

Estudios específicos

4

4.2 ESQUELETOCRONOLOGÍA

Federico Marangoni¹ & Javier A. López^{2,3}

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste (FACENA: UNNE-CONICET). Avenida Libertad 5460 — CP 3400 Corrientes, Argentina.

² Instituto Nacional de Limnología (INALI: CONICET-UNL). Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.

³ Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.

El término “*Skeletochronology*” fue propuesto por Castanet et al.⁽¹⁾ para análisis teóricos y aplicaciones prácticas del uso de las marcas de crecimiento en el esqueleto (GMs de aquí en más, por sus siglas en inglés: “*Growth Marks*”) mediante los cuales las estrategias de historia de vida, y los factores que las controlan pueden ser descifradas. Esto se debe en parte a que durante la ontogenia de un vertebrado, las variaciones en las tasas de crecimientos producidas por variaciones ambientales locales, tienen una gran influencia en la organización del tejido esquelético mineralizado, principalmente huesos y dientes⁽²⁾. Si se considera además que cada parte del esqueleto tiene su propia condición específica de crecimiento, el cual también diferirá de un lugar a otro para un estado ontogenético en particular, se estará en condiciones de realizar inferencias de los patrones de crecimiento de un organismo, partiendo de estas variaciones en espacio y tiempo que sufre la organización tisular.

Así, para poder realizar estas inferencias, la esqueletoncronología se basa en la presencia de marcas de crecimiento óseo de forma cíclico y anular, que se puede visualizar en secciones transversales principalmente de los huesos largos de los organismos. En los anfibios, especialmente en anuros y caudados, las marcas de crecimiento en el esqueleto osificado son identificadas con gran calidad debido a que los huesos de los “anfibios modernos” poseen una organización ósea muy simple^(3,4). A pesar de ello, desde la década de los 40, momento en el cual Senning reporta por primera vez la presencia de GMs en los huesos de *Necturus maculosus*, no siempre ha sido fácil encontrar un consenso en la descripción e identificación de estas marcas. Por ello resulta importante describir brevemente las tres categorías de GMs que pueden ser identificadas:

ZONAS: corresponden a las capas opacas más anchas, que se visualizan en las secciones transversales, depositadas durante los períodos anuales de osteogénesis activa⁽⁵⁾.

ANNULI: corresponden a períodos donde la osteogénesis es más lenta y, por lo tanto, estas marcas son más estrechas y translúcidas que las zonas adyacentes⁽⁵⁾.

LAGs (Lines of Arrested Growth): son líneas siempre delgadas, funcionalmente definidas como líneas de descanso (“*resting lines*”) que se depositan en los períodos donde la osteogénesis casi se detiene o se detiene completamente^(6,7).

En forma genérica, se puede decir que las GMs son la expresión de una variación gradual en la velocidad de la osteogenesis que se dá en cada marca. Esto determina en su conjunto un ciclo completo de deposición del hueso. De este modo cada ciclo sucesivo comprende: una osteogenésis muy activa (ZONAS), pasando por una de menor actividad (ANNULI), y finalmente un detenimiento o “descanso” de la misma (LAGs). Cabe mencionar que

en muchos ocasiones, dependiendo de factores intrínsecos o extrínsecos de cada especie, esta descripción general sufre importantes modificaciones (e.g. no siempre están presente las annuli, presencia de doble LAGs, reabsorción ósea, entre otras), que se tratará en detalle al explicar el análisis de interpretación de los cortes realizados.

Las estimaciones de la edad a través del conteo directo de las LAGs, tanto en Argentina como en el resto del mundo sigue, en sus aspectos más generales, los procedimientos histológicos empleados por Castanet⁽³⁾ y Castanet y Simirina⁽⁴⁾. Aunque pueden incorporarse pequeñas modificaciones a la técnica en función de las características de las muestras, equipamiento y objetivos del trabajo. En este punto es preciso quizás recordar que la esqueletocronología no es una línea de investigación en sí misma, sino, simplemente, un método que permite responder formulados que realizan los investigadores a la hora de intentar entender diferentes procesos y mecanismos próximos que determinan las observaciones efectuadas. En otras palabras, es la herramienta que permite acercarse, dentro de diferentes líneas de investigación, a un mejor entendimiento de las posibles adaptaciones, patrones, estructuras o funciones, en la historia de vida de una población, especie o comunidad biológica.

Primer paso, obtención de las muestras

Como se sugirió en los párrafos introductorios, la muestra para esqueletocronología consiste en huesos largos de los individuos a analizar. La cantidad de individuos a analizar dependerá íntimamente de los objetivos del trabajo y de la disponibilidad de ejemplares.

Los huesos pueden ser tanto falanges (lo más usual) u otros huesos largos tales como húmeros, fémures, etc. (menos usual)^(8,9,10). Una ventaja del uso de falanges es que pueden obtenerse de animales vivos, ya que el corte de un dedo (*toe clipping*) no debería afectar significativamente la supervivencia del animal, ni genera mucho estrés⁽¹¹⁾. La alternativa es el uso de animales de colección, en los que la selección del hueso a utilizar dependerá del objetivo del trabajo, el tamaño del animal y la posibilidad de disponer solo de una/s falange/s, u otro hueso largo.

Aspectos a considerar en y para el ajuste de la técnica de esqueletocronología

Los mayores aspectos que hacen al ajuste de la técnica son:

- a) La especie que se vaya a estudiar

Las diferencias que puedan surgir en la metodología para la estimación de la edad, en función de las especies a estudiar, están relacionadas a los tamaños de las falanges, u otros huesos largos (húmero, fémur) propios de cada especie, y al patrón de crecimiento que cada especie presenta. No es intención en este punto ahondar en las particularidades de cada especie, pero podríamos decir de forma general en base a la experiencia y, centrado en la revisión de estudios que se han realizado en la última década en especies Argentinas, que la mayor o menor factibilidad de obtener buenos cortes y GMs bien definidas, ya se evidencia a nivel Familia. Así, especies de la familia Bufonidae como *Rhinella achalensis*, *R. arenarium*, *Melanophrynniscus devincenzi*, *M. atroluteus* y *M. krauczuki*⁽¹²⁻¹⁵⁾; Microhylidae: *Dermatonotus muelleri*^(16, 17); Ceratophryidae: *Ceratophrys cranwelli*⁽¹⁶⁾ y *Chacophrys pierottii*⁽¹⁸⁾; Leptodactylidae: *Leptodactylus latinasus*, *L. mystacinus*, *L. luctator*, *L. bufonius*, *Physalaemus fernandezae*⁽¹⁹⁻²²⁾; Hylidae: *Nyctimantis siemersi*^(23,24) y Odontophrynidae: *Odontophrynus cf. barrioi*⁽²⁵⁾, presentan diferencias que hace más fácil o dificultosa la tarea de hacer una lectura y análisis de las GMs. Las especies de la familia Bufonidae tienen, por ejemplo, huesos de las falanges de diámetro mayores en relación al tamaño corporal, presentando mayor área de hueso cortical, y unas GMs que, por lo general, están bien definidas y se tiñen con un buen contraste. Las especies de la familia Leptodactylidae, presentan LAGs que se tiñen más débilmente, y dado su patrón de crecimiento acelerado, es posible observar en las Zonas de crecimiento (es decir entre dos verdaderas LAGs) otras líneas más delgadas y más suavemente teñidas, que pueden dificultar su lectura. Como ejemplo de diferencias entre especies de una misma familia se puede citar el caso de la diferencia en este aspecto que se observa entre las especies de los géneros *Rhinella* y *Melanophrynniscus*, siendo estas últimas más complejas a la hora de estimar la edad, dado su pequeño tamaño de hueso y la proximidad de diferentes GMs que se depositan en el mismo.

Por estas diferencias, y considerando el esfuerzo que demandan los cortes, con los gastos de insumos asociados, es recomendable analizar *a priori* qué especies son de interés para analizar, entre el abanico de posibilidades que se presenta. Lo ideal sería una especie con un tamaño de hueso cortical importante, que se conozca por la literatura que las líneas se expresan bien, y que no hay dificultad en su lectura y análisis posterior.

b) Preparación de los tejidos: tiempos y agentes utilizados en la fijación, descalcificación, deshidratación, inclusión, desparafinado y colorante utilizados para la tinción

Siguiendo la cronología con que se realiza el procesamiento de los tejidos, hasta el corte en sí en el micrótomo, se recomienda tener en cuenta:

El agente y tiempo de descalcificación que se va a utilizar. La mayor parte de la literatura y los estudios realizados en Argentina utilizan preferentemente el ácido nítrico al 5%. No obstante, en lo que se refiere a los tiempos de descalcificación existe mucha variación entre especies, autores y técnicas.

Los tiempos de descalcificación siempre están en relación a la longitud y diámetro del hueso. No es lo mismo el tiempo que llevará la descalcificación de una falange del dedo III de un *Rhinella diptycha* que el de un *Physalaemus albonotatus*. En la mayoría de los casos los tiempos de inmersión de las falanges en ácido nítrico varían entre 30 minutos y hasta 72 horas. Lo aconsejable es estandarizar los tiempos para cada especie, pinchando cada 30 minutos la falange con un alfiler entomológico y testear su rigidez hasta lograr que el tejido tome una consistencia más flexible para realizar el corte.

Por otro lado, existen diferencias entre autores a la hora de decidir si descalcificar las falanges sin extraer los tejidos que la recubren, o hacerlo con anterioridad y poner el hueso, pelado. Nuestra experiencia permite sugerir que no existen diferencias, en lo que a calidad de corte obtenido se refiere, en un caso u otro.

c) Equipamiento para el procesamiento de los tejidos. Procesador “calesita”, dispensador de parafina, baño de flotación, casetes

Quizás en este punto es donde se pone en juego la creatividad del investigador, becario o técnico que esté a cargo de los cortes. Es evidente, que toda aquella “ocurrencia innovativa” para reducir tiempos y costos, del personal y del laboratorio, es siempre aceptado con muy buen agrado. Es por ello que, si bien la mayoría sigue una metodología estándar, en los procesos de deshidratación, inclusión, desparafinado y tinción de los cortes, en cada laboratorio se haya incluido alguna modificación. Así se observa cómo varían la cantidad de concentraciones diferentes de alcoholes que se utilizan, la inclusión o no de Peterfi para evitar el endurecimiento de los huesos o el reemplazo del xileno por otro agente menos invasivo para el tejido. Además, los pasos por los diferentes agentes se puede realizar de un modo manual o con un procesador automático, o comúnmente llamado “calesita”. En la inclusión entra en juego las diferencias en el medio de inclusión que se utiliza, ya sea parafina y el tipo de parafina según los grados de temperatura que acepta, otros medios de inclusión como el caso de la resina plástica, que es más costosa y no recicitable, pero brinda un mejor medio de “sostén” al tejido. Consideramos que una parafina de 50-60 °C es lo más aconsejable y lo que se utiliza en la mayoría de los casos, y no existen grandes diferencias en eficiencia a la hora de obtener buenos cortes. Lo importante en este caso es que siempre la parafina esté en el rango de temperatura adecuado, no muy

caliente por ejemplo, y que siempre se encuentre limpia. Es recomendable reemplazarla cuando se observa que ya comienza a perder el color blanco original.

También es muy simpático conocer cómo en cada laboratorio se han esmerado por equilibrar la balanza de costo/beneficio, a la hora de elegir el molde en el cual se va a incluir el tejido en el medio seleccionado. Desde los clásicos cassetes que se compran en las proveedoras científicas, pasando por el armado manual de pequeños recipientes con papel metalizado, hasta la utilización de la parte posterior de las pipetas plásticas Pasteur descartables. No cabe duda en este caso que el tamaño del tejido y la orientación correcta que se le debe dar juega un rol importante. En este sentido, sería un costo en vano de parafina y, tiempo y agentes de desparafinado, colocar una minúscula falange de *Melanophryniscus* en un casete. Para ello es recomendable el armado de un molde alternativo “casero” más pequeño (**Figura 4.2.1**).

d) Equipamiento de corte: Criostato vs. Micrótomo de rotación tipo Spencer

Nuevamente aquí se presenta el caso de la balanza costos/beneficios. Quienes han tenido la posibilidad de usar los dos medios más comunes de instrumental de corte lo saben.

Por un lado, el Criostato presenta grandes ventajas frente al Micrótomo de rotación tipo Spencer (**Figura 4.2.1**). Si bien el paso de la descalcificación es el mismo, una vez realizado este paso, con el Criostato se pasa directamente al corte de los huesos. Es decir, no se precisa ni la deshidratación previa al corte, ni a la tinción. Una vez descalcificada la muestra se incluye con un medio, que casi de forma instantánea se congela, en el interior del criostato y se procede inmediatamente el corte del hueso, para posteriormente pasar a la tinción directa con unas gotas de Hematoxilina. Por lo general, la selección de los cortes bajo lupa y el montaje directo en los portaobjetos se realiza utilizando un medio permanente no soluble en xileno. En esta etapa es aconsejable poner los cortes teñidos en unas cápsulas de Petri con agua, para ayudar al viraje del colorante, mientras bajo lupa binocular se seleccionan para el montaje aquellos en los que se observa mayor hueso cortical, poca reabsorción ósea y GMs evidentes.

Por la rapidez con que se obtienen resultados con el criostato, debido al menor número de pasos en el corte en comparación con el micrótomo rotatorio, es que es muy utilizado en laboratorios patológicos donde es preciso acelerar los tiempos para el diagnóstico que se requiera.

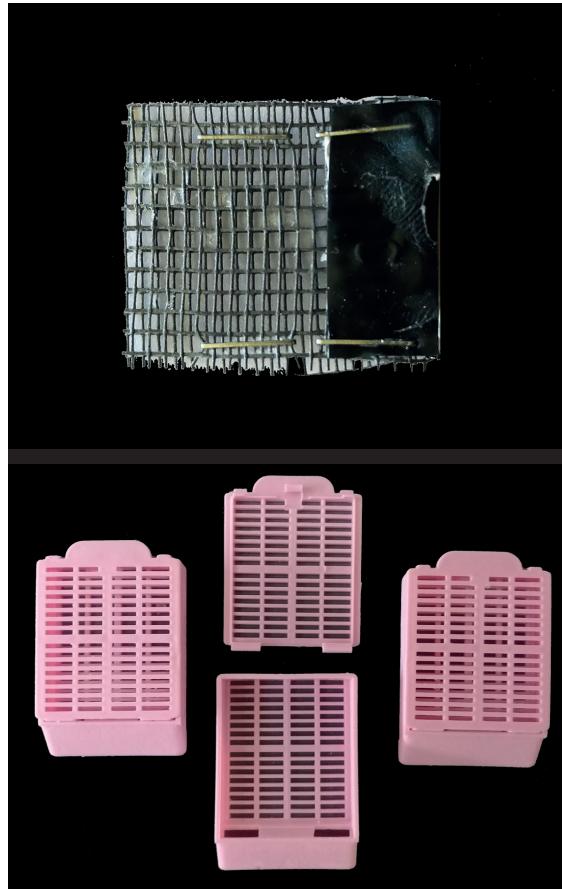
La desventaja que existe es el costo de adquisición del instrumental. Es un equipamiento de importación, con precios en dólares, y que siempre superan



(A) MICROTOMO DE ROTACIÓN TIPO SPENCER

Recomendaciones:

- Realice periódicamente un ajuste de todos los tornillos del mecanismo interior y exterior.
- Mantenga siempre lubricado el mecanismo. Puede utilizarse aceite de máquinas de coser.
- Mantenga siempre limpio de polvo o restos de parafina el equipo.

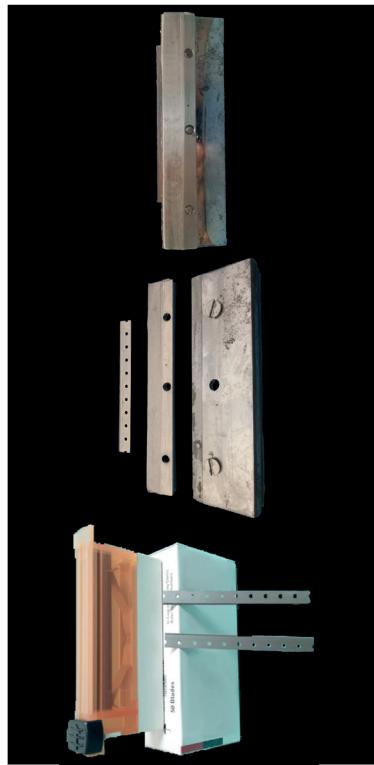


(B) CASETES PARA INCLUSIÓN

Opciones:

- Se pueden usar los cassetes comerciales o bien construir pequeñas canastitas con malla plástica con menor costo.
- En cualquiera de los casos, de ser muy pequeño las falanges u otro tejido a procesar, es aconsejable envolver el mismo con pequeños retazos de medias de nylon de mujer. De esta manera evitaremos que los tejidos se escapen por los orificios del cassette o canastita.

Figura 4.2.1: Equipamiento para el procesamiento de los tejidos. Todas las fotografías incluidas en la figura fueron realizadas con el instrumental e insumos del “Laboratorio de Histología de la Asignatura Limnología de la FACENA-UNNE” por el Lic. José Miguel Piñeiro, bajo la dirección del Dr. Federico Marangoni.



(C) MOLDES DE CONFECCIÓN DE TACOS DE PARAFINA

Opciones:

- Optar por los comerciales, o fabricar de modo casero
- Para pequeñas falanges, de fabricar pequeños moldes con la parte posterior de pipetas plásticas en desuso. De esta manera se logra un taco de forma cilíndrica en vez de cuadrada o rectangular, pero igual de efectiva a la hora de realizar los cortes.

(D) PARAFINERO

Opciones:

-Existen opciones alternativas para comprar un parafinero.

-En este caso se adaptó, un parafinero que se puede adquirir en las casas especializadas en artículos de peluquerías. Al mismo se le incorporó una canilla que dispensa la parafina, recubierta de un material que evita la perdida de calor y consiguiente solidificación de la parafina.

(E) CUCHILLAS

-En este caso se transformó la cuchilla que trae el micrótomo, a un soporte para cuchillas descartables.

-A la cuchilla original se le realizó un muesca tipo "socalo" para que descanse la cuchilla descartable, y mediante tres orificios se asegura otra pieza construida, con función de sujetador que mantiene fija la cuchilla. Se requirió del trabajo de un tornero.

-Las descartables es reemplazan al perder el filo. Por el contrario las que trae de fábrica el micrótomo hay que mandarla a afilar.

los porcentajes máximos que se pueden utilizar en un proyecto de investigación para la compra de este tipo de equipamiento (material inventariable). Con lo cual para un grupo en formación es una tarea titánica.

Sin considerarla una desventaja, también esa rapidez con que se obtienen los resultados en el criostato, se traduce en una merma de la calidad de los cortes. Se puede observar mejores detalles y mayor nitidez con la metodología que se aplica usando un micrótomo rotatorio dado que los tejidos se tiñen y aclaran mejor. Esta es en sí, además de la reducción en la compra del equipamiento, mucho más accesible para cualquier laboratorio, una de las razones del porqué este tipo de micrótomo es el instrumental más utilizado en esqueletocronología.

En la **Caja 4.2.1** se ha compilado una serie de causas posibles de problemas diferentes que pueden surgir cuando se realizan cortes histológicos con el micrótomo rotatorio.

e) Tinción, colorantes más utilizados

Como en la mayoría de los estudios generales de histología, la Hematoxilina-Eosina (H&E) suele ser el teñido de rutina. En el caso de la esqueletocronología, la hematoxilina de Harris se usa en el método regresivo. Este consiste en teñir todas las estructuras del tejido y luego someterlo a un proceso de decoloración controlada. En cambio, cuando se utiliza hematoxilina de Mayer, el método es progresivo. La tinción progresiva consiste en obtener una coloración adecuada controlando el tiempo de la sección en el colorante, de modo que a más tiempo más coloración. Otra de las hematoxilinas comúnmente usada es la de Ehrlich o de Gill.

Como recomendación para su uso es mantenerla en lugar seco y fresco, y filtrarla antes de su uso, valiéndose de un papel de filtro de café por ejemplo.

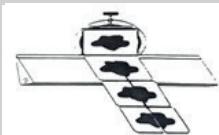
f) Medios de montaje

Para el caso del criostato, se utiliza un medio comercial cuya formulación es sólo conocida por sus fabricantes. En su reemplazo hemos tenido buenos resultados con el adhesivo sintético Voligoma®. Por otro lado, en el caso de realizar la técnica con el micrótomo rotatorio, el más común y permanente es el bálsamo de Canadá. Sin embargo, también es posible utilizar una solución 1:1 de glicerina líquida y alcohol. Si bien esta última tiene la ventaja de ser más barata, es un medio de montaje no permanente. Por ello, transcurridos unos pocos días, se puede comenzar a observar decoloración de los tejidos. Por lo cual se recomienda realizar el fotografiado de las secciones de hueso, el mismo día o al día siguiente de realizar los cortes.

Caja 4.2.1 - Problemas con cortes histológicos

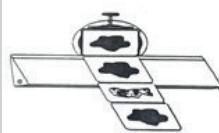
CINTA PARTIDA O RASGUÑADA A LO LARGO

- Polvo o material indeseable en el filo de la cuchilla.
- Calcio o cuerpos extraños en el tejido.
- Partículas o Polvo en la parafina.



CORTES GRUESOS Y DELGADOS

- Bloque muy grande para el micrótomo.
- Tornillos sueltos.
- Bloque o tejido muy duro para cortar.
- Cuchilla oxidada.
- Grado de inclinación de la cuchilla insuficiente



COMPRESIÓN Y ARRUGAS

- Bloque o cuchillas calientes.
- Cuchilla muy vertical.
- Cortes muy finos.
- Tornillos del micrótomo sueltos.
- Cuchilla sin filo.



CORTES CON AGUJEROS O PORCIONES FINAS Y GRUESAS

- Tejidos procesados incompletos.



CORTES INCOMPLETOS, SECOS O DEGRADADOS

- Procesamiento o infiltración incompletos.
- Parafina muy caliente al momento de infiltrar o incluir.



NO SE FORMAN CINTAS

- Cuchilla sin filo.
- Bloque muy caliente.
- Ángulo incorrecto de la cuchilla.
- Mecanismo del micrótomo suelto.
- Procesamiento incompleto.



RASGUÑOS, LINEAS O FRACTURAS EN EL CORTE

- Polvo o cuerpos extraños en la parafina.
- Calcio o cuerpos extraños en el tejido.



CORTES DE TAMAÑO DESIGUAL

- Bloque inadecuadamente devastado.
- Bloque no alineado con la cuchilla.



CINTAS TORCIDAS O DESIGUALES

- Filo de la cuchilla irregular.
- Bloque y cuchilla no están paralelos.
- Bloque no es rectangular o cuadrado.



g) Equipamiento para el fotografiado

Gracias al avance en la tecnología hoy podemos observar desde imponentes, costosos y calificados microscopios con cámaras fotográficas acopladas, hasta un simple soporte para realizar fotografías con cualquier teléfono equipado con cámara directamente acoplado al ocular. Es evidente que las funcionalidades y las posibilidades que se abren teniendo un buen equipamiento no tienen discusión. Sin embargo, hay que mencionar que para el caso de obtener las fotomicrografías de los cortes de falanges, basta con un teléfono equipado con cámara y, como se indica a continuación, de un software para la posterior medición de las GMs.

h) Medición de los cortes y calibración del instrumental

A lo largo de los años, y el paso por varios laboratorios, hemos observado que son muy pocos los casos en lo que se cuenta con un microscopio con cámara acoplada y conectada a un software que esté bien calibrado en función de los distintos aumentos que se seleccionen para la obtención de las fotos. En muchos casos es necesario recurrir a la transformación de píxeles a micras u otras magnitudes, partiendo de una referencia de medida conocida, para calcular el tamaño del hueso. Estas medidas de referencias se pueden obtener fotografiando, con cada uno de los objetivos que presente el microscopio, un portaobjetos milimetrado que se puede comprar en las proveedoras científicas, a partir de fotografiar una cámara de Neubauer o directamente fotografiando un papel milimetrado. Con estas fotos de referencia se podrá calibrar los softwares a utilizar. Esto será el caso de no contar con uno ya calibrado en el laboratorio.

Para la medición de los cortes, en la mayoría de los estudios se toma el diámetro del axis mayor y menor de la cavidad medular, de cada LAGs y del perímetro del hueso. Esto servirá para los posteriores análisis del tamaño del hueso y poder estimar los patrones de crecimiento de la especie en estudio.

Siempre es aconsejable tomar como mínimo dos buenas fotos con el menor aumento en el que el corte sea visible en todo su contorno, las cuales servirán posteriormente para realizar las mediciones. Otras dos como mínimo, con el mayor aumento que el tamaño del corte lo permita, nos servirá para tener un buen detalle de la sección de hueso donde se analizarán las GMs y se estimará la edad.

i) Interpretación de las GMs para las estimas de la edad y patrón de crecimiento

Se podría decir que esta etapa, luego de la obtención de los datos, es la más importante de todas. Será la forma en que se interpretan los resultados ob-

tenidos lo que dará mayor probabilidad de realizar una estimación segura de la edad. Claro que el lanzarse a la aplicación de la técnica, aprender sobre ella, y poder obtener buenos cortes es algo que se debe alentar a quienes se interesen en la ecología de anfibios y reptiles. Pero, no se debe olvidar proveer también el asesoramiento o el material bibliográfico que permita a los principiantes adquirir los conocimientos teóricos para luego poder interpretar lo que observan en las fotografías de los cortes. En muchos casos el personal adiestrado en la técnica obtiene muy buenos cortes, pero no ha recibido la preparación previa suficiente para entender lo que observa bajo el microscopio e intenta sacar conclusión a tientas.

Los procedimientos habituales que se siguen y aconsejan para la interpretación de los cortes son:

- Que las observaciones (o lectura de los cortes) se realicen de forma independiente por al menos dos personas. Esto garantiza que la estimación que cada uno realiza, no se verá condicionada por la interpretación de la otra persona.
- Que ninguno de los dos observadores cuente con la información del sexo o tamaño del individuo del cual proceden las falanges que está observando. Conocer a priori esta información los convertiría en observadores subjetivos, partiendo que generalmente en los anfibios se ha demostrado que las hembras alcanzan la madurez sexual en años posteriores a los machos, y que en algunos casos, el tamaño puede ser directamente proporcional a la edad. Como ejemplo, ante la duda si un animal tiene 3 o 4 años, se podría incurrir en el sesgo de optar por los 4 años al conocer con antelación que se trata de una hembra.
- En una etapa posterior, ambos observadores contrastarán sus datos y definirán, de forma conjunta, qué edad acuerdan en aquellos individuos que no hubo coincidencia en la estimación de la edad al analizarlo de forma independiente. La experiencia demuestra que esta instancia es muy enriquecedora, sobre todo cuando alguno de los dos observadores posee un mayor conocimiento en interpretación de los cortes y, como se indica más adelante, un buen conocimiento de la ecología de la especie en estudio.
- Siempre se selecciona para la estimación de la edad, aquellos cortes que contengan la mayor cantidad de hueso cortical y menor cavidad medular (ver más abajo), como es el caso de aquellos cortes de las diáfisis de los huesos largos donde se pueden observar las GMs.
- Dentro de la variedad de cortes “buenos” que se pueden encontrar al atravesar la diáfisis, siempre se recomienda seleccionar para la estimación de la edad aquellos cortes donde se observa la mayor cantidad de LAGs. Si bien

los estudios demuestran que la cantidad de LAGs, o por expresarlo de otra forma, la edad estimada en LAGs, no varía en función del corte de una u otra falange, u otro hueso largo del mismo individuo, es posible encontrar algún tipo de variación en la cantidad de LAGs observadas entre diferentes secciones de un mismo individuo, producto de un artefacto de la técnica.

- Como ya se ha mencionado, es sumamente importante tener un conocimiento exhaustivo de la ecología en general, y particularmente de la biología reproductiva de la especie en estudio. Es necesario saber cuáles son sus períodos de actividad reproductiva, períodos que está activo pero que no necesariamente esté en la búsqueda activa de pareja o en núcleos reproductivos y los períodos de inactividad, sean hibernación o estivación. Como es sabido, existen especies que se reproducen en invierno y pasan el verano inactivos o viceversa. Por otro lado, también es muy importante conocer si dentro de un mismo año, una especie puede atravesar uno o dos períodos de actividad/inactividad, como es el caso de *Triturus marmoratus*⁽³³⁾. Como se indicará a continuación en el párrafo de “Formación y cronología de las LAGs”, el desconocimiento de estos aspectos podría llevar a errores, por sobre o subestimación de la edad.

Realizadas estas aclaraciones, las sugerencias para el procedimiento de identificar las GMs y estimar la edad son:

- 1) Identificación de las GMs.
- 2) Identificación de la Línea de Metamorfosis.
- 3) Reabsorción endosteal e Identificación de la Línea de Reabsorción.
- 4) Presencia de LAGs en el hueso endosteal.
- 5) LAGs suplementarias.
- 6) Consideración del perímetro de hueso como una LAGs.

1) Para identificar las GMs resulta sumamente necesario contar con el conocimiento previo de lo que son las Zonas, Annuli, LAGs, y hacer una identificación de ellas como primera medida (**Figura 4.2.2**).

2) Se debe identificar la Línea de Metamorfosis (LM, de aquí en más) para, luego, expresar en qué porcentaje del total de individuos fue observada. La presencia de la LM garantiza que en el proceso de remodelación, la absorción ósea, no ha degradado ninguna de las LAGs más internas. Es decir, aquellas que se formaron en los primeros años de vida de un individuo. Esto,

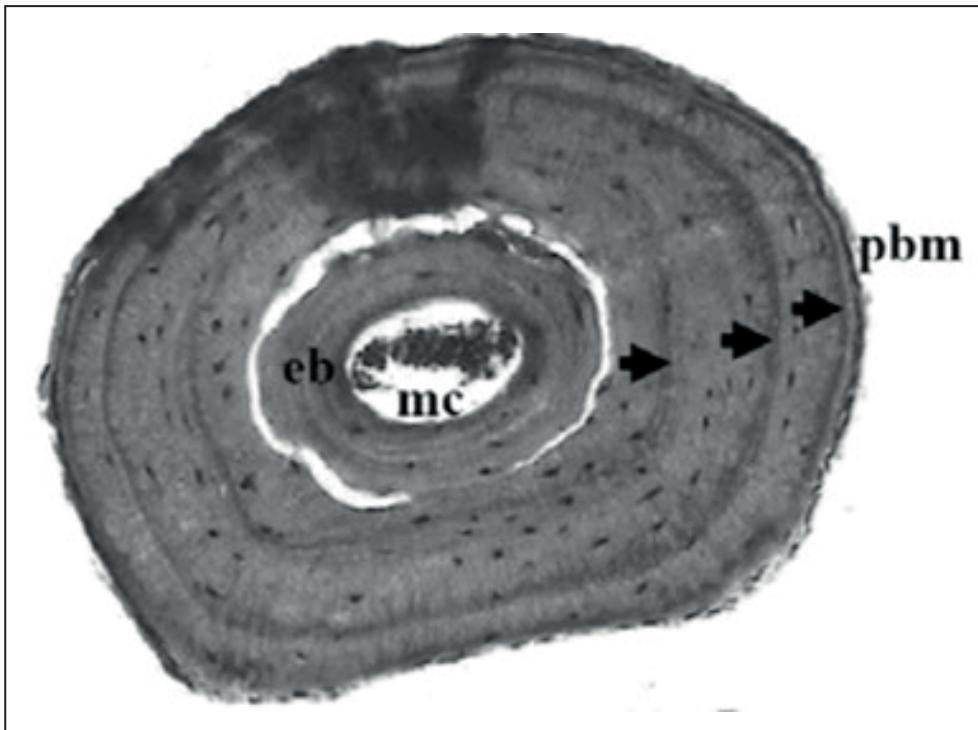


Figura 4.2.2: Sección de falange de una hembra adulta de *Physalaemus fernandezae* teñida con Hematoxilina de Ehrlich, donde se pueden observar tres LAGs en el periosteo (indicadas con flechas). mc: cavidad medular, eb: hueso endosteal, pbm: margen del periosteo. Extraído de Marangoni y colaboradores⁽¹⁹⁾

en el caso de ocurrir, podría llevar a una subestimación de la edad.

Consecuentemente, la presencia de la LM también estará indicando los límites entre el hueso endosteal y el periosteo, siendo en este último donde se contarán las LAGs que se observan. Para la identificación a nivel histológico de la LM, el endosteal y periosteo, se sugiere la lectura de la bibliografía recomendada en el siguiente punto (**Figura 4.2.2**).

3) Como se ha comentado anteriormente, las LAGs depositadas en la región más interna del periosteo, es decir aquellas que se formaron durante los primeros años de vida (generalmente la primera o segunda LAGs), pueden ser totalmente removidas durante la reabsorción perimedular del hueso endosteal. Este proceso de remodelación ósea, deja marcada una línea identificable, mayormente en adultos con mayor grado de hueso endosteal, por su contorno irregular que se tiñe menos intensamente que la LM. Esta línea es denominada por muchos autores como Línea de Reabsorción (LR, de aquí en más). En los casos donde puede observarse reabsorción ósea, la LR pasa a ser el límite entre el hueso endosteal y el periosteo, y no la LM que fuera removida en el proceso. Es preciso también mencionar que las causas próximas de la reabsorción no están muy bien entendidas hasta el momento, por lo que se sugiere la consulta de: Castanet y colaboradores⁽²⁶⁾, Hemelaar⁽²⁷⁾, Castanet & Smirina⁽⁴⁾, Sinsch⁽²⁸⁻³⁰⁾, Marangoni y colaboradores⁽³¹⁾ (**Figura 4.2.2**).

4) Durante la osteogénesis, las Zonas se alternan con líneas que se tiñen intensamente con Hematoxilina y representan períodos de detenimiento del crecimiento. Por tal motivo se las denomina LAGs, “*Lines of Arrested Growth*”, líneas de detenimiento o de descanso (“*resting lines*”), dado que unas pocas semanas sin osteogénesis es suficiente para inducir la deposición de las LAGs en anfibios⁽³²⁾. Castanet y colaboradores⁽²⁶⁾ las describen como “más translúcidas que las otras marcas, también son más refractarias y aparecen como la estructura ósea más brillante bajo luz polarizada” (*sic*) (Figura 4.2.2). En el apartado siguiente se aborda el origen de su formación y cronología.

5) Al comenzar esta sección se hizo mención a la importancia que tiene, a la hora de realizar una estimación correcta de la edad por análisis de las GMs, el conocimiento exhaustivo de la biología reproductiva de la especie. Como se describe en el punto (4), las LAGs representan momentos en los que la osteogénesis se detiene, y si bien que las origina se analizará más adelante, está claro que estos períodos corresponden a momentos en los que los individuos se encuentran inactivos, ya sea por inviernos fríos y/o secos (hibernación), o veranos calurosos y secos donde los cuerpos de agua para la reproducción desaparecen y los individuos permanecen en sus refugios (estivación). También, se adelanta para una mejor comprensión, que estas LAGs en la mayoría de los casos se forman anualmente, es decir porque los individuos tienen un solo período de inactividad por año, sea por hibernación o estivación. Sin embargo, la presencia de LAGs suplementarias que irrumpen la regla general de “una LAGs por año”, es un caso que ocurre en un número importante de especies^(8,27,33-35). En muchos de los casos esto es debido a dos períodos de inactividad/actividad en un mismo año, lo que lleva a la formación de dos LAGs por año. Es aquí donde toma relevancia la recomendación de conocer *a priori* la biología de la especie que se estudia a fin de poder interpretar correctamente este tipo de excepciones a la regla general cuando se presente.

6) Otro de los detalles abiertos al debate entre los herpetólogos que aplican la técnica esqueletocronológica para la estimación de la edad, es la consideración o no del perímetro de hueso (es decir del borde exterior) como una LAGs. Es frecuente entre los observadores, que se opte por contar la cantidad de Zonas, es decir cuántos períodos de crecimiento tuvo el individuo, u optar por contar la cantidad de períodos de detenimiento del crecimiento, es decir, la cantidad de LAGs que se observan en la sección del hueso. Es en este último caso, donde se presenta la disyuntiva de considerar o no al perímetro como una LAG más. En este caso se debería considerar dos cosas: en primer lugar, la fecha de captura, y en segundo lugar, e insistiendo en el conocimiento previo que se debe tener sobre la biología de la especie en estudio, saber si la fecha de captura fue en los días o meses anteriores a la

hibernación/estivación, o por el contrario los individuos se capturaron en un lapso de tiempo inmediato posterior a estos períodos. En la **Figura 4.2.2**, se observa cómo en el primer caso el perímetro se cuenta como una LAG más, y no se cuenta de ocurrir el segundo caso.

Formación y cronología de las LAGs y validación del método

Validación:

Es importante, a la hora de realizar las interpretaciones correctas y poder discutir los resultados, detenerse a considerar las causas que originan la formación de las GMs, y su periodicidad. La bibliografía es muy extensa (ver Sinsch²⁸), y a pesar de haber estado en debate por varias décadas, hoy existe suficiente evidencia para afirmar que:

Los estudios soportan la hipótesis de Castanet y colaboradores⁽²⁶⁾ quienes sostienen que la formación de las LAGs es, en última instancia, causada por una base genética con un ritmo circanual, que bajo condiciones naturales se torna sincrónica y reforzada con el ciclo estacional.

Para los anfibios sujetos a una marcada estacionalidad (cálido/frío o seco/húmedo), el ciclo climático anual parece ser el factor ambiental más importante responsable de la periodicidad anual observada.

Sin embargo, como se demostró en las últimas décadas, estudios realizados en especies tropicales y subtropicales, que viven en condiciones climáticas más o menos constantes a lo largo del año, o en condiciones estables de laboratorio (ver seguidamente), las líneas se expresan de igual forma⁽¹²⁻²⁵⁾.

La periodicidad de las LAGs es anual, con excepción de aquellas especies que pueden presentar un doble ciclo de actividad anual^(8,27,33-35).

Ahora bien, en la práctica, para confirmar la confiabilidad del método esqueletocronológico, se puede asumir esa periodicidad anual basada en las fuentes bibliográficas que la confirman en numerosas especies, o bien confirmarlo empíricamente para cada una de las especies de las cuales se quiera describir su estructura de edad y sus parámetros relacionados.

Distintos acercamientos que se pueden utilizar y algunas consideraciones finales:

(i) Individuos de edad conocida

Se puede referir el caso del trabajo pionero de Schroeder y Baskett⁽³⁶⁾ quienes

marcaron 42 metamórficos de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*), utilizando la técnica de toe-clipping⁽³⁷⁾. Se criaron por muchos años en sitios cercados, y posteriormente se pudo confirmar que el número de zonas o annulus marcadas en el hueso pterigoideo, fueron iguales al número de años transcurridos desde el marcado de los metamórficos.

(ii) Estudios de Marca-Recaptura en la naturaleza

(iia) Metamórficos: es posible, siguiendo lo realizado por Tejedo y colaboradores⁽³⁸⁾ realizar una marcado individual de anfibios metamorfoseándose en una charca, y dado su intensa filopatría, realizar recapturas en su regreso al cuerpo de agua en años posteriores. Así, mediante el uso de la esqueletronología, confirmar la concordancia entre los años transcurridos desde la metamorfosis (cuando se los marcó) y la cantidad de líneas que se observa en los huesos.

(iib) Adultos: esto implica la captura de adultos, de los cuales no se requiere conocer la edad *a priori*, sino simplemente observar la cantidad de líneas presentes en, por ejemplo, las falanges al momento de la captura. Posteriormente, cuando en años sucesivos se recapture el mismo individuo, se aplicará la técnica utilizando otra de sus falanges. Si la periodicidad es anual, el número de LAGs incrementadas entre la primera falange y segunda falange cortadas, se debería corresponder con los años transcurridos.

(iii) Etiquetado fluorescente

Este método implica la introducción de marcas artificiales teñidas en el hueso en crecimiento y la realización de estudios de marca-recaptura. Estas marcas artificiales nos van a permitir observar el momento preciso de la deposición de las marcas y confirmar de esta manera su periodicidad.

Sin lugar a dudas, al considerar las alternativas de validación del método mediante las opciones (i) y (ii), los investigadores se encuentran con algunas problemáticas. Una de las que se resalta es el insignificante porcentaje de recapturas reportadas para anfibios cuando se marcan individuos en la naturaleza. Así, el esfuerzo en recursos humanos y financieros, relacionado a los resultados obtenidos, hace que estos métodos sean poco eficientes. Lamentablemente, en muy pocos casos es posible esperar el tiempo necesario para que los individuos marcados regresen a los cuerpos de agua, sea en uno, dos, o más años para poder validar el método y posteriormente publicar los resultados.

Validación del método en especies de Argentina

En anfibios de Argentina, existen en la actualidad solo tres trabajos publicados que validaron el método en tres especies de anuros. Marangoni y colaboradores⁽¹⁶⁾ criaron desde la metamorphosis (G-43, Gosner³⁹) hasta cumplido un año de edad (desde el 15 de diciembre de 2006 al 15 de diciembre de 2007), siete individuos de *Ceratophrys cranwelli* y nueve de *Dermatonotus muelleri*, en los que se confirmó no solo la periodicidad anual de las GMs, sino también, la hipótesis de la base genética en la formación de la edad propuesta por Castanet y colaboradores⁽²⁶⁾. Esto último basado en que los individuos fueron criados en condiciones constantes de laboratorio, eliminando cualquier influencia del ambiente, y los individuos permanecieron durante todo el año en actividad. A pesar de estas condiciones, las GMs se formaron en las falanges analizadas.

López y colaboradores⁽²¹⁾, capturaron ocho individuos adultos de *Leptodactylus luctator*, realizaron el corte de la primera y segunda falange del segundo dedo del pie izquierdo y los mantuvieron en cautiverio durante un año (diciembre de 2013 a enero de 2015). Los ocho ejemplares fueron divididos en dos grupos de cuatro individuos. Un grupo fue mantenido en condiciones estándares de laboratorio ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 12hs luz / 12hs oscuridad), eliminando cualquier influencia del ambiente. Mientras que el otro grupo fue mantenido en una habitación con menor temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y luz natural. Transcurrido el año de cautiverio, realizaron el corte de la tercera falange del mismo dedo y se compararon las GMs al inicio y al final del cautiverio para los individuos. En los ocho ejemplares se observó la formación de una sola LAG tras el año de cautiverio, sin relacionarse con el grupo al que pertenecieran, confirmando también en esta especie la hipótesis de la base genética en la formación de las GMs propuesta por Castanet y colaboradores⁽²⁶⁾.

Recientemente, Piñeiro y colaboradores⁽²⁴⁾, utilizando la misma metodología propuesta por Marangoni y colaboradores⁽¹⁶⁾, llegaron a las mismas conclusiones analizando en este caso individuos de *Nyctimantis siemersi*.

Bibliografía

1. Castanet, J.; Meumier, F.J. & de Ricqles, A. 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les Vertébrés poikilothermes: données comparatives et essai de synthèse. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique* 111: 183-202.
2. Amprino, R. 1947. La structure du tissu osseux envisagée comme expression de différences dans la vitesse de l'accroissement. *Archives de Biologie* 58: 315-330.
3. Castanet, J. 1982. Recherches sur la croissance du tissu osseux des reptiles. Application: la méthode squelettochronologique. Unpubl. PhD diss., Université Paris 7, Paris.
4. Castanet, J. & Smirina, E. 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibian and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 11: 191-196.

5. Peabody, F.E. 1961. Annual growth zones in vertebrates (living and fossil). *Journal of Morphology* 108: 11-62.
6. Castanet, J. 1981. Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Archives de Biologie* 92: 1-24.
7. Ricqlès, A.; Meunier, F.J.; Castanet, J. & Francillon-Vieillot, H. 1991. Comparative microstructures of bone: 1-78. En: Hall B.K, (ed.). Volume 3 Bone Matrix and Bone Specific Products. CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Leclair, M.H.; Leclair Jr., R. & Gallant, J. 2005. Application of skeletochronology to a population of *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) from Portugal. *Journal of Herpetology* 39: 199-207.
9. Bruce, R.C. & Castanet, J. 2006. Application of skeletochronology in aging larvae of the salamanders *Gyrinophilus porphyriticus* and *Pseudotriton ruber*. *Journal of Herpetology* 40: 85-90.
10. Cabezas-Cartes, F.; Boretto, J.M. & Ibargüengoytía, N.R. 2015. Age, growth and life-history parameters of an endemic vulnerable lizard from Patagonia, Argentina. *Herpetological Journal* 25: 215-224.
11. Perry, G.; Wallace, M.C.; Perry, D.; Curzer, H. & Muhlberger, P. 2011. Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law. *Journal of Herpetology* 45: 547-555.
12. Jofré, G.M.; Reading, C.J. & di Tada, I.E. 2005. Breeding behaviour and reproduction in the Pampa de Achala toad, *Bufo achalensis*. *Amphibia-Reptilia* 26: 451-458.
13. Bionda, C.L.; Kost, S.; Salas, N.E.; Lajmanovich, R.C.; Sinsch, U. & Martino, A.L. 2015. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetologica* 10: 55-62.
14. Bionda, C.L.; Babini, S.; Martino, A.L.; Salas, N.E. & Lajmanovich, R.C. 2018. Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation* 14: e00398.
15. Marangoni, F. 2012. Ecología y demografía de tres especies sintópicas del género *Melanophryneiscus* de los campos del sur de misiones. Seminario. XIII Congreso Argentino de Herpetología. Mar del Plata, Argentina.
16. Marangoni, F.; Schaefer, E.; Cajade, R. & Tejedo, M. 2009. Growth-mark formation and chronology of two neotropical anuran species. *Journal of Herpetology* 43: 546-550.
17. Stănescu, F.; Marangoni, F.; Reinko, I. & Cogălniceanu, D. 2016. Life history traits of a Neotropical microhylid (*Dermatonotus muelleri*, Boettger 1885) from the Arid Chaco, Argentina. *The Herpetological Journal* 26: 41-48.
18. Marangoni, F.; Stănescu, F.; Courtis, A.; Piñeiro, J.M.; Ingaramo, M.D.R.; Cajade, R. & Cogălniceanu, D. 2018. Coping with aridity: life history of *Chacophrys pierottii*, a fossorial anuran of Gran Chaco. *South American Journal of Herpetology* 13: 230-237.
19. Marangoni, F.; Barrasso, D.A.; Cajade, R. & Agostini, G. 2012. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. *North-Western Journal of Zoology* 8: 63-71.
20. Attademo, M.A.; Bionda, C.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Seib, S.N.; Basso, A. & Junges, C.M. 2014. Age, size at sexual maturity, longevity, and reproductive potential of *Leptodactylus latinasus* and *Leptodactylus mystacinus* in a soybean crop and a native forest from mideastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 315-317.
21. López, J.A.; Antoniazzi, C.E.; Llanes, R.E. & Ghirardi, R. 2017. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. *Amphibia-Reptilia* 38: 371-379.
22. Marangoni, F.; Courtis, A.; Piñeiro, J.M.; Ingaramo, M.D.R.; Cajade, R. & Stănescu, F. 2019. Contrasting life-histories in two syntopic amphibians of the *Leptodactylus fuscus* group (Heyer 1978). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91: e20180507.
23. Cajade, R.; Marangoni, F. & Gangenova, E. 2013. Age, body size, and growth pattern of *Argenteohyla siemersi pedersenii*. *Journal of Natural History* 47: 237-251.
24. Piñeiro, J.M.; Cajade, R.; Courtis, A.; Ingaramo, M.D.R. & Marangoni, F. 2018. Chronology of the LAGs formation and body growth in *Argenteohyla siemersi* from northeastern Argentina. *North-Western Journal of Zoology* 2019: e182502
25. Quiroga, L.; Sanabria, E. & Marangoni, F. 2015. Sexual size dimorphism and age in

- Odontophrynus cf. barrioi* (Anura: Odontophryidae) from the Monte Desert, Argentina. *Journal of Herpetology* 49: 627-632.
- 26. Castanet, J.; Francillon-Vieillot, H.; Meunier, F.J. & de Ricqles, A. 1993. Bone and individual aging: 245-283. En: Hall, B.K. (ed.). *Bone growth*. CRC Press, Boca Raton.
 - 27. Hemelaar, A.S.M. 1985. An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its application to populations from different latitudes and altitudes. *Amphibia-Reptilia* 6: 323-342.
 - 28. Sinsch, U. 2015. Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *Herpetological Journal* 25: 5-13.
 - 29. Sinsch, U.; Marangoni, F.; Leskovar, C. & Tejedo, M. 2010. Proximate mechanisms determining size variability in natterjack toads. *Journal of Zoology* 281: 272-281.
 - 30. Sinsch, U.; Oromi, N. & Sanuy, D. 2007. Growth marks in natterjack toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *Herpetological Journal* 17: 129-137.
 - 31. Marangoni, F.; Tejedo, M. & Cogălniceanu, D. 2021. Can age and growth patterns explain the geographical variation in the body size of two toad species? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93: e20190470. DOI 10.1590/0001-3765202120190470.
 - 32. Smirina, E.M.; Klevezal, G.A. & Berger, L. 1986. Experimental investigation of the annual layer formation in bones of amphibians. *Zoologichesky Zhurnal* 65: 1526-1534.
 - 33. Caetano, M.H.; Castanet, J. & Francillon, H. 1985. Determination de l'age de *Triturus marmoratus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda GerCs (Portugal) par squelettochronologie. *Amphibia-Reptilia* 6: 117-132.
 - 34. Olgun, K.; Üzüm, N.; Avci, A. & Miaud, C. 2005. Age, size and growth of the southern crested newt *Triturus karelinii* (Strauch 1870) in a population from Bozdag (Western Turkey). *Amphibia-Reptilia* 26: 223-230.
 - 35. Alcobendas, M. & Castanet, J. 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. *Herpetologica* 56: 14-26.
 - 36. Schroeder, E.E. & Baskett, T.S. 1968. Age Estimation, growth rates, and population structure in Missouri Bullfrogs. *Copeia* 1968: 583.
 - 37. Donnelly, M. & Guyer, C. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in assemblage of Neotropical hylid frogs. *Oecologia* 98: 291-302.
 - 38. Tejedo, M.; Reques, R. & Esteban, M. 1997. Actual and osteochronological estimated age of Natterjack Toads (*Bufo calamita*). *Herpetological Journal* 7: 81-82.
 - 39. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.