

00322
3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Verificación y validación de la edad estimada por
anillos de crecimiento en vértebras de Carcharhinus
limbatus.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ARTURO ALCÁNTARA ZAVALA

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. María del Pilar Torres García

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

México, D.F.



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Verificación y validación de la edad estimada por anillos de crecimiento en vértebras de *Carcharhinus limbatus*"

realizado por Alcántara Zavala Arturo

con número de cuenta 9332480-1, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en C. María del Pilar Torres García

Propietario M. en C. Javier Tovar Avila

Propietario M. en C. Patricia Fuentes Mata

Suplente M. en C. José Ignacio Fernández Méndez

Suplente M. en C. José Luis Bortolini Rosales

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Ms. Pilar Torres
Javier Tovar Avila

Patricia Fuentes Mata

José Ignacio Fernández Méndez

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ~~Juan Manuel Rodríguez Chávez~~



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

2

Dedico el presente trabajo:

Principalmente a Mis Padres Eva y Arturo, las personas a las que más respeto y admiro.

A Mis Hermanas Maricarmen, Eva, Virginia y Julia, siempre apoyándonos y tan unidos como cuando nos conocimos.

A Mercedes, por un excelente comienzo.

A Mi Amigo Abud y a su Familia, por su amistad.

Y por una perfecta formación mental, espiritual y física, y por dejarme sentir el orgullo de decir Soy Puma, a la UANAM.

Agradecimientos

- M. en C. María del Pilar Torres García por su enseñanza, apoyo incondicional y dirección de este trabajo.
- M. en C. Javier Tovar Ávila quien junto a la maestra Pilar dirigió este trabajo, por su paciencia y confianza, pese a la distancia, y por su amistad.
- M. en C. Patricia Fuentes Mata por su tiempo y apoyo en la realización de esta tesis.
- M. en C. José Ignacio Fernández Méndez por su tiempo y colaboración en la realización de este trabajo.
- M. en C. José Luis Bortolini Rosales por todos sus comentarios, ayuda y tiempo que le dedicó a mi tesis.
- Dr. Xavier Chiappa Carrara por su participación en diferentes aspectos teórico-prácticos.
- Biólogo Gabriel González Chávez por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo.
- Bióloga Yolanda Hornelas Orozco por su tiempo y su apoyo en todo lo referente a la microscopía electrónica.
- Dr. Sergio Cevallos Ferriz por la ayuda técnica brindada.

Este trabajo fue aprobado por el Proyecto de Tesis de Licenciatura (PROBETEL) de la UNAM, intitulado "Histología de Invertebrados y Pesquerías", coordinado por la M. en C. María del Pilar Torres García, Profesor Asociado "C" de tiempo completo. Laboratorio de Invertebrados. Departamento de Biología Comparada. Facultad de Ciencias, UNAM.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Invertebrados. Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la M. en C. María del Pilar Torres García y en el Instituto Nacional de la Pesca bajo la dirección del M. en C. Javier Tovar Ávila.

ÍNDICE

RESUMEN ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades e importancia de los elasmobranquios	1
1.2 Determinación de la edad	1
1.3 Estructura del cartilago y formación de los anillos de crecimiento	3
1.4 Determinación, verificación y validación	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Resalte de los anillos de crecimiento	7
2.2 Validación directa	8
2.3 <i>Carcharhinus limbatus</i>	9
2.4 Estudios de edad y crecimiento en <i>Carcharhinus limbatus</i>	11
2.5 Estudios en México	11
3. OBJETIVOS	13
3.1 General	13
3.2 Particulares	13
4. ÁREA DE ESTUDIO	14
4.1 Ubicación geográfica	14
4.2 Factores fisicoquímicos	15
5. MATERIAL Y MÉTODO	16
5.1 Tipo de calcificación de la vértebra	16
5.2 Lectura de los anillos	16
5.3 Validación directa de la formación de anillos	18
6. RESULTADOS	21
6.1 Tipo de calcificación de la vértebra	21
6.2 Lectura de los anillos	24
6.3 Validación directa de la formación de anillos	27
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	31
9. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	32

RESUMEN

Con el fin de entender la formación de los anillos de crecimiento en las vértebras del tiburón *Carcharhinus limbatus*, se analizaron fragmentos de vértebras de esta especie mediante microscopía electrónica de barrido sin encontrarse diferencias en el tipo de cristales ó en el acomodo de éstos dentro de los anillos opacos ó hialinos, no obstante se observó una mayor cantidad de matriz extracelular en los anillos opacos con respecto a los anillos hialinos. Para especificar un método preciso para el resalte y la lectura de los anillos de crecimiento se hizo una comparación entre dos colorantes, el rojo de alizarina y el cristal violeta, además de que se implementó una nueva técnica de preparación de las muestras consistente en leer cortes de las mismas montados en preparaciones permanentes. Se calcularon el Índice del Error Promedio Porcentual (APE) y el Coeficiente de Variación (CV) para obtener la precisión de los datos obtenidos. El mejor método para resaltar los anillos de las vértebras fue el teñir los cortes con rojo de alizarina y montarlos en preparaciones permanentes para su observación, calculándose con este método un APE de 6.4% para el autor y un valor del CV de 0.126. Para validar la formación de los anillos de crecimiento de manera directa se marcaron dos tiburones puntas negras que se encontraban viviendo en el "corral" del Acuario de Veracruz, sin embargo, ambos organismos murieron una hora después de ser inyectados.

ABSTRACT

In order to understand the growing rings in the vertebrae of the shark *Carcharhinus limbatus*, portions of vertebrae of this specie were analyzed using scanning electron microscopy and neither differences in kind of crystals in arrange were found nor inside of these opaque and hyaline rings, but a mayor quantity of an extracelular matrix in the opaque rings in relation with hyaline was observed. So as to specify a precise method for observing the rings and have structures in them rebound such as the rings themselves (growing structures) a comparison between two colorings, alizarine red and violet crystal, besides a new technique was implemented so as to observe and count the marks, this technique was done using slides and the samples were set on using resin. Average Percentage Error (APE) and Variation Coefficient (VC) was calculated to obtain precise results. The best technique to rebound growing marks was using alizarine red and keep them on slides as permanent samples for observing and having with this method an APE of 6.4% for autor and value of 0.126 for VC. For validating rings development in direct way two sharks were marked that were living in a "corral" in Veracruz Acuarium but both animals died an hour after being marked.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades e importancia de los elasmobranquios

Los tiburones, las rayas y las quimeras son peces con un esqueleto constituido por cartílago, por lo que se les denomina peces cartilaginosos. Por ser más ligero que el hueso, el cartílago les proporciona a los tiburones, en conjunto con su forma corporal, ciertas ventajas como pueden ser una mejor flotación y mayor impulso al nadar, debido a que es un material relativamente flexible, lo que se traduce en fuerza tensora al momento del nado por parte del organismo. Aunado a esto, el esqueleto de un tiburón está fortalecido por depósitos de minerales en áreas que están sujetas a una tensión particular, como es el caso de las mandíbulas y las vértebras.

Según Compagno (1999) existen cerca de 450 especies de tiburones en el mundo distribuidas en 8 órdenes, 30 familias y 100 géneros, de las cuales en aguas mexicanas se han reportado alrededor de 100 especies (Applegate *et al.*, 1979). De las especies presentes en aguas mexicanas, se consideran comercialmente importantes alrededor de 40, distribuidas en ambos litorales, siendo las familias Carcharhinidae y Sphyrnidae las más representadas en las capturas realizadas en el Golfo de México (Castillo, 1992; Applegate *et al.*, 1994).

En 1999 la pesca de tiburón a nivel nacional representó el 2.03% de la producción pesquera total y de acuerdo a las estadísticas mundiales, en 1998 nuestro país ocupó el décimo lugar en volumen de capturas (SEMARNAP, 2000).

A pesar de la importancia de la pesquería de tiburones y debido al escaso valor económico que tiene su carne, se cuenta con poca información biológica y pesquera de las diversas especies (Bonfil, 1994). Para manejar de manera racional un recurso pesquero como son los tiburones, es necesario el conocer la biología y ecología de sus poblaciones (Pitcher y Hart, 1982). Sin embargo, la dinámica poblacional de la mayoría de los tiburones es difícil de estudiar debido a su gran tamaño y a sus hábitos migratorios.

Las características biológicas de los tiburones, tales como una madurez sexual tardía, largos periodos de gestación, una lenta tasa de crecimiento, prolongada longevidad y una estrecha relación entre los reclutas y la población adulta, hacen a sus poblaciones susceptibles a ser sobre-explotadas por intensas y prolongadas presiones de pesca (Hoening y Gruber, 1990; Anderson, 1990; Pratt y Casey, 1990; Castillo, 1991).

1.2 Determinación de la edad

La determinación de la edad es la base para estimar el crecimiento, mortalidad, reclutamiento y otros parámetros fundamentales en el estudio de las poblaciones. Por lo tanto, los estudios de edad y crecimiento resultan esenciales para la evaluación de la dinámica y estructura poblacional de las especies explotadas (Holden y Raitt, 1975; Powers, 1983; Officer *et al.*, 1996). Sin embargo, la información sobre edad y crecimiento de la mayoría de las especies de tiburones es escasa y dispersa, no existiendo además un

indicador de edad confiable en estos organismos (Branstetter y McEachran, 1986; Parsons, 1993).

La estimación de las edades tanto en los peces óseos como en los elasmobranquios puede hacerse por métodos directos o indirectos (Tovar, 2000). Entre los métodos directos están el marcaje y recaptura y la cuantificación de marcas periódicas en partes duras, siendo las vértebras en los tiburones y las rayas, las estructuras utilizadas por tener mayor grado de calcificación, empleándose en algunas especies también las espinas de las aletas dorsales.

La lectura de marcas periódicas se basa en la interpretación de zonas con cantidades diferenciales de calcio, que se asumen como bandas de crecimiento cuya formación obedece a cambios estacionales a los que estuvo sujeto el organismo a lo largo de su vida (Casselman, 1974; Branstetter *et al.*, 1987). Se han desarrollado distintos métodos para resaltar dichas zonas de crecimiento en diversas especies de elasmobranquios (Cailliet *et al.*, 1983a), estos métodos de resalte incluyen la observación directa de las vértebras, métodos de tinción, impregnación del borde vertebral con grafito y radiografías de las vértebras.

Entre los métodos indirectos de determinación de edades se puede citar el análisis de distribución de frecuencias de tallas en muestras sucesivas, el cual se basa en el supuesto de que todos los individuos de la muestra tienen la misma edad a la misma longitud, sin embargo, en los tiburones de gran tamaño esto es poco usual, ya que al disminuir la tasa de crecimiento la separación de los grupos de edad se dificulta. A partir de este método se originaron otros métodos indirectos como los de Harding (1949), Tanaka (1953), Cassie (1954) y Bhattacharya (1967) (Sparre y Venema, 1992).

El análisis de anillos de crecimiento en las vértebras es considerado un método útil para la determinación de la edad en la mayoría de los elasmobranquios (Cailliet *et al.*, 1983a; Parsons, 1985; Cailliet, 1990), debido a que en estos organismos el crecimiento del esqueleto de cartilago calcificado ocurre por un proceso de depositación de calcio y no existe evidencia de reabsorción o modificación interna de éste (Simkiss, 1974; Clement 1992; Officer, 1995). También se ha observado en algunas especies que el incremento de las tallas corporales va acompañado de un incremento en el diámetro vertebral y que la diferencia en la densidad de los anillos se debe a diferencias en la mineralización durante las fases de crecimiento como resultado de cambios ambientales (Casselman, 1974; Martin y Cailliet, 1988; Officer, *Op. cit.*).

En la actualidad no existe un método único para la determinación de la edad que pueda ser utilizado satisfactoriamente en todos los elasmobranquios (Parsons, 1983), debido a que los patrones de calcificación, responsables de la formación de los anillos, pueden variar considerablemente entre las especies (Ridewood, 1921; Urist, 1961; Cailliet *et al.*, 1983a; Gelsleichter *et al.*, 1998) por lo que el establecimiento de una técnica apropiada para evidenciar el patrón de bandeas en las vértebras de una especie determinada, depende de una revisión y evaluación de las metodologías disponibles y su aplicación a las características específicas de sus vértebras.

1.3 Estructura del cartílago y formación de los anillos de crecimiento

Como todos los tejidos conectivos, el cartílago está compuesto por dos componentes principales: las células vivas ó condrocitos y la matriz extracelular en la cual están embebidas las células. La forma en la que estos componentes pueden estar combinados hacen al cartílago un tejido conectivo especializado que puede ser suficientemente rígido para dar al esqueleto el soporte necesario para el movimiento y la protección de los órganos vitales y flexible para permitir el crecimiento (Officer, 1995).

El crecimiento del cartílago puede ser intersticial ó por aposición. El crecimiento intersticial ocurre cuando los condrocitos se dividen por mitosis en el cartílago; las células hijas ocuparan temporalmente una misma laguna (formando los grupos isogénicos). El posterior crecimiento de los condrocitos de los grupos isogénicos así como de los condrocitos individuales aumentará el volumen del cartílago preexistente. El crecimiento por aposición ocurre a través de la proliferación y diferenciación de los condroblastos a partir del pericondrio. Conforme los condroblastos maduran se diferencian en condrocitos, los cuales secretan matriz extracelular alrededor de ellos hasta quedar rodeados. De esta forma los condrocitos agregan nueva matriz extracelular a la superficie preexistente del cartílago y contribuyen al crecimiento por aposición (Officer, 1995).

El proceso por el cual la matriz extracelular del cartílago se mineraliza por la impregnación de sales minerales no está completamente entendido (Ham y Cormack, 1979). El cartílago está envuelto por una capa protectora de tejido conjuntivo fibroso llamado pericondrio, capa de la cual se derivan los condrocitos. La mineralización del cartílago ocurre cuando sales minerales, principalmente de calcio, se depositan en la matriz extracelular. Se cree que el primer depósito de minerales en el cartílago es fosfato de calcio amorfo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que posteriormente forma cristales de apatita (Urist, 1961).

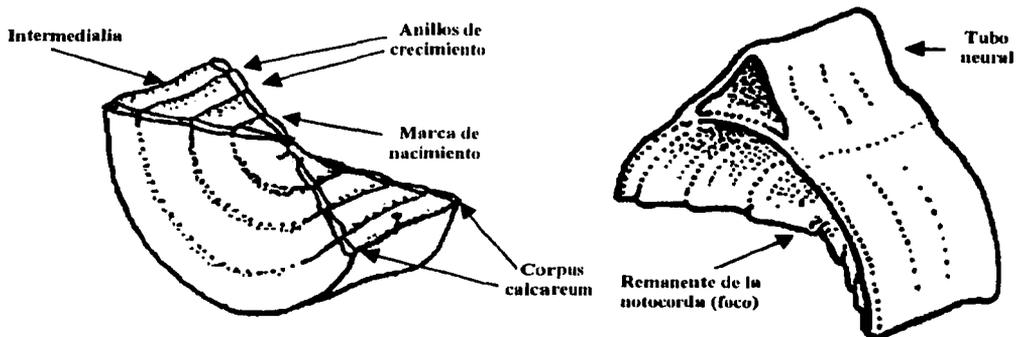


Figura 1. Partes de una vértebra y corte longitudinal (tomado de Tovar, 2000).

A pesar de que el grado de mineralización de la matriz extracelular en el cartilago es normalmente homogéneo, se pueden ver en cortes histológicos bandas paralelas al pericondrio que corresponden a anillos de diferente densidad mineral a la de la matriz extracelular que los rodea, los cuales pueden ser considerados como variaciones en la mineralización de todo el tejido en general (Fig. 1). Estas marcas pueden representar variaciones estacionales en el crecimiento somático (verano-invierno), estando altamente influenciadas por la cantidad y calidad del alimento y factores fisicoquímicos como la temperatura y la salinidad (Cailliet, 1990; Officer, 1995).

Los anillos implican un patrón de depositación en un tiempo determinado, que puede ser anual o no. Una marca de crecimiento, un anillo o una banda son utilizados como sinónimos, siendo zonas concéntricas translúcidas u opacas. En algunos trabajos un anillo se define como una marca concéntrica delgada y una banda como una marca ancha compuesta de un grupo de anillos (Tovar, 2000), siendo así como se definirán éstos términos en el presente trabajo.

La formación de los anillos está relacionada con distintos factores, como la variación estacional en la cantidad y calidad de alimento, de acuerdo a la disponibilidad de algunos de los elementos, como el calcio y el fósforo, que son incorporados mediante el proceso de crecimiento, o por la influencia que los cambios en la temperatura pueden ejercer en la velocidad de incorporación de estos elementos (Jones y Geen, 1977; Casselmann, 1983). Los anillos también pueden ser atribuidos a características endógenas y ritmos biológicos particulares para cada especie (Kusher *et al.*, 1992) o al estrés provocado durante la época de reproducción o migraciones (Simpfendorfer, 1993). Por su parte Clement (1992), sugiere que los anillos en las vértebras de los elasmobranchios se forman en respuesta a el cambio en las proporciones de las células con respecto a la matriz extracelular, aunque no explica el mecanismo por el cual éstas proporciones son alteradas.

En las vértebras de los organismos también se observa un cambio de ángulo en la cara central, esto se debe a la diferencia entre el crecimiento intrauterino rápido y el crecimiento post-natal lento (Walter y Ebert, 1991), dando como resultado la denominada "marca de nacimiento" (Fig. 1).

En un microscopio con luz transmitida, los anillos oscuros u opacos representan el crecimiento de verano, momento en el cual se presenta una mayor depositación de sales de calcio, fósforo y materia orgánica, mientras que los anillos claros o hialinos (que permiten con mayor facilidad el paso de la luz) representan los periodos de invierno (Tovar, 2000).

En tiburones de talla grande, los anillos que se encuentran en el borde de la vértebra están muy compactados, lo que dificulta su lectura en vértebras completas, por lo que fácilmente se puede subestimar la edad de un organismo (Moulton *et al.*, 1992).

1.4 Determinación, verificación y validación

Para entender la dinámica poblacional de una especie es importante una correcta estimación de la edad y la tasa de crecimiento de los organismos. Para la estimación

adecuada de la edad en los tiburones, se requiere la utilización del método correcto dependiendo del patrón de calcificación de las vértebras de cada especie.

Para el conteo y observación de las marcas de crecimiento existen diversas técnicas, siendo de suma importancia la verificación del método y la validación de la formación periódica anual de los anillos de crecimiento (Cailliet, 1990; Officer, 1995), definiendo la verificación como el proceso de confirmar una edad estimada por un método con la estimada por otro y validación como la conclusión, después de varias hipótesis probadas, de la periodicidad con que las bandas son depositadas (Cailliet, 1990).

Si es posible encontrar un intervalo de tiempo regular y predecible entre la formación de los incrementos vertebrales, entonces éstos pueden ser usados para designar la edad del tiburón y consecuentemente, el grado de crecimiento de su población. El resaltar y contar los anillos únicamente, permite asignar al individuo una edad estimada que no necesariamente corresponderá a su edad verdadera, de aquí la importancia de que la periodicidad con que los anillos se formen pueda ser validada. Desafortunadamente es común que la validación no se lleve a cabo en la biología de pesquerías de varias especies de tiburones (Beamish y McFarlane, 1983; Cailliet *et al.*, 1983a).

La periodicidad con que los anillos se forman difiere entre las diferentes líneas evolutivas de los tiburones; se ha observado que en varias especies de Carchariniformes existe una periodicidad anual (Gruber y Stout, 1983; Smith, 1984; Branstetter y MacEachran, 1986; Branstetter 1987a), mientras que en los lamnidos se cree que se producen dos anillos al año (Parker y Stout, 1965; Pratt y Casey, 1983) y en *Squatina californica* parece no haber periodicidad en la formación de los anillos (Natanson y Cailliet (1990).

La validación directa sólo se puede llevar a cabo en organismos en los cuales al menos una edad parcial es conocida y el crecimiento a través de un intervalo de tiempo puede ser documentado. Por ejemplo, el crecimiento de un organismo desde que es marcado hasta que es recapturado puede ser validado si se tomaron medidas precisas en ambos eventos y la fecha en que se marcó nos indica la edad parcial. Las formaciones de los anillos para ese periodo de tiempo solo puede ser verificado, pero no validado, a menos de que se haya inyectado al organismo con alguna sustancia que se incorpore en las vértebras, como es el caso de la oxytetraciclina (Smith, 1984).

Los métodos directos de validación son el marcaje y recaptura y los estudios de crecimiento de los organismos en cautiverio. El inconveniente de estos estudios es el bajo porcentaje de organismos recuperados en el primero, y la incapacidad de muchas especies para sobrevivir en cautiverio, el alto costo y el tiempo requerido para la obtención de resultados, en el segundo (Beamish y McFarland, 1983; Branstetter, 1987a). Aunado a lo anterior se ha reportado que los tiburones que son mantenidos en cautiverio con frecuencia no tienen una tasa de crecimiento similar a la de aquellos que crecen en vida libre (Wass, 1973; Gruber y Stout, 1983; Casey *et al.*, 1985).

El método indirecto de validación comúnmente utilizado en los elasmobranchios es por el análisis del incremento marginal de la vértebra, el cual proporciona información sobre el proceso de formación de los anillos de crecimiento en un ciclo (Branstetter, 1987a). Con este método, se puede distinguir en la vértebra de los organismos una marca que corresponde al final de un par de bandas (opaca y hialina) que se forma en octubre-diciembre y que es visible en el borde de la vértebra para enero, validando la periodicidad anual de esta banda.

El hecho de que no exista un método que pueda emplearse efectivamente en la mayoría de las especies de tiburones, ha originado una falta de estandarización no solo en cuanto a los términos apropiados para describir las bandas de crecimiento de acuerdo a sus características ópticas (traslúcidas ú opacas), sino también para definir las de acuerdo al periodo de crecimiento que representan (lento ó rápido) y mas aún, en los resultados de edad asignadas a partir de su cuantificación y los análisis que de ellos se derivan. Los diversos términos reportados en la literatura, tales como bandas claras y oscuras, blancas y negras, translúcidas ó hialinas y opacas, así como *annulus*, *annuli*, anillo y banda (Casselman, 1983) pueden resultar confusos o incluso contradictorios, especialmente si no se pone atención en el tipo de iluminación empleada por el autor, ya que las cualidades ópticas de las diferentes zonas varían según se trabaje con luz reflejada o con luz transmitida.

Como ya se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se definirá un anillo como una marca concéntrica delgada y una banda como una marca ancha compuesta de un grupo de anillos (Tovar, 2000).

2. ANTECEDENTES

2.1 Resalte de los anillos de crecimiento

Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios de edad y crecimiento en tiburones en diversos países como Australia, Brasil, Canadá, Estados Unidos y Japón, entre otros, utilizando diversos métodos, entre los que podemos citar:

a) resalte de anillos por tinciones

En 1982, Thorson y Lacy impregnaron con nitrato de plata las vértebras de *Carcharhinus leucas* para contar los anillos y estimar su edad. En 1983, Schwartz encontró que solo las técnicas de tinción con cristal violeta o impregnación con nitrato de plata resaltan eficientemente los anillos en las estructuras vertebrales de *Sphyrna lewini* y *C. obscurus*. También en 1983, Gruber y Stout probaron varias técnicas para resaltar los anillos en las vértebras de *Negaprion brevirostris* y estimar su tasa de crecimiento, pero solo la tinción con rojo de alizarina les permitió diferenciar claramente dichos anillos.

En 1988, Brown y Gruber encontraron que la formación de los anillos vertebrales sigue un patrón estacional en *Negaprion brevirostris* al comparar los datos sobre el número de anillos en cortes vertebrales teñidos con rojo de alizarina y cortes de vértebras de organismos inyectados con tetraciclina en vida libre y mantenidos en cautiverio.

Otros autores como Moulton *et al.* (1992), estimaron la edad y la tasa de crecimiento de *Mustelus antarcticus* y *Galeorhinus galeus* a partir de la lectura de los anillos de crecimiento teñidos con rojo de alizarina, pero mencionan que la tasa de crecimiento de la segunda especie resulta subestimada con este método debido a la dificultad que presentó la tinción y lectura de los anillos muy compactos del margen exterior del borde.

En 1995, Officer comparó lecturas de dos métodos, rojo de alizarina y microrradiografía, en vértebras de *Mustelus antarcticus* y *Galeorhinus galeus*, encontrando resultados similares, por lo que concluye que no hay beneficio en cambiar de la tinción con rojo de alizarina a la microrradiografía. También encontró que las vértebras cercanas a la primera aleta dorsal tuvieron estadísticamente más anillos que las vértebras localizadas cerca de la cabeza o de la cola del organismo.

b) resalte de anillos por rayos X

En 1983b, Cailliet *et al.* usaron rayos X para determinar la edad en *Prionace glauca*, *Alopius vulpinus* e *Isurus oxyrinchus*. Cailliet *et al.*, (1985) determinaron la edad del tiburón blanco, *Carcharodon carcharias* también por medio de rayos X.

En 1990, Cailliet *et al.* utilizaron tinciones con hematoxilina y rayos X para resaltar los anillos de crecimiento en las vértebras de especímenes de dos poblaciones de *Mustelus manazo* y determinar las diferencias en el crecimiento de ambas poblaciones. La radiación de las vértebras con rayos X fue también aplicada por Natanson y Cailliet (1990) en *Squatina californica* y Yudin y Cailliet (1990) la utilizaron para *Mustelus californicus* y *M. henlei*. En 1991, Ferreira y Vooren, obtuvieron con rayos X una edad estimada de 41 años

para *Galeorhinus galeus* de las aguas del sur de Brasil, siendo el doble de la edad máxima reportada para esta especie en las aguas del sur de Australia usando tinciones con rojo de alizarina.

c) resalte de anillos por otros métodos

En 1977, Jones y Geen determinaron la edad de *Squalus acanthias* por espectrometría de rayos X. En 1985, Parsons utilizó un lápiz de grafito para resaltar los anillos de crecimiento, pasando suavemente la punta del lápiz sobre el borde de las vértebras de especímenes de *Rizoprionodon terranovae* mantenidos en cautiverio.

En 1987, Welden *et al.* usaron la técnica de fechación radiométrica, basada en los niveles de radioactividad de los isótopos que ocurren naturalmente en diferentes partes del disco vertebral, para estimar la edad y crecimiento de *Carcharodon carcharias*, *Squatina californica*, *Triakis semifasciata* y *Alopias vulpinus*; sin embargo debido a la poca confiabilidad de los resultados, al alto costo del método y al elevado consumo de tiempo que requiere, no se ha intentado en otras especies de elasmobranchios. Branstetter (1987b), realizó el conteo de los anillos de crecimiento de *C. limbatus* y *C. brevipinna* sin aplicar alguna técnica para resaltarlos.

También en 1987, Cailliet y Radtke trabajaron con *Carcharhinus amblyrhynchos* y *Alopias vulpinus*; realizaron un microanálisis químico de las vértebras para obtener el número de picos en la concentración de calcio y fósforo y lo compararon con el número de anillos opacos visibles en radiografías de las vértebras y encontraron que coincidían, no importando que estas especies pertenecen a diferentes hábitats.

Más recientemente, Gelsleichter *et al.* (1998), evaluaron la utilidad de tres metales como métodos alternativos para determinar la edad de *Mustelus canis*, *Ginglymostoma cirratum*, *Carcharhinus plumbeus* y *Rizoprionodon terranovae*, *C. altimus*, *Gymnura altavela* y *Raja eglanteria*. Los autores observaron que la sustitución de las sales de calcio de los depósitos vertebrales por las de cobre, plomo ó hierro producen una coloración diferencial variable, aunque solo fue eficiente en 5 de las especies estudiadas, mientras que en *G. cirratum* y *C. altimus* el contraste entre los anillos resultó ineficiente con los tres metales.

2.2 Validación directa

Varios autores han validado una periodicidad anual en varias especies de carcarinidos usando tetraciclina. En 1983, Gruber y Stout validaron la edad de *Negaprion brevirostris*; en 1984, Smith la de *Triakis semifasciata* y en 1985, Beamish y McFarlane la de *Squalus acanthias*, mediante marcaje de organismos con tetraciclina y su posterior recaptura. Por otra parte, Parker y Stout (1965), con *Cetorhinus maximus* y Pratt y Casey (1983), con *Isurus oxyrinchus* han observado que los lamnidos pueden producir dos anillos (ya sea claros u oscuros) al año, mientras que Natanson y Cailliet (1990), no encontraron una periodicidad en la formación de los anillos de crecimiento de *Squatina californica* en California.

En 1987a, Branstetter validó la edad de *Rhizoprionodon terraenovae* manteniendo organismos neonatos en un acuario durante 16 meses, marcándolos con tetraciclina. En 1988, Brown y Gruber validaron la edad de *Negaprion brevirostris* inyectando organismos con tetraciclina y manteniéndolos en cautiverio. En 1990, Tanaka validó la edad de *Orectolobus japonicus* y *Cephaloscyllium umbratile*, a partir de los anillos vertebrales marcados con tetraciclina de especímenes mantenidos en cautiverio desde su nacimiento.

En 1992, Casey y Natanson en un estudio de marcaje y recaptura que duró 26 años en *Carcharhinus plumbeus*, encontraron que esta especie crece más lentamente de lo previamente propuesto por Casey *et al.* en 1985, quienes estimaron la edad a partir de anillos de crecimiento en vértebras de especímenes provenientes de la pesca comercial.

Gelsleichter *et al.* (1997), usaron calceína para validar la formación de los anillos de crecimiento en las vértebras de *Ginglymostoma cirratum*. Encontraron que las dosis recomendadas para peces teleósteos (25 mg/kg) son tóxicas para los elasmobranquios, por lo que usaron dosis menores de calceína (10 y 5 mg/kg) con las que obtuvieron las marcas necesarias para la validación de la edad.

2.3 *Carcharhinus limbatus*

La familia Carcharhinidae (Jordan y Evermann, 1969) es una de las familias más numerosas y de mayor distribución (Castro, 1983) que agrupa especies de pequeño a gran tamaño. La mayoría son depredadores voraces de crustáceos, moluscos, peces, rayas e incluso pequeños tiburones. Generalmente las especies más pequeñas se encuentran cerca de la costa mientras que las especies de mayor talla habitan a grandes profundidades. Esta familia se considera la más importante económicamente, ya que muchas especies se utilizan como alimento, al igual que su aceite, piel ó harina, entre otros, mientras que en las especies grandes su principal valor son sus aletas para el consumo oriental. Otras causan grandes pérdidas en las pesquerías, debido al daño que hacen a las redes y otras artes de pesca. Pocas especies se consideran peligrosas para el hombre (Garrick, 1982).

Ubicación taxonómica de *Carcharhinus limbatus* (Compagno, 1988)

Clase	Chondrichthyes
Subclase	Elasmobranchii
Cohorte	Euselachii
Subcohorta	Neoselachii
Superorden	Squalomorphii
Orden	Carcharhiniformes
Familia	Carcharhinidae
Genero	<i>Carcharhinus</i>
Especie	<i>C. limbatus</i> (Valenciennes, 1839)

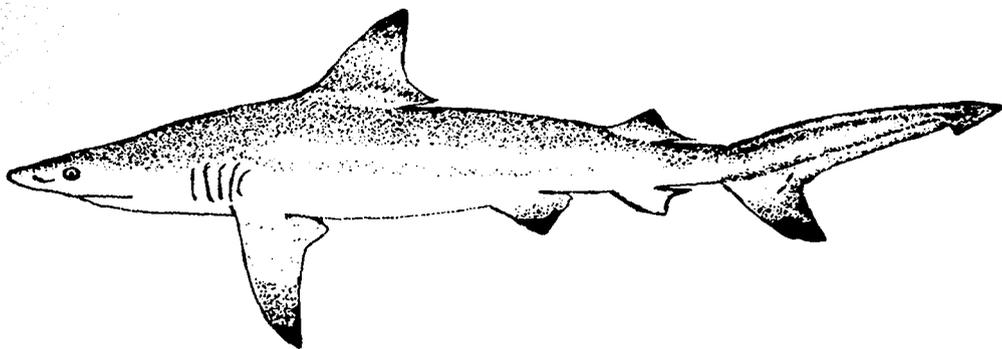


Figura 2. *Carcharhinus limbatus* (Valenciennes, 1839)
ó tiburón puntas negras (tomado de Marin, 1994).

También llamado tiburón aleta prieta, tiburón volador ó tiburón picudo. Es un tiburón largo grisáceo o bronceo con un morro largo y puntiagudo. Presenta la región ventral blanca, bandas blancas conspicuas situadas a los flancos del cuerpo, manchas negras en las aletas dorsales, pectorales y el lóbulo caudal ventral; tiene una pigmentación que se atenúa con el crecimiento. La aleta anal es de color blanco. Ojos pequeños. Dientes estrechos, erectos y de cúspides serradas y 15/14 filas de dientes anterolaterales. No tiene pliegue interdorsal. La primera aleta dorsal está ligeramente falcada en su margen posterior y se origina a la mitad del margen interno de la aleta pectoral. El espacio interdorsal es menor o igual a dos veces la altura de la primera aleta dorsal (Compagno, 1984).

Se distribuye en todos los mares tropicales incluyendo el Golfo de México y Mar Caribe. Es un tiburón muy común en aguas tropicales y subtropicales; pelágico y normalmente cercano a la plataforma continental, comúnmente se acerca a aguas someras, bocas de río y estuarios. Su talla varía de 62 cm a 255 cm de longitud total (LT) (Garrick, 1982). Es un tiburón rápido de hábitos gregarios y normalmente nada cerca de la superficie (Castro, 1996).

Para el Golfo de México se reporta una talla que va de 55-62 cm hasta 190-200 cm LT (Tovar, 1995). La longitud total mínima de madurez sexual para las poblaciones del Atlántico noroeste es 130 cm para los machos y 150-155 cm para las hembras (Branstetter, 1987b), aunque Castro (1996), reportó para las poblaciones del sureste de los Estados Unidos 145 cm para los machos y 156 cm para las hembras, mientras que Killam y Parsons (1989), reportaron 133-136 cm para los machos y 158-162 cm para las hembras en Florida. Tovar (1995), reporta 125 cm para los machos y 145 cm para las hembras en el Golfo de México.

2.4 Estudios de edad y crecimiento en *Carcharhinus limbatus*

En 1986, Branstetter y McEachran estimaron la edad de *C. limbatus* del noroeste del Golfo de México a partir de los anillos vertebrales e intentaron validarla inyectando tetraciclina a 2 organismos y manteniéndolos en cautiverio, pero los organismos murieron antes de 3 meses, por lo que no obtuvieron resultados en la validación, aunque encontraron que si incorporaban la tetraciclina en las vértebras. El conteo de los anillos se hizo en la cara de la vértebra (*corpus calcareum*) sin utilizar ninguna técnica para resaltarlas y utilizando un microscopio estereoscópico con luz reflejada. También observaron cortes transversales de la vértebra sin teñir (0.5 - 1 mm de espesor) en un microscopio estereoscópico con luz transmitida.

En 1989, Killam y Parsons investigaron la edad y crecimiento de esta especie en las costas de Florida, reportando un número mínimo y máximo de "anillos translúcidos de invierno" de 0 y 11, respectivamente. Compararon dos métodos para resaltar los anillos, la impregnación con nitrato de plata y resaltarlos con un lápiz de grafito. Decidieron trabajar con el segundo método por el ahorro de tiempo en comparación con la tinción. Por medio del método de incremento marginal validaron la periodicidad anual del anillo que se forma en los meses de diciembre y enero.

En 1996, Wintner y Cliff determinaron edad y crecimiento de *C. limbatus* en la costa este de Sudáfrica. Usaron cinco métodos para evidenciar los anillos de las vértebras: radiografía con rayos X, impregnación con nitrato de plata, tinción con cristal violeta, observación microscópica con luz transmitida y campo oscuro de la vértebra entera y observación de cortes transversales de la vértebra (0.5 mm de espesor) sin teñir. La observación de la vértebra entera al microscopio fue el método en el que obtuvieron conteos más precisos. Los organismos a los que se les asignó mayor edad fueron una hembra de 11 años (179 cm de longitud precaudal) y un macho de 10 años (179 cm de longitud precaudal), asumiendo que la formación del anillo opaco ocurre en verano, aunque no lo validaron.

2.5 Estudios en México

En México se han realizado pocos estudios de edad y crecimiento en tiburones: En 1990, Bonfil estudió la biología y pesquería de *Carcharhinus falciformis* en Yucatán. En 1995 y 2000, Tolentino trabajó con *Sphyrna lewini* en el Pacífico Mexicano, particularmente en las costas de Michoacán, resaltando los anillos de crecimiento con cristal violeta. En 1995, Mendizábal estudió la reproducción, el crecimiento y la mortalidad de *Alopias vulpinus* y *Carcharhinus limbatus* en el Pacífico utilizando el método indirecto de análisis de frecuencias y Miranda en 1996, realizó un análisis biológico pesquero con *Prionace glauca* en Baja California.

En el 2000, Tovar trabajó con edad y crecimiento de *C. limbatus* en el Golfo de México. Para resaltar los anillos realizó pruebas con diversas técnicas como la tinción con rojo de alizarina, cristal violeta, impregnación con nitrato de plata y radiografías con rayos

X. Observó las vértebras enteras, así como cortes de las mismas. Utilizó un microscopio estereoscópico y comparó la conveniencia de luz transmitida contra la luz reflejada. El autor concluyó que los cortes teñidos con cristal violeta y observados con luz transmitida fueron los más convenientes para evidenciar los anillos. Los organismos en los que contabilizó el mayor número de anillos fueron, un macho de 178 cm LT (14 anillos) y una hembra de 178 cm LT (12 anillos). Con el método del incremento marginal validó la formación anual de los anillos.

También en el 2000, Cruz estudió la edad y crecimiento de *Carcharhinus leucas* de las aguas de Veracruz y Campeche, pudiendo observar sin dificultad los anillos de crecimiento de organismos menores de 220 cm de longitud total, ya que en organismos más grandes los anillos estaban muy juntos y se dificultaba el conteo.

Ribot en el 2002, determinó la edad de *Isurus oxyrinchus* de las costas de Baja California Sur y en este mismo año, Andrade determinó la edad y crecimiento de *Sphyrna lewini* en el Pacífico.

Los resultados que se obtengan en este trabajo se podrán complementar con futuras investigaciones de edad y crecimiento para conocer la dinámica poblacional del tiburón puntas negras y de otras especies de elasmobranquios.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Comprobar que la lectura de anillos de crecimiento en las vértebras de *Carcharhinus limbatus* es un medio confiable para determinar la edad en esta especie y determinar el mejor método para hacerlo.

3.2 Particulares

- > **Determinar el tipo de calcificación en las vértebras de *Carcharhinus limbatus*.**
- > **Comparar distintos métodos para resaltar y observar los anillos con el fin de determinar el de mayor confiabilidad para *Carcharhinus limbatus*.**
- > **Validar de manera directa la formación de los anillos de crecimiento en *Carcharhinus limbatus*.**

4. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras con las que se realizó el presente trabajo corresponden a organismos capturados por pescadores artesanales en campamentos pesqueros situados en Tamaulipas (Playa Bagdad) y Veracruz (Tamiahua, Tuxpan, Casitas y Alvarado)(Fig. 3).

4.1 Ubicación geográfica

El Golfo de México se localiza entre los 98° y 80° de longitud oeste y los 18° y 30° de latitud norte. La parte norte del Golfo de México pertenece a la Zona Económica Exclusiva de Estados Unidos, donde la plataforma continental se encuentra ampliamente desarrollada, sobre todo frente a la península de Florida, mientras que la parte sur pertenece a la Zona Económica Exclusiva de México, siendo la plataforma mexicana al sur del Río Grande la más estrecha del Golfo con un área de 40 km, cerca de Tampico, Tamaulipas e incrementándose hacia el sur frente a la Sonda de Campeche y extendiéndose aún más en la Península de Yucatán, donde se constituye el límite geológico sur de la cuenca. Se extiende en un área total de 1 768 000 km² y se comunica con el Océano Atlántico a través del estrecho de Florida y con el Mar Caribe a través del Canal de Yucatán (De la Lanza, 1992).

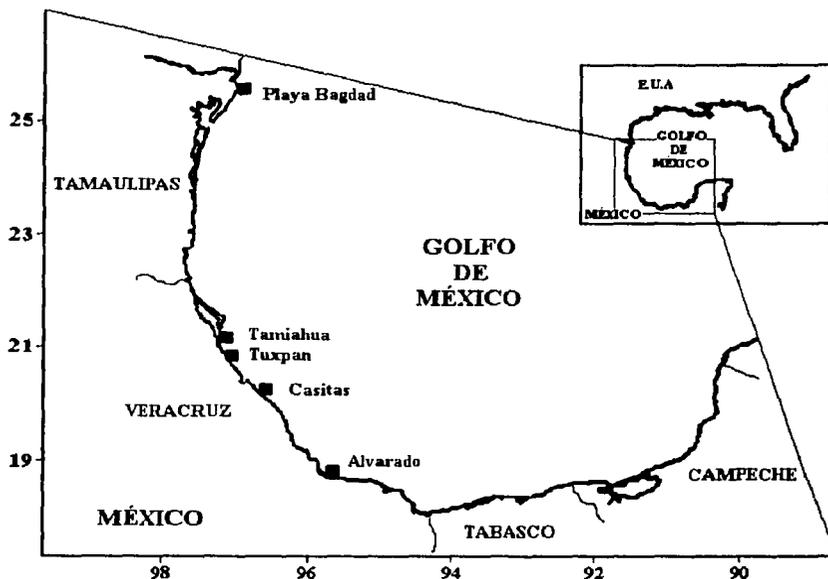


Figura 3. Área de estudio y principales localidades de muestreo.

4.2 Factores fisicoquímicos

En el oeste del Golfo de México la termoclina es poco profunda, mostrándose en ocasiones por arriba de los 50 m. En julio la termoclina es aún más somera, entre los 20 y 50 m de profundidad frente a Tamaulipas. Durante el verano, las temperaturas superficiales del mar oscilan entre 23 y 30 °C, la más alta se presenta en el norte y en el este del Golfo, ocurriendo las más bajas en el sur y oeste, situación inversa en el invierno. Durante todo el año penetra agua cálida a través del Canal de Yucatán, la cual proviene del mar Caribe, mediante la corriente del Lazo, misma que durante el verano alcanza temperaturas entre 28 y 29 °C, reduciendo hasta 25 °C en invierno, ocasionando cambios drásticos en la temperatura de la columna de agua (NOAA, 1985).

Debido a la gran corriente del Golfo, la temperatura se mantiene cálida, lo cual le confiere características particulares que favorecen movimientos migratorios, ya que las masas de aguas cálidas del sur proporcionan un refugio en invierno para varias especies, entre ellas *Carcharhinus limbatus* y *Carcharhinus leucas* (Tovar, 1995).

Es importante tener en cuenta los factores abióticos (luz del día, temperatura y química del agua), ya que influyen en la fisiología de los organismos y en cierta forma son determinantes para que pueda suceder la mineralización de las mandíbulas y vértebras de los tiburones.

5. MATERIAL Y MÉTODO

Las vértebras utilizadas en el presente trabajo, un total de 51, fueron extraídas del mismo número de organismos capturados por pescadores artesanales de localidades pesqueras ubicadas en el Golfo de México, en los estados de Veracruz y Tamaulipas.

Las vértebras pertenecieron a organismos mayores a 80 cm de longitud total, debido a que en ellos es donde se van a presentar un mayor número de anillos de crecimiento. Las vértebras se obtuvieron realizando un corte en la base de la primera aleta dorsal desde el interior de la cavidad corporal, una vez que el animal había sido eviscerado. Con la ayuda de un cuchillo se extrajeron de 5 a 19 vértebras de cada organismo, siendo las vértebras de esta región dorsal las más recomendadas por ser las que representan mayor diámetro, haciendo la lectura de los anillos más confiable y disminuyendo el error (Officer, 1995). Las vértebras fueron preservadas en alcohol al 70% para su posterior procesamiento.

Para la limpieza de las vértebras se usó hipoclorito de sodio al 5.0%, manteniéndolas en esta solución de 30 minutos hasta 2 horas, con 2 cambios de solución dependiendo de la cantidad de tejido residual, después se enjuagaron con agua corriente y se mantuvieron en alcohol al 70%.

Las vértebras ya limpias, se montaron en bases de madera para poder cortarlas transversalmente, ya que en estos cortes son donde se leerán los anillos de crecimiento. Para pegar las vértebras completas a las bases de madera se utilizó la resina Araldite GY-6010 con el endurecedor de resina HY-956 de CIBA (Tovar, 2000). Los cortes se llevaron a cabo con una cortadora Isomet (Buehler) con cuchilla de borde de diamante, con un grosor de 0.3 – 0.5 mm (Cruz, 2000; Tovar *Op. cit.*).

5.1 Tipo de calcificación de la vértebra

Para examinar la ultraestructura de las vértebras, éstas se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-35).

Teniendo una vez limpias las vértebras se dejaron secar al aire libre para que perdieran la mayor cantidad de humedad posible. Para poder observar la estructura interna de las vértebras, éstas se fracturaron golpeándolas con un martillo para dejar expuesta la intermedialia. Los fragmentos se pegaron a los portaobjetos con pintura de plata y se recubrieron con oro ionizado. Se examinaron con el microscopio electrónico de barrido.

5.2 Lectura de los anillos

Se usaron dos métodos de tinción para decidir el que fuera más efectivo para resaltar los anillos:

- Rojo de alizarina y NaOH 0.1% en proporción 1:9 (Gruber y Stout, 1983).
- Cristal violeta 0.01% e isopropanol 50% (Wintner y Cliffl, 1996).

El número de anillos se determinó observando los cortes en un microscopio estereoscópico con luz transmitida.

También se hicieron preparaciones permanentes para observarlas en el microscopio óptico. Se escogió un corte de cada vértebra y se adelgazó usando lijas de agua del número 1200 hasta dejarlo con un grosor de 50 – 70 μm , se tiñó con rojo de alizarina durante 60 minutos, se dejó secar y se retiró el exceso de colorante volviéndola a lijar hasta obtener un tono rosa pálido. Se sumergió en xileno y se montó en resina sintética. Se siguió el mismo procedimiento con un corte de cada vértebra.

Antes de estimar el número de anillos, los cortes de las vértebras se observaron con detenimiento para identificarlos y distinguirlos de los anillos falsos que son marcas que aparecen como anillos incompletos, esto es, que no tienen continuidad en el *corpus calcareum* y en la *intermedialia* de la vértebra (Casselman, 1983)(Fig. 4).

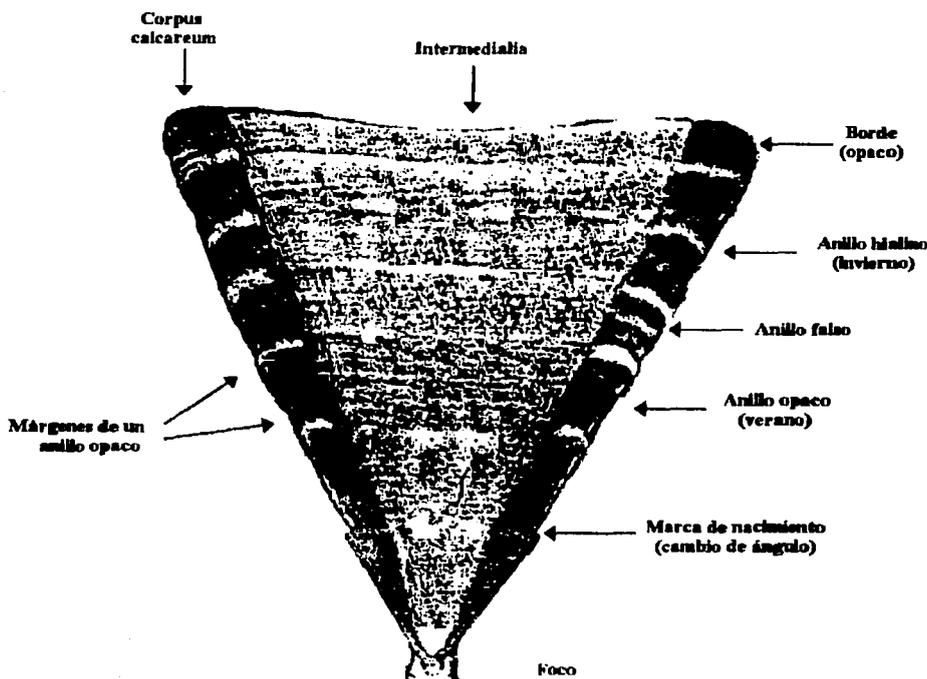


Figura 4. Corte longitudinal de una vértebra (tomado de Tovar, 2000).

Todos los cortes presentaron la marca de nacimiento (el cambio de ángulo en el *corpus calcareum*) y en la mayoría se observó, en mayor o menor grado, una banda hialina que coincidía con dicha marca.

El número de anillos hialinos se empezó a contar a partir de la primera banda hialina posterior a la marca de nacimiento.

Se realizaron tres lecturas por vértebra en el microscopio estereoscópico y tres lecturas en el microscopio óptico, sin considerar los datos previos para evitar influir en el número de anillos asignados en ocasiones anteriores, además de que entre las lecturas se dejó transcurrir un periodo de tiempo de 3 semanas. Se determinó que tan precisas fueron las lecturas para los diferentes métodos, utilizando el Índice del Error Promedio Porcentual (APE por sus siglas en inglés) (Beamish y Fournier, 1981).

$$APE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \left[\frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{|X_{ij} - X_j|}{X_j} \right] \times 100$$

donde N es el número de muestras, R es el número de veces que se leyó la muestra, X_{ij} es la edad i determinada para el pez j y X_j es el promedio de las edades determinadas para el pez j .

También se calculó el Coeficiente de Variación (CV) propuesto por Chang (1982).

$$CV = \frac{(R(\sum(X_{ij})^2) - (\sum X_{ij})^2)^{\frac{1}{2}}}{R(R-1)(X_j)}$$

donde R es el número de veces que se leyó la muestra, X_{ij} es la edad i determinada para el pez j y X_j es el promedio de las edades determinadas para el pez j .

Se hizo también una comparación de precisión con otro lector con experiencia en la lectura de los anillos de crecimiento. Además se efectuó una prueba de "t" pareada para determinar si existen diferencias significativas entre las lecturas realizadas por los lectores.

5.3 Validación directa de la formación de anillos

El marcaje de los tiburones se realizó en conjunto con el acuario de Veracruz. Se marcaron cuatro organismos, un *Ginglymostoma cirratum*, dos *Carcharhinus limbatus* y un *Carcharhinus plumbeus* (Tabla 1), estos últimos se encontraban viviendo en el corral de la Isla de Sacrificios, frente al Puerto de Veracruz, en condiciones naturales, desde dos años antes del marcaje los puntas negras y cuatro años el tiburón aleta de cartón, mientras que el tiburón gata se encontraba en una pecera de exhibición del acuario.

Se le administró a cada tiburón una dosis de 25 mg/kg de peso corporal (Smith, 1984; Branstetter y McEachran, 1986; Branstetter, 1987b) mediante una inyección intramuscular de oxytetraciclina marca Purina (con una concentración de 50 mg/ml) para el

tiburón gata y Pfizer (concentración de 50 mg/ml) para los tres restantes con jeringas estériles de 5 a 25 ml marca Plastipak. A el tiburón aleta de cartón y a uno de los tiburones puntas negras se les administró además el anestésico MS2 en una concentración de 1.2%.

Se capturaron a los organismos con una red de enmalle y se subieron a una embarcación de 15 m. de eslora y motor fuera de borda, manteniéndoseles dentro de un estanque de 1.5 m. de diámetro y 1 m. de altura con agua marina, la cual fue cambiada completamente en cada proceso de marcaje.

Se obtuvo el peso de los organismos utilizando una camilla de plástico y tela y una balanza digital de 100 kg de capacidad. La longitud total se midió con una cinta métrica de asbesto graduada en milímetros. También se registró el sexo de cada organismo. El marcaje en el corral de la Isla de Sacrificios inició a las 10:35 am y terminó a las 12:30 am, con un promedio de tiempo de manejo de los organismos de 15 minutos.

Después de la inyección, los tiburones quedaron en observación. El tiburón gata no presentó diferencia alguna tanto conductual como fisiológica en las 24 hrs. posteriores a la inyección; el tiburón aleta de cartón presentó aletargamiento después de ser inyectado; los dos tiburones puntas negras mostraron desorientación al nadar y un cambio de coloración, posiblemente debido a una probable anoxia, muriendo ambos tiburones después de una hora de la inyección.

Se les realizó la autopsia a los tiburones, se examinaron los órganos internos así como la zona muscular en donde se aplicó la inyección y no se encontró daño alguno, tampoco se encontraron parásitos internos en los organismos.

Después de la autopsia se extrajeron las columnas completas de los organismos y se mantuvieron en refrigeración hasta su posterior limpieza. En el laboratorio se limpiaron las vértebras quitándoles la mayor cantidad posible de tejido conectivo y músculo con la ayuda de un cuchillo y sumergiéndolas posteriormente en hipoclorito de sodio al 5.0% por tiempo de una hora aproximadamente, fueron enjuagadas con agua corriente y guardadas en alcohol al 70%, todo esto conservando la ubicación de cada vértebra a lo largo de la columna.

No. de organismo	Especie	Sexo	Longitud total (cm)	Peso (kg)	Dosis utilizada (mg/kg)	Cantidad inyectada (ml)
1	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	H	97	6.6	25	3.3
2	<i>Carcharhinus limbatus</i>	M	140	26.2	25	13
3	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	M	191	60.0	25	30
4	<i>Carcharhinus limbatus</i>	M	152	27.5	25	13

Tabla 1. Organismos marcados con tetraciclina.

Se seleccionaron dos vértebras para comparar el número de anillos visibles en ellas, una vértebra de la región cervical y una de la región dorsal (vértebras 1 y 27 respectivamente) y se siguió el mismo procedimiento para cortarlas y teñirlas que con las muestras anteriores.

El tiburón aleta de cartón murió (4 de diciembre) cuatro meses después de la inyección de tetraciclina (10 de agosto) por lo que hubo tiempo suficiente para que el antibiótico se incorporara a las vértebras del organismo. De la misma forma que con los puntas negras, se extrajo la columna del organismo y se mantuvo en refrigeración. Para evitar la descomposición de la tetraciclina por la exposición a la luz, la columna se guardó en bolsas negras. Una vez en el laboratorio, se seleccionó una vértebra cervical y una dorsal, se limpiaron y cortaron de la forma antes mencionada, evitando exponer las vértebras a la luz. Los cortes de las vértebras se preservaron en alcohol al 70° en frascos color ámbar. Los cortes fueron observados por medio de microscopía de fluorescencia (luz ultravioleta de 365 nm y filtro verde marca Carl Zeiss) en un microscopio óptico con un aumento de 10x.

6. RESULTADOS

6.1 Tipo de calcificación de la vértebra

Los tiburones son peces Chondrichthyes por presentar su esqueleto formado por cartilago. El cartilago fibroso y el hialino son los dos tipos de cartilago que forman la vértebra, el fibroso se calcifica en la vértebra y da lugar a la formación de los anillos de crecimiento. El cartilago hialino permanece sin calcificarse y se encuentra llenando las cavidades de la vértebra entre las partes que forman la *intermedialia*.

El cuerpo de las vértebras está formado por los condrocitos embebidos en la matriz extracelular. La calcificación del cartilago ocurre cuando los cristales de calcio se depositan en la matriz extracelular. La renovación constante se realiza por el crecimiento que presenta el cartilago por el método de aposición, por medio del cuál aumenta capas nuevas de células que producirán más substancia intercelular ó matriz extracelular en la que posteriormente se seguirán depositando cristales de calcio (Fig. 5), por lo que las zonas centrales de la vértebra, cercanas al foco, están más calcificadas.

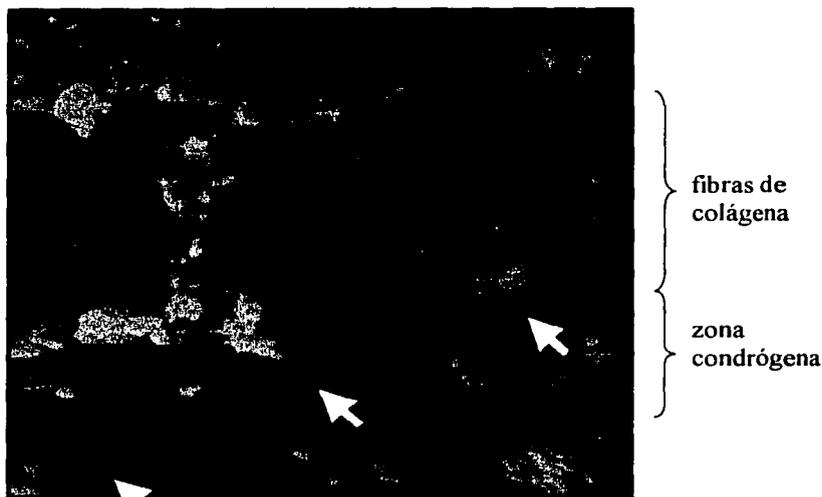


Figura 5. Estructura del pericondrio. Se observan fibras laxas de colágena (flechas negras) y lagunas de condroblastos (flechas blancas), precursores de condrocitos. También se pueden observar, abajo del pericondrio, lagunas de condrocitos (punta de flecha negra) embebidas en la matriz extracelular (punta de flecha blanca). Microscopía electrónica (720x).

La superficie externa de la vértebra está compuesta por una capa fibrosa formando el pericondrio (Fig. 5). Por debajo del pericondrio, el *corpus calcareum* está formado por condrocitos dispuestos en capas paralelas que tienen un arreglo radial desde el foco hacia el margen de la vértebra (Figs. 6 y 7).

Por debajo de las capas radiales del *corpus calcareum*, en la *intermedialia* se encuentran lagunas de condrocitos con un arreglo diferente, éstas se observan agrupadas en capas circulares con respecto del foco, en ángulo recto con las capas radiales que forman la superficie (Fig. 7).

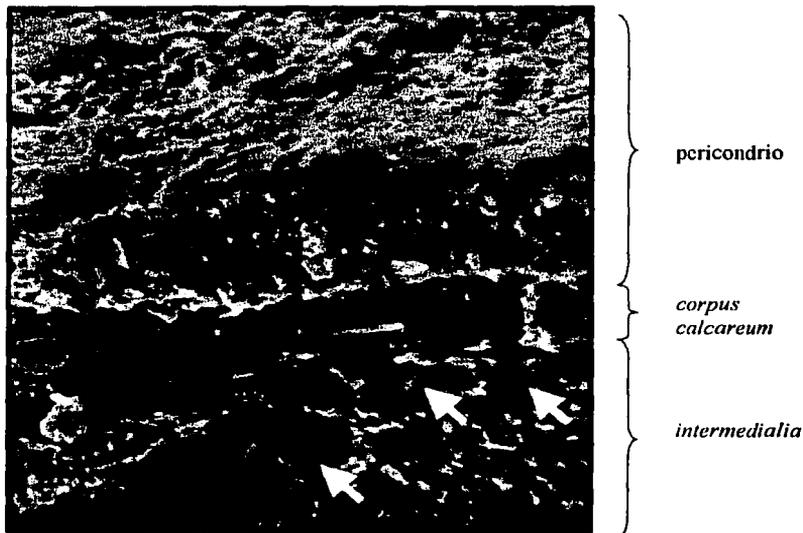


Figura 6. Fotomicrografía de una vértebra fracturada de *C. limbatus*. Se muestran las capas radiales que forman el *corpus calcareum* (flechas negras) y se observa el cambio en la disposición de las lagunas de los condrocitos (flechas blancas) que se encuentran en la *intermedialia*. Microscopía electrónica (480x).

Las capas paralelas de condrocitos que forman la matriz extracelular en el *corpus calcareum* son más gruesas cerca del foco de la vértebra y se van adelgazando conforme se alejan de éste y se aproximan al borde, pudiéndose explicar con esto la mejor resolución de los anillos de crecimiento localizados en el centro de la vértebra.

La matriz extracelular que forma la superficie del propio cartilago (inmediatamente por debajo del pericondrio) es la zona que se encuentra más densamente calcificada de toda la vértebra (Fig. 8). Se puede encontrar una gran diferencia en la densidad de los cristales de calcio de la superficie, contra los del *corpus calcareum*.

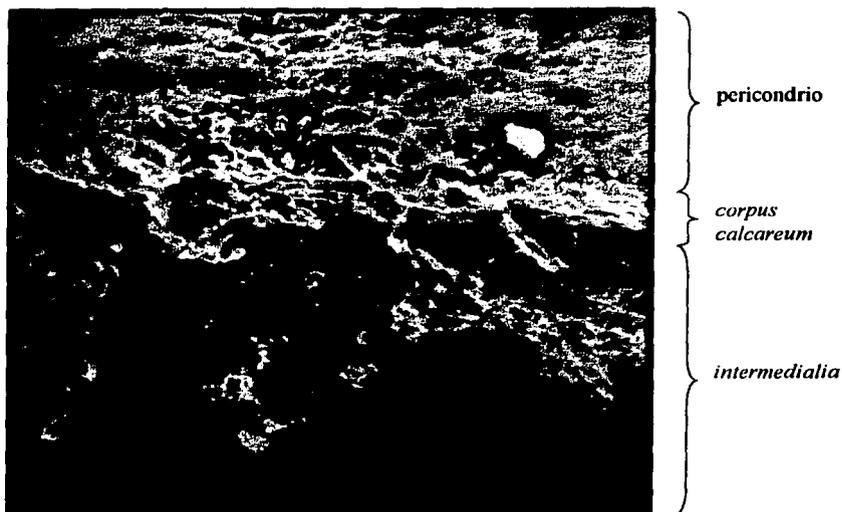


Figura 7. Fotomicrografía de una vértebra fracturada de *C. limbatus*. En l parte de la *intermedialia* se puede observar un arreglo circular de la lagunas de los condrocitos (flechas) con respecto del foco de l vértebra. Microscopía electrónica (200x).

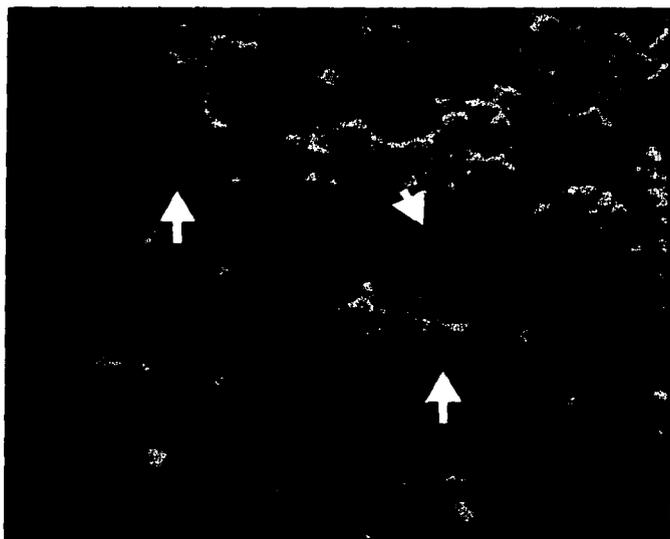


Figura 8. Fotomicrografía de la superficie de una vértebra de *C. limbatus*. Se pueden observar los cristales de calcio (flechas negras) y las lagunas de los condrocitos (flechas blancas) embebidas en la matriz calcificada. La superficie es la parte más calcificada de toda la vértebra. Microscopía electrónica (720x).

6.2 Lectura de los anillos

Se utilizaron un total de 51 muestras colectadas en el periodo de julio de 1994 a diciembre del 2001. El método que resultó más conveniente para resaltar los anillos de crecimiento en *C. limbatus* fue el de hacer preparaciones permanentes con cortes de un grosor de 50 – 70 μm , teñidos con rojo de alizarina.

En los cortes de 0.3 - 0.5 mm de grosor, se observaron sin problema, los primeros tres o cuatro anillos, dificultándose distinguir las siguientes bandas, debido a que se encontraban muy cerca una de la otra; este problema quedó resuelto en las preparaciones permanentes donde se obtuvieron cortes de 50 – 70 μm de grosor, facilitando observar el contraste entre una banda clara y una banda oscura haciéndola más evidente, por lo que es menos común ignorar o repetir el conteo de una banda, incluso aunque se trate de las que se encuentran cerca del borde de la vértebra (Fig. 9 y 10c).

En cuanto a los colorantes utilizados, el rojo de alizarina dio mejores resultados debido a que las preparaciones teñidas con dicha técnica presentaron un contraste más evidente resaltando con facilidad las bandas. A diferencia de las preparaciones teñidas con cristal violeta, que después de permanecer un tiempo conservadas en alcohol 70 °, perdían

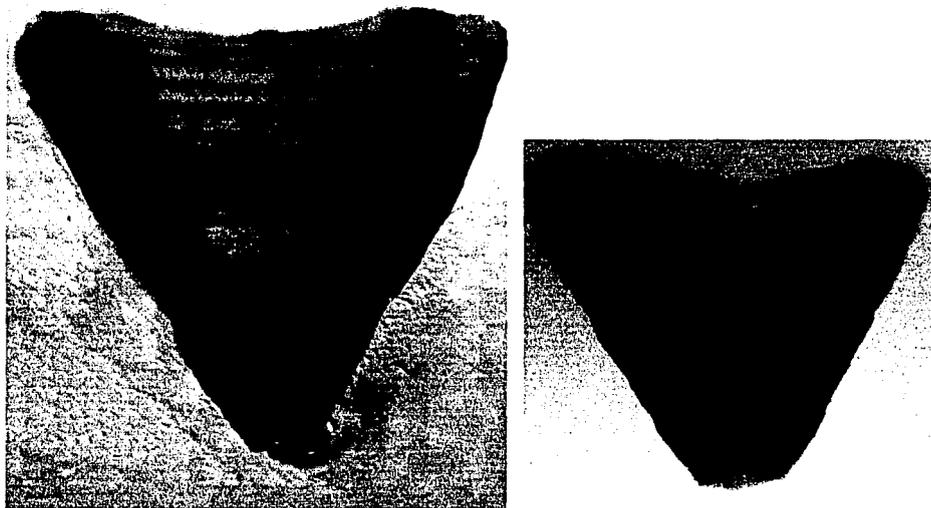


Figura 9. Preparaciones permanentes con cortes adelgazados de dos vértebras de *C. limbatus* y teñidas con rojo de alizarina para resaltar los anillos.

el color parcial o totalmente, mientras que, cuando se tiñeron los cortes adelgazados para las preparaciones permanentes con este mismo colorante, las preparaciones se teñían muy suavemente ó se sobreteñían, en ambos casos era difícil determinar el número de anillos presentes, debido a que el contraste entre una banda hialina y una banda opaca era muy tenue o prácticamente no se apreciaba (Fig. 10b).

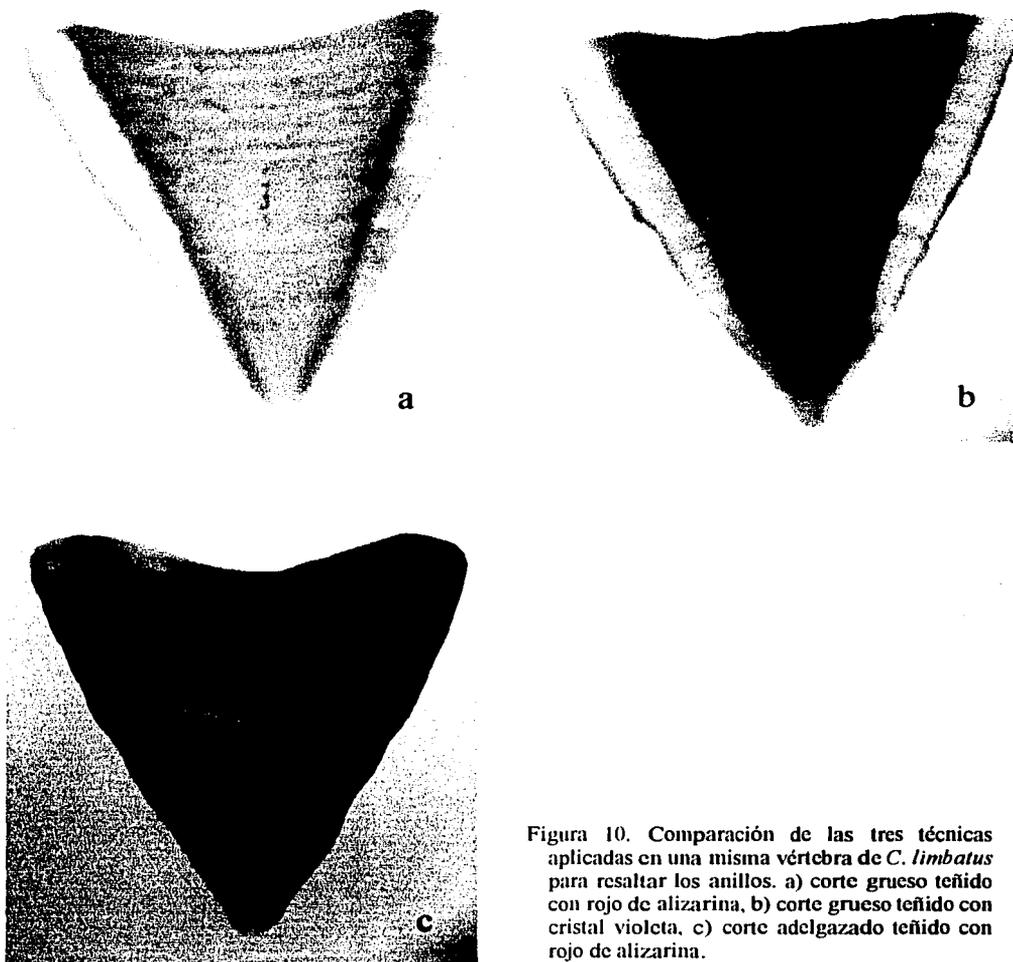


Figura 10. Comparación de las tres técnicas aplicadas en una misma vértebra de *C. limbatus* para resaltar los anillos. a) corte grueso teñido con rojo de alizarina, b) corte grueso teñido con cristal violeta, c) corte adelgazado teñido con rojo de alizarina.

La marca de nacimiento estuvo presente en todas las muestras y solo en una no coincidió con la primera banda hialina. En este caso, la primera banda hialina se consideró como la primera marca formada en el primer invierno que vivió el organismo.

Las lecturas de los anillos de crecimiento resultaron ser más precisas en las preparaciones permanentes con las muestras adelgazadas que en los cortes de las vértebras sin rebajar. Como se puede ver en las gráficas de la figura 11, en los cortes gruesos, 9 de las 51 muestras leídas concordaron en las tres lecturas realizadas, 26 tuvieron una diferencia de +/- 1 anillo y 16 tuvieron una diferencia de más de 1 anillo. En las preparaciones permanentes concordaron 19 muestras en las tres lecturas, 24 tuvieron una diferencia de +/- 1 anillo y sólo 7 muestras tuvieron una diferencia de más de 1 anillo.

Al calcular el Índice del Error Promedio Porcentual (APE) se obtuvo un valor de 10.3% para el autor en las lecturas de los cortes gruesos y de 6.4% en las lecturas de las preparaciones permanentes. El APE interlectores (el otro lector con experiencia en la lectura de anillos de crecimiento) fue de 16.3% en los cortes gruesos contra 9.4% en las preparaciones permanentes. En el caso del coeficiente de variación (CV) se obtuvo un valor de 0.126 y 0.071 para el autor en los cortes gruesos y en las preparaciones permanentes, respectivamente, mientras que el CV interlectores fue de 0.183 en los cortes gruesos y 0.108 en las preparaciones permanentes (Tabla 2).

Se encontró que existían diferencias significativas entre las lecturas del lector experimentado y el autor al leer los cortes gruesos, mientras que al leer los cortes adelgazados, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2).

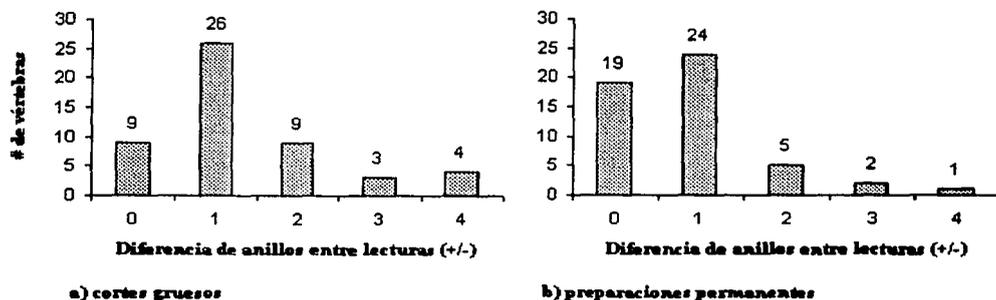


Figura 11. Precisión de las lecturas en vértebras de *C. limbatus*.

	APE autor	APE interlectores	CV autor	CV interlectores	t pareada
Cortes gruesos	10.3%	16.3%	0.126	0.183	0.0000002
Preparaciones permanentes	6.4%	9.4%	0.071	0.108	0.068

Tabla 2. Resultados de las estadísticas aplicadas a las lecturas de las vértebras de *C. limbatus*. APE es el índice del error promedio porcentual y CV es el coeficiente de variación.

6.3 Validación directa de la formación de anillos

No se pudo realizar la validación directa de los tiburones puntas negras, ya que murieron una hora después de ser inyectados. En su estudio Tovar (2000) valida de manera indirecta la formación anual de un anillo hialino.

De los dos tiburones puntas negras que murieron, se seleccionaron una vértebra cervical y una vértebra dorsal para compararlas entre sí y ver si presentaban el mismo número de anillos, encontrándose que tanto en las lecturas realizadas por el autor como por otros dos lectores este número fue muy variable. El resultado difiere de lo encontrado por Tovar (2000) en donde él reporta que de cuatro columnas completas que procesó, el número de anillos leídos en las vértebras cervicales y precaudales con respecto a las dorsales es el mismo. Sin embargo, en ambos estudios el resultado no puede considerarse significativo por el bajo número de muestras.

El tiburón aleta de cartón murió casi cuatro meses después de la inyección de tetraciclina debido a una intoxicación por marea roja en el puerto de Veracruz, tiempo suficiente para que el antibiótico quedara incorporado en las vértebras del animal, pero no bastante para hacer la validación de la formación de los anillos de crecimiento en esta especie. De cualquier forma queda comprobado que la tetraciclina se incorpora a las vértebras, como se observa en la Figura 12.

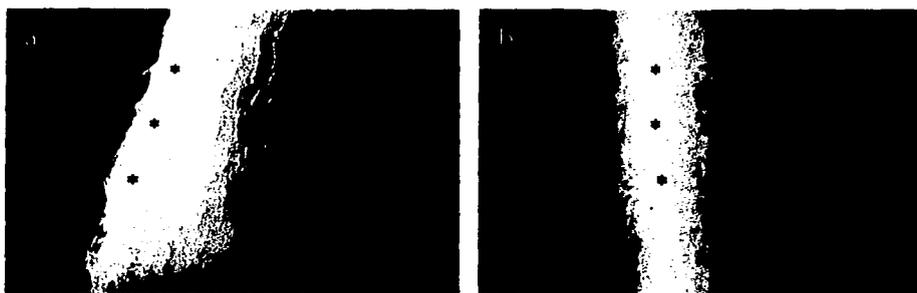


Figura 12. Corte de una vértebra dorsal de *C. plumbeus* mostrando la banda en donde se incorporó la tetraciclina administrada (*). a) es la parte del *corpus calcareum* y b) la *intermedialia*.

7. DISCUSIÓN

Para entender como se forman los anillos de crecimiento en las vértebras, se requiere determinar el método a emplear para resaltarlos, según la estructura o el grado de calcificación de las vértebras de cada especie, ya que existen métodos que dan buenos resultados con algunas especies mientras que con otras no funcionan. En el caso del tiburón puntas negras es difícil cuantificar los anillos presentes en las vértebras, sobre todo si se trata de organismos de más de cinco años de edad, por lo que en todos los estudios realizados con esta especie se han utilizado diferentes métodos para resaltarlos (Killam y Parsons, 1989; Winter y Cliff, 1996; Tovar, 2000).

En el microscopio electrónico no se apreció diferencia alguna en la superficie de la vértebra en donde está presente un anillo opaco y un anillo hialino; en un corte de la vértebra se pueden ver las lagunas de los condrocitos embebidas en la matriz extracelular, además de que hay una mayor densidad de cristales en la superficie de la vértebra y en las partes más cercanas al foco que en las zonas que están más cercanas al borde vertebral.

La estructura que se observa en las vértebras de *C. limbatus*, es semejante a la descrita por Officer (1995) en las vértebras de *Mustelus antarcticus* y *Galeorhinus galeus*. En el cartilago calcificado, los minerales se depositan en la matriz extracelular donde están embebidos los condrocitos, así que entre más matriz extracelular exista habrá más superficie para que se depositen los minerales. Es importante resaltar que los anillos de crecimiento son un reflejo de la densidad mineral del tejido en general y no solamente de la densidad mineral de la matriz extracelular, por eso los anillos son considerados como zonas de variación en el grado de mineralización del tejido.

El crecimiento intersticial del cartilago ocurre sólo cuando éste no está calcificado, ya que de lo contrario la rigidez de la matriz extracelular impedirá la división de los condrocitos y la separación de las células hijas. El volumen de la matriz extracelular secretado por los condrocitos antes de la calcificación y su grado de hipertrofia son de particular importancia. Si la calcificación de la matriz extracelular procede rápido, los condrocitos no tienen tiempo de crecer y permanecen relativamente pequeños, mientras que si el proceso de calcificación se da más lentamente, los condrocitos pueden alcanzar un tamaño más grande antes de quedar embebidos en la matriz extracelular mineralizada. En su estudio Officer (1995) encontró que las lagunas celulares fueron más grandes en los anillos hialinos y tuvieron un tamaño más variable que las de los anillos opacos.

El grado en que el condrocito es capaz de crecer está relacionado con la densidad mineral del tejido en general. Si las células son capaces de crecer considerablemente antes de que se calcifique el tejido que las rodea, entonces ocuparán un mayor espacio dentro de la matriz, dando lugar a la formación de un anillo hialino en el cartilago recién calcificado. Si por el contrario, la matriz extracelular se calcifica antes de que las células crezcan significativamente, éstas ocuparán un espacio más pequeño dentro de esta matriz, dando lugar a la formación de un anillo opaco.

Un posible factor que puede afectar la velocidad con la que la matriz extracelular se calcifica puede ser la limitación en la disponibilidad de las sales minerales requeridas para el proceso. En los cartilagos calcificados, una variación temporal en la disponibilidad de fósforo puede afectar la cantidad de fosfato disponible para la depositación como fosfato de calcio (Halstead, 1974).

Por otro lado, en lo que respecta a la lectura de los anillos, el rebajar los cortes de las vértebras hasta un grosor de 50 – 70 μm , teñirlos con rojo de alizarina y montarlos en preparaciones permanentes fue el método con el que se obtuvieron resultados más precisos en la estimación de la edad de los organismos, además de que resultó un método práctico si consideramos que se tuvieron que realizar varias lecturas de las muestras, ya que el manejo posterior de las preparaciones permanentes fue más cómodo y más rápido.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que hay varios trabajos en los que se cuenta el número de anillos de crecimiento en vértebras de *C. limbatus* utilizando diversos métodos, no se ha llegado a determinar un método que sobresalga de los demás (Branstetter y McEachran, 1986; Killam y Parsons, 1989; Wintner y Cliff, 1996; Tovar, 2000). Un ejemplo es la tinción de la vértebra entera o de un corte de la misma con rojo de alizarina, técnica que no resalta claramente los últimos anillos de las vértebras grandes (con más de cinco anillos). Sin embargo, en los cortes delgados resulta que este colorante dio muy buenos resultados, ya que de todas las repeticiones en las lecturas, el número de anillos contados varió muy poco en comparación con las lecturas realizadas en los cortes gruesos.

El valor del APE de las lecturas en los cortes delgados disminuyó notablemente en las lecturas hechas por el autor, de 10.3% a 6.4%, así como también bajó el valor del APE interlectores, de 16.3% a 9.4%. En otros trabajos con el tiburón puntas negras en los que se calculó el APE, Wintner y Cliff (1996) obtuvieron un valor de 9% y de 8.9% en el APE interlectores y Tovar obtuvo un valor de 7.5% y de 8.3% en el APE interlectores. De la misma forma el valor calculado del CV disminuyó de 0.126 a 0.071 en nuestras lecturas hechas, en los cortes gruesos y en las preparaciones permanentes respectivamente, sin embargo, en ningún trabajo anterior hecho con esta especie se había calculado el CV. Además las diferencias estadísticas que hubo entre las lecturas del lector con experiencia y las lecturas del autor en los cortes gruesos, no se encontraron en las lecturas de los cortes delgados, como quedó demostrado al aplicar la *t* pareada.

Debido a lo delgado de los cortes, la luz puede pasar con mayor facilidad a través de los anillos hialinos y por lo tanto, al existir un mayor contraste entre los anillos opacos y hialinos, se pueden contar fácilmente el número de anillos presentes, incluso si éstos están muy juntos. Por esta misma razón, una vértebra que tenga varios anillos, al observar únicamente los cortes gruesos se puede subestimar el número de éstos, mientras que en las preparaciones permanentes esta posibilidad disminuye. En el presente trabajo se pudieron contar en la vértebra más grande hasta 14 anillos con un error de -2 anillos en sólo una de las lecturas realizadas por los dos lectores, siendo que en los cortes gruesos de la misma vértebra se contaron solamente 12 anillos con una diferencia de - 4.

También hay que mencionar las ventajas que se tuvieron al trabajar con los cortes delgados, como la fácil transportación y almacenamiento de las muestras, así como la mayor rapidez al momento de observarlas posteriormente debido a que se evita el estar guardándolas en alcohol para que no se descalcifiquen, así como el bajo costo de la técnica.

Dependiendo del objetivo que se persiga se puede trabajar con las vértebras enteras, lo cual ahorraría tiempo pero a costa de una menor precisión en la asignación de las edades, a menos que se trate únicamente de organismos pequeños en donde los anillos pueden observarse a simple vista, o se puede invertir un poco más de tiempo que nos resultará en lecturas más precisas y en una simplificación del trabajo. Hay que tener en cuenta que la elección de un método para determinar la edad en cualquier especie, nos debe permitir conseguir la mejor información en poco tiempo, con relativa facilidad y a un bajo costo.

El trabajo de la validación directa de la formación de los anillos de crecimiento en las vértebras de *C. limbatus* no se pudo llevar a cabo debido a la muerte de los dos tiburones marcados con tetraciclina una hora después de la inyección.

Branstetter y McEachran (1986) anteriormente intentaron validar mediante este mismo método la formación de los anillos en esta misma especie, inyectaron intraperitonealmente oxytetraciclina en la misma concentración que se usó en este estudio (25 mg/kg), siendo la misma concentración que se ha usado para hacer la validación en otras especies de tiburones (Gruber y Stout, 1983; Smith, 1984). Los dos organismos que marcaron murieron tres días después de la inyección y reportaron que en uno de ellos la tetraciclina aparentemente quedó incorporada en las vértebras.

Teniendo en cuenta lo anterior, se considera que la tetraciclina pudiera ser tóxica para esta especie de tiburones, por lo que se recomienda usar otro tipo de marcadores, como la calceína (Gelsleichter *et al.*, 1997).

Con base en la validación indirecta realizada por Branstetter (1987b) y Tovar (2000) se asume que en *C. limbatus* el primer anillo hialino corresponde a la marca de nacimiento (formado en los meses de mayo y junio), el siguiente anillo se considera que es formado en el siguiente invierno (diciembre) y representa seis meses de vida del organismo. Los siguientes anillos presentes en la vértebra se pueden atribuir, como se explicó anteriormente, a cambios en los parámetros ambientales, los cuales representan un evento anual.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se concluye que:

1. Las vértebras de *Carcharhinus limbatus* son estructuras que permiten la determinación de la edad en este tiburón.
2. La formación de los anillos opacos o hialinos en las vértebras de *C. limbatus* depende de la velocidad con la que se calcifique la matriz extracelular en que están embebidos los condrocitos.
3. La técnica más adecuada para la lectura de los anillos de crecimiento en esta especie fue la de hacer preparaciones permanentes de cortes de vértebras con un grosor de 50 - 70 μm , teñirlos con rojo de alizarina y observarlos en un microscopio con luz transmitida.
4. La validación directa de la formación de los anillos de crecimiento en vértebras de *C. limbatus* debe hacerse con otro tipo de marcador químico, debido a la respuesta adversa que los organismos presentan ante la tetraciclina ó probar otras dosis.
5. Es la primera vez que se calcula el valor del coeficiente de variación en esta especie de tiburón.

9. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Anderson, E.D. 1990. **Fishery models applied to elasmobranch fisheries.** In: H.L Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi (eds.) *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries.* U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 90: 427-443.
- Andrade, G.Z. 2002. **Determinación de edad y crecimiento del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith) 1834 (Clase selachii, Subclase elasmobranquii, Familia sphyridae) del Pacífico Mexicano mediante la lectura de sus anillos vertebrales.** Fac. de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México.
- Applegate, S.P., L. Espinoza-Arrubarrena, L.B. Menchaca-López y F. Sotelo-Macias. 1979. **Tiburones Mexicanos.** Subsecretaría de Educación e Investigación Tecnológica. Dirección General de Ciencia y Tecnología del Mar. México. 147 pp.
- Applegate, S.P., L. Espinoza-Arrubarrena and F. Sotelo-Macias. 1994. **An overview of Mexican Shark Fisheries, with suggestions for Shark conservation in Mexico.** In: Branstetter, S. (ed.) *Conservation Biology of Sharks.* U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 115: 31-37.
- Beamish, R.J. and D.A. Fournier. 1981. **A method for comparing the precision of a set of age determinations.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 982-983.
- Beamish, R.J. and G.A. McFarlane. 1983. **Validation of age determination estimates the forgotten requirement.** In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks.* Miami, Florida, U.S. 29-34.
- Beamish, R.J. and G.A. McFarlane. 1985. **Annulus development on the second dorsal spine of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) and its validity for age determination.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 1799-1805.
- Bonfil, S.R. 1990. **Contribution to the fisheries biology of the Silky Shark *Carcharhinus falciformis* (Bibron 1839) from Yucatán, México.** Magister in Scientia Thesis. School of Biologicas Sciences, U.C.N.W. Bangor. U.K. 77 pp.
- Bonfil, S.R. 1994. **Overview of world elasmobranch fisheries.** FAO Technical Paper 341. Rome. 119 pp.
- Branstetter, S. 1981. **Biological notes on the sharks of North Central Gulf of México.** Contribution in Marine Science. 24: 13-34.
- Branstetter, S. 1987a. **Age and growth validation of newborn sharks held in laboratory aquaria, with comments on the life history of the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*.** Copeia 2: 291-300.
- Branstetter, S. 1987b. **Age and growth estimates for blacktip, *Carcharhinus limbatus*, and spinner, *C. brevipinna*, sharks from the northwestern Gulf of Mexico.** Copeia 4: 964-974.
- Branstetter, S. and J.D. McEachran. 1986. **Age and growth of four Carcharhinid sharks common to the Gulf of Mexico: a summary paper.** In: T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsura (eds.) *Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes.* Tokio, Japón. 361-371.
- Branstetter, S., J.A. Musick and J.A. Colvocoresses. 1987. **A comparison of the age and growth of the tiger shark, *Galeocerdo cuvieri* from off Virginia and from the northwestern Gulf of Mexico.** Fishery Bulletin. 85 (2) 269-279.
- Brown, C.A. and S.H. Gruber. 1988. **Age assesment of the lemon shark, *Negaprion brevirostris*, using tetracycline validated vertebral centra.** Copeia: 747-753.
- Cailliet, G.M. 1990. **Elasmobranch age determination and verification an updated review.** In: H.L Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi, (eds.) *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries.* U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 90: 157-166.

- Cailliet, G.M. and R.L. Radtke. 1987. **A progress report on the electron microprobe analysis technique for age determination and verification in elasmobranchs.** In R.C. Summerfelt and G.E. Hall (ed.) *The Age and Growth of Fish.* Iowa State University Press, Ames, Iowa. 359-369.
- Cailliet, G.M., L.K. Martin, D. Kusher, P. Wolf and B.A. Welden. 1983a. **Techniques for enhancing vertebral bands in age estimation of California elasmobranchs.** In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks.* Miami, Florida, U.S. 157-166.
- Cailliet, G.M., L.K. Martin, J.T. Harvey, D. Kusher and B.A. Welden. 1983b. **Preliminary studies on the age and growth of blue, *Prionace glauca*, common thresher, *Alopius vulpinus* and shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, sharks from California waters.** In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks.* Miami, Florida, U.S. 179-188.
- Cailliet, G.M., Natanson, L.J. Welden, B.A., and D.A. Ebert. 1985. **Preliminary studies on the age and growth of the white shark, *Carcharodon carcharias*, using vertebral bands.** In J.A. Seigel and C.C. Swift (ed.) *Biology of the White Shark.* Southern Californian Academy of Science, USA. 49-60.
- Cailliet, G.M., K.G. Yudin, S. Tanaka and T. Taniuchi. 1990. **Growth characteristics of two populations of *Mustelus manazo* from Japan based upon cross-readings of vertebral bands.** In: H.L. Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi, (eds.) *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries.* U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. 90. 167 - 175.
- Casey, J.G, H.L. Pratt Jr, and Ch.E. Stillwell. 1985. **Age and growth of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, from the western north atlantic.** MARMAP contribution MED/NEFC. 82-1.
- Casey, J.G. and L.J. Natanson. 1992. **Revised estimates of age and growth of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) from the western north atlantic.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1474-1477.
- Casselmann, J.M. 1974. **Analysis of hard tissue of pike *Esox lucius* L. with special reference to age and growth.** In: T. B. Bagenal (ed.) *The ageing of fish.* Unwin Brothers. Ltd. England. 13-27.
- Casselmann, J.M. 1983. **Age and growth assesment of fish from their calcified structures-techniques and tools.** In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks.* Miami, Florida, U.S. 1-17.
- Castillo-Géniz, J.L. 1991. **Tiburón.** Panorama pesquero. 3: 21-31.
- Castillo-Géniz, J.L. 1992. **Diagnóstico de la pesca de tiburón en México.** INP. Secretaría de Pesca. 76 pp.
- Castro, J.I. 1983. **The sharks of north american waters.** Texas A&M University Press, College Station, Texas. U.S. 180 pp.
- Castro, J.I. 1996. **Biology of the blacktip shark, *Carcharhinus limbatus* of the southeastern United States.** Bulletin of Marine Sciences 59 (3): 508-522.
- Chang, W.Y.B. 1982. **A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 1208-1210.
- Clement, G.J. 1992. **Re-examination of the fine structure of endoskeletal mineralization in chondrichthyans: implications for growth ageing and calcium homeostasis.** Aust. J. Mar. Freshwater Res. 43: 157-181.
- Compagno, L.J.V. 1984. **Sharks of the world. An annotated and ilustrated catalogue of shark species known to date.** Part 2, Carcharhiniformes. FAO Fish. Synop. Rome 125 (4): 251-655.
- Compagno, L.J.V. 1999. **FAO species catalogue. Sharks of the world. An annotated and ilustrated catalogue of shark species known to date.** FAO Fish. Synop. In Press.
- Cruz, M.A. 2000. **Edad y crecimiento del tiburón toro *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) en las aguas de Veracruz y Campeche, México.** Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, México. 65 pp.

- De la Lanza, G.E. 1992. **Oceanografía de Mares Mexicanos**. 1ª edición. AGT editores, México D.F. 596 pp.
- Ferreira, B.P. and C.M. Vooren. 1991. **Age, growth and structure of vertebra in the school shark *Galeorhinus galeus* from Southern Brazil**. *Fish. Bull.* 89: 19-31.
- Garrick, J.A.F. 1982. **Sharks of the genus *Carcharhinus***. NOAA Technical Report NMFS 445. U.S. Dept. Commer. 194 pp.
- Gelsichter, J., E. Cortes, A. Manire, R. Hueter and J.A. Musick. 1997. **Use of calcein as a fluorescent marker for elasmobranch vertebral cartilage**. *Trans. Am. Fish Soc.* 126: 862-865.
- Gelsichter, J., A. Piercy and J.A. Musick. 1998. **Evaluation of copper, iron and lead substitution techniques in elasmobranch age determination**. *Journal of Fish Biology*. 53: 465-470.
- Gruber, S.H. and R.G. Stout. 1983. **Biological materials for the study of age and growth in a tropical marine elasmobranch, the lemon shark, *Negaprion brevirostris***. In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks*. Miami, Florida, U.S. 193-206.
- Halstead, L.B. 1974. **Vertebrate hard tissues**. Wykeham Science Series Publication Ltd. London. 239 pp.
- Ham, A.W. and D.H. Cormack. 1979. **Histopathology of cartilage, bone and joints**. Philadelphia, US. JB Lippincott Co. 966 pp.
- Hoening, J.M. and S.H. Gruber. 1990. **Life history patterns in the elasmobranchs: Implications for fisheries management**. In: H.L. Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi, (eds.) *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries*. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 90: 1-16.
- Holden, M.J. y D.F. Raitt (eds.). 1975. **Manual de ciencia pesquera**. Parte 2. Métodos para investigar los recursos y su aplicación. Documento Técnico. FAO 115. 74 pp.
- Jones, B.C. and G.H. Geen. 1977. **Age determination of an elasmobranch (*Squalus acanthias*) by x-ray spectrometry**. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 44-48.
- Killam, K.A. and G. Parsons. 1989. **Age and growth of the blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, near Tampa Bay, Florida**. *Fishery Bulletin* 87 (4): 845-857.
- Kusher, D.I., S.E. Smith and G.M. Cailliet. 1992. **Validated age and growth of the leopard shark, *Triakis semifasciata*, with comments on reproduction**. *Environmental Biology of Fishes* 35: 187-203.
- Marin, O.R. 1994. **Clave para la identificación de los tiburones del Golfo de México**. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa. Ver. México. 31 pp.
- Martin, L.I. and G.M. Cailliet. 1988. **Age and growth determination of the bat ray *Myliobatis californicus*, in Central California**. *Copeia*. 3: 762-773.
- Mendizábal, O.D. 1995. **Biología reproductiva, crecimiento, mortalidad y diagnóstico de *Alopias vulpinus* (tiburón zorro) y *Carcharhinus limbatus* (tiburón volador); de la boca del Golfo de California al Golfo de Tehuantepec**. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 125 pp.
- Miranda, V.L.A. 1996. **Análisis biológico-pesquero del tiburón azul (*Prionace glauca* Linnaeus, 1758) en Ensenada, Baja California**. Tesis de Maestría, CICESE, Ensenada, B.C. México. 115 pp.
- Moulton, P.L., T.I. Walker and S.R. Saddler. 1992. **Age and growth studies of gummy shark, *Muselus antarcticus* (Günther), and school shark, *Galeorhinus galeus* (Linnaeus), from southern australian waters**. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 43: 1241-1267.
- Natanson, L.J. and G.M. Cailliet. 1990. **Vertebral growth zone deposition in pacific angel sharks**. *Copeia* 4: 1133-1145.
- Officer, R.A. 1995. **Vertebral mineralisation patterns in gummy and school sharks and their utility for age determination**. Doctoral Thesis. The University of Melbourn. Australia. 300 pp.

- Officer, R.A., A.S. Gason, T.I. Walker and J.G. Clement. 1996. Sources of variation in counts of growth increments in vertebrae from gummy shark *Mustelus antarcticus*, and school shark, *Galeorhinus galeus*: implications for age determination. *Can. J. Aquat. Sci.* 53: 1765-1777.
- Parker, H.W. and F.C. Stout. 1965. Age, size and vertebral calcification in the basking shark, *Cetorhinus maximus*. *Zool. Meded.* 40: 305-319.
- Parsons, G.R. 1983. An examination of the vertebral rings of the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Northeast Gulf Sci.* 6 (1): 63-66.
- Parsons, G.R. 1985. Growth and age estimation of the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Copeia*: 80-85.
- Parsons, G.R. 1993. Age determination and growth of the bonnethead shark *Sphyrna tiburo*: a comparison of two populations. *Mar. Biol.* 117: 23-31.
- Pitcher, J.T. and P.J. Hart. 1982. *Fisheries ecology*. Chapman and Hall. London. 197 pp.
- Powers, J.E. 1983. Some statistical characteristics of ageing data and their ramifications in population analysis of oceanic pelagic fishes. In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks*. Miami, Florida, U.S. pp. 19-24.
- Pratt, H.L. and J.G. Casey. 1983. Age and growth of the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, using four methods. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* 40: 1944-1957.
- Pratt, R.L. and J.G. Casey. 1990. Shark reproductive strategies as a limiting factor in directed fisheries, with a review of Holden's method of estimating growth parameters. In: H.L. Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi, (eds.) *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries*. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 90: 97-108.
- Ribot, C.C. 2002. Determinación de la edad del tiburón mako *Isurus oxyrinchus*, capturado en las costas de Baja California Sur, México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 44 pp.
- Ridewood, W.G. 1921. On the calcification of the vertebral centra in sharks and rays. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 210: 311-407
- Schwartz, F.J. 1983. Shark ageing methods and age estimation of scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini*, and dusky, *Carcharhinus obscurus*, sharks based on vertebral ring counts. In: D. Prince and L.M. Pulas (eds.) *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks*. Miami, Florida, U.S. 167-174.
- SEMARNAP. 2000. Anuario estadístico de pesca 1999.
- Simkiss, K. 1974. Calcium metabolism of fish in relation to ageing. In: J. B. Bagenal (ed) *The ageing of fish*. Unwin Bros. England. 1-12.
- Simpfendorfer, C.A. 1993. Age and growth of the australian sharpnose shark, *Rhizoprionodon taylori*, from north Queensland, Australia. *Environmental Biology of Fishes* 36: 233-421.
- Schmid, T.H., F.L. Murru and F. McDonald. 1990. Feeding habits and growth rates of bull shark (*Carcharhinus leucas* (Valenciennes)), sandtiger (*Eugomphodus taurus* (Rafinesque)) and nurse (*Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterra)) sharks maintained in captivity. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*, 5(4): 110-115.
- Smith, S.E. 1984. Timing of vertebral band deposition in tetracycline-injected leopard sharks. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 113: 308-313.
- Sparre, P. y S.C. Venema. 1992. *Introducción a la evaluación de los recursos pesqueros tropicales*. Parte I. Valparaíso, Chile. 250 p.
- Tanaka, S. 1990. Age and growth studies on the calcified structures of newborn sharks in laboratory aquaria using tetracycline. In: H.L. Pratt Jr, S.H. Gruber and T. Taniuchi, (eds.) *Elasmobranchs as living*

- resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries.* U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep. NMFS 90: 89-202.
- Thorson, T.B. and E.J. Lacy. 1982. Age, growth rate and longevity of *Carcharhinus leucas* estimated from tagging and vertebral rings. *Copeia*. 1: 110-116.
- Tolentino, V.A. 1995. Determinación de la edad y crecimiento del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834), (Elasmobranchii, Sphyrnidae) en el Pacífico central mexicano. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 64 pp.
- Tolentino, V.A. 2000. Ecología pesquera del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) en el litoral del estado de Michoacán, México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 142 pp.
- Tovar, A.J. 1995. Biología y pesquería del tiburón puntas negras *Carcharhinus limbatus* (Valenciennes, 1839) de las aguas de Veracruz y Tamaulipas, México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 95 pp.
- Tovar, A.J. 2000. Edad y crecimiento del tiburón puntas negras *Carcharhinus limbatus* (Valenciennes, 1839) en el Golfo de México. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, México. 67 pp.
- Urist, M.R. 1961. Calcium and phosphorus in the blood and skeleton of the elasmobranchii. *Endocrinology* (Baltimore) 69: 778-801.
- Walter, J.P. and D.A. Ebert. 1991. Preliminary estimates of age of the bronze whaler *Carcharhinus brachyurus* from southern Africa. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 10: 37-44.
- Wass, R.C. 1973. Size, growth, and reproduction of the sandbar shark, *Carcharhinus milberti*, in Hawaii. *Pac. Sci.* 27: 305-318.
- Welden, B.A., G.M. Cailliet and A.R. Flegal. 1987. Comparison of radiometric with vertebral band age estimates in four California elasmobranchs. Age and growth in fish. Summerfelt, R.C. Hall G.E. eds. 1987 pp. 301-315.
- Wintner, S.P. and G. Cliff. 1996. Age and growth determination of the blacktip shark *Carcharhinus limbatus*, from the east coast of South Africa. *Fishery Bulletin* 94 (1): 135-144.
- Yudin, K.G. and G.M. Cailliet. 1990. Age and growth of the gray smouthound, *Mustelus californicus*, and the brown smouthound, *M. henlei*, sharks from Central California. *Copeia*. 1: 191-204.