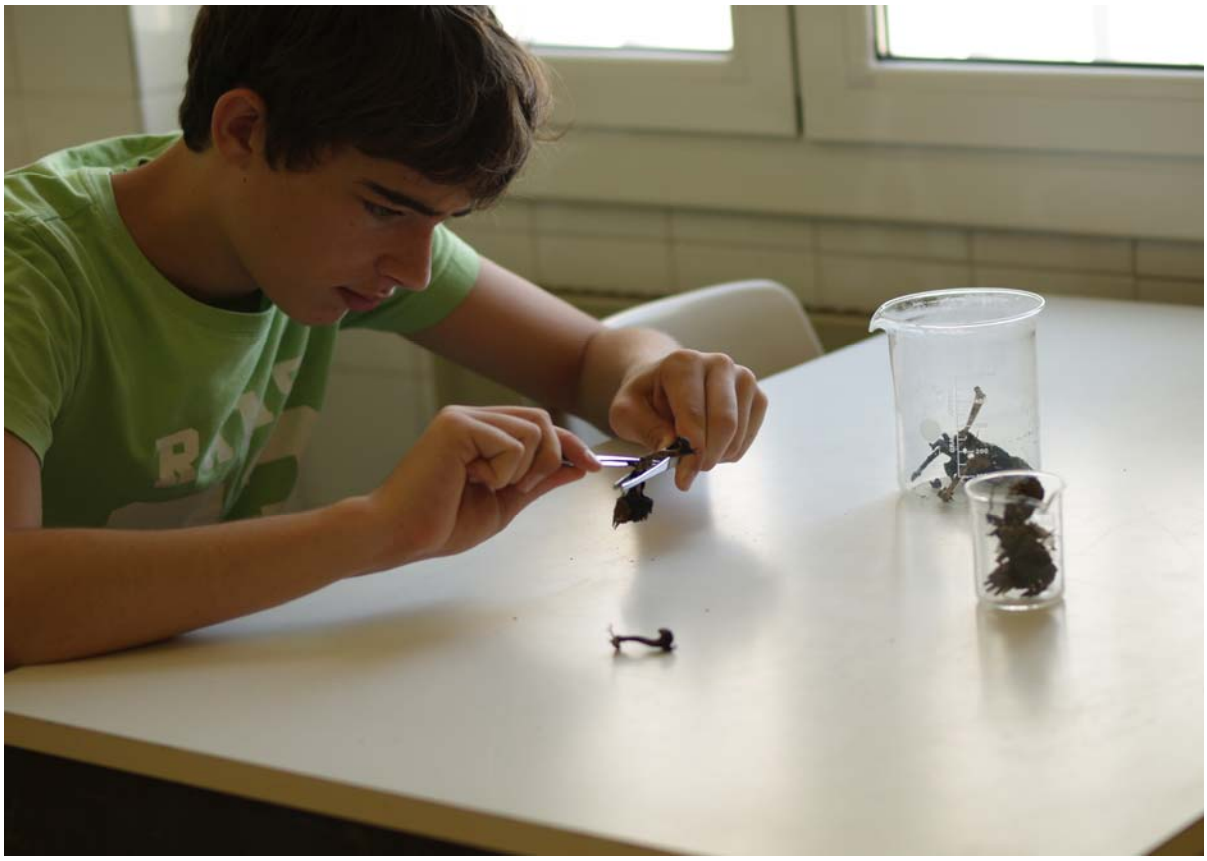

Fig.8 Aquí estic treien les restes de pell seca que han quedat enganxades a l'os.

Fig.9 Detall del procés de separació de l'os de la pell seca.

Fig.10 Fèmurs anteriors un cop nets i desinfectats.

3. Metodologies d'osteocronologia

Com ja hem assenyalat al pròleg, necessitàvem el consell i l'ajuda d'experts per tal d'intentar portar a terme el nostre projecte. Per això, després de comentar-ho amb Joaquim Soler i Albert Martínez del CRARC, consultàrem al Dr.Salvador Carranza, de l'Institut de Biologia Evolutiva del CSIC (Centre Superior d'Investigacions Científiques)[13] per dues raons, en primer lloc perquè ens interessava conèixer els resultats de l'estudi que havia portat a terme amb les nostres tortugues (veure apartat 1.4), i de l'altra perquè és expert en amfibis i rèptils. El Dr. Carranza ens va dir que en el seu departament no disposaven d'aparell de microtomia, però ens va proporcionar dos contactes que sí en tenien: el Dr. Delfí Sanui de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de la Universitat de Lleida i la Dra. Mercè Durfort del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Ens varem decidir clarament per aquesta segona i en la primera visita al seu departament, la Dra. Durfort ens va fer una llarga explicació de les diferents possibilitats que teníem i ens va presentar a Jordi Correas (el seu tècnic de microscòpia). També ens va explicar que el micròtom del seu departament no pot tallar os sense descalcificar, i que probablement per veure els anells de creixement dels talls de fèmur és el que necessitaríem; aquests micròtoms-serra són els que utilitzen a la Facultat d'Odontologia per a fer talls de peces dentàries. Ens va recomanar que ens poséssim en contacte amb la Dra. Cristina Manzanares de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina del Campus de Bellvitge per veure si ens podien fer els talls de l'os sense descalcificar. Per tal de provar de fer els talls nosaltres mateixos (i mentre esperàvem poder fer una visita a la Dra. Manzanares) la Dra. Durfort ens va deixar instruments i materials per portar-ho a terme al laboratori de l'Escola, així com bibliografia especialitzada.

La Dra. Manzanares no només va accedir a fer els talls de l'os, sinó que ens va proposar noves tècniques d'observació, fins i tot de microscòpia electrònica de rastreig.

Al llarg dels últims mesos hem realitzat diverses visites a aquests dos departaments (Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia i Unitat d'Anatomia de la Facultat de Medicina) i també una als *S*erveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Algunes d'aquestes visites han estat molt recents i no ha donat temps a processar la informació per incloure-la en aquest treball.

[13] En aquell moment encara estava al Departament de Biologia Animal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Abans de començar a tractar els diferents processos, cal considerar que quan parlem de "talls" ens hi podem referir per a designar tant una porció d'os relativament gruixuda (per a iniciar un procés de descalcificació i posteriorment fer talls més fins amb micròtom convencional, o bé per a incloure en metacrilat per a la seva observació al MER[14]) com als talls d'un mm o menys, realitzats amb serra odontològica[15] destinats a desgast o poliment, sense descalcificar (microtomia en sec), per a la seva observació microscòpica.

3.1 Talls de fèmur

3.1.1 Amb serra de rellotger (a l'Escola)

La Dra. Durfort ens va explicar que abans d'existir micròtoms i serres odontològiques els talls d'os es feien utilitzant una serra de rellotger. Ens en va deixar una perquè intentéssim fer els talls nosaltres al laboratori de l'Escola, aprofitant que en Joaquim Soler del CRARC ens havia proporcionat uns ossos de tortuga mediterrània (3 fèmurs i 1 húmer) per si necessitàvem fer proves abans d'utilitzar els ossos de la tortuga 7492.
Per a realitzar el tall d'aquests ossos proporcionats pel CRARC es va fer un muntatge amb una pinça i un cargol de fuster que subjectaven l'os, de tal manera que permetia fer els talls rectes i paral·lels (Fig.11).

Fig.11 Muntatge per procedir a fer el tall de l'os de prova amb una serra de rellotger, al laboratori de Tecnologia de l'Escola.

Amb els dos talls transversals practicats a un os de fèmur per obtenir una mostra d'os de forma discoïdal d'un gruix aproximat d'1,5 mm i també amb la tècnica del desgast per

[14] Microscopi electrònic de rastreig.
[15] També inclouria els talls fets amb la serra de rellotger.

abrasió (veure apartat 3.2) vaig poder comprovar l'extraordinària duresa i resistència del teixit ossi.

Després d'aquesta prova no necessitàrem fer els talls als fèmurs de la nostra tortuga (7492) amb aquest mètode manual perquè ja teníem hora per fer els talls amb la serra odontològica del Departament d'Anatomia i Embriologia Humana.

3.1.2 Amb serra odontològica

Per poder realitzar els talls amb la serra odontològica, la Dra. Manzanares ens havia donat instruccions de com havíem de portar els ossos, ens va demanar que portéssim un os intacte amb formol i els altres nets (com ja s'ha explicat a l'apartat 2.2).

Abans de practicar els talls es van realitzat diverses fotografies dels ossos sencers nets i desinfectats, disposats en diverses posicions, sobre paper mil·limetrat, amb un equip rèflex digital (càmera Olympus E-330 i objectiu Zuiko Digital Olympus Macro 2.0 de 50 mm) que portàvem de l'Escola, muntat sobre un carro mòbil de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana (Figs. 12 i 13).

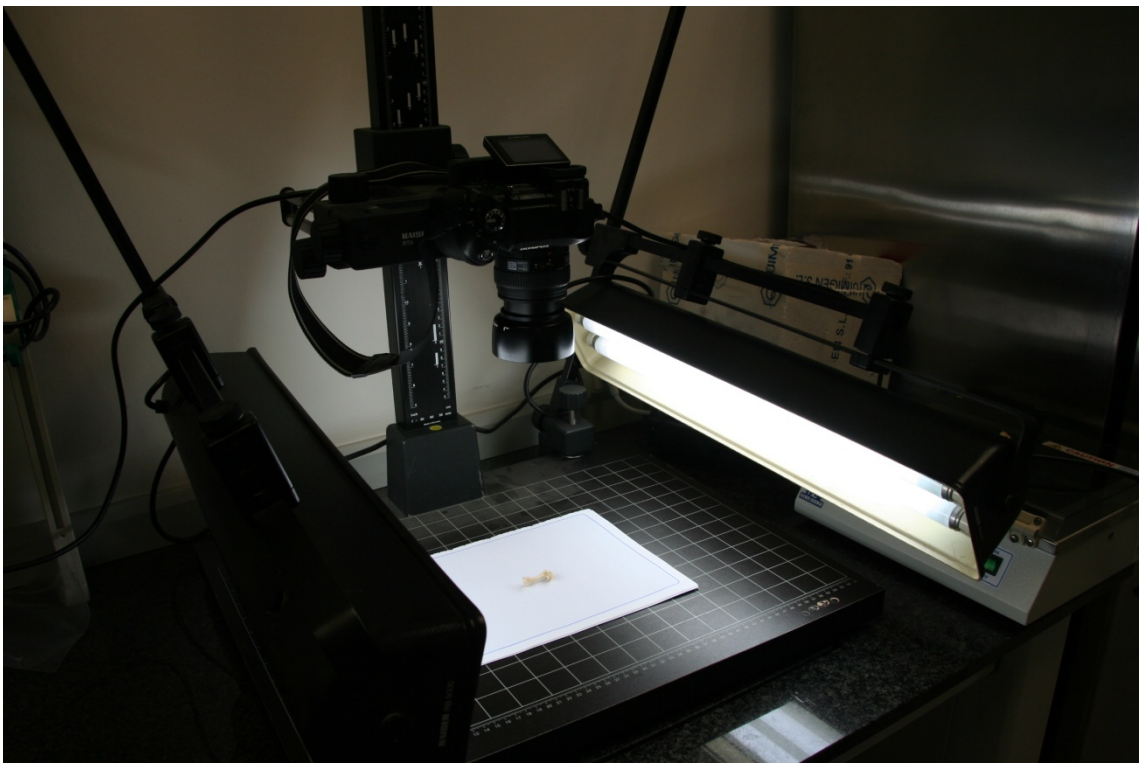

Fig.12 Muntatge sobre un carro mòbil de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana amb un equip rèflex digital (càmera Olympus E-330 i objectiu Zuiko Digital Olympus Macro 2.0 de 50 mm) de l'Escola.

Fig.13 Fèmurs de les extremitats anteriors de la tortuga 7492 sobre paper mil·limetrat.

En total es van realitzar talls de 3 fèmurs:

- Fèmur 1: net i sec, corresponent a una tortuga que suposadament pot tenir uns 40 anys, que s'ha fet servir de prova i de la que s'ha guardat una mostra de diàfisi (d'uns 3 mm), per incloure en el procés de descalcificació (etiquetada com T40B4). La resta d'aquest os ha quedat a la Unitat d'Anatomia.

- Fèmur 2 (anterior): net i sec, corresponent a la nostra tortuga d'estudi (tortuga nº 7492, d'uns suposats 70 anys), se li han practicat 5 talls per obtenir-ne 4 mostres, 3 de gruixudes (d'uns 4 mm), dues de les quals s'inclouran en el procés de descalcificació, perquè van destinats a parafinar i a microtomia tradicional (etiquetats com T70B1 i T70B2), una tercera (T70B3) quedarà a la unitat d'Anatomia per a preparar per microscòpia òptica sense descalcificar (tinció amb blau de toluïdina i tricròmica i la quarta mostra (T70B4), molt més prima, es destinarà a la tècnica d'abrasió (a l'Escola) i muntatge en bàlsam de Canadà.

- Fèmur 3 (posterior, intacte, en formol al 10%). Se li han practicat 4 talls per a obtenir 3 mostres equidistants de diàfisi d'uns 4 mm, ordenades per la seva posició relativa a l'os, en proximal (T70C1), mitjana (T70C2) i distal (T70C3). Els talls s'han mantingut en formol al 10% en recipients individuals fins el moment de processar-los, seguint la metodologia que ens va explicar la Dra. Manzanares, detallada a "Optimisation of a Scheduled Study for Undecalcified Samples" (Manzanares i col. 1997). I que es destinaran al muntatge en metil-metacrilat per microscòpia electrònica de rastreig amb electrons retrodispersats (veure apartat 3.4).

Tots aquests talls realitzats amb una serra de banda EXACT (Fig. 14) els va portar a terme la mateixa Dra. Manzanares mentre ens explicava tot el procés.

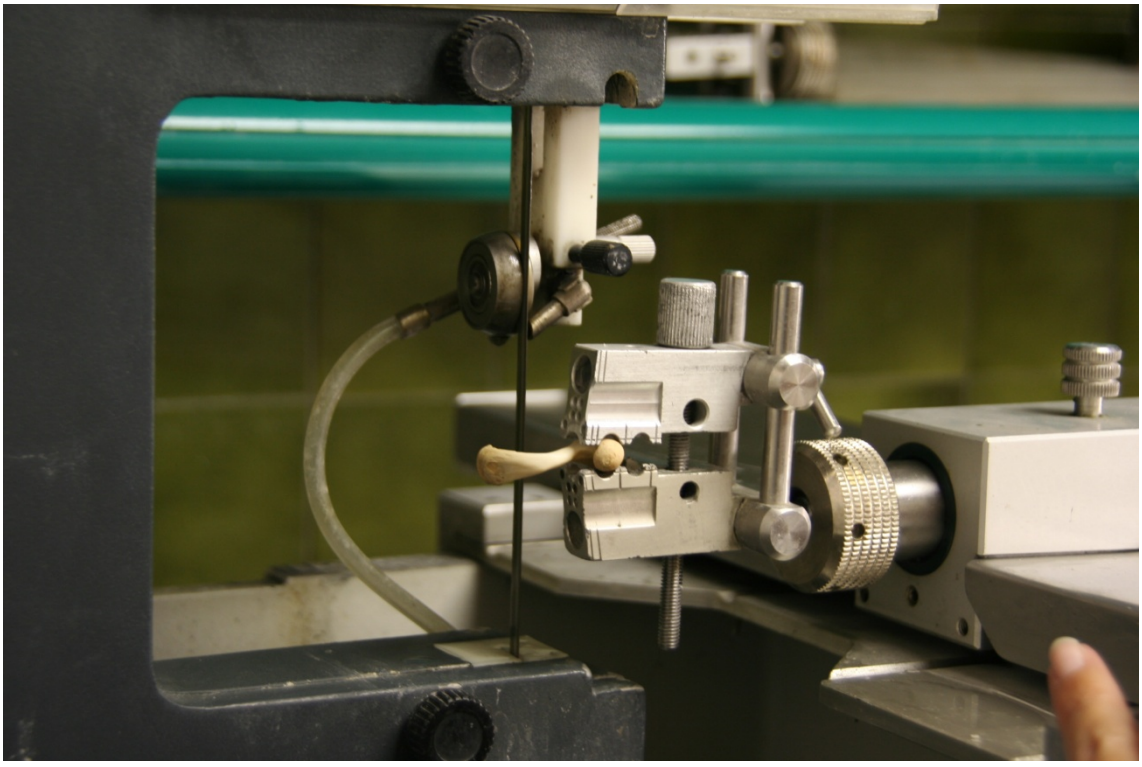

Fig.14 Serra de banda Exakt cutting-grinding system (Exakt-Kulzer, _Norderstedt, Germany) (Hamburg, Alemanya) que conte una banda diamantada de 0.2 cm a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge).

Un cop obtinguts els talls primaris es va procedir a l'obtenció de les mostres microscòpiques seguint les metodologies esmentades.

3.2 Mètode 1 (Per abrasió o desgast)

El tall per fer aquest mètode es va obtenir del fèmur 2, net i sec, corresponent a la nostra tortuga d'estudi (tortuga Nº 7492, d'uns suposats 70 anys), el tall destinat a aquest mètode tenia un gruix d'1 mm, anomenat: T70B4 (veure apartat 3.1.2).

Aquest procés, que es va fer a l'Escola amb el material proporcionat per la Dra. Durfort i seguint les seves recomanacions, consisteix a desgastar l'os amb materials abrasius per deixar-lo ben fi i així poder observar la seva estructura (amb les suposades marques de creixement) per transparència al microscopi òptic.
Procediment:

- Fer lliscar el tall de l'os per la pedra d'Arenisca en cercles i barrejat amb una mica d'aigua fins assolir una lleugera transparència.
- Raspar el tall fi per un tros de paper de vidre (TP3220) també barrejat amb aigua, per allisar les imperfeccions deixades amb la pedra d'Arenisca.
- I finalment es passa el tros d'os per la pedra d'Arkansas[16] també en cercles per deixar l'os totalment llis[17].
- Quan està totalment llis es procedeix al rentat de la mostra en aigua durant unes 12-24 hores i es deixa assecar.

3.2.1. Observació al microscopi

Abans de procedir a fer la preparació permanent a l'Escola amb bàlsam del Canadà (veure apartat 4.1.1) vam anar al Departament de Biologia Cel·lular perquè la doctora Durfort ens digués si el tall estava prou rebaixat. Per tal de comprovar-ho ens va dir que féssim una preparació temporal de la mostra (muntada amb aigua) i tots vam poder observar, tant amb el microscopi òptic de doble binocular com amb el que incorpora la pantalla digital (Fig. 15), la presència dels anells de creixement. La Dra. Durfort va opinar que el grau de desgast era el correcte, que la mostra es veia molt bé i que continuéssim el procés fins el muntatge amb bàlsam del Canadà.

[16] un tipus especial d'arenisca, de gra molt fi.
[17] el procés de desgast i poliment va durar entre dues i tres hores, tant amb el tall de prova com amb el T70B4.

Fig.15 Primera imatge de la mostra T70B4 de tall transversal de fèmur anterior obtingut amb el mètode 1 (per abrasió) a partir d'una preparació temporal muntada amb aigua, al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia.

Per tant, un cop novament al laboratori de biologia de l'Escola, vam procedir a fer diversos rentats de la mostra amb aigua i més tard al seu assecament a sobre de paper de filtre, protegit de la pols per mitja d'una placa de Petri.

- Preparació amb bàlsam del Canadà:

Aquesta preparació consisteix en posar la mostra, ben seca i lliure de pols, al damunt d'un portaobjectes en el que prèviament s'ha posat una gota de bàlsam del Canadà[18], cobrir-la amb una o més gotes de bàlsam fins que quedi tota la mostra ben coberta i amb la precaució de no deixar bombolles d'aire, i finalment cobrir la mostra amb un cobreobjectes amb la precaució també de no deixar cap resta d'aire atrapat que pugui afectar la visió de la mostra al microscopi òptic.

3.2.2 Resultats

L'observació de la mostra a través dels microscopis òptics de l'Escola era correcta, però per contar les línies s'havia de fer sobre fotografies ampliades i el sistema que disposem de captura d'imatge al nostre laboratori no té prou qualitat, de manera que vam decidir tornar a la Facultat de Biologia per fer-les amb un bon sistema de microfotografia (Fig. 27)

[18] Abans de posar les gotes de bàlsam del Canadà pel damunt de la mostra vaig haver de diluir-lo amb xilè i escalfar-lo a l'estufa ja que no tenia prou fluïdesa.

amb el que capturàrem les imatges a 12 megapíxels, que permeten un grau d'ampliació i detall força més elevats (Fig. 16). A partir d'una ampliació sobre paper i resseguint amb llapis les línies en vaig poder arribar a contar entre 73 i 78 (Fig. 17). Les línies també es podien apreciar, encara que no tant clarament, amb llum polaritzada (Fig.18).

Tot i així faltava per comprovar si les línies que s'han obtingut corresponen a veritables marques anuals de creixement. En qualsevol cas era el primer mètode, el més manual i es veien marques, de manera que semblava que anàvem per bon camí (veure discussió sobre aquest punt a l'apartat 4).

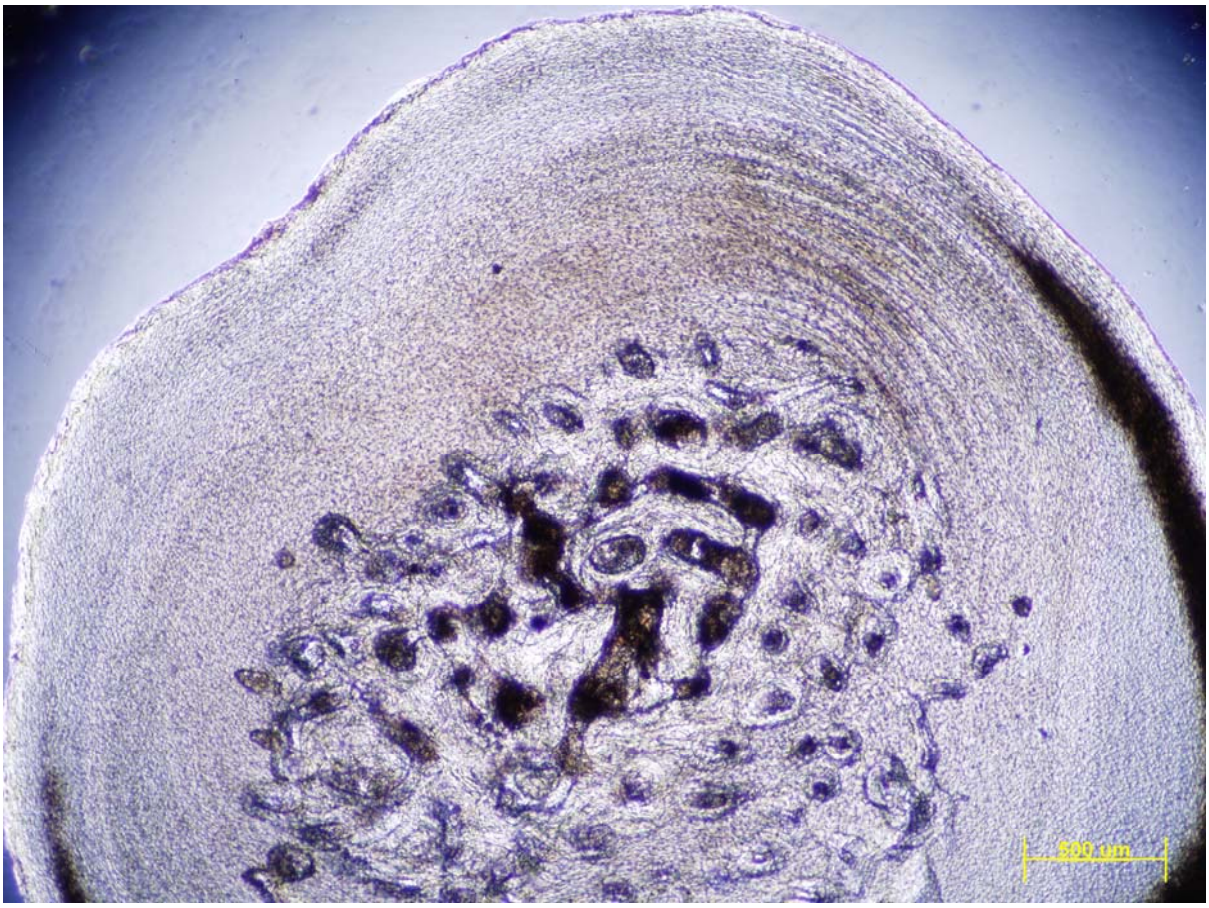

Fig.16 Microfotografia de la mostra T70B4 de tall transversal de fèmur anterior obtinguda amb el mètode 1 (per abrasió), muntada amb bàlsam del Canadà. La imatge ha estat obtinguda amb l'equip Olympus DP70 del laboratori de Microfotografia del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (veure figura 27).

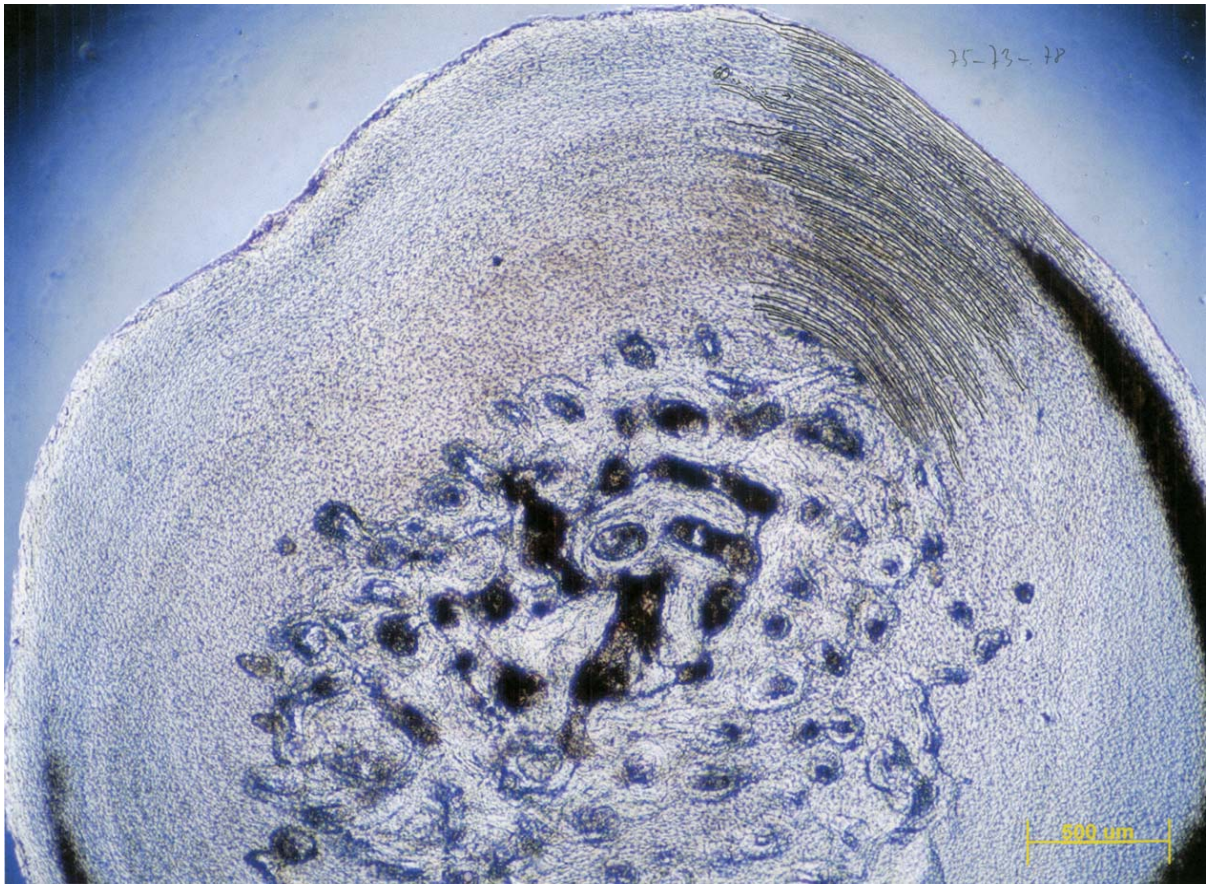

Fig.17 Imatge escanejada de la microfotografia anterior (figura 16) impresa en paper, després d'haver resseguit amb llapis (punta fina) les línies observades en l'ampliació.

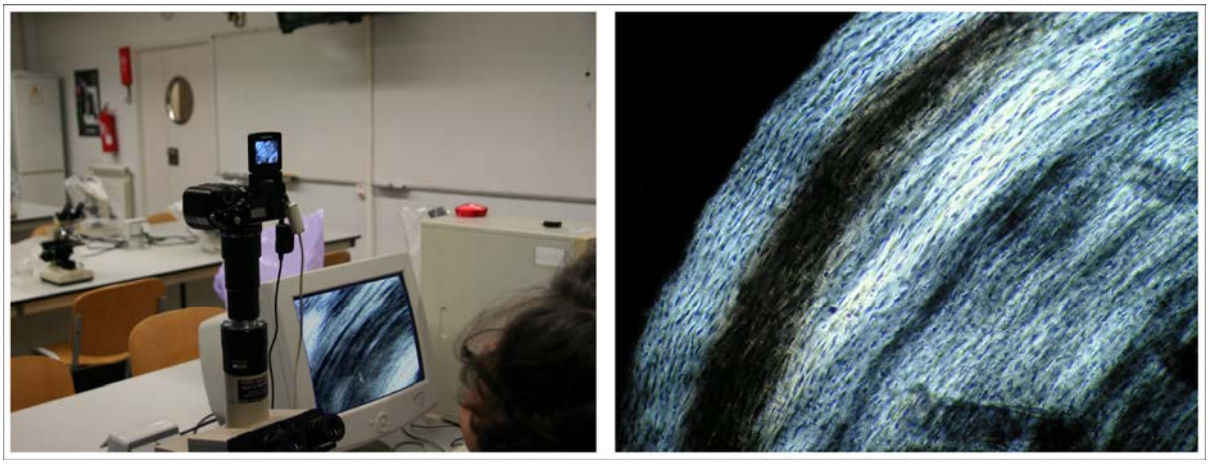

Fig.18. Microscopi de llum polaritzada (esquerra) i microfotografia ampliada (dreta) de la mostra T70B4 de tall transversal de fèmur anterior obtinguda amb el mètode 1 (per abrasió).

3.3 Mètode 2 (Microtomia amb descalcificació)

Aquest mètode consisteix en descalcificar prèviament l'os per tal de poder portar a terme els talls semifins amb micròtom convencional i realitzar posteriorment una tinció amb hematoxilina-eosina o amb roig de ruteni.
Cronològicament, els passos a seguir són: descalcificació, deshidratació, inclusió en parafina, hidratació i tinció.
Els diferents processos s'han realitzat seguint les indicacions de la Dra. Durfort. El primer, la descalcificació, es va portar a terme al laboratori de biologia de l'Escola i els restants al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia amb l'ajuda de Jordi Correas (tècnic del Departament).

3.3.1 Descalcificació

Les mostres que es varen sotmetre a descalcificació són la T40B4, corresponent a un fèmur d'una tortuga del CRARC d'uns suposats 40 anys d'edat, i la T70B1 i T70B2, que corresponen al fèmur anterior nº2 de la tortuga 7492 d'uns suposats 70 anys (veure apartat 3.1.2). Es seguiren dos sistemes de descalcificació diferents.

• Descalcificació de les mostres T40B4 i T70B1:
A aquestes mostres se'ls va aplicar un procés de descalcificació amb una dissolució recomanada per la Dra. Manzanares composta per:

- 100 ml d'àcid fòrmic al 98%.
- 100 ml de formol al 10%.
- 800 ml d'aigua destil·lada.

Un cop preparada la dissolució, el mateix dia 13/10/2008 vaig posar les dues mostres d'os a dins de la dissolució, i les hi vaig deixar durant 4 dies, ja que la Dra. Manzanares ens va advertir de tenir precaució al cinquè dia perquè la mostra es podia acabar trencant si es deixava massa temps.
Al quart dia vaig extreure els dos ossos de les dissolucions i vaig comprovar si les mostres estaven prou descalcificades intentant travessar-los amb una agulla molt fina i vaig poder observar que el T70B1 era més tou i que el T40B4 costava una mica més de travessar, però vaig considerar que els dos ja estaven prou descalcificats. Un cop trets de

la dissolució els vaig posar en dos tubs d'assaig diferents fins que al dia següent els vaig posar en aigua, tot esperant el dia de quedar amb Jordi Correas per a començar el procés de deshidratació just abans de parafinar (veure apartat 3.3.2).

• Descalcificació de la mostra T70B2:

Aquesta mostra d'os de la tortuga de l'Escola va ser processada amb una dissolució, recomanada per la Dra. Durfort (Durfort, 2006), anomenada Zenker:

- 2.5 g bicromat potàssic
- 5 g biclorur de mercuri
- 1 g sulfat sòdic
- 100 ml aigua destil·lada

Aquesta dissolució la vaig preparar al laboratori de biologia de l'Escola, però aquest procés de descalcificació no va arribar a funcionar, ja que passaven els dies i la mostra continuava endurida, sense poder ésser travessada amb l'agulla. Finalment vaig aplicar-li el mateix procés de descalcificació que l'utilitzat amb les mostres T70B1 i T40B4. Aquest cop vaig deixar una mica més de temps la mostra en la dissolució perquè no passés el mateix que amb les altres dues mostres (que no es descalcificaren del tot, com veurem més endavant). Malgrat els esforços, la mostra T70B2 no va prosperar perquè en intentar-la travessar amb l'agulla es va trencar en molts petits fragments. De manera que el mètode 2 va continuar únicament amb les mostres T70B1 i T40B4.

3.3.2 Deshidratació

Després de descalcificar les mostres que segueixen el mètode per parafinar (T40B4 i T70B1) s'havien de deshidratar per a poder incloure la mostra en substàncies o reactius hidrofòbics (com la parafina) i es fa seguint un procediment estàndard d'immersió en alcohols de grau creixent, acabant amb xilè (Durfort, 2006) i amb els temps adaptats a les característiques i mides de les nostres mostres:

- 45 minuts en alcohol de 70º
- 45 minuts en alcohol de 90º
- 30 minuts en alcohol absolut (dos cops)
- 30 minuts finals en xilè

Per hidratar la mostra es fa el mateix, però en sentit invers i acabant amb aigua destil·lada (quan el que es vol és tractar la mostra amb substàncies hidrofíliques).

Un cop concertat dia i hora amb Jordi Correas començàrem el procés de deshidratació calculant els temps de manera que coincidís l'arribada al Departament de Biologia Cel·lular amb la finalització de l'últim pas del procés de deshidratació (amb xilè).

3.3.3 Inclusió en parafina

La inclusió de la mostra en un medi o material (parafina, cel·loïdina...) és un pas necessari per a poder realitzar els talls amb un micròtom convencional.

Com ja hem comentat, la parafina és insoluble en aigua i per això calia deshidratar la mostra prèviament. Les dues mostres (T40B1 i T70B1), descalcificades seguint la metodologia de la Dra. Manzanares, i deshidratades com s'ha explicat en l'apartat anterior, van ser examinades per Jordi Correas que va provar de travessar-les amb una agulla i va considerar que encara estaven un pèl endurides i no podia garantir uns talls correctes. La Dra. Durfort, però, va opinar que valia la pena provar-ho i que si no funcionava es podia tornar enrere (desparafinar, rehidratar i descalcificar), ja que és un procés totalment reversible.

A partir d'aquest moment ens quedàrem amb en Jordi, que ens va ensenyar tot el procés d'englobar en parafina, que bàsicament consistia en posar la mostra dins d'un pot amb parafina i seguidament s'havia de jugar amb els canvis de temperatura, situant el pot alternativament a sobre de dues planxes, una de freda i una altra de calenta (Fig. 19) perquè la mostra quedés en la posició correcte. Aquest procés es podia fer tantes

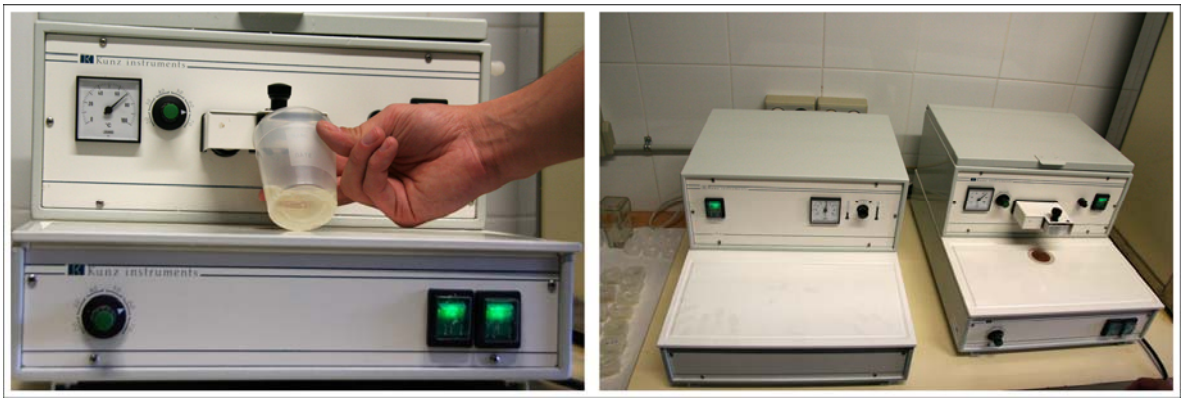

Fig.19 Procés d'obtenció de parafina líquida a 60°C (a l'esquerra) i vista general de les dues planxes –freda i calenta- per a aconseguir el punt de solidificació desitjat de parafina (a la dreta).

vegades com es volgués fins que el muntatge fos el correcte. Posteriorment, amb uns motlles o bé amb l'ajut d'unes pinces especials, es fan els blocs de parafina (Fig. 20) i es pot procedir a fer els talls.

3.3.4 Obtenció dels talls

Quan en Jordi va començar a fer els talls dels blocs amb les mostres T40B1 i T70B1 (Fig. 20) va observar que efectivament el procés de descalcificació no s'havia fet correctament i va procedir a desparafinar, rehidratar i descalcificar de nou les mostres amb la mateixa dissolució que havíem utilitzat nosaltres[19]. Després d'haver descalcificat les dues mostres va tornar a deshidratar i parafinar per poder realitzar els talls correctament i poder-los veure al microscopi òptic, però tot i així l'os continuava una mica dur per la part central. Malgrat tots aquests inconvenients es va decidir continuar el procés endavant i fer únicament la tinció amb hematoxilina-eosina, amb l'objectiu de determinar (encara que fos en un petit fragment de mostra) si aquest sistema permetia distingir les línies de creixement amb suficient claredat, abans de repetir el procés des del principi.

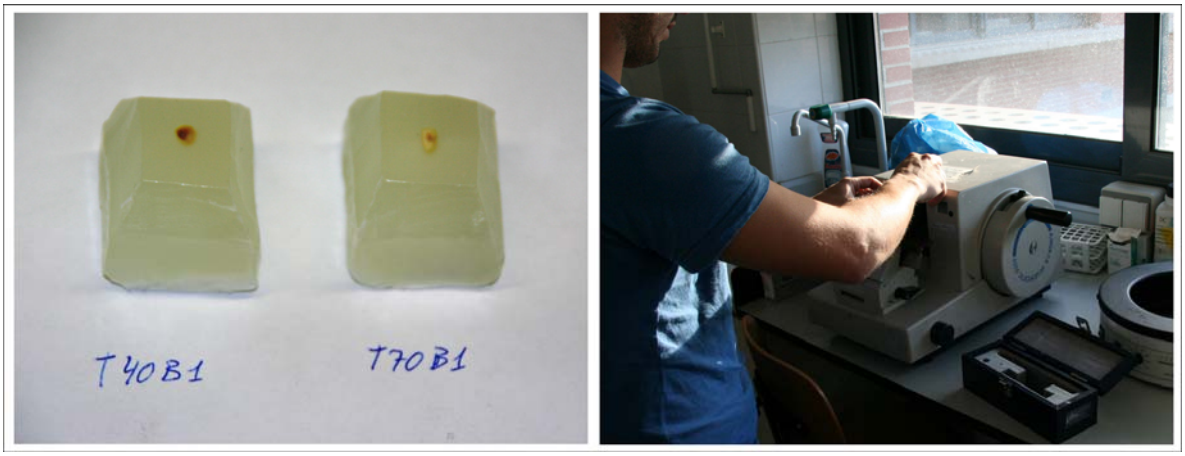

Fig.20 Blocs de parafina amb les mostres T40B1 i T70B1 (a l'esquerra) i micròtom amb el que es van realitzar els talls (a la dreta), al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia.

[19] Ens va sol·licitar –via Email- els detalls del sistema de descalcificació de la Dra. Manzanares.

3.3.5 Tinció

Una vegada obtinguts els talls, estirats i enganxats al portaobjectes mitjançant albúmina de Mayer es procedeix a la seva tinció amb hematoxilina-eosina, però abans cal treure la parafina dels talls, ja que no hi deixaria entrar el colorant i realitzar un procés d'hidratació perquè aquests colorants són solucions aquoses (Durfort, 2006). Tot el procés es pot resumir com segueix:

1- Desparafinar
   - Posar la mostra a l'estufa durant 30 minuts a 60º.
   - Després de l'escalfament de la mostra posar-la en xilè durant 10-15 minuts.
2- Hidratar
   - Posar la mostra en alcohol absolut durant 5 minuts.
   - Posar la mostra en alcohol 96º durant 5 minuts.
   - Posar la mostra en alcohol 70º durant 5 minuts.
3- Rentar la mostra en aigua destil·lada.
4- Posar la mostra en hematoxilina durant 5 minuts.
5- Tornar a rentar la mostra en aigua durant 5 minuts.
6- Posar la mostra en eosina alcohòlica durant 1 minut.
7- Deshidratar la mostra (procés contrari a la hidratació)
   - Posar la mostra en alcohol 70º.
   - Posar la mostra en alcohol 96º.
   - Posar la mostra en alcohol absolut (dos cops).
   - Posar la mostra en xilè.
8- Muntatge amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

3.3.6 Resultats

Degut als problemes de descalcificació ja esmentats, no es va aconseguir per aquest mètode una preparació en la que hi hagués un tall sencer de la mostra, però sí fragments de mostra correctament muntats i tenyits que permeten indicar que, si el comparem amb altres (veure discussió a l'apartat 4), el mètode de descalcificació no és el millor, perquè malgrat s'observen algunes línies (Fig. 21), aquestes no són tant nítides com amb els altres mètodes de microscòpia òptica utilitzats.

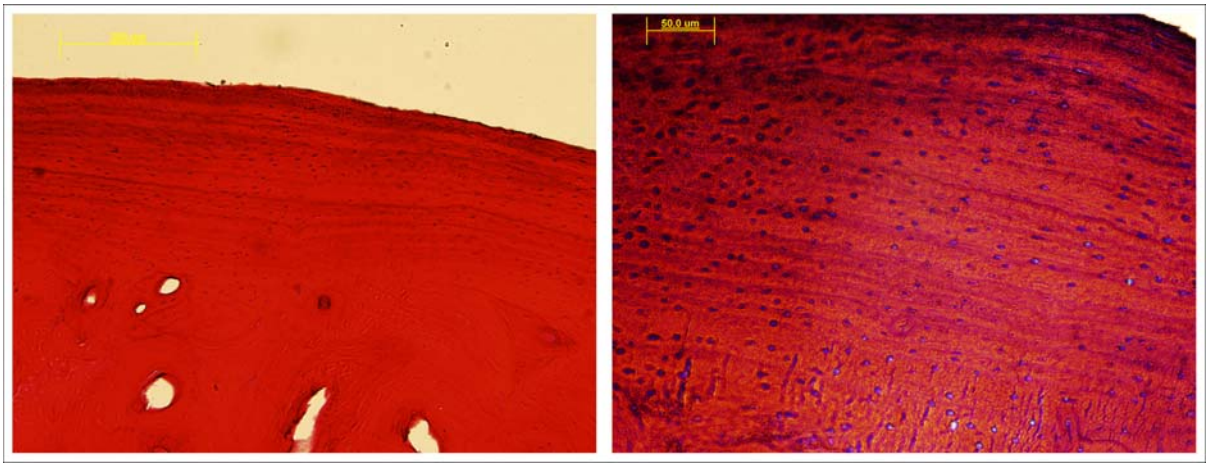

Fig.21 Microfotografies corresponents a la mostra T70B1 de tall transversal de fèmur anterior obtinguda amb el mètode 2 (microtomia amb descalcificació), amb doble tinció hematoxilina – eosina. La imatge ha estat obtinguda amb l'equip Olympus DP70 del laboratori de Microfotografia del Departament de Biologia Cel·lular.

3.4 Mètode 3 (Microtomia en sec)

Un cop fets els talls com s'explica a l'apartat 3.1.2 es van preparar unes mostres per a microscòpia electrònica de rastreig amb electrons retrodispersats o secundaris (mostres T70C1, T70C2 i T70C3 del fèmur posterior de la tortuga 7492) i unes altres per a microscòpia òptica sense descalcificació i tinció histològica amb blau de toluïdina i tricròmica de Masson (mostra T70B3, corresponent al mateix fèmur anterior que la mostra destinada al mètode d'abrasió i a les mostres destinades a descalcificació).

3.4.1 Microscopi electrònic de rastreig

El procés de preparació de les mostres es va portar a terme a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat d'Odontologia de la Universitat de Barcelona, seguint el protocol d'estudi estandaritzat per la mateixa Unitat (Manzanares i col. 1997).
Essencialment consisteix en un procés de fixació, seguit de la deshidratació i preinclusió en polímers del metil-metacrilat (Technovit®, Exact-Kultzer, Wehrheim, Alemania) de les mostres, que no són sotmeses a descalcificació prèvia. Les mostres queden així incloses en el producte, que es fotopolimeritza, obtenint-se un bloc rígid (Fig. 22) que es successivament muntat, seccionat amb una serra de banda diamantada i erosionat fins permetre el seu estudi sistemàtic per microscòpia electrònica amb electrons retrodispersats o secundaris (Manzanares i col. 1997).

Aquest és un procés realment laboriós i lent. Des del moment en que es fan els talls primaris fins que es tenen els blocs rígids a punt per observar, poden passar d'un a dos mesos. Quan va estar tot a punt, la Dra. Manzanares ens va avisar que teníem reservat el matí del dia 7 de gener per anar a fer les observacions al Servei de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (Fig.23).

Fig.22 Distribució de les mostres T70C1, T70C2 i T70C3 a dins del MER (a l'esquerra). Muntatge de les mostres (a la dreta).

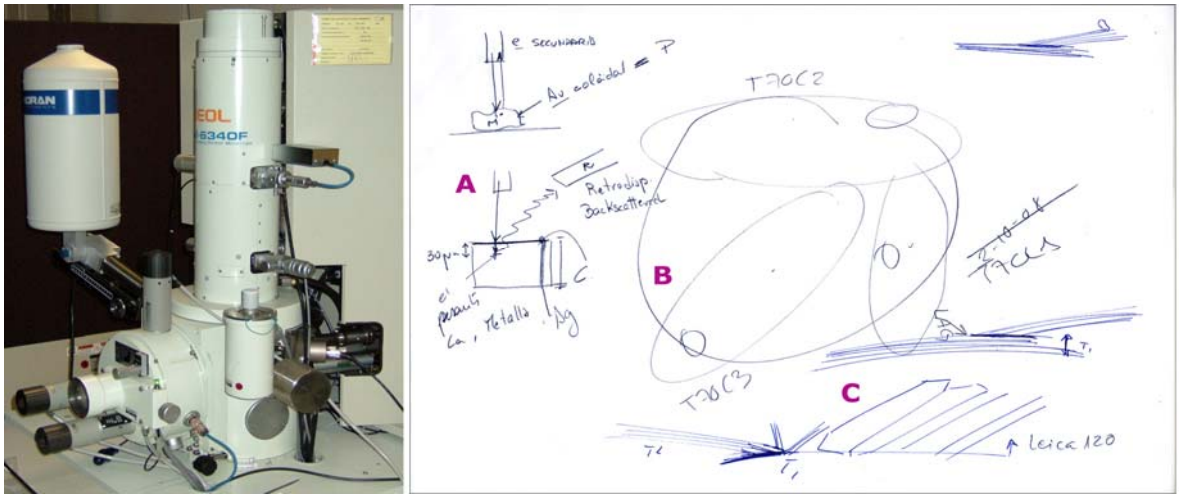

Fig.23 A l'esquerra microscopi electrònic de rastreig amb electrons retrodispersats i a la dreta explicació gràfica del funcionament del MER (A), situació de les mostres (B) i interpretació de les línies de creixement de l'os (C) que ens va fer la Dra. Manzanares mentre realitzàvem les observacions al microscopi electrònic.

3.4.1.1 Resultats

Els resultats amb el microscopi electrònic no han estat els esperats, les línies no es veuen tant clarament com amb els mètodes de microscòpia òptica. Això pot ser degut, segons la Dra. Manzanares, a que aquestes línies no són diferències d'hipercalcificació com passa amb altres animals. Les bandes (com veurem tot seguit) existeixen, però com

a diferències de consistència, probablement degut a la disposició de les fibres de col·lagen prèvies a l'ossificació. En qualsevol cas, aquestes línies o bandes que s'hi observen indiquen l'existència d'anells de creixement a la mostra i per tant representen una evidència més que les línies obtingudes amb els altres mètodes són reals i no marques produïdes posteriorment a l'os (artefactes). Tot i això la mostra presentava moltes esquerdes[20] degut a que aquesta tècnica (microscòpia electrònica) requereix utilitzar-la fent el buit i podria ser que moltes de les línies que es veuen fossin artefactes, però la Dra. Manzanares ens va ensenyar a comprovar-ho (Figs. 24 i 25).

Aquests talls ens han servit també per a comprovar quina de les zones de l'os és la més idònia per a estudiar les línies, resultant que de les tres mostres, la T70C2 (mitjana) era la que es podia obtenir millor resultat i per tant la que s'hauria d'utilitzar sempre ja que d'aquesta manera la mostra conté menys teixit vascular (que està més centralitzat) i les marques perifèriques, al no estar tan juntes com passa en el cas de les dues mostres proximal i distal, s'observen millor (Fig. 24).

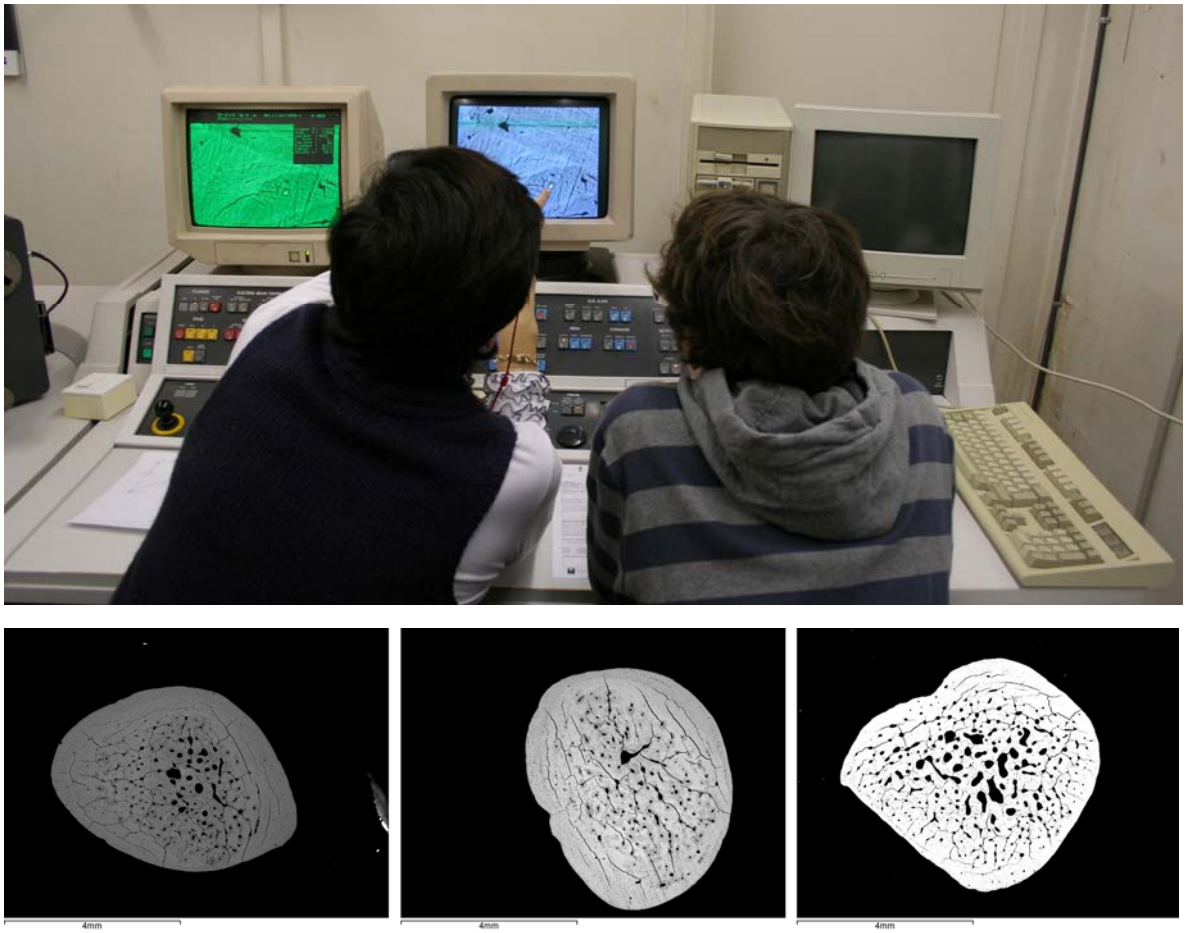

Fig.24 A dalt: La Dra. Manzanares ensenyant–me a interpretar les imatges del MER. A baix: Seccions completes vistes al MER (a mínim augment) de les mostres corresponents a les porcions proximal, mitjana i distal (respectivament, d'esquerra a dreta: T70C1, T70C2, T70C3) del fèmur posterior nº3 en les quals es pot observar clarament que la mostra mitjana te menys teixit vascular.

La Dra. Manzanares, també ens va fer notar que aquest os tenia poquíssim teixit actiu, que era gairebé miraculós que continués essent funcional (aspecte que es podria comprovar per la diferent tonalitat que envoltava a les osteones). Segons el meu tutor, podríem fer una analogia amb altres organismes molt vells com és el cas de *Pinus longaeva* (veure apartat 1.1), en que la major part de l'estructura de l'arbre és matèria inactiva i només es mantenen actius alguns teixits que arriben a l'exterior (branques vives) i permeten mantenir viu a l'organisme durant molts anys.

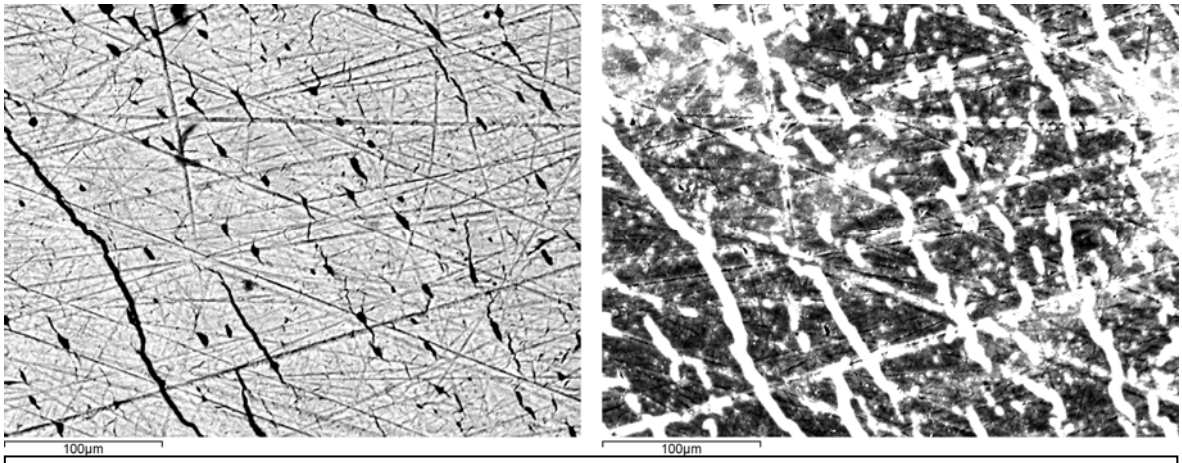

Fig.25 Electromicrografia en la que es pot comparar l'aspecte amb visió normal amb el MER (a l'esquerra) i el resultat amb l'opció secundaria (a la dreta)que permet comprovar que moltes de les línies que s'observen a l'esquerra no són reals sinó que corresponen a artefactes (zones més clares a la dreta).

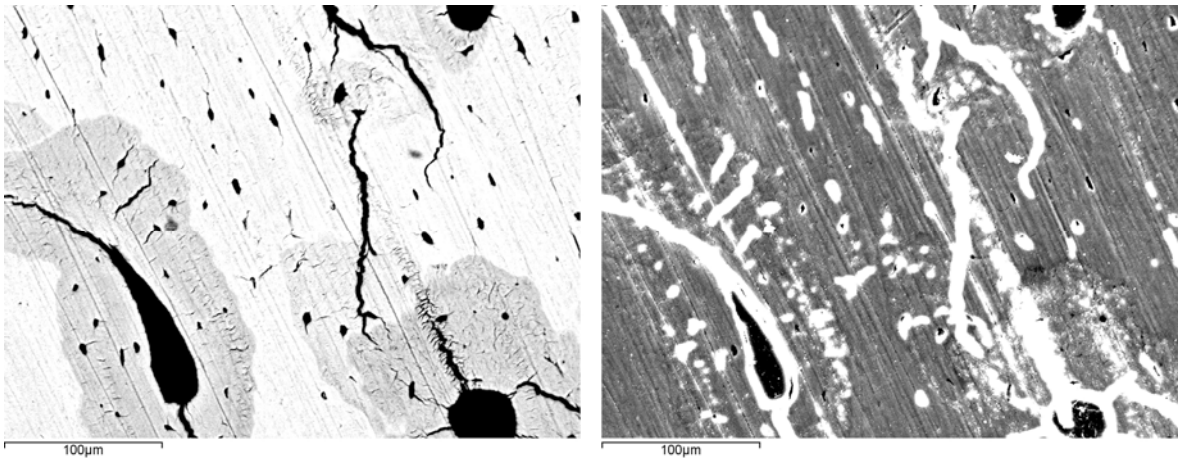

Fig.26 En aquesta imatge es fan visibles dos nivells de línies reals, unes de més gruixudes (a nivell dels conductes de Havers) i unes de més fines entremig de les gruixudes. També s'hi observen altres aspectes interessants, com la tonalitat de gris que envolta els conductes de Havers que podria indicar la zona de teixit actiu, en relació a la més blanca (inactiva).

Bé, en qualsevol cas, s'hauran de portar a terme més observacions amb el MER d'aquest material (faltarien encara unes 6 hores d'observació segons la Dra. Manzanares) i sobretot estudiar més a fons el material ja obtingut.

3.4.2 Microscopi òptic

Com ja s'ha comentat anteriorment, del mateix os (fèmur anterior nº2) utilitzat per a la tècnica d'abrasió (apartat 3.2) i per a la de microtomia amb descalcificació (apartat 3.3), es realitzaren uns talls amb la serra odontològica Exakt (veure apartat 3.1.2) destinats a observació d'os sense descalcificar, amb unes tècniques de transparentat i tinció específiques: tinció histològica amb blau de toluïdina i tricròmica de Masson.

Aquest procés de preparació histològica es va portar a terme a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat d'Odontologia de la Universitat de Barcelona, seguint el protocol detallat a "Optimisation of a Scheduled Study for Undecalcified Samples" (Manzanares i col. 1997).

Es realitzaren dues preparacions (A i B) de cada sistema de tinció, de manera que hi havia 4 preparacions en total: T70B3A(tricròmic), T70B3B(tricròmic), T70B3A(toluïdina) i T70B3B (toluïdina).

Recollírem les preparacions microscòpiques de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana i les portàrem al Departament de Biologia Cel·lular per fer-ne les fotografies al Laboratori de Microfotografia amb l'equip Olympus DP-70 (Fig. 27), explicat anteriorment (veure apartat 3.2.2).

Fig.27 Equip Olympus DP70 del laboratori de Microfotografia del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia amb el que s'han digitalitzat totes les preparacions de microscòpia òptica, amb l'ajuda dels tècnics del Departament. La imatge correspon a la mostra T70B4.

3.4.2.1 Resultats

Cal dir que no hem pogut disposar dels resultats fins pocs dies abans del dia d'entrega de la memòria del treball de recerca i per això no hem pogut estudiar les imatges encara amb prou detall, però les primeres observacions ens fan pensar en que possiblement sigui aquest el millor mètode per a l'estudi de les marques de creixement ossi, ja que els

anells s'observen clarament tan en les preparacions processades amb la tinció tricròmica (Figs. 28 i 29), com amb les tenyides amb blau de toluïdina (Fig. 30).

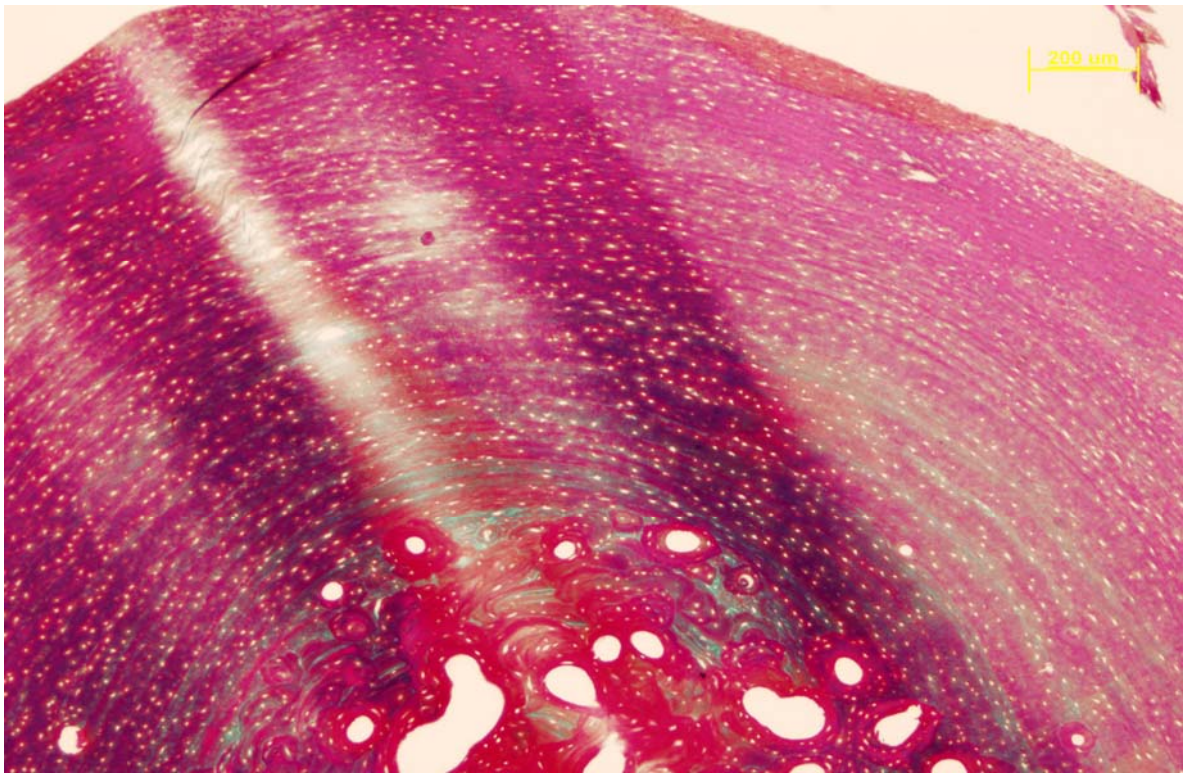

Fig.28 Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal de fèmur anterior que mostra el resultat de la tinció tricròmica per evidenciar les marques de creixement.

En aquestes últimes, a més, s'observen unes diferències molt marcades en el gruix (marques de creixement ossi) entre línies d'aturada de creixement (LAG), si ho comparem amb la tinció tricròmica, sobretot amb l'ampliació (Fig. 29) o amb la d'abrasió muntada amb bàlsam del Canadà (Fig. 17), que corresponen al mateix os i les distàncies entre línies es veuen més homogènies. Per altra banda tampoc és homogeni el grau de tinció (toluïdina) al llarg de tota la mostra (Fig. 30).

Tot això podria indicar que les zones més amples potser "amaguen "línies que no han quedat marcades per una qüestió de tinció o bé perquè els talls són massa prims. Caldrà estudiar més a fons aquestes preparacions, fer ampliacions en paper per resseguir amb llapis les línies (com s'ha fet amb el mètode 1) i consultar a experts per decidir també si s'ha de repetir algun dels processos portats a terme.

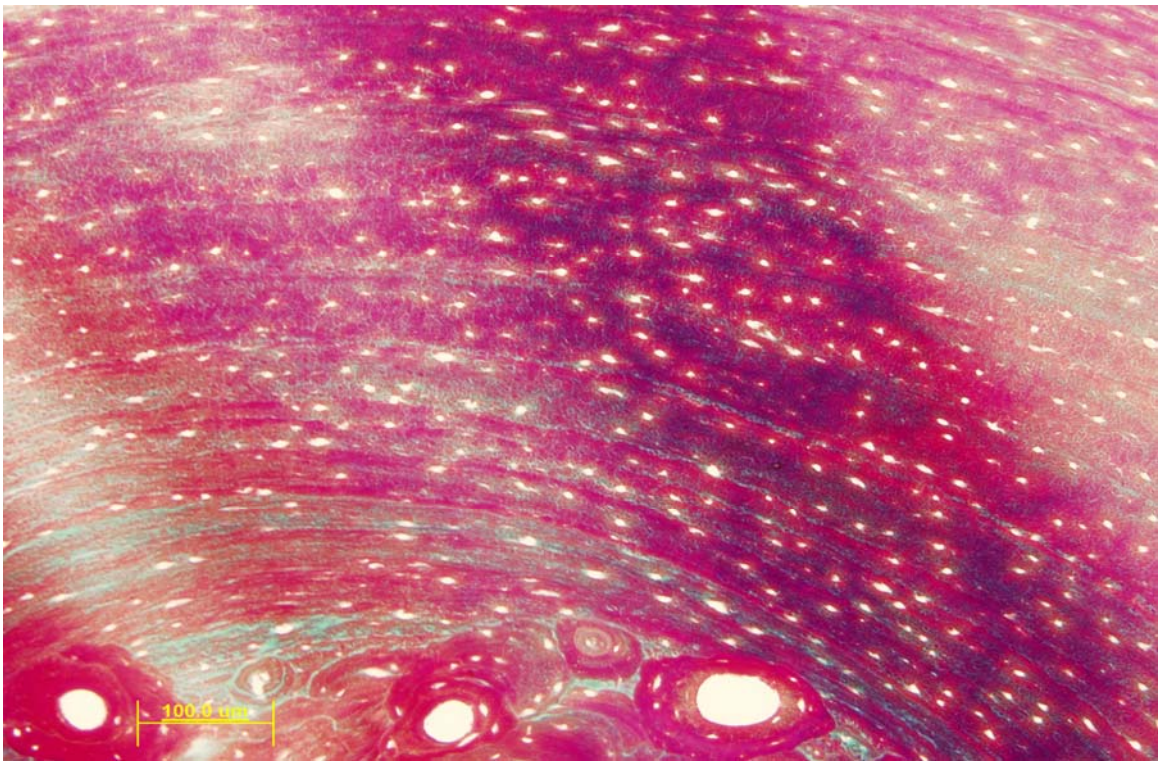

Fig.29 detall ampliat de la figura 28 on es poden identificar més clarament les marques de creixement ossi separades per línies d'aturada de creixement (LAC) de color gris.

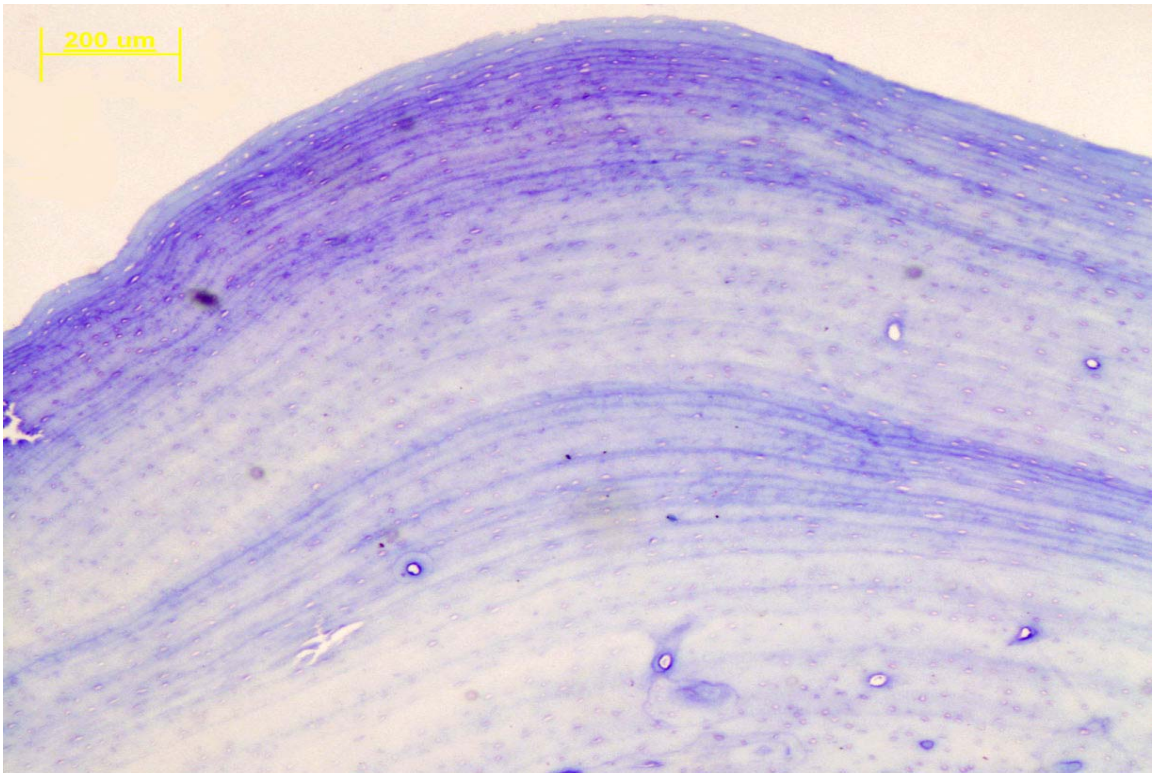

Fig.30 Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal de fèmur anterior que mostra el resultat de la tinció amb blau de toluïdina per evidenciar les marques de creixement.

4. Discussió

L'objectiu inicial d'aquest treball, recordem-ho, era el d'esbrinar si es podia determinar pel mètode d'osteocronologia l'edat exacta d'una tortuga mediterrània (aprofitant que s'acabava de morir un exemplar molt vell al Pati de les tortugues de l'Escola), tenint en compte que aquest sistema per a la determinació de l'edat (el més exacta per aquests animals) no s'havia aplicat en exemplars de més de 20 anys (i a la nostra tortuga se li havia suposat una edat d'uns 70-80 anys) i, en cas afirmatiu, intentar determinar quin dels mètodes d'osteocronologia resulta el més adequat.

S'han portat a la pràctica diverses metodologies d'osteocronologia però encara no s'ha pogut realitzar un anàlisi exhaustiu de tot el material (tampoc hem tingut temps de consultar a experts en la matèria per no disposar abans del material esmentat).

Les metodologies portades a terme són les més utilitzades en cronologia esquelètica (Castanet i Cheylan, 1979; Zug, 1991), és a dir, la tècnica d'abrasió, la tècnica de microtomia sobre os descalcificat i tenyit amb hematoxilina, la tècnica de microtomia en sec i observació directe i fins i tot l'observació amb microscopi de llum polaritzada.

Ara bé, s'han incorporat unes variants de tinció en os sense descalcificar (toluïdina i tricròmica) que, precisament, s'han manifestat com les tècniques més vàlides i que, de moment, ens han permès confirmar que les línies observades amb el mètode d'abrasió o desgast, que és l'únic mètode realment estudiat, muntades (sense tenyir) amb bàlsam del Canadà (Fig. 16) i marcades per a facilitar-ne el recompte (Fig. 17), corresponen a veritables marques, suposadament de creixement anual de l'os, perquè es repeteixen en totes les observacions realitzades i es veuen especialment bé en algunes franges de les mostres tenyides amb la tècnica tricròmica (Figs. 28 i 29) i amb la del blau de toluïdina (Fig. 30). S'hauran d'estudiar a fons aquestes preparacions, com ja s'ha comentat (veure apartat 3.4.2), per acabar de decidir si cal repetir-ne alguna o potser incorporar alguna altra tècnica de tinció o d'observació nova, com ara la tècnica d'observació de Nomarski, que és un contrast de fases interferencial en el que (segons ens va indicar la Dra. Durfort) és veuen imatges i fons en diferents colors i dóna una sensació de relleu molt interessant.

Es tractaria de veure fins a quin punt es pot assegurar que els espais entre dues línies (LAG) corresponen totes realment a un any i determinar si s'ha produït alguna reabsorció o remodelació de l'os (veure apartat 1.3) o fins i tot alguna duplicació, com s'ha citat en el cas dels anells dels arbres[21].

[21] Precisament ens ha quedat pendent la visita amb la Dra. Gutiérrez del Departament d'Ecologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, experta en dendrocronologia, per ensenyar-li el material i fer-li consultes d'interpretació, com havíem acordat amb ella.

També s'ha aplicat una metodologia nova, la de microscòpia electrònica de rastreig amb electrons retrodispersats. Els primers anàlisis d'aquestes observacions ja ens han indicat que no és el millor mètode per a observar i contar els anells de creixement de l'os d'aquesta espècie, però ens ha permès comprovar alguns aspectes i ha obert possibles línies d'investigació que creiem molt interessants (veure apartat 3.4.1.1).

Malgrat tots aquests aspectes inacabats, creiem estar en disposició d'aventurar unes conclusions preliminars, en relació a si es pot determinar l'edat en tortugues d'edat avançada, al millor mètode per a portar-ho a terme i a l'edat aproximada de la nostra tortuga morta, que hauran, això si, d'ésser comprovades amb un estudi posterior.
En aquest sentit s'han deixat dos fèmurs intactes, un d'anterior i un de posterior (com els processats) per si s'ha de repetir alguna de les tècniques metodològiques utilitzades o per fer altres comprovacions que es considerin oportunes.

4. Conclusions

Tenint en compte les limitacions exposades en l'apartat de discussió, podem concloure que:

- Es pot fer servir l'osteocronologia per a la datació de l'edat de tortugues de més de 20 anys, però no tots els mètodes d'osteocronologia es mostren igualment vàlids.
- Els millors resultats s'obtenen, en tots els casos, sobre os sense descalcificar (del mig de la diàfisi) i observació amb microscopi òptic. La millor tècnica específica encara està per determinar, però de moment les noves tincions (tricròmica i blau de toluïdina) s'han mostrat més efectives que l'observació directa d'os sense tenyir (muntat amb bàlsam del Canadà) tan si aquesta és observada amb microscopi òptic normal com amb microscopi de llum polaritzada (faltaria provar-ho amb microscopi interferencial de Nomarski).
- Pel que fa a l'edat de la tortuga 7492, encara caldrà una posterior comprovació, però sembla que en Joaquim Soler i l'Albert Martínez del CRARC tenen un bon ull clínic perquè li suposaren entre 70 i 80 anys i he pogut contar entre 73 i 78 línies, que suposadament correspondrien a l'edat, en anys, de la tortuga morta.
- Un aspecte que ens ha cridat l'atenció, fruit de l'observació al microscopi electrònic, és la presència de línies més fines entremig de les gruixudes (anuals). Seria interessant determinar la possible relació d'aquestes línies més fines amb les petites marques que s'observen entremig de les marques anuals de creixement de les escames còrnies de la closca i també amb un creixement no lineal que hem detectat en tortugues petites[22]. D'altra banda, també hem observat que en un tall de l'os hi ha molta heterogeneïtat entre gruix dels espais interlineals possiblement degut a moments de diferent ritme de creixement, de forma anàloga a la que s'observa en dendrocronologia.

  Pet tot això proposaríem que es continuessin aquests estudis en un futur treball de recerca.

[22] Aspecte tractat més a fons per la meva companya Èlia Faixó que ha estudiat el creixement de les tortugues nascudes a l'Escola durant el seu primer any de vida.

5. Bibliografia

Bujosa F. *Els arbres més vells.* [En línia]. [Consultat: 7 de juny de 2008]. Disponible a Internet: <http://amicsarbres.blogspot.com/2006/06/els-arbres-ms-vells.html>

Campelo, F., Nabais, C., Freitas, H., and Gutiérrez, E. (2007). *Climatic significance of tree-ring width and intra-annual density fluctuations in Pinus pinea from a dry Mediterranean area in Portugal.* Ann. For. Sci. 64(2): 229-238. doi: 10.1007/ BF00118210.

Campelo, F., Gutiérrez, E. Ribas, M., Nabais, C. and Freitas, H., (2007). *Relationships between climate and double rings in quercus ilex from northeast Spain*. Can. J. For. Res. 37(2): 1915-1923. doi: 10.1139/ X07-050.

Carranza, S., Roca J. Ll. (2007). *Caracterització genètica de les poblacions de tortugues mediterrànies de Març*à. Departament de Medi Ambient i Habitatge i Forestal Catalana S.A. 35 pp.

Díaz, H. & Ortiz, J.C. (1995). Contribución a la Historia Natural de *Pleurodema thaul* Lesson. ¿Es el Esfuerzo Reproductivo Determinado por la Edad?. Noticiero de Biología 3 (3): 131. [En línia]. [Consultat: 10 de desembre de 2008]. Disponible a Internet: <http://www.geocities.com/RainForest/3532/tesis.html>

Durfort, M. (2006). *Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals.* Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

Ferrer, Diego (1975). *Esquemas de histología.* Quarta Edición. Editorial Espaxs.

Gainza. F. (1998). *Dendrocronología definición y metodología* [En línia]. [Consultat: 10 de juny de 2008]. Disponible a Internet: <http://www.arkeolan.com/dendro.htm#consultas>

Gutiérrez, E. 1987*. Dendrocronologia de Pinus uncinata, Pinus sylvestris y Fagus silvatica en Catalunya.* Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona.

Génova, R. 1987. *Analisis e interpretación de las series de anillos de Pinus uncinata y Pinus sylvestris en la Península Ibérica*. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona.

Herrerias, Laia (2007). *Hibernació i reproducció de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. (Premi CIRIT 2007). [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Hickman, Jr. C. P., Roberts, L. S. Larson, A. (1997). Zoologia. *Principios integrales*. 9ª Estación (3ª Ed. Española). Ed. Mc.Graw-Hill. Interamericana. Madrid.

Juárez, A., Ardisson, P. (2005). *Anillos de crecimiento: Fuente natural de información biológica y ambiental.* Avance y perspectiva nº24.

Manzanares, M.C., Calero, M.I., Franch, J., Jimenez, M.P., Serra, I. (1997). Optimisation of a Scheduled Study for Undecalcified Samples. Microscopy and Analysis nº31.

Masalles, R. i col. (1988). *Història natural dels Països Catalans* vol. VI (Plantes superiors). Enciclopedia Catalana S.A. Barcelona.

Mosquin, D. (2008). /Pinus aristata/. [En línia]. [Consultat: 6 de gener de 2009]. Disponible a Internet: <http://www.ubcbotanicalagarden.org/potd/2008/09/pinus_aristata.php#002597>

Nabors, M.W. 2006 *Introducción a la botánica*. Pearson Educación, S.A. Madrid.

Ollé, Berta (2008). *Reproducció de la tortuga mediterrània a l'escola*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. [En línia]. [Consultat: 10 de maig de 2008]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Pakenham, T. (2008). *Árboles excepcionales del mundo*. Naturart, S.A. Editorial Blume.

Pascual, Eudald (2008). *Variacions de pes durant el procés d'hibernació de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Sanz E. (2000). *Los seres más viejos del mundo.* [En línia]. [Consultat: 7 de juny de 2008]. Disponible a Internet: <http://www.cienciadigital.es/hemeroteca/reportaje.php?id=78>

Soler, J. (2008). *La tortuga mediterrània.* Rev. Peluts, vol.9, juny. [En línia]. [Consultat: 10 de juliol de 2008]. Disponible a Internet: < http://www.amasquefa.com/uploads/37.177.pdf>

Soler, J., Martínez, A. (2005). *La tortuga mediterrània a Catalunya.* Col·lecció Natura,3. Edicions l'Agulla de cultura popular. Tarragona.

Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A.F.W. (2004). *Tratado de Botànica*. 35º edición. Ediciones Omega. Barcelona.

Vendrell, Alba (2006). *Etologia i reproducció de la tortuga mediterrània*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. [En línia]. [Consultat: 20 d'abril de 2008]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Vetter, H. (2006). *La tortuga mediterránea, Testudo hermanni*. Edition Chimaira i Reptilia Ediciones.

Agraïments

Aquest treball de recerca ha estat possible gràcies a:

- Principalment al meu tutor, Josep Marí, per la direcció del treball i temps que hi ha dedicat durant tots aquests mesos, fins i tot durant els períodes de vacances. Al seu costat he après a valorar molt especialment la importància del rigor metodològic en la tasca científica.

- A Joaquim Soler i a l'Albert Martínez responsables, respectivament, de la direcció tècnica i científica del CRARC, per les idees i consells que ens han anat donant i per la bibliografia específica que ens han proporcionat, que ha estat el punt de partida d'aquest treball.

- A la Dra. Mercè Durfort del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, pels seus consells al llarg del treball i per permetre'ns l'ús del seu laboratori i equip de microfotografia; i al seu tècnic de microscòpia i microtomia, Jordi Correas, per les seves explicacions i la seva inestimable ajuda en el processat de les mostres i l'obtenció de les microfotografies finals.

- A la Dra. Mª Cristina Manzanares de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge), per la seva inestimable col·laboració en aquest projecte per a l'obtenció dels talls sense descalcificar i proporcionar-nos l'oportunitat de realitzar les observacions de microscòpia electrònica de rastreig als Serveis Cientifico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

- Al Dr. Salvador Carranza, per les seves explicacions sobre filogènia evolutiva, proporcionar-nos els resultats dels estudis d'ADN mitocondrial realitzats en les nostres tortugues i la visita guiada al CSIC (Centre Superior d'Investigacions Científiques) i sobretot per fer-nos de científic "de capçalera" en aquest treball.

- A Èlia Faixó i Laura Pascual per la seva col·laboració en totes les tasques realitzades durant el període del treball de recerca.

- Als meus pares per el seu suport moral durant el treball de recerca i les llargues hores dedicades a les correccions.