

00528  
45



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIOS CRISTALOQUIMICOS EN CASCARONES DE  
HUEVO DE QUELONIOS: INFLUENCIA MEDIOAMBIENTAL  
SOBRE LA BIOMINERALIZACION.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
MIGUEL HERRERA ROBLEDO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

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.

# ÍNDICE

<b>1 Justificación</b>	05
<b>2 Antecedentes</b>	07
2.1 Las tortugas y sus características únicas	07
2.1.1 Datos generales de las tortugas estudiadas	13
<i>Kinosternon Oaxacae</i>	13
<i>Dermodochelys coriacea</i>	14
<i>Trachemys scripta</i>	15
<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>	16
<i>Lepidochelys olivacea</i>	17
2.2 Cascarones de Huevo	19
2.2.1 Componentes orgánicos del cascarón	22
2.3 Biomineralización	24
2.3.1 La biomineralización y sus perspectivas de estudio	24
2.3.2 La importancia del Carbonato de calcio en los seres vivos	26
2.3.3 Otros biominerales de importancia en la naturaleza	28
2.3.4 Biomineralización Biológicamente Inducida (BIM)	29
2.3.5 Biomineralización Biológicamente Controlada (BCM)	29
2.3.6 Sitios de Biomineralización	30
2.4 La Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y los Biomateriales	31
2.4.1 Principio de la AFM	32
2.4.2 Modo no dinámico de la AFM (Contact mode)	34
<b>3 Objetivos</b>	36
<b>4 Materiales y Métodos</b>	37
4.1 Colecta de los cascarrones	37
4.2 Análisis Mineralógico de los cascarrones	37
4.3 Aislamiento de las proteínas solubles de la matriz (SMP)	37
4.4 Electroforesis	38
4.5 Caracterización microscópica de los cascarrones	38
<b>5. Resultados y Discusión</b>	39
5.1 Colecta de los cascarrones	39
5.2 Análisis Mineralógico de los cascarrones	39
5.3 Aislamiento de las proteínas solubles de la matriz (SMP)	40
5.5 Caracterización microscópica de los cascarrones	48
<b>6. Conclusiones</b>	52
<b>7 Referencias</b>	54
<b>8 Apéndice</b>	58

**Silencio frente a una antigua piedra.**

Estoy aquí, sentada, con todas mis palabras  
como una cesta de fruta verde, intactas  
los fragmentos  
de mil dioses derribados  
se buscan por mi sangre, se aprisionan, queriendo  
recomponer su estatua.

De las bocas destruidas  
quiere subir hasta mi boca un canto  
un olor a resinas quemadas, algún gesto  
de misterios de roca trabajada.

Pero soy el olvido la traición  
el caracol que no guardó el mar  
ni el eco de las más pequeña ola.

Y no miro los templos sumergidos  
sólo miro los árboles encima de las ruinas,  
mueven su vasta sombra, muerden con dientes ácidos  
el viento cuando pasa  
y los signos se cierran bajo mis ojos como  
la flor los ojos torpísimos de un ciego.

Pero yo sé: detrás  
detrás de mi cuerpo otro cuerpo se agazapa  
y alrededor de mi muchas respiraciones  
cruzan furtivamente  
como los animales nocturnos en la selva.

Pero yo no conozco más que ciertas palabras  
en el idioma o lápida  
bajo al que sepultaron vivo a mi antepasado.

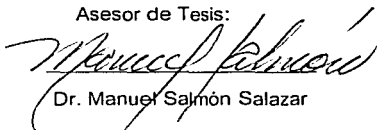
*Rosario Castellanos.*

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. MANUEL DE JESÚS SALMÓN SALAZAR
VOCAL	Prof. PEDRO VALLE VEGA
SECRETARIO	Prof. JOSÉ MANUEL MENDEZ STIVALET
1er SUPLENTE	Prof. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
2do. SUPLENTE	Prof. EDUARDO CUMMING GONZALEZ

Esta TESIS se desarrolló en el Laboratorio 3 del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM

Asesor de Tesis:

  
Dr. Manuel Salmón Salazar

Supervisor Técnico

  
Dr. Abel Moreno Cárcamo

Sustentante:

  
Miguel Herrera Robledo

## Agradecimientos.

Al Dr. Manuel Salmón Salazar, por haber creído siempre en mí además de abrirme las puertas del laberinto extraordinario de la investigación científica. Por darme la oportunidad y los recursos para realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo por permitirme convivir de cerca con la Bioquímica y con sus fronteras además de permitirme el uso de las instalaciones de su laboratorio. Por hacerme comprender el contorno del limbo científico.

A mis amigos *quasi*doctores Juan Pablo Reyes Grajeda, David Jáuregui Zúñiga y César Reyes por sus brillantes y acertados consejos y directrices sobre las metas de este trabajo. También por el apoyo humano y técnico para aterrizarme en los destinos de este estudio.

A mi amigo Eduardo Villarreal por su amistad y sentido del humor además por contagiarme un poco de la alegría que puede tener la investigación científica. Asimismo por tener un trato humano en un mundo maquina. Gracias.

A mi entrañable amigo M en C Carlos Damián Zea por su notable y sincera amistad además de la compañía en tardes difíciles.

A mis amigos Nurit, Ramón, Refugio, Lorena, Martha, Lucila, Maricarmen, Mercedes, Adelma y Gladis porque también hablando y conversando se aprende algo que luego se escribe o se borra.

A la Maestra Martha Harfush y a su equipo de trabajo del Centro Mexicano de la Tortuga, por su inquietud científica y preocupación profesional al proporcionarme los cascarones usados en este estudio así datos importantes sobre la alimentación y biología de las tortugas.

Al Dr. Rafael Acuña-Mesén por su ayuda desinteresada, al enviarme bibliografía crucial para la realización de este trabajo.

A la Ing. Leticia Baños del laboratorio de Difracción de rayos x del Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM por su trabajo con los cascarones usados en este estudio.

Al M en C. Jorge Cárdenas y a todo el personal del laboratorio 2-8 por su apoyo en equipos de cómputo, recomendaciones y también por su amistad.

A la UNAM y al Instituto de Química por proveerme de los medios y conocimientos necesarios para mi formación profesional y humana.

## **Dedicatoria.**

Para mi familia

A mis padres: Arturo y Consuelo.

Y a mis hermanas: Elizabeth y Sofia....

más la cantidad incontable de lazos que puedan emerger de ellos.

## 1. JUSTIFICACIÓN.

---

El conocimiento de la estructura de los cascarones de los huevos de los reptiles contribuye a elucidar de manera más profunda las relaciones que ocurren entre el huevo y el medio ambiente así como proporcionar nuevos conocimientos para el estudio de su fisiología (Acuña-Mesén 2001).

El cascarón del huevo es un sistema en donde la selección natural ha actuado y que por ende muestra con más claridad las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los distintos grupos taxonómicos (Ewert, 1979). Los cascarones de los huevos de los reptiles como lagartos y de los quelonios contemporáneos muestran rasgos muy particulares correspondientes a cada especie que son tanto de utilidad taxonómica y además pueden ser una enorme fuente de desarrollo de nuevos materiales. Por ejemplo, se ha determinado que estos cascarones presentan gran flexibilidad y una extraordinaria capacidad de extenderse al retener agua, por otro lado, pueden ser rígidos y formar estructuras similares a las de los cascarones de los huevos de aves, cuya estructura es comparada con la de acero en concreto reforzado (Silyn-Roberts & R Sharp, 1985, 1986).

En la mayoría de los sistemas biológicos, los organismos producen materiales suaves y duros (o una extraña mezcla de ambos) de naturaleza bioinorgánica que tienen extraordinarias propiedades, las cuales podrían ser aplicadas al diseño de nuevos materiales. Estos compuestos bioinorgánicos son complejos en términos de composición y microestructura, pero sin embargo son altamente ordenados, conteniendo componentes tanto orgánicos como inorgánicos en una intrincada mezcla, por lo que desde hace algún tiempo se ha comenzado a estudiar esta relación para el desarrollo de materiales híbridos orgánicos-inorgánico (Mark, 1995) y sus diferentes aplicaciones en Nanotecnología (Hull, 1981; Chow, 1996), dado que estos compuestos presentan inusuales propiedades fisicoquímicas.

Un punto importante en este proceso en los seres vivos es, que se realiza a condiciones normales, es decir a 25°C y presión atmosférica, con un control estructural reforzado por los sistemas vivientes (Sarikaya, 1994).

Aunque la microestructura única y las propiedades estos biomateriales no son bien conocidos aún, éstos pueden ser una fuente de inspiración en el desarrollo de nuevos materiales sintéticos emulando a los de origen biogénico, dando inicio a una nueva generación de materiales para el desarrollo de nuevas tecnologías.



Un material biológico que por sus cualidades biomecánicas ha despertado el interés de los científicos desde hace tres décadas es el cascarón de los reptiles, en particular el de las tortugas, el que, sin embargo, sólo ha sido caracterizado en algunas especies únicamente en lo referente a su ultraestructura y composición mineral. El cascarón de los quelonios al ser un material con una extraordinaria asociación de componentes inorgánicos y macromoléculas orgánicas, puede servir como un modelo alterno de biomineralización dirigida por una matriz orgánica (biomineralización biológicamente controlada), pero hasta el momento su estudio bioquímico es prácticamente nulo, por lo que se requiere un acercamiento entre los estudios de química inorgánica, bioquímicos y de ciencia de materiales en este trabajo se propone, por primera vez, esta asociación con bases estructurales.

## 2. ANTECEDENTES.

---

### 2.1 Las tortugas y sus características únicas.

Las tortugas han jugado un papel muy importante en la mitología de varias culturas. Algunas tribus de nativos norteamericanos, entre ellos los Iroquois, Seri y Mandanos tenían la creencia de que la tierra estaba soportada sobre la espalda de una tortuga gigante (Jobes, 1961). Mientras tanto, a miles de kilómetros, los chinos consideraban a estos animales como sagrados y emblema de longevidad y sabiduría (Dyson, 1927). Los burmesanos creían que las tortugas eran divinas y por lo tanto eran mantenidas en tanques ubicados dentro de templos en los cuales se les alimentaba en exceso, de acuerdo a James Parsons (1962), aún existen muchos grupos humanos que se rehúsan a comer su carne por considerarlos animales sagrados. Pritchard (1986) describe que aún existen estos templos en la India, Bangladesh, Malasia y Tailandia. Los templos están generalmente localizados sobre ríos e incluyen pequeños santuarios en donde las tortugas son alimentadas a mano por los fieles seguidores. En uno de estos templos, en Chittagong, Bangladesh, se puede encontrar una rara especie de tortuga con un caparazón negro y flexible.

Aunque son numerosas las historias que relacionan a las tortugas con la creación de la tierra, muchas otras hacen referencia a su naturaleza salvaje y su carácter particular. Aún hoy se escriben libros, poemas y ensayos en relación a su apariencia y comportamiento. Una de las más famosas historias del fabulador griego Esopo involucra a una tortuga en competencia con una liebre, relato que ha permanecido a través de generaciones y que confiere cualidades humanas a estos animales.

La primera referencia a las tortugas en la historia antigua refiere al temor del dios egipcio Ra a estos animales. También en Egipto se creía que las tortugas poseían notables conocimientos de medicina natural: comían mejorana silvestre después de haber saboreado una víbora venenosa para literalmente "revivirse". Este conocimiento fue parte de ensayos de Aristóteles; de Lyly, un escritor inglés del renacimiento y del escritor francés Montaigne, (Garfield, 1986)

Los romanos las asociaban con el dios Mercurio y como símbolo de lujo y ostentación ya que su caparazón era muypreciado por los patricios (Toynbee, 1973). La naciente comunidad cristiana de Roma le confirió dos significados contradictorios: por un lado era un animal "hereje" y símbolo del mal en el arte cristiano

mientras que por el otro lado, su silueta era también tomada como símbolo de castidad y del "deber" de las mujeres cristianas a no alejarse de su casa al esperar a su esposo (Garfield, 1986).

#### *El papel de las tortugas en la alimentación.*

Las tortugas marinas gigantes, en especial la verde, jugaron un papel muy importante durante el "descubrimiento" del nuevo mundo debido a que podían permanecer a bordo de los navios por meses sin necesidad de ser alimentadas con lo que se convertían en almacenes para los marinos. Dada la monotonía de la alimentación de la tripulación (carne seca, pan duro y vino) la carne de tortuga además de deliciosa era la cura para el escorbuto (Garfield, 1986). Con las tortugas gigantes de las Galápagos no era distinto, eran los almacenes de los marinos de los barcos balleneros que viajaban por los océanos pacífico e indico (Pritchard, 1986).

Durante los siglos XVI y XVII, debido a los efectos tónicos que produce su consumo, la carne de tortuga verde adquirió un gran valor médico. Era común que los médicos portugueses recetaran a los enfermos de sífilis ir a las Islas Cabo Verde y comer carne de tortuga para así restaurar su salud (Garfield, 1986).

A través de la historia tanto los huevos como la carne de tortuga han sido considerados como afrodisíacos (Parsons, 1962) y hoy en día en muchas partes del mundo son vendidos como tales. En nuestro país el comercio ilegal de estos productos es uno de los principales factores que están mermando la población de tortugas.

La sopa de tortuga es considerada un manjar desde el siglo XVII (Parsons, 1962). Este platillo fue tan estimado en el Reino Unido que fueron importadas cerca de 15.000 tortugas por Londres desde las Islas Caimán. Es en este lugar donde existe la única granja de tortugas verdes en el mundo hoy en día. (Garfield, 1986).

Pese a toda la normatividad que prohíbe su venta, la tortuga es consumida en muchas partes del mundo contribuyendo así a la desaparición de algunas especies.

#### *Las tortugas y la selección natural.*

Galápagos, una palabra del español medieval, era usada para referirse a las tortugas de tierra, por esta razón los aventureros españoles que "descubrieron" estas islas en el pacífico sur, frente a las costas de Ecuador,

nombraron a estas, famosas por sus tortugas gigantes, las Galápagos. En 1835 Charles Darwin visitó estas islas y quedó fascinado con la enorme diversidad de especies y de rasgos en ellas que jamás había visto. Por las noches dibujaba sus recuerdos para desarrollar su teoría de la selección natural, en la cual las tortugas tuvieron un papel esencial. Joseph Wood (1961), historiador estadounidense, relata que las diferencias y similitudes que Darwin notó entre las aves y las tortugas de aquel lugar fueron lo que despertó su interés en la evolución y la influencia de la selección natural sobre ella.

Las tortugas son organismos únicos ya que han experimentado pocos pero importantes cambios durante su existencia en la tierra. A mediados del período Triásico, hace aproximadamente 200 millones de años, las tortugas ya lucían la mayoría de las características que ahora tienen (Garfield, 1986).

#### *Anatomía y clasificación.*

Se cree que las tortugas evolucionaron a partir del *cotylosaurus*, el reptil primitivo a partir del cual se desarrollaron que los modernos reptiles (Garfield, 1986). Sin embargo, uno de los problemas relacionados a la biología de las tortugas es su clasificación: La *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, ha asignado el nombre tortuga para todos los miembros de la familia quelonía, los cuales en ocasiones se nombran *Testudines* o *Testudinata* (Reimer, 1963). En los EUA, el nombre *Tortoise* es usado para describir a las tortugas de tierra de desplazamiento lento. El término Terrapene, una palabra de los indios algonquianos, significa tortuga pequeña y es aplicado a algunas especies de quelonios apreciados por su carne (Parsons, 1986) La palabra terrapene se usa para describir a la mayoría de las tortugas dulceacuicolas así como el término *tortoise* describe a la mayoría de las tortugas de hábitos terrestres. (Enciclopedia Británica, 1985) En Australia los científicos se refieren a todas las tortugas como *tortoise* (Garfield, 1986).

Existen más de 200 especies vivientes dentro del orden *Chelonia*, el cual pertenece a la clase *Reptilia* y a la subclase *Anápsida*. Estos organismos habitan en todos los continentes excepto en la Antártica. Aunque la mayoría de las especies son de hábitos acuáticos o anfibios, algunas son completamente terrestres. Todas poseen un caparazón compuesto de hueso y piel que protege los órganos vitales del cuerpo y a menudo también la cabeza y las extremidades. Este caparazón, el cual es responsable del gran éxito evolutivo de la tortuga en cuanto a adaptación, consiste de una parte alta (el carapacho) y una parte inferior (el plastrón) que están conectadas por ambos lados mediante un puente. La fuerza del carapacho en las especies de caparazón rígido proviene de la fusión de los huesos de la columna vertebral con una capa de huesos en forma de plato cubiertos por una capa más de huesos planos. Las costillas de las tortugas son anchas y planas además de estar también

fusionadas al caparazón. En algunas tortugas, el caparazón posee una articulación móvil, generalmente en el plastrón, que permite al caparazón movimientos hacia arriba y hacia abajo. Esto permite a algunas tortugas recluirse por completo dentro de su caparazón. (Pritchard, 1985)

Los taxonomistas clasifican a las tortugas modernas de acuerdo a la manera en que retraen sus cabezas dentro de sus caparazones (Garfield, 1986). La mayoría de las tortugas pertenecen al suborden *Cryptodira*, el cual involucra a todas las tortugas que retraen su cabeza en un plano vertical. Estos quelonios doblan sus cuellos con una curva en forma de S. Este suborden incluye las tortugas de caparazón blando, las de lodo, las de almizcle (o apesotosas) así como las *tortoises*. Aunque no puede retraer su cabeza, la tortuga Laúd (*Dermodochelys coriacea*), una colosal tortuga marina que alcanza media tonelada y 150 cm, se incluye en este suborden. Es la tortuga más grande de todas las existentes hoy en día.

Dentro de este suborden se encuentran todas las tortugas marinas, desde la tortuga verde, altamente estimada por su carne, hasta la tortuga oliva o golfina (*Lepidochelys olivacea*), conocida por sus masivas visitas a las playas para depositar sus huevos. A este suborden también pertenecen las tortugas gigantes de las Islas Galápagos (Garfield, 1986).

Por otro lado, el suborden *Pleurodira* involucra a las tortugas que retraen su cabeza y cuello sobre un plano horizontal al mover su cuello de un lado a otro (Pritchard, 1986). Se han encontrado fósiles de algunas tortugas terrestres que pertenecen a este suborden sin embargo, todos los miembros de este grupo son tortugas marinas. Se incluyen aquí las tortugas "cuello de víbora", cuyo cuello puede ser mayor de la mitad de la extensión total de su cuerpo.

*El regreso a casa. ¿De donde proviene el sentido de orientación de las tortugas?*

El aspecto más misterioso alrededor del carácter de las tortugas es su sobresaliente habilidad de navegación (Garfield, 1986). Algunas especies nadan hasta 1000 millas o más para depositar sus huevos en pequeñas playas en las que presumiblemente no habían vuelto desde que nacieron entre 10 y 50 años antes. Los investigadores están tratando de determinar la manera en que las tortugas conocen cual es la playa adecuada para la incubación y como discriminan otras playas de características similares además de determinar las técnicas que usan para migrar entre los periodos de alimentación y ovoposición (Garfield, 1986).

Una hipótesis aceptada sobre el "regreso a casa" de las tortugas, es que poseen un mecanismo de memoria fotográfica de las características químicas de su playa natal. Este es un proceso de aprendizaje mediante el cual animales muy jóvenes enfocan y graban en su memoria el primer objeto con el que tienen contacto visual, cinestésico, o auditivo y subsecuentemente seguir ese objeto (Garfield, 1986). Carr, un estudioso de las tortugas, ha sugerido (1984) que las tortugas marinas logran una impresión de su momento de nacimiento que involucra tanto la arena como el agua del mar del medio ambiente en el cual vieron la luz. De acuerdo a esta teoría, la química de la playa natal de la tortuga, es impresa en la memoria y permanece en la tortuga hasta que esta alcanza una madurez sexual unos 10 o 50 años después.

Una vez que las tortugas han detectado las características químicas de su playa natal, deben determinar hacia que dirección deben comenzar a nadar. Algunas teorías sugieren que esta habilidad para nadar se debe a que poseen un mecanismo interno de orientación relativo al campo magnético de la tierra. Investigaciones recientes sobre la habilidad visual de las tortugas marinas han mostrado que poseen una visión muy deficiente bajo el agua, lo que ha fomentado la creencia en la existencia del mecanismo de orientación, y, más aún desde que Kirschvink encontró pequeñas partículas magnéticas (magnetita) dentro del cuerpo de tortugas marinas (1980). Más tarde Anjanette Perry (1982) aisló partículas magnéticas del cerebro de tortuga.

#### *Anidación*

La mayoría de la tortugas marinas ponen solamente sólo una vez cada temporada de reproducción, sin embargo, algunas pueden poner de 3 a 10 veces, regularmente en intervalos de 10-14 días. Los huevos puestos no han sido fecundados en la mayoría de los casos. Pritchard describe que hembras de algunas tortugas han puesto huevos fertilizados algunos años después de su último contacto con un macho (1979).

Una vez que ha finalizado la ovoposición, las hembras se dirigen al mar y, usando sus patas, cubren el foso donde depositaron sus huevos, el cual tiene casi un metro de profundidad. Algunas tortugas pueden depositar hasta 200 huevos (Garfield, 1986). En este proceso, la tortuga secreta lágrimas, las cuales no son de dolor sino el método para eliminar sales minerales de su organismo (Hudson y Lutz, 1985). De regreso al mar la tortuga agita sus extremidades en un intento de borrar el camino hacia su nido y abandona sus huevos para siempre.

### *Nacimiento*

Después de dos meses de incubación, los huevos finalmente se rompen, "una pequeña erupción" de tortugas invade la playa y después de unos instantes de incertidumbre se dirigen hacia el mar. En una revisión sobre la orientación de las tortugas después de su nacimiento, Paul Raymond (1984) concluye que las tortugas al nacer tienen una visión desarrollada que les permite encontrar el agua. Ehrenfel y colaboradores (1983) encontraron que las tortugas jóvenes son inicialmente dependientes de la intensidad de la luz al internarse en el agua. Mrosovsky y Kingsmill (1983) reportaron que las tortugas marinas poseen un mecanismo *Fototropotáctico* para encontrar el mar: Ellas comparan la intensidad de la luz en el horizonte y el balance de brillantez en los ojos para mantener una orientación hacia la luz del horizonte.

### *La relación sexo-temperatura en las tortugas.*

Durante la década de 1970, los investigadores encontraron dependencia entre el género (macho o hembra) de los tortugas con la temperatura del nido. (Bull et al, 1979, 1980) describió que temperaturas calurosas tienden a producir tortugas hembra y temperaturas menores a 27°C permiten el desarrollo de tortugas machos. En un artículo publicado en 1984, Vogt y Bull reportaron que nidos con vegetación cercana producen nacimientos en su totalidad de tortugas machos.

### *Conservación*

Los seres humanos hemos contribuido en muchas maneras a la tragedia de las tortugas. La gran popularidad de la carne y sopa de tortuga, la belleza de sus caparazones y la incidencia de tortugas en bancos de peces y su consecuente pesca, han contribuido a mermar su población, esto sumado al amplio espectro de depredadores naturales que tienen las tortugas jóvenes (desde hormigas y cangrejos hasta perros salvajes, aves, cerdos y tigres de bengala) han hecho de todas las tortugas del mundo una especie en peligro de extinción (Garfield, 1986).

La mayoría de las investigaciones recientes se han enfocado en la conservación. Existen alrededor del mundo varias organizaciones cuyo único propósito es el conocimiento de las tortugas para evitar su desaparición. En nuestro país sobresale el Centro Mexicano de la Tortuga, un museo-instituto de investigación ubicado en el poblado de Mazunte en Pochutla, Oaxaca.

### 2.1.1 Datos generales acerca de las tortugas estudiadas.

*Kinosternon oaxacae*. (*Mocorroy de Oaxaca*, *Tortuga casquito o de lodo*)

El *Morrocroy de Oaxaca* es una tortuga dulceacuicola de ciénaga endémica de México. Su distribución se limita al estado de Oaxaca, en los ríos Colotepec y Tonameca. Estas tortugas son de hábitos semiacuáticos. Pasa la mayor parte del tiempo en el fondo de los lagos y ríos de poca corriente. También las encontramos en el fango en los pantanales y ciénagas, por lo que se les llaman tortugas de fango o tortugas de barro.

Su carapacho logra una longitud de unos 17 cm. El peto tiene dos charnelas. A este morrocroy en inglés se le conoce por "*Oaxacan Mud Turtle*".

El *Morrocroy de Oaxaca* (*Kinosternon oaxacae*) fue descrito por Berry e Iverson en 1980. El siguiente cuadro muestra la taxonomía del *Mocorroy de Oaxaca*. (Frank et al, 1996)

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares - nutrición por ingestión.
Phyla	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal.
Subphyla	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Clase	Reptilia	Reptiles: Vertebrados exotérmicos con pulmones desarrollados
Subclase	Anapsida	Anápsidos
Orden	Testudines	Tortugas
Suborden	Cryptodira	Tortugas Criptodiras
Familia	Kinosternidae	Tortugas de Ciénaga
Género	Kinosternon	Morrocroyes
Especie	<i>oaxacae</i>	<u>Morrocroy de Oaxaca</u>



*Dermochelys coriacea*. (*Tortuga laúd*)

La tortuga Laúd, es marina por lo que la mayor parte del tiempo lo pasa en alta mar, lejos de tierra, aunque es posible verla en mares no muy profundos. Esta tortuga es la más grande que ha logrado sobrevivir hasta nuestros días. El promedio de longitud es de 2 metros, algunos individuos alcanzando los 2.4 m. El peso normal es de 500 Kg, aunque algunos llegan hasta los 800 Kg.

El carapacho es de color oscuro con siete quillas en la parte superior. Está cubierto por piel en vez de los escudos o placas que vemos en la mayoría de las otras tortugas. En las aletas no tiene pezuñas.

Su alimentación consiste de aguas malas o medusas, siendo complementada con crustáceos y moluscos.

La Tortuga Laúd ( Familia Dermochelyidae ) descrita por Vandelli en 1761. En la siguiente tabla muestra la Taxonomía de la tortuga Laúd. (Frank et al, 1996, Ernst et al, 1989).

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares - nutrición por ingestión.
Phyla	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal.
Subphyla	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Clase	Reptilia	Reptiles: Vertebrados exotérmicos con pulmones desarrollados
Subclase	Anapsida	Anápsidos
Orden	Testudines	Tortugas
Suborden	Cryptodira	Tortugas Criptodiras
Familia	Dermochelyidae	Tortuga Laúd: Familia monotípica.
Género	Dermochelys	Tortuga Laúd
Especie	coriacea	<u>Tortuga Laúd</u>

*Trachemys scripta (tortuga resbaladora)*

Estas tortugas acuáticas son originarias del continente americano, se encuentran desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina en zonas subtropicales o tropicales en donde las temperaturas oscilan entre los 26-36°C, habitan en ríos y lagunas así como en pequeños pantanos en donde tienen la posibilidad de asolearse, elemento vital para su supervivencia debido a que son animales de sangre fría, su alimentación en su estado salvaje se compone de peces, crustáceos e insectos cuando son jóvenes y al llegar a la edad adulta, por vegetales.

Son tortugas con el caparazón de color verde en algunos casos dependiendo de la subespecie con líneas de color amarillento, y franjas en las zonas de piel tales como cabeza, cuello, patas. Esta es una tortuga pequeña que alcanza los 60 cm de largo, aunque la mayoría de los especímenes son de menor tamaño.

El caparazón es ovalado -si se mira dorsalmente- bajo de perfil y con una quilla en la parte media poco marcada. El margen posterior del caparazón está débilmente aserrado.

El plastrón es rígido y está unido al caparazón por un puente muy amplio. La cabeza es grande y el hocico levemente protuberante. Las patas son robustas y las membranas interdigitales son extensivamente amplias. El caparazón es café con tonalidades verde oliva, con un patrón de líneas y reticulaciones amarillas encima. Cada escama pleural y vertebral tiene *ocellus* claros con centro oscuro. En individuos jóvenes éstos pueden ser rojos. Tanto la cabeza, como el cuello y las extremidades son grises verduscas y hasta cafés con bandas distinguibles amarillas.

Los machos son de menor tamaño con la cola más larga y con la punta redondeada, así como uñas muy largas en las patas delanteras, las hembras son de mayor tamaño y carecen de uñas largas en las patas delanteras, así como la cola es de menor tamaño y con terminación en forma de flecha, alcanzan la madurez sexual a partir de los 5 años.

La Tortuga resbaladora fue descrita por Schoepff, J.D. 1792. En la siguiente tabla muestra la Taxonomía de esta tortuga (Frank et al, 1996, Ernst et al, 1989).

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares - nutrición por ingestión.
phyla	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal.
Subphyla	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Clase	Reptilia	Reptiles: Vertebrados exotérmicos con pulmones desarrollados
Subclase	Anapsida	Anápsidos
Orden	Testudines	Tortugas
Suborden	Cryptodira	Tortugas Criptodiras
Familia	Emydidae	Tortugas Semi Acuáticas
Genero	Trachemys	Tortuga Resbaladora
Especie	scripta	<u>Tortuga Resbaladora</u>

*Rhinoclemmys pulcherrima.* (*Terrapene rayado, tortuga sabanera, tortuga de bosque mexicana*)

Esta especie de tortuga es endémica de México y únicamente puede ser encontrada en el sur de Oaxaca y en el sureste de Guerrero.

Esta es una tortuga pequeña que alcanza como máximo 20 cm de longitud del caparazón. Los machos son de menores dimensiones que las hembras, tienen el plastrón cóncavo y la cola más delgada y larga que la hembra. Los adultos de esta especie son muy agresivos entre sí. Pese a ser tímidos y a que usan el medio acuático, tienen interés también de permanecer en tierra que es donde se alimentan, generalmente de flores, vegetales, frutas, lombrices, pescados pequeños e insectos.

Se muestra a continuación su taxonomía. (Frank et al, 1996, Ernst et al, 1989)

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares - nutrición por ingestión.
Phyla	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal.
Subphyla	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Clase	Reptilia	Reptiles: Vertebrados exotérmicos con pulmones desarrollados
Subclase	Anapsida	Anápsidos
Orden	Testudines	Tortugas
Suborden	Cryptodira	Tortugas Criptodiras
Familia	Emydidae	Tortugas Semi Acuáticas
Genero	Rhinoclemmys	Terrapene
Especie	puicherrima	<u>Terrapene rayado</u>

Lepidochelys olivacea (*Tortuga golfina, tortuga oliva, tortuga lora*)

Esta es la más pequeña de las tortugas marinas, además de ser la más abundante alrededor del mundo (Sahoo et al. 1998); alcanza una longitud de 71 cm y un peso que no excede los 45 Kg. Posee de 6 a 8 pleurales a cada lado. El caparazón aplanado tiene forma de corazón, visto dorsalmente, es alto hacia el puente y aserrado en su extremo posterior.

El primer par de pleurales están en contacto con la cervical. Doce de las catorce marginales están en el caparazón. Tanto el puente como el plastrón van del blanco verdusco a un tono amarillento. El plastrón presenta dos bordes longitudinales.

La piel es de color oliva en el dorso y más clara en la parte inferior. Una de las características morfológicas más interesantes de esta especie, es la presencia de poros glandulares cerca del margen posterior de cada uno de los 4 pares de escamas inframarginales. No se conoce su función pero se presume que pueden ser las salidas de conductos de secreciones de feromonas, que actúan como elementos de reconocimiento.

Se distribuye en las aguas tropicales de los océanos Pacífico e Índico, en México se puede encontrar arribazones masivas en la playa El Escobillon en el sur de Oaxaca y en menores proporciones en Mazatlán y otras playas del pacífico mexicano.

Se encuentra especialmente en zonas de aguas marinas poco profundas y protegidas, aunque a veces son vistas en el mar abierto. La tortuga golfinia es una especie preferentemente carnívora, se ha visto que se alimenta principalmente de crustáceos, moluscos y pequeños peces.

Depositán de 40 a 130 huevos por nido. La incubación toma de 50 a 60 días. En algunas regiones forman parte importante de la economía debido a el uso gastronómico de los huevos.

Se presenta a continuación la taxonomía (Frank et al, 1996, Ernst et al, 1989).

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares - nutrición por ingestión.
Phyla	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal.
Subphyla	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Clase	Reptilia	Reptiles: Vertebrados exotérmicos con pulmones desarrollados
Subclase	Anapsida	Anápsidos
Orden	Testudines	Tortugas
Suborden	Cryptodira	Tortugas Criptodiras
Familia	Cheloniidae	Tortugas Marinas
Genero	Lepidochelys	Tortuga
Especie	olivacea	<u>Tortuga oliva o golfinia</u>

## 2.2 Cascarones de Huevo.

El cascarón es un compartimiento microambiental para miles de embriones en desarrollo de un gran número de especies y en este respecto constituyen una amplia estrategia evolutiva a través de la filogenia. Esta multicapa no sólo provee protección al embrión sino que también regula la transferencia de humedad, de gas y de iones metálicos y, en algunos huevos calcáreos, como el de las aves y los reptiles, es una fuente de calcio para la formación del esqueleto del embrión (Arias *et al.* 1993), esto también ha sido demostrado en quelonios. Un estudio con Tortuga Laúd, realizado por Sahoo y colab. (1998), ha concluido que el calcio del cascaron se transmite al embrión, en total 130mg de calcio pasan del cascaron al embrión: Tan pronto como se consume la totalidad del calcio del albumen/yema, el embrión comienza a utilizar las reservas de calcio del cascaron (esto a partir del día 40 de desarrollo, 60% de la necesidades de calcio del embrión se transportan desde el cascaron). Hace ya más de 100 años que van Nathusius realizó las primeras caracterizaciones de la estructura de los cascarones de huevos de aves demostrando que formaban una estructura compleja, altamente ordenada, compuesta de múltiples membranas orgánicas y matrices calcificadas (Arias *et al.* 1993). Los primeros estudios sobre ultraestructura registrados con cascarones de huevo de quelonios datan de 1976 cuando Solomon y Baird estudiaron las diferencias de los cascarones antes y después de la ovoposición en la tortuga gigante *Chelonia midas* (Solomon *et al.* 1976).

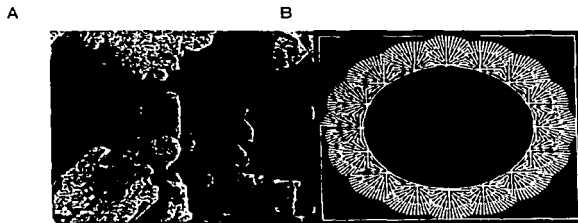
El conocimiento sobre la ultraestructura de la cáscara de los huevos de los reptiles puede contribuir a concebir una visión más profunda de su fisiología y sobre los procesos de intercambio que se dan entre el huevo y el ambiente. Además ayuda a plantear con más claridad las relaciones filogenéticas y evolutivas, entre los distintos grupos taxonómicos (Ewert, 1979). El cascarón de los huevos de los reptiles escamosos y de las tortugas contemporáneas muestra rasgos muy particulares correspondientes a cada especie que son de utilidad taxonómica. Por ejemplo, se ha determinado que sus cascarones pueden ser flexibles o rígidos usualmente están compuestos por una capa calcárea que descansa sobre una red de macromoléculas que pueden modificar la formación de la fase mineral, e influenciar las propiedades mecánicas del cascarón, mediante la formación de una red proteínica fibrosa. El material cristalino de los huevos de los reptiles escamosos se encuentra, por lo general, en forma de calcita mientras que los de los quelonios es aragonita (Silyn-Roberts y Sharp, 1985, Packard *et al.* 1984, Acuña-Mesén, 2001)

El carbonato de calcio, componente principal de la porción mineral del cascarón, existe en tres diferentes polimorfos en la naturaleza: calcita, vaterita y aragonita. En condiciones normales de presión y temperatura la calcita es la forma predominante ya que es termodinámicamente más estable, por lo que es posible encontrarla en los cascarones de aves y reptiles, sin embargo, es común encontrar aragonita en quelonios (Silyn-Roberts y Sharp, 1995, Packard *et al*, 1986, 1984, Sahoo, 1998). Se han reportado casos excepcionales, como en la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) cuyo cascarón abarca los tres polimorfos de carbonato de calcio (Sahoo *et al*, 1996). Los factores que influyen en la forma y la fase del cristal son varios, entre ellos se encuentra la temperatura, la presión y la velocidad de la mineralización, además de la matriz orgánica que soporta al cascarón (Solomon, 1999).

El calcio es uno de los constituyentes más importantes de los huevos y embriones de los vertebrados. El desarrollo del embrión de estas especies tiene tres fuentes (yema, cascarón de huevo y la sangre), para satisfacer sus requerimientos de crecimiento. Los cascarones de huevo como fuente de calcio han sido estudiados en aves, cocodrilos y tortugas (Sahoo *et al*, 1998). Los reptiles tienen un inusual metabolismo de calcio durante su desarrollo embrionario debido a que tienen calcio en sus estructuras de protección y adaptación como lo son las escamas en los lagartos y los caparazones en los quelonios. En la tortuga golfinia el calcio es el componente inorgánico más abundante en el cascarón ( $\text{CaCO}_3$  como polimorfo aragonita), sin embargo, también presenta contenido de magnesio, azufre y potasio en trazas.

Ewert (1979) propuso para las observaciones macroscópicas de los cascarones de los huevos de las tortugas, una clasificación en tres categorías: 1. Cascarones apergamizados y tendencia a expandirse al absorber agua en la incubación (Ej. *Dermochelys coriacea* y *Lepidochelys olivacea*); 2. Cascarones frágiles o quebradizos, no expansibles durante la incubación (Ej. *Kinosternon oxaccae*, y *Rinoclemmys pulcherrima*) y 3. Cascarones duros y expansibles (Ej. *Chelydra serpentina*). Sin embargo, para poder establecer comparaciones más precisas entre géneros y especies, también deben realizarse microscópicamente estudios exhaustivos. A este nivel se observa que tanto los cascarones rígidos como los flexibles están compuestos por bloques estructurales o unidades de cascarón. En los huevos con cascarón duro, las unidades calcáreas colindan muy estrechamente y existen muy pocos poros. En contraste, los de cascarón flexible exhiben gran número de espacios o poros en el material cristalino (Packard y Hirsch 1986). Los cascarones frágiles son una biocerámica ubicado entre estas dos características. Existen descripciones sobre la ultraestructura de la cáscara de los huevos de varias especies de quelonios: por ejemplo, *Lepidochelys olivacea* fue estudiada mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM) determinando que su cascarón presenta centros de nucleación y crecimiento del carbonato de calcio en forma de agujas (Sahoo *et al*, 1996). De la familia Kinosternidae, se ha descrito el

cascarón del huevo de siete especies: *Sternotherus minor*, *Kinosternon flavescens*, *K. baurii*, *K. hirtipes*, *K. alamosae*, *K. leucostomum* y *K. scorpioides* (Packard, *et al.* 1984; Packard y Hirsch 1986, Acuña-Mesén 1990) y en la familia Emydidae se describieron los cascarones de *Pseudemys scripta* (Acuña-Mesén 1989). Químicamente sus cascarones están compuestos por carbonatos de calcio, principalmente en la forma de aragonita (Silyn-Roberts y Sharp 1985), tienen un centro común o núcleo de cristalización del cual radian estructuras en forma de agujas. Esto ha sido determinado por observaciones de microscopía electrónica o por análisis de difracción de rayos X de polvos (Packard *et al.* 1982, Acuña-Mesén 1987 y 1990). También la porosidad en las superficies externa e interna podría ser un rasgo importante en la caracterización de la ultraestructura de estos cascarones (Acuña-Mesén, 2001) En los kinosternídeos y probablemente en otras tortugas las diferencias se deben además al espesor de la cascaron y al ondulamiento de su superficie externa (Packard *et al.* 1984).



Figuras 2.2 A Imagen obtenida mediante SEM de cascarones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* que muestra cristales de aragonita B Modelo esquemático del cascaron de las tortugas marinas en donde se aprecian los sitios de nucleación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 2.2.1 Componentes orgánicos del cascarón.

Hay evidencia de desarrollo de tejido mineralizado por seres vivos desde el periodo cámbrico hace 540 millones de años (Borelli et al, 2003), subsecuentemente la mineralización se distribuyó en todo el reino animal (esqueleto, caparazón, cascarones de huevo, dientes) asumiendo un papel estructural y funcional muy importante en relación a la postura, protección y masticación. Aunque las estructuras calcificadas (materiales biogénicos por excelencia) son usados como evidencias biológicas de este proceso, su biomineralización es todavía poco comprendida.

Estudios bioquímicos han demostrado que la matriz orgánica del cascarón de gallina (*Gallus gallus*), que es aproximadamente el 2% del peso total de este biomaterial, esta constituida principalmente por proteínas (70%) y polisacáridos ricos en grupos sulfatados (11%) (Baker y Balch, 1962; Heaney y Robinson, 1976; Abatangelo et al 1978). Se ha sugerido que esta fracción pudiera jugar un importante papel regulador de varias etapas del crecimiento mineral (Addadi y Weiner, 1992; Hinckle et al, 1992, 1993, 1995; Gautron et al, 1993, 1995; Pines, 1995). Estos componentes orgánicos pueden modificar la formación del carbonato de calcio al proveer de sitios de nucleación (epitaxia) o bien mediante la inhibición y/o envenenamiento de ciertos planos cristalográficos del mineral (Wheeler y Skies, 1989). Silyn-Roberts y Sharp (1986) propusieron una posibilidad alternativa: "Las proteínas de la matriz pueden influenciar las propiedades mecánicas de un material cristalino mediante la formación de una intrincada red fibrosa, similar a la de acero en concreto reforzado"

También en aves se ha demostrado que las células uterinas secretan los componentes de un fluido acelular el cual se encuentra sobresaturado en carbonato de calcio y contiene además, los precursores de la matriz (Nys et Al, 1999)

Las proteínas de la matriz son el componente orgánico más estudiado en los cascarones de aves, estas proteínas se dividen principalmente en dos grupos según su solubilidad en ácidos (Gautron et al, 1996): las extraminerales (SMP) y las intraminerales (IMP). Al ser la solubilidad un prerrequisito para la caracterización proteinica, la fracción insoluble ha recibido poca atención, sin embargo hay estudios en donde las IMP han podido ser disueltas en clorhidruro de guanidina y se han caracterizado mediante técnicas bioquímicas como electroforesis SDS-PAGE (Gautron et al, 1996)

De acuerdo a su función fisiológica, existen cuatro tipos de proteínas en la matriz orgánica de los cascarones de gallina común: 1) Proteínas de la clara, ovotransferrina (80kDa), ovalbumina (45kDa), lisozima

(15kDa) y ovomucoide; 2) Proteínas del esqueleto de la matriz, osteopontina; 3) Proteínas del suero, albúmina sérica, y; 4) Proteínas específicas del cascarón, ovocleidina 17, ovocleidina 116, ovocalexina 21, 32 y 36. (Dominguez Vera et al, 2000; Nys, comunicación personal).

Aunque su papel en la biomineralización del cascarón del huevo no está bien elucidado se reconoce que estas macromoléculas biológicas juegan un papel trascendental en las propiedades de este biomaterial. Actualmente se estudia el efecto de estas proteínas en la cristalización de carbonato de calcio *in vitro* (Reyes Grajeda *et al*, 2002; Dominguez Vera *et al*, 2000) para comprobar su afinidad e influencia en el crecimiento mineral.

## 2.3 BIOMINERALIZACIÓN.

Este apartado es una traducción directa y libre de los primeros capítulos del libro *Biomíneralización: principios and concepts in Bioinorganic materials chemistry* del Ph D. Stephen Mann, catedrático de la Universidad de Bristol en el Reino Unido. Esta traducción se realizó en virtud de obtener una mejor comprensión del tema dada la simplicidad que este profesor le confiere a los conceptos de biomineralización.

### 2.3.1 La biomineralización y sus perspectivas de estudio.

La Biomineralización estudia el proceso mediante el cual los organismos vivos forman sólidos inorgánicos, cristalinos o amorfos, en estrecha asociación con una matriz orgánica dentro de sistemas biológicos. Desde el nano-mundo de las proteínas acarreadoras de compases magnéticos en bacterias hasta las estructuras macroscópicas de los corales, el marfil, huesos, esmalte, conchas de ostras y cascara de huevo, la biología se ha mezclado con un nuevo tipo de química que estudia tanto la síntesis como la construcción de materiales duros y suaves para el diseño de componentes orgánico-inorgánicos con características funcionales. Este proceso que permite el crecimiento de esas pequeñas estructuras de base inorgánica constituye biomineralización.

La biomineralización involucra la extracción selectiva y adaptación de elementos del medio ambiente local así como su incorporación hacia estructuras funcionales bajo un estricto control biológico. Este proceso tiene una posición esencial en la ciencia de la vida debido a sus diferencias con otras transformaciones biológicas. Hay evidencia – con la formación de estructuras llamadas estromatolitas- de que los procesos biológicos involucrados en la mineralización inorgánica se llevan a cabo desde hace más de 3500 millones de años (la tierra tiene aproximadamente 4200 millones de años de antigüedad). Tanto la vida como el medio ambiente han cambiado fundamentalmente con el advenimiento de la biomineralización, la cual llegó a gran escala hace 570 millones de años cuando partes esqueléticas se volvieron comunes. Todas estas estructuras biomineralizadas aparecen, sin embargo, como el resultado de combinaciones químicas que controlan rigurosamente la precipitación de sólidos inorgánicos para una precisa función biológica.

La proliferación tanto en tipo como en número de caparzones y microesqueletos hechos de minerales como carbonato de calcio, fosfato de calcio o sílica, desde hace millones de años ha tenido implicaciones en escala global. La biomineralización tiene estudios importantes en varias áreas de ciencias de la tierra como son:

- El ciclo global de los elementos
- Sedimentología
- Fossilización (Paleontología y Taxonomía)
- Química marina
- Geoquímica

Por ejemplo, elementos como el calcio, hierro, carbono, fósforo y silicio han recirculado en la tierra por millones de años a través de complejas transformaciones sucesivas que tienen involucrada la biomineralización en etapas críticas. La acumulación mineral se manifiesta a escala geológica en los depósitos de cal rocosa en Dover, en el sur de la Gran Bretaña, rocas sedimentarias son el resultado del proceso de calcificación de organismos unicelulares que vivieron hace 200 millones de años.

La evolución del proceso de biomineralización ha proveído a los organismos de construir materiales de gran dureza y de menor costo energético, por ejemplo, la construcción de  $\alpha$ -quitina como material de protección en insectos. La biomineralización ofrece a los organismos no solo soporte estructural sino además resistencia mecánica. En la naturaleza han aparecido gran variedad de funciones biológicas relacionadas con la biomineralización, como son:

- protección
- movimiento
- capacidad de corte
- sensibilidad gravitacional, óptica y magnética
- almacenamiento

Es adecuado mencionar que estas funciones altamente ordenadas aparecieron como consecuencia de la evolución de tejidos especializados, y que estas estructuras deben ser integradas a un cuerpo que tiene un hueco que ellos deberán llenar con funcionalidad y/o soporte. De manera clara, la importancia fundamental de tejidos mineralizados significa que hay también consecuencias patológicas cuando el proceso de biomineralización no se realiza adecuadamente. Debido a su gran importancia, el estudio de la biomineralización patológica (piedras en los riñones y en vías urinarias, cálculos dentales, sedimentación mineral en las arterias, etc) es un área de notable crecimiento los últimos años.

Desde hace dos décadas, la atención de la biomineralización se ha enfocado desde una perspectiva química, primero como Química bioinorgánica y más recientemente, como Química de biomimética de materiales. Para los químicos bioinorgánicos, la biomineralización representa una extensión a gran escala de la interrelación entre los procesos biológicos y la química inorgánica. Mientras que la química de biocoordinación se enfoca

principalmente entre las atracciones entre átomos metálicos y sus ligandos a nivel de la esfera de coordinación, la biomineralización documenta la química entre átomos inorgánicos (sitios de inicio de nucleación, planos cristalográficos, etc) y numerosos ligandos embebidos en superficies orgánicas como proteínas, lípidos y carbohidratos. La investigación en biomineralización en el contexto de la química bioinorgánica incluye:

- La caracterización estructural y la composición de los biominaerales.
- La comprensión de las propiedades funcionales de los biomateriales.
- La elucidación del proceso mediante el cual macromoléculas y estructuras orgánicas controlan la síntesis, construcción y organización de materiales basados en componentes inorgánicos.

A un nivel más genérico, la biomineralización es de vital importancia –junto con otros campos de estudio como la química supramolecular- en el desarrollo de un paradigma moderno de la química basado en el concepto de que las interacciones moleculares pueden ser integradas en sistemas con muy altos niveles de organización y dinamismo.

### 2.3.2 La importancia del carbonato de calcio en los seres vivos.

De los 25 elementos esenciales que requieren los organismos vivos para sobrevivir: H, C, O, Mg, Si, P, S, Ca, Mn, Fe son constituyentes comunes de los más de 60 minerales biológicos. Dentro de ellos, el calcio tiene un lugar especial debido a que es el componente principal de las estructuras esqueléticas como los dientes y los huesos (HPA, hidroxapatita) y los caparazones (carbonato de calcio). La razón de esta diferencia no está conocida, sin embargo, en ambos casos, el mineral inorgánico está íntimamente asociado con un complejo ensamblaje orgánico de macromoléculas –la matriz orgánica- que es de una importancia fundamental en las propiedades mecánicas del tejido

Tanto el carbonato como el fosfato de calcio tienen altas energías para mantener su estructura cristalina y baja solubilidad además de ser termodinámicamente estables en medios biológicos. En contraste, los polimorfos hidratados, como el oxalato y el sulfato de calcio son ligeramente más solubles y por lo tanto menos comunes. En general, la precipitación de sales de calcio provee un efectivo medio de control sobre la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en fluidos biológicos. Este proceso ayuda al mantenimiento de la Homeostasis que requiere concentraciones estables de calcio en el medio intracelular.

### Carbonato de calcio –calcita y aragonita.

Existen seis carbonatos de calcio cuya composición es igual pero su estructura tridimensional es totalmente distinta: calcita, aragonita, vaterita, carbonato de calcio monohidratado, carbonato de calcio hexahidratado y carbonato amorfo. De esos polimorfos, sólo dos forman estructuras termodinámicamente estables –calcita y aragonita- que son extensamente depositados como biominerales.

### Vaterita y carbonatos de calcio amorfos.

Aunque la mayoría de los carbonatos de calcio que se forman en los sistemas vivos tienen estructuras de calcita y aragonita, algunos organismos tienen vaterita. Este polimorfo es el menos estable termodinámicamente y rápidamente se transforma en calcita o aragonita en solución acuosa. Esta transformación ocurre en las espículas de algunas criaturas marinas llamadas *ascidians* en donde su presencia puede estar relacionada como soporte estructural de defensa contra algunos depredadores. La vaterita también ha sido observada en dos especies de peces.

El carbonato de calcio amorfo se forma en las hojas de algunas plantas principalmente como almacén de calcio. Aunque este material es inestable en sistemas inorgánicos debido a su transformación en solución acuosa, el biomineral parece ser estabilizado debido a la absorción de macromoléculas biológicas como polisacáridos en la superficie sólida.

La tabla siguiente, ejemplifica las funciones biológicas de los polimorfos más comunes y estables además de su incidencia en los organismos vivos.

Tabla 2 3 2. Biominerales de Carbonato de calcio (Modificada de *Biominalization*, Mann, 2001)

Mineral	Formula	Organismo	Localización	Función Biológica
Calcita	CaCO <sub>3</sub>	Coccolithophoros	Pared celular	Exoesqueleto
		Foraminífera	Caparazón	Exoesqueleto
		Trilobites	Lentes ópticos	Visión
		Moluscos	Caparazón	Exoesqueleto
		Crustáceos	Cutícula	Soporte mecánico
		Aves	Cascarones de huevo	Protección
Mg-calcita	(MgCa)CO <sub>3</sub>	Mamíferos	Oído interno	Monitor gravitacional
		Octocorales	Espículas	Soporte mecánico
		Equinodermos	Caparazón	Protección
			Espinas	
Aragonita	CaCO <sub>3</sub>	Corales Escleractinianos	Pared celular	Exoesqueleto

		Moluscos	Caparazón	Exoesqueleto
		Gastrópodos	Dardos de conquista	Reproducción
		Cefalópodos	Caparazón	Protección
		Pescados	Cabeza	Monitor gravitacional
		Tortugas	Cascarón de huevo	Protección
Vatenta	CaCO <sub>3</sub>	Gastrópodos	Caparazón	Exoesqueleto
		Ascidianos	Espículas	Protección
Amorfo	CaCO <sub>3</sub> ·nH <sub>2</sub> O	Crustáceos	Cutícula	Soporte mecánico
		Plantas	Desechos	Almacén

### 2.3.3 Otros biominerales de importancia en la naturaleza.

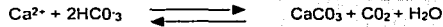
La tabla 2.3.3 muestra otros biominerales distribuidos en la naturaleza.

Tabla 2.3.3 Biominerales (Modificada de Biomineralization, Mann, 2001)

Mineral	Fórmula	Organismo	Localización	Función Biológica
Gypsum	CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Peces	Estatoconia	Sensor de gravedad
Celestita	SrSO <sub>4</sub>	Achantaria	Celular	microesqueleto
Barita	BaSO <sub>4</sub>	Loxedes	Intracelular	Sensor de gravedad
		Xenophyophores		Desconocido
		Chara	Estatolitos	Sensor de gravedad
Dolomita	MgCO <sub>3</sub>	<i>M. edulis</i>	Caparazón	Soporte mecánico
Wedelita	CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Plantas/fungi	Hojas/raíces	Almacenamiento de calcio
Vedelita	CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Plantas/fungi	Hojas/raíces	Almacenamiento de calcio
Silica	SiO <sub>2</sub> · nH <sub>2</sub> O	Diatomeas	Pared celular	Exoesqueleto
		Choanoflagelados	Intracelular	Protección
		Radiolarianos	Intracelular	Microesqueleto
		Crisófitas	Pared celular	Protección
		Limpetos	Dientes	Masticación
		Plantas	Hojas	Protección
Magnetita	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Bacteria	Intracelular	Magnetotaxis
		Quitones	Dientes	Masticación
		Atún/salmón	Cabeza	Navegación magnética
Geolita	α - FeOOH	Limpetos	Dientes	Masticación
Lepidocrocita	γ - FeOOH	Esponjas	Filamentos	Desconocido
		Quitones	Dientes	Masticación
Ferrhidrita	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	Animales/plantas	Ferritinas	Almacén proteínico
		Quitones	Dientes	Precursor de fase
		Castor/Roedores/peces	Superficie dental	Soporte mecánico
	+ fosfato	Bacteria	Ferritinas	Almacén proteínico
		Pepino de mar	Piel	Soporte mecánico

### 2.3.4 Mineralización biológicamente inducida (BIM).

En la mineralización biológicamente inducida, los minerales inorgánicos son depositados mediante precipitación, la cual aumenta las interacciones secundarias entre varios procesos metabólicos y el medio ambiente circundante. Por ejemplo, en cierto tipo de algas verdes, los carbonatos de calcio son precipitados a partir de soluciones saturadas de bicarbonato de calcio mediante una remoción metabólica de dióxido de carbono durante la fotosíntesis, de acuerdo al siguiente equilibrio,



De manera similar, la extrusión de productos metabólicos a través o dentro de la pared celular de la bacteria puede resultar en una precipitación biológicamente inducida de varios minerales inorgánicos con la subsiguiente reacción con los iones metálicos exógenos.

Una característica distintiva de este tipo de biomineralización es que generalmente los minerales forman estructuras sobre superficie de la célula en donde permanecen firmemente unidos a ella. En muchos casos, células completas permanecen totalmente incrustadas dentro de los depósitos minerales. Algunos componentes de la pared celular –como lípidos, proteínas y polisacáridos- pueden influenciar el proceso de mineralización al actuar como superficies generales de precipitación. Además, los sitios específicos en la pared celular están a menudo involucrados debido a que se encuentran en regiones de flujo metabólico o, como en el caso de formación de hielo en una bacteria, tienen altas concentraciones de agregados proteínicos que son activos durante la nucleación

Los biominerales formados mediante BIM no tienen un estricto control celular, y como consecuencia de esto, el tamaño, la forma, la estructura, composición y organización de las partículas minerales son poco homogéneas y pobremente definidas.

### 2.3.5 Mineralización biológicamente controlada. (BCM)

En contraste con la BIM, la mineralización biológicamente controlada es el resultado de un proceso altamente dirigido que produce huesos, caparazones, conchas, dientes y cascarones de huevo que tienen funciones biológicas específicas. Los materiales formados por este proceso, son distinguidos por sus propiedades cristalográficas reproducibles y específicas, las cuales incluyen:



- uniformidad en el tamaño de partícula
- estructuras y composiciones bien definidas
- altos niveles de organización espacial
- Morfologías complejas
- Textura y agregación controladas
- Orientación cristalográfica preferencial
- Ensamblajes altamente ordenados sobre estructuras jerárquicas.

La BCM es rara en organismos unicelulares como algas y protozoarios pero extremadamente común en organismos multicelulares. Entonces, la BCM involucra una regulación especializada de la deposición mineral y resulta en materiales funcionales con propiedades cristaloquímicas bien definidas y específicas.

### 2.3.6 Sitios de biomineralización.

La biomineralización se lleva a cabo en cuatro principales sitios biológicos:

- Epicelular –en la pared celular, (BIM)
- Intercelular –en los espacios entre células empacadas muy cercanas (BIM/BCM)
- Intracelular –dentro de compartimentos en la célula (BCM)
- Extracelular –Sobre o dentro de una red macromolecular insoluble fuera de la célula (BCM)

Para el adecuado control biológico de la mineralización se requiere de una red compleja de macromoléculas además de una serie de factores fisicoquímicos que involucran delineación espacial, difusión limitada en el flujo iónico, regulación química y superficies orgánicas para regular la nucleación. Requiere además mecanismos de control morfológico y construccional para dar soporte mecánico al tejido mineralizado.

## 2.4 La Microscopía de Fuerza Atómica y los Biomateriales.

Desde su aparición en 1986, la microscopía de fuerza atómica (AFM) ha cambiado el estudio de las ciencias naturales de acuerdo a su contribución al progreso en la comprensión de la estructura y función de la materia condensada (Jandt, 1998). La AFM es hoy en día parte del equipo estándar en cualquier laboratorio de desarrollo e investigación encargado de la caracterización, diseño o ingeniería de materiales e interfaces (Jandt, 2001). Asimismo la AFM ha encontrado numerosas aplicaciones en las ciencias biológicas basada en su habilidad de explorar muestras bajo una gran variedad de condiciones ambientales (Kaas et al, 1997; Colton, 1997; Gaub, 1997). Por ejemplo, la descripción de biomoléculas en solución acuosa con resolución atómica no fue posible sino hasta la introducción de esta microscopía y su celda de fluidos (Drake, 1989; Weisenhorst, 1991).

La principal aplicación de la AFM es la descripción topográfica de alta resolución de superficies de materiales en los que incluyen metales (Orizaka et al, 1999), polímeros (Jandt et al, 1993), cerámicas (Baretzky et al, 1996), biomoléculas (Klinov et al, 1998) y células (DeRose et al, 1998). Cuando se usan superficies rígidas y ultradelgadas, esta técnica permite alcanzar una verdadera resolución a nivel atómico (Ohnesorge et al, 1993). El uso de la celda de fluidos en AFM permite una observación detallada, en tiempo real y en solución acuosa, de fenómenos como el plegamiento de las proteínas (Oberhauser, 1999). Debido al gran número de modos de operación que la AFM permite, es posible obtener diferentes detalles estructurales y de propiedades de la muestra estudiada. La AFM y sus subtipos miden propiedades de la muestra como la topografía de la superficie (Binnig et al, 1986), las características de fricción de un material mediante microscopía de fuerza friccional/lateral (FFM/LFM) (Mate et al, 1987), la composición química de la superficie lateral mediante el uso de Microscopía de fuerza química (CFM) (Frisbie et al, 1994), diferencias en elasticidad usando la Microscopía de fuerza de modulación (FMM) (Mairwald et al, 1991) y también las propiedades magnéticas con el uso de microscopía de fuerza magnética (Grutter et al, 1992).

La resolución única de la mayoría de las técnicas de AFM esta basada en las ultrafinas puntas de AFM (agujas con *radii* típico de 4-60nm) soportadas en un muelle o *cantilever* flexible y precisos piezoelementos cerámicos que permiten que la muestra pueda ser explorada en el plano *x-y* con precisión sub-nanométrica. Los piezoelementos se mueven en dirección *z*, para mantener constante la fuerza entre la punta y la muestra. Las puntas de AFM "barren" sobre la superficie de la muestra y el AFM almacena las interacciones entre la punta y la superficie. Estas interacciones incluyen la repulsión electrostática y las fuerzas de van der Waals descritas por el potencial Lennard-Jones, las fuerzas capilares y de fricción (Jandt 2001).

Las características nanomecánicas y nanoconformacionales de las moléculas pueden ser estudiadas mediante la cuantificación de curvas de fuerza-distancia de las moléculas unidas a otra o a la punta del AFM. A menudo más de una molécula es soportada a la punta del AFM al realizarse estas experimentaciones (Jandt 2001).

Los métodos de AFM comparten importantes necesidades en ciencia de biomateriales. Los biomateriales pueden definirse como materiales no-viables usados en ciencias biomédicas, tratando de realizar interacciones y afinidad estructural con los sistemas biológicos (Williams, 1990). Los científicos de biomateriales tienen el reto de encontrar relaciones en la estructura y las propiedades de los materiales en todas las escalas posibles. Esto requiere la disminución del tamaño de las estructuras usadas como unidades funcionales en sistemas biomateriales como los implantes cardiovasculares, la ingeniería de los tejidos o la comprensión de los principios de biocompatibilidad. El científico de biomateriales se encuentra interesado especialmente en la estructura, la textura de la superficie, las propiedades químicas y mecánicas de los materiales así como en la interacción de los biomateriales con la materia orgánica. Algunas de estas propiedades pueden ser mensuradas con métodos tradicionales de microscopía, sin embargo dado el amplio espectro de cualidades que permite medir el AFM, esta técnica microscópica tiene asegurado mucho tiempo por delante de investigación original (Jandt, 2001).

#### 2.4.1 Principio de operación de la AFM.

De manera contraria a los microscopios óptico y electrónico, el AFM no requiere el uso de vidrios o lentes magnéticos para producir imágenes de una muestra sin embargo si utiliza una delgada punta (o aguja). De hecho la resolución del AFM depende mayoritariamente de la forma de la punta (Weisendanger, 1995). Una punta de AFM consiste de una estructura piramidal de silicio o de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (radio típico de 10nm para las de silicio y de 20-60 para las de nitruro de silicio) soportada en un muelle (*cantilever*) con una constante específica de elasticidad. El *cantilever* defleja en dirección Z sobre la superficie de la muestra durante el barrido topográfico. La figura 1 muestra el principio fundamental de este proceso. Un fotodiodo (fotodetector) de cuatro segmentos detecta la deflexión del *cantilever* a través de un haz electrónico dirigido sobre él y reflejado desde la parte posterior del *cantilever*. Una computadora procesa la señal eléctrica diferencial del fotodiodo obtenida desde cada punto de la superficie y genera una señal retroalimentada por el piezoescaner para mantener una fuerza constante en la punta. Esta información es transformada en una imagen topográfica de la superficie. Las principales fuerzas involucradas en la deflexión del *cantilever* son repulsiones electroestáticas y van der Waals de atracción entre los átomos de la punta y los de la superficie de la muestra. Es por esta cualidad que la AFM es también conocida como microscopía de fuerza de barrido (Jandt, 2001). En la práctica, otras fuerzas, como las capilares o

electroestáticas de atracción, pueden también contribuir sobre los datos obtenidos de la imagen, lo cual a menudo complica la interpretación de los datos de AFM.

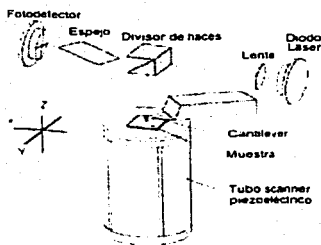


Figura 1. Esquema de un AFM

En el comienzo del proceso de captura de imagen, la punta es acercada, o bien mantenida encima unos 10nm, de la superficie del material que va a ser analizado. El contacto físico o la cercanía de la punta y la superficie de la muestra permiten interacciones físicas específicas en donde las fuerzas de van der Waals tienen lugar. Debido a que las fuerzas entre estos dos materiales decrecen rápidamente con la distancia que los separa, la resolución lateral de 0.2 y horizontal de 0.001nm no son alcanzadas por otros métodos de microscopía de barrido (Jandt, 2001)

Asumiendo que las energías de enlace en muestras unidas iónicamente son menores de 10eV y de 10 meV para las fuerzas de van der Waals en cristales orgánicos y tomando en cuenta que las fuerzas de repulsión actúan a partir de una distancia  $\Delta x = 0.02\text{nm}$ , la fuerza de interacción  $F$ :

$$F = -\Delta U/\Delta x$$

podría ser menor a  $10^{-7} \text{ N/m}$  para enlaces iónicos y menor  $10^{-11} \text{ N/m}$  para enlaces de van der Waals (Binning et al, 1986). Esos valores definen los requerimientos de fuerza aplicada soportada por la punta de AFM y por lo tanto la constante de fuerza del cantilever. Los cantilever flexibles de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  utilizados en biomateriales suaves tienen constantes de fuerza que oscilan de 0.0006 a los  $2 \text{ Nm}^{-1}$  que les ayudan a minimizar la fuerza aplicada por el AFM sobre la muestra. Las frecuencias de resonancia típicas de los muelles son de 3-120 kHz. Los ángulos de inclinación de las puntas piramidales de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  o silicio son generalmente 55 y con puntas cuyo radio oscila entre

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

20 y 400 nm permitiendo que la punta resbale sin presión sobre superficies rugosas. Modos diferentes de operación del AFM pueden requerir diferentes tipos de puntas. Un gran número de sistemas *cantilever*-punta con un gran intervalo de constantes de elasticidad se encuentran disponibles, lo cual permite elegir el sistema adecuado para la muestra analizada (Jandt, 2001).

El segundo componente específico de un AFM es un escáner piezoeléctrico, a menudo en forma de tubo (Binning et al. 1986b). Este escáner convierte las señales eléctricas, enviadas desde el control electrónico del AFM, en movimiento mecánico de barrido en dirección lateral de la muestra. La mayoría de los piezoescáner son producidos de cerámicas de zirconio y titanio (PZT). Estos aparatos deben ser calibrados cada dos meses para permanecer en estado óptimo de funcionamiento. Esta calibración se realiza con placas de grafito pirolítico orientado (HOPG) o de mica. La medición de distancias atómicas de estas muestras son entonces comparadas con valores conocidos por otros métodos y el escáner es calibrado si es necesario. Los escáner de tubo largo responden de manera no lineal a bajos voltajes (Weisendanger, 1995). El software de la computadora control del AFM corrige esta tendencia no lineal.

Durante el proceso de barrido la punta detecta cambios locales en las propiedades físicas de interés convirtiendo en una imagen la medición de las propiedades físicas de la muestra. En algunos sistemas la punta esta unida al piezoescáner mientras que en otros es la muestra la que esta unida a la unidad "piezo", permitiendo movimiento relativo de la punta y la muestra en ambos casos. Los piezoescáner son construidos en forma de tubos que consisten de un gran número de segmentos que permiten un movimiento de barrido bidimensional en un plano  $x$ - $y$  así como movimiento en dirección  $z$  que permite variación en la distancia entre la punta y la muestra. Al final es necesario mantener las distancias y las fuerzas elegidas para el análisis, el AFM tiene un mecanismo de retroalimentación que se encarga de este control. La parte electrónica del AFM consiste de una computadora y una unidad de control que se usan en la adquisición y procesamiento de señales (Jandt, 2001).

#### 2.4.2 Modo no dinámico del AFM (Contact mode)

El AFM puede operar en diferentes modos, sin embargo para estudios con biomateriales el más usado es de fuerza constante o no dinámico. En el modo de fuerza constante, la fuerza (que es proporcional a la deflexión del *cantilever* en dirección  $z$ ) entre la punta y la superficie de la muestra es mantenida constante mediante un *loop* de retroalimentación electrónica. En este modo de operación, la punta permanece en contacto físico con la muestra. Este modo es también conocido como de contacto. Una imagen topográfica superficial de la muestra que se crea a partir de la deflexión del *cantilever* requiere mantener constante la fuerza aplicada sobre la

superficie. El monitoreo de las señales recibidas desde el fotodetector y la permanencia de esta señal al nivel otorgado se realizan mediante el *loop*. Este sistema de retroalimentación (feedback) transmite esta señal al componente z del piezoescáner, que mantiene la fuerza constante mediante movimientos adecuados en dirección z.

El modo contacto puede usarse para analizar muestras de gran dureza y estabilidad que no puedan ser afectadas por la fricción que la punta aplica a la muestra. Sin embargo, el modo de fuerza constante no es siempre el medio adecuado para la aplicación de la AFM en biomateriales, especialmente cuando biomoléculas muy débiles son analizadas. La magnitud de las fuerzas aplicadas en este modo son del orden de nN pero pueden variar de acuerdo a las características de los muelles (Jandt, 2001).

### 3. OBJETIVOS.

---

#### GENERAL.

- Realizar estudios bioquímicos y estructurales en cascarrones de huevo en 5 especies de quelonios para identificar las proteínas solubles de la matriz del cascarrón (SMP) y la naturaleza mineral de ese biomaterial así como obtener datos topográficos de su capa externa mediante un estudio microscópico que permitan obtener datos importantes acerca de la biomineralización en estos sistemas biológicos.

#### PARTICULARES.

- Identificar, mediante técnicas físicas, el tipo de estructura cristalina presente en los cascarrones.
- Desarrollar un método de aislamiento e identificación de las proteínas solubles de la matriz orgánica (SMP) de los cascarrones.
- Obtener datos estructurales y topográficos de la capa externa del cascarrón de los quelonios mediante técnicas de microscopía de fuerza atómica.
- Proponer vías de formación de los agregados minerales en relación al medio ambiente y a sus propias características bioquímicas.
- Discutir, con bases estructurales, la posibilidad de incorporación de este sistema como modelo alternativo de biomineralización en relación directa con el modelo estudiado en cascarrón de aves.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Colecta de los cascarones.

Se usaron en este trabajo cascarones de huevos recién eclosionados. Los cascarones corresponden a las siguientes tortugas: golfinia (*Lepidochelys olivacea*), Laúd (*Dermochelys coriacea*), Sabanera (*Rhinochelymys pulcherrima*), Casquito (*Kinosternon oxacae*) y Jicotea (*Trachemys scripta*).

Las muestras fueron proporcionadas por la M en C. Martha Harfush, investigadora del Centro Mexicano de la Tortuga ubicado en el poblado de Mazunte en Pochutla Oaxaca.

Hasta el momento de los análisis minerales y bioquímicos, las muestras se mantuvieron en refrigeración.

### 4.2 Análisis Mineralógico de los cascarones.

Los minerales cristalinos en los cascarones fueron determinados mediante Difracción de Rayos X en polvos. Este estudio se realizó en un Difractómetro de rayos X en el Instituto de Materiales de la UNAM con el aparato de difracción Bruker-axs D8-Advance, con el software Diffplus B\_S y la base de datos ICDD.

### 4.3 Aislamiento de proteínas solubles de la matriz del cascarón (SMP).

Los cascarones limpios fueron molidos y pulverizados hasta obtener un polvo fino. Trescientos mg fueron suspendidos en 8ml de una solución de ácido acético al 10% y agitados durante 12 horas a 4 °C. La fracción soluble e insoluble se separaron mediante centrifugación a 16 000 rpm durante 40 minutos. El sobrenadante se dializó contra agua en membranas de diálisis de 3.5kDa de corte (Spectrum laboratories, USA) durante 72 horas a 4°C con dos litros de agua que se cambió en cinco ocasiones. El dializado fue concentrado hasta 1ml mediante ultrafiltración con membrana de 3kDa de corte molecular para que finalmente las SMP fueran precipitadas con TCA.



#### 4.4 Electroforésis.

Las SMP fueron sometidas a Electroforésis bajo condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel concentrador fue 4.5% poliacrilamida y el gel de resolución 10%. Las muestras liofilizadas fueron diluidas en 5 $\mu$ l de buffer de muestra (5% p/v 2-mercaptoetanol, 2.3% SDS, 62.4 mM Tris-HCl, 0.02% azul de bromofenol, 10% glicerol, pH = 6.7). Los geles fueron teñidos con el colorante coloidal Coomassie R (Sigma-Aldrich, EUA).

#### 4.5 Caracterización microscópica de los cascarones.

La caracterización estructural de los cascarones se realizó en el laboratorio del Dr Abel Moreno Cárcamo en el departamento de Bioquímica del Instituto de Química UNAM, mediante un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) *Multimode* con un controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA) utilizando puntas de nitruro de silicio con una constante de fuerza de 0.6 N/m en el modo contacto con velocidades de entre 0.5-5 Hz con 512 puntos por línea de barrido, lo cual corresponde a 2 minutos de captura por imagen.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Colecta de los Cascarones.

La importancia taxonómica, la ecológica y el *habitat* de cada tortuga fueron los criterios usados para la elección de las especies estudiadas en este trabajo. Al ser animales en peligro de extinción, ofrecen áreas de estudio limitadas sin embargo, su aportación puede ser enorme.

Siguiendo la clasificación propuesta por Ewert (1979) los cascarones de las tortugas laúd y golfinia corresponden a los cascarones apergamizados que al absorber agua se expanden mientras que los de las tortugas dulceacuicolas (casquito, sabanera) corresponden a la categoría de cascarones rígidos y frágiles que son incapaces de absorber agua por lo se rompen fácilmente. Aunque la tortuga jicotea es dulceacuicola, su cascarón presenta también tendencia a apergamizarse sobre si y algunas propiedades físicas similares a los de las tortugas marina como la coloración y la flexibilidad. Esto nos llevo a hacer una distinción de dos grupos de afinidad para nuestro trabajo.

Se analizaran por separado los resultados de los cascarones de las tortugas marinas y de las dulceacuicolas tomando como puente de relación el cascarón de *Trachemys scripta*.

### 5.2 Análisis mineralógico de los cascarones.

La presencia de materiales inorgánicos cristalinos en los cascarones fue determinada mediante Difracción de Rayos X de polvos. La siguiente tabla muestra los resultados de esta determinación.

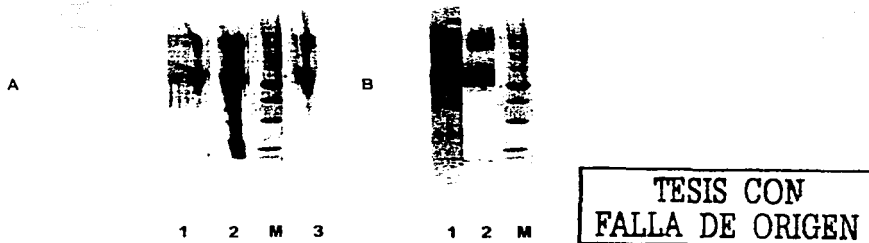
Tabla 5.2 Análisis mineral de los cascarones de huevo

Tortugas dulceacuicolas			Tortugas maritimas				
<i>K. oaxacae</i>		<i>T. scripta</i>	<i>R. pulcherrima</i>	<i>D. conacea</i>		<i>L. olivacea</i>	
Aragonita	96.6%	Aragonita	91.2%	Aragonita	90.6%	Aragonita	10%
Cuarzo	2.4%	Cuarzo	7.2%	Vadolita	5.4%	Material amorfo	90%
Calcita	1%	Calcita	1.6%	Calcita	3.8%		

Los difractogramas de estas muestras pueden ser revisados en el apéndice de este trabajo.

### 5.3 Aislamiento de SMP y SDS-PAGE

Los gels de Electroforesis llevados a cabo a condiciones desnaturalizantes y reductoras fueron teñidos con el colorante coloidal Coomassie R (Sigma-Aldrich, EUA). Las siguientes figuras muestran los gels de electroforesis.



Figuras 5.3a y 5.3b. La Figura A muestra el perfil electroforético (SDS-PAGE) de las proteínas solubles de la matriz (SMP) de las tortugas dulcícolas *Trachemys scripta* (1) *Rhinoclemmys pulcherrima* (2) y *Kinostemon oxacaec* (3). el carril marcado con M corresponde a los marcadores de peso molecular cuyas bandas, de abajo a arriba, corresponden a 15,20,25,37,50,75,100,150 y 250kDa. La figura B presenta la electroforesis SDS-PAGE de las tortugas marinas *Dermochelys coriacea* (1) y *Lepidochelys olivacea* (2). el carril M corresponde a los marcadores de peso molecular detallados en la figura A.

#### Tortugas marinas.

Los resultados sobre la composición mineral de las tortugas marinas corresponden a lo reportado en la literatura especializada, los cascarones de huevos de la tortuga *Lepidochelys olivacea* están compuestos en su totalidad por carbonato de calcio, presente como polimorfo aragonita (Salomon y Baird 1976, Baird y Solomon 1979) mientras que en cascarones de *Dermochelys coriacea* el carbonato de calcio esta presente en sus tres polimorfos, información que corresponde a lo reportado por Sahoo (1996).

El polimorfo más estable del biomineral carbonato de calcio es la calcita. Debido a sus propiedades cristalóquímicas, la calcita provee de una mejor protección térmica que la aragonita y por esta razón, la mayoría de los moluscos de aguas frías tienen en sus caparazones tanto calcita como aragonita (Lowenstam, 1954). La tortuga golfina (*Dermochelys coriacea*) es una tortuga que pasa la mayor parte de su vida en alta mar (Ernst y Barbour, 1989), la incidencia de calcita en la estructura del cascaron de sus huevos podría estar relacionada con

las bajas temperaturas a las que esta expuesta ya que es un polimorfo que juega un papel importante en la regulación térmica, un factor importante en la protección del embrión. Por otro lado, la incidencia del polimorfo más inestable del  $\text{CaCO}_3$ , la vaterita podría estar directamente relacionada a dos factores principales: a la naturaleza de los compuestos que forman la matriz orgánica del cascarón y a la combinación temperatura/presión de los mares en que transcurre su existencia, esto es, su tiempo de persistencia a determinada profundidad. Se ha encontrado vaterita en un gastrópodo que habita en un lago muy frío ( $-20^\circ\text{C}$ ) en Eslovenia (Medakovic et al, 2002), esto podría ser indicativo de que temperaturas bajas pueden inducir cambios físicos en la estructura del carbonato de calcio dentro de los sistemas vivos. Otro ejemplo, en el gastrópodo subterráneo *Zospeum alpestre*, debido a su localidad y a su medio ambiente con una temperatura anual alta y estable, contiene en la capa interior de su concha 5% de calcita mientras que la misma especie que habita en una localidad con una menor temperatura y con una mayor oscilación térmica contiene 37% de calcita (Medakovic et al, 1995). Este fenómeno podría repetirse en los cascarones de tortugas marinas trabajados en este estudio: Al disminuir la temperatura ocurren cambios en el arreglo espacial del carbonato de calcio en estos organismos, al requerirse protección contra la temperatura del medio exterior, la aragonita podría cambiar su conformación hacia un polimorfo más estable. La calcita, es posible que durante ese cambio, debido a las condiciones de presión y/o profundidad, ocurra la formación de vaterita, inestable termodinámicamente pero favorecida a altas presiones. Este estrés metabólico inducido por los cambios climáticos puede o no obedecer las reglas clásicas de crecimiento mineral ya que se desconoce el papel de las proteínas y los proteoglicanos del cascarón en el fenómeno de biomineralización en estos sistemas.

Por otro lado, la tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*), habita en las aguas cálidas de los océanos pacífico e indico. Se distribuye especialmente en zonas de aguas marinas poco profundas y protegidas (Ernst y Barbour, 1989). La presencia de aragonita como único material cristalino sugiere que a condiciones más o menos normales de presión y temperatura ( $25^\circ\text{C}$  y 1atm) la maquinaria orgánica del cascarón induce únicamente la formación de aragonita y son las condiciones ambientales (y el estrés metabólico) las que podrían involucrarse en los cambios en la precipitación y cristalización de los otros polimorfos del carbonato biogénico. Fallini et al (1996) confirmaron que los cationes divalentes, particularmente el  $\text{Mg}^{2+}$ , al estar presentes en soluciones de  $\text{CaCO}_3$  favorecen la formación de aragonita. Se ha comprobado que en algunos caracoles, un incremento en la concentración de magnesio en la solución es directamente proporcional al incremento en la concentración del magnesio en el caparazón y por lo tanto se incrementa la concentración de aragonita en la estructura mineral en *M. edulis*. (Lorens y Bander 1980). Es posible que durante la formación del cascarón en todas las tortugas que tengan aragonita como componente mayoritario haya una cantidad mayor de magnesio en relación a los sistemas cuyo principal componente es la calcita, como en los cascarones de aves.

Esta bien establecido que los organismos vivos "reflejan" ritmos exógenos y/o endógenos de acuerdo al medio ambiente y que la mineralogía y la composición de la estructura calcificada son afectadas tanto por factores fisiológicos como medioambientales (Medakovic et al, 2002). Los factores involucrados en la precipitación de polimorfos de carbonato en los cascarones incluyen una completa interacción entre los organismos y el medio ambiente, los iones inorgánicos, los materiales orgánicos solubles, la actividad enzimática, otras macromoléculas, etc. Sin embargo, de acuerdo al perfil electroforético realizado en este estudio, en ambas especies de tortugas marinas parece haber homología en peso en las SMP del cascarón (proteínas de 14, 51 y 55kDa) por lo que las diferencias en la conformación de la capa calcárea de estos biomateriales podrían ser consecuencia de la influencia medioambiental como en el caso un gastrópodo subterráneo estudiado por Medakovic (1995). Tampoco se descarta la influencia de los iones magnesio en la formación de aragonita dentro del oviducto de estas tortugas así como de la fracción insoluble del cascarón que no se estudia en este trabajo

Siguiendo la lógica de las deducciones anteriores podría descartarse la influencia de la alimentación como un factor de peso en la formación de determinado polimorfo en estos cascarones; la alimentación es importante como suplemento efectivo de calcio, iones inorgánicos y metales indispensables para la actividad enzimática como el cobre pero no hay evidencia que confirme su influencia sobre la formación o cambio sobre los polimorfos en estos sistemas.

La gran cantidad de material amorfo presente en los cascarones de tortuga golfiná se deben a que la muestra no pudo ser pulverizada en su totalidad y al tener partículas grandes la técnica no pudo realizarse de la mejor manera ya que Solomon *et al.* que reportaron la composición de estos cascarones en 1976, no registraron otro mineral cristalino en esas estructuras.

En cascarones de gallina (*Gallus gallus*), existen cinco proteínas específicas del cascarón que forman parte de la red fibrosa que confiere sus propiedades mecánicas, la ovocleidina 17 (OC-17), la ovocleidina 116 (OC-116), las ovocaixinas 21, 32 y 36. (Dominguez Vera et al, 2000, Nys, comunicación personal), además de otras proteínas como lisozima (15kDa), ovalbúmina (45kDa) y ovotransferrina (80kDa). El perfil electroforético de ambas tortugas es muy similar, presentan dos bandas muy marcadas en 51 y 55 kDa además de una tenue banda en 14kDa que se presenta más marcada en la tortuga golfiná. La tortuga laud presenta también una banda de más de 250kDa

Las bandas de 51 y 55kDa son parte de las SMP de varios materiales calcificados de organismos marinos. En un estudio reciente, Borelli y colab. (2003) se realiza una comparación electroforética de las SMP de otolita en peces, corales, y otros organismos marinos con un extracto SMP de cascarones de gallina, aunque no abunda en la discusión sobre estas proteínas, en la electroforésis comparativa realizada (en condiciones muy similares a las de este estudio) se ilustra la presencia de bandas muy marcadas entre 50 y 60 kDa. La presencia de estas proteínas relacionadas con biomateriales de calcio en organismo marinos sugiere que el medio ambiente marino y sus peculiares características de salinidad, presión y temperatura pueden influir en la conformación mineral de los biominerales que se forman en organismos que habitan en él. Esto, obviamente, involucraría también a las tortugas marinas.

La banda de 14kDa podría ser una proteína homóloga a la lisozima, una macromolécula que confiere estructura a los cascarones de aves. Esta proteína es abundante en la membrana que delimita el cascaron y la clara del huevo, además también los cristales de carbonato de calcio sufren modificaciones al crecer en su presencia por lo que su papel en la biomineralización ha sido sugerido como importante. Sin embargo, algunos autores sugieren que su presencia se debe a sus propiedades antimicrobianas para proteger al embrión (Hinckle et al, 2000). Si la proteína de 14kDa que se encuentra en los cascarones corresponde a la lisozima, el cascarón de huevos de tortuga sería el medio adecuado para estudiar su influencia en la cristalización de los carbonatos de calcio ya que las SMP no son tan abundantes como en otras especies. No se descarta tampoco que la presencia de lisozima corresponda a un factor de protección contra bacterias dado que las condiciones de anidación pueden favorecer el crecimiento bacteriano.

Aparentemente, la biomineralización del cascarón de las tortugas marinas esta influenciada en gran medida por el medio ambiente y es este quién provocaría cambios inusuales en la composición mineral de estos biomateriales, además, dada la "simplicidad" de la red proteínica soluble de esos materiales, al parecer la cantidad de magnesio y otros iones presentes en el agua del mar podrían también influenciar la formación predominante de aragonita en estas biocerámicas.

La aparente simplicidad del perfil electroforético de estos biomateriales podría permitir el desarrollo de modelos de biomineralización dirigida por una matriz orgánica "sencilla" ya que con sólo tres proteínas se guía un intrincado polimorfismo de carbonatos de calcio. Esta bioformación mineral es otra muestra de la avanzada ingeniería de materiales que se encuentra en la naturaleza.

Esta aparente simplicidad puede ser solamente una parte de un sistema más complejo ya que se desconocen los fenómenos que ocurren en el oviducto de estas tortugas, además de que también es desconocido el papel de la fracción insoluble del cascarón.

#### Tortugas Dulceacuícolas.

A nivel macroscópico, los cascarones de la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima* son muy similares a los de *Gallus gallus*: blancos y rígidos, rompibles y esféricos, con varios poros visibles. Fue el único cascarón que fue soluble totalmente en la solución de ácido acético. El cascarón de los huevos de esta tortuga de hábitos semiacuáticos presenta una biomineralización extremadamente compleja tanto en su composición orgánica como mineral. Aunque una gran parte de su estructura mineral (85%) esta compuesta por los dos carbonatos de calcio más estables y biogénicos, el resto corresponde a una estructura mineral ampliamente difundida en el reino vegetal (Mann, 2001), el oxalato de calcio dihidratado o vedelita.

Que el cascarón de esta tortuga tenga una parte principal de aragonita puede estar relacionado con lo observado en las tortugas marinas, la maquinaria bioquímica para la formación del cascarón dentro del oviducto de las tortugas favorece su precipitación dirigiendo su crecimiento (tal vez por la cantidad de iones Mg). Por lo tanto la presencia de aragonita y calcita podría considerarse "normal" en un cascarón. Debido a su naturaleza anfibia, la presión en su entorno oscila de acuerdo a sus hábitos, puede estar sometida a un aumento de presión al colocarse en el fondo de una laguna (en donde a veces permanece enterrada) o estar en condiciones ambientales de presión y temperatura en la orilla de aquella mientras se alimenta. Lo que aparentemente carece de lógica es la presencia de vedelita, un mineral de rara incidencia en el reino animal. En los cascarones de tortugas marinas sólo hay tres bandas en el perfil electroforético, el cascarón de esta especie tiene una cantidad mayor de SMP (nueve proteínas. bandas muy concentradas en 15,17, 23, 50 y 55kDa, bandas tenues en 24, 33, 41 y 170 kDa)

Los valores de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en cascarones de huevo de *Rhinoclemmys pulcherrima* podrían ser homólogas en peso a varias proteínas presentes también en cascarones de aves y que pueden tener relación con la formación de calcita en ese biomaterial: hay bandas en 17 (OC-17), 21 y 33 (ovocalixinas 21 y 32) y 45 (ovalbúmina) (Reyes Grajeda, 2002; Nys, comunicación personal). El perfil electroforético presenta también las tres bandas encontradas en los cascarones de las tortugas marinas (55, 51 y 15kDa) y que, al menos con la evidencia encontrada en este trabajo acerca de que estas proteínas podrían estar

involucradas en la formación de aragonita en esos biomateriales, sólo restan dos proteínas que podrían relacionarse con la inusual presencia de vedelita, las correspondientes a 41 y 170kDa.

La vedelita es oxalato de calcio dihidratado cuya fórmula mínima es  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . Es un mineral de rara incidencia en los animales, se ha encontrado en patologías dentales de ovejas (Unmack & Rowles, 1963), pero es abundante en tejidos vegetales como reserva de sales o como mecanismo de defensa (Mann, 2001). Es posible que la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima*, cuya alimentación en edad adulta corresponde solamente a vegetales, tenga en su sistema cantidades altas de oxalato de calcio proveniente de esa alimentación vegetal, y que, debido a este estrés metabólico, inducido por el medio ambiente y la alimentación en este caso, se produzcan proteínas en respuesta a estos cambios cuya función principal sea el transporte y la precipitación de la vedelita en el cascarón, quizás confiriéndole propiedades de dureza o porosidad o como una forma de salida metabólica para el exceso de oxalato de calcio debido a su dieta vegetal. Estas proteínas podrían ser las correspondientes a las bandas de 41 y 170kDa.

Aparentemente, la complejidad de este sistema biomineral presenta relaciones entre la fracción orgánica y la fracción mineral en estrecha asociación con la alimentación y el medio ambiente. Este sistema de biomineralización dirigida ejemplifica que este fenómeno tiene dependencia tanto del medio ambiente como del estrés metabólico; cuando un componente de la maquinaria falta, o no está en las concentraciones adecuadas, se sintetizan proteínas (en este caso de 41 y 170kDa) que proveen un camino alternativo de mineralización que refleja los ritmos exógenos y/o endógenos de acuerdo a las condiciones ambientales (Medakovic et al. 2002) y que los organismos toman del medio ambiente algunos minerales que más tarde serán usados (o adaptados) para convertirse en tejidos mineralizados que conferirán estructura y propiedades, en este caso el oxalato de calcio como parte de un cascarón que debería estar compuesto en su totalidad por carbonato de calcio.

Para el caso de los cascarones correspondientes a la tortuga *Kinosternon Oaxacae* los resultados son muy diferentes. La composición mineral del cascarón es básicamente aragonita (96%) con algunas pequeñas proporciones de cuarzo y calcita (2.4 y 1%). Las SMP encontradas presentan bandas en 47, 51 y 55kDa. Esto corrobora que la hipótesis de que la maquinaria involucrada en la formación del cascarón de huevo de tortugas induce la precipitación de aragonita como componente mayoritario y que son las condiciones ambientales y el estrés metabólico las causantes del polimorfismo y de la formación de cristales minerales poco usuales para esas estructuras.



Los cascarones de esta tortuga son muy similares en morfología y color a los de codorniz, tienen manchas y su estructura es más bien frágil. Las bandas electroforéticas de 51 y 55 corresponden a las de las otras especies de tortugas marinas y la composición mineral en donde la aragonita prevalece. Sin embargo, ni en las propiedades biomecánicas ni la geometría del cascarón, son similares. Los de las tortugas marinas son biomateriales flexibles que se hidratan mientras que los de esta tortuga son muy rígidos y no pierden dureza con el agua. Tal vez esto este relacionado con la cantidad de proteínas que forman la red que confiere las propiedades.

Para observar el progreso del aislamiento de las SMP, se recurrió al uso de la espectroscopia, mediciones de los grupos aromáticos de las proteínas a 280nm. Con cantidades iguales de cascarón y con la misma técnica de aislamiento, la absorbancia del cascarón de la tortuga laúd, fue de 0.750 mientras que el de kinoster fue de 0.256. Aunque para que estos valores tengan validez se debe realizar un ensayo con albúmina sérica bovina (BSA), su relación puede ser útil para la explicación siguiente. Además Acuña-Mesén asegura que la tortuga laúd contiene una capa proteínica muy "gruesa" sin incidencia en otras tortugas (Comunicación personal, 2003).

Según Ewert (1979) los cascarones de las tortugas se pueden clasificar microscópicamente en tres categorías cascarones apergaminados, como los de las tortugas laúd y gollina; cascarones frágiles o quebradizos, como *Kinosternon oaxacae* y, cascarones duros y expansibles como los de *Chelydra serpentina*. Pero para poder establecer comparaciones más precisas entre géneros y especies, también debe realizarse microscópicamente un estudio exhaustivo. A este nivel se observa que tanto los cascarones rígidos como los flexibles están compuestas por bloques estructurales o unidades calcáreas del cascarón. En los huevos con cascaron duro, las unidades calcáreas colindan muy estrechamente y la penetran muy pocos poros. En contraste, los de cascaron flexible exhiben gran número de espacios o poros en el material cristalino (Packard y Hirsch 1986) Los cascarones frágiles de *Kinosternon oaxacae* son un biomaterial ubicado entre estas dos características. Es decir, los cascarones de las tortugas marinas estudiadas tienen más espacios entre las capas calcáreas mientras que en los de la tortuga kinoster, por ejemplo, las capas minerales están más cercanas. Estos parches, podrían contener mayor cantidad de proteína "libre" que confiere las propiedades de flexibilidad del cascaron. Esta proteína la llamé libre porque podría no estar vinculada a la aragonita sino que podría fungir como enlace entre varias capas calcáreas. Esta proteína debe ser de la misma naturaleza que las involucradas con el mineral ya que en la electroforésis no hay presencia de otras bandas. En el caso de la tortuga kinoster, al estar el mineral colindando más estrechamente podría no requerir ese soporte estructural y por lo tanto, se tiene menor

densidad de proteínas de 51 y 55kDa, todo esto, como lo predijeron Silyn-Roberts y Sharp, podría influenciar las propiedades biomecánicas del tejido mineralizado (1986), en estos casos, la flexibilidad.

Respecto al cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) en su estructura, no hay reportes de este mineral en otras especies de tortugas por lo que, un posible mecanismo para la incorporación de cuarzo podría estar relacionado con las características estructurales de la capa interna del cascarón o concha y/o las características hidrográficas específicas del habitat de las especies estudiadas (Medakovic, 2002). Hay reportes de cuarzo en otras especies, principalmente como estructura de soporte además de que ha sido demostrado que una larga exposición de los organismos a condiciones ambientales podría causar la presencia de partículas extrañas en sus estructuras minerales (Medakovic, 2002).

Los cascarones de la tortuga jicotea (*Trachemys scripta*) tienen una coloración rosada-amarilla con un cascarón de cierta rigidez pero con tendencia a apergamarse entre sí, como los de las tortugas laúd y golfina. Su composición mineral es también similar a las de las tortugas del mar (aragonita como polimorfo predominante) pero tiene un 7.6% de cuarzo que no es usual para estos biocerámicas.

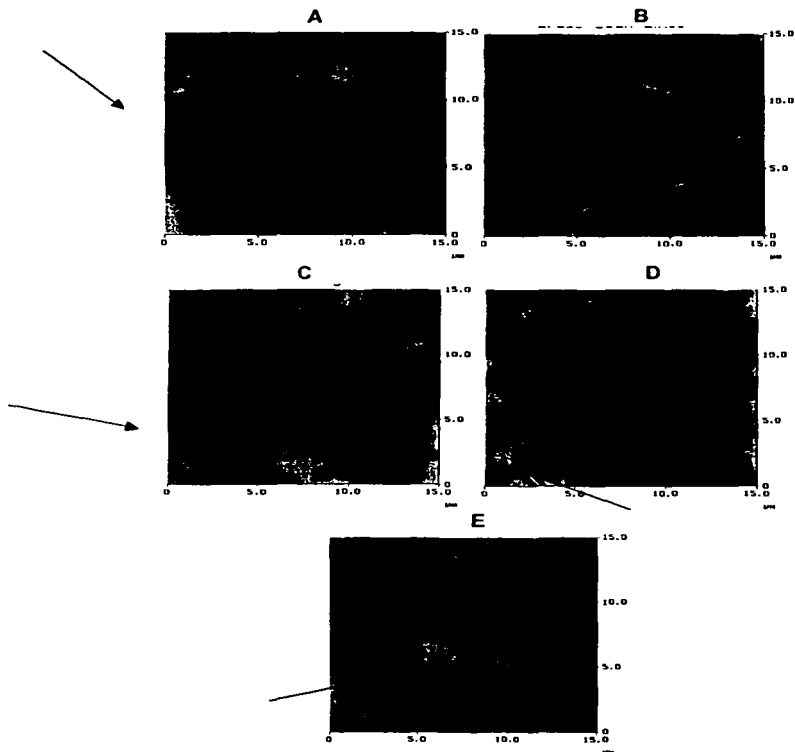
Su perfil electroforético corresponde a algunos de los cascarones estudiados, dos bandas de SMP, una en 51 y otra en 55kDa. Al parecer el papel regulador de estas proteínas sobre el polimorfismo del carbonato de calcio está distribuido en todas las tortugas estudiadas.

Aparentemente, todas las tortugas tienen tres o cuatro proteínas solubles en la matriz orgánica encargadas de darle soporte, funcionalidad, protección y propiedades a sus cascarones además de que su estructura (y con la cantidad de magnesio en el fluido acelular del oviducto) y acomodo espacial confieren sitios de epitaxia para la precipitación de aragonita, la cual, en función de las características medioambientales (presión, temperatura) y al estrés metabólico del organismo (hábitos alimentarios y carencia de minerales), puede tener polimorfismo y cambiar a estructuras más estables como la calcita y en menor proporción a otras menos estables como la velerita. Todo esto de acuerdo a un control biológico riguroso y jerárquico en donde el organismo responde al medio ambiente permitiendo la producción de otras proteínas para adecuar los minerales de su alimentación como estructuras complementarias de soporte que cambian las propiedades biomecánicas del cascarón. Las tortugas marinas son más antiguas que las dulceacuicolas y es posible que estas últimas hayan desarrollado una mejor adaptación a ambientes no acuosos y que al cambiar su *habitat* hayan aprendido a adaptar compuestos minerales obtenidos de su alimentación como estructuras de soporte y protección embrional.

#### 5.4 Caracterización microscópica de los Cascarones.

Para realizar una adecuada comparación estructural de la capa externa de los cascarones de huevo de las tortugas estudiadas se realizaron barridos de  $15\mu\text{m}$ . En todos los cascarones estudiados se observan estructuras delgadas que crecen radialmente desde un punto que no podemos ver. Estas agujas han sido reportadas como aragonita en otros trabajos en donde se usa como herramienta la microscopía electrónica de barrido (Silyn-Roberts y Sharp, 1985, Packard *et al*, 1984, Acuña-Mesén, 2001).

El comportamiento cristalográfico es diferente en cada especie ya que, como se estudio en los puntos anteriores, las condiciones medioambientales, alimentarias y de composición orgánica del biomaterial influyen directamente en las propiedades mecánicas y de cristalización en el cascarón. En la figura 5.4 se muestran las micrografías obtenidas en modo contacto del AFM en donde se aprecian estas diferencias. Aparentemente, las agujas tienen un crecimiento radial y parecen provenir de centros de epitaxia que permiten un crecimiento mineral en forma de "V" que se observa claramente al emerger la aragonita dentro de los poros del material, que corresponde a los sitios más oscuros en las micrografías.



Figuras 5.4. Micrografías obtenidas en el modo contacto de AFM con barridos de  $15\mu\text{m}$ . A corresponde al cascarón de tortuga *Lepidochelys olivacea*, B *Dermochelys coriacea*, C *Trachemys scripta*, D *Rhinoclemmys pulcherrima* y E *Kinosternon ouanoense*. Las flechas indican el crecimiento radial de aragonita

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ewert (1979) ha reportado que las distancias entre los poros son características de cada especie y que además, el cascarón basa sus propiedades mecánicas en la distancia entre sus capas calcáreas. Al realizar análisis en la profundidad de los poros de tres especies, se ha encontrado que también esta variable presenta diferencias entre los cascarones de las especies estudiadas. Mientras que para la especie *Rhinoclemmys pulcherrima* y *Dermodochelys coriacea*, los poros tienen una profundidad de aproximadamente 1500nm, en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* estos tienen apenas 500nm. Estas diferencias en el grosor del biomineral pueden estar asociadas al flujo de calcio durante el desarrollo del embrión ya que al desarrollarse obtiene del cascarón el mineral para formar su esqueleto y con esto debilita la estructura calcárea (Sahoo et al, 1998). Las imágenes mostradas en la figura 5.4.1 muestran estas diferencias.

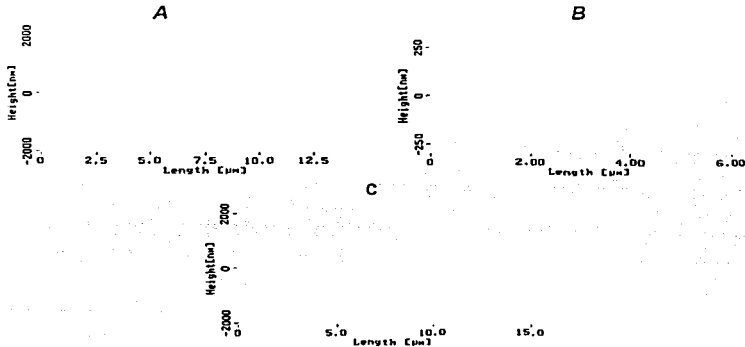
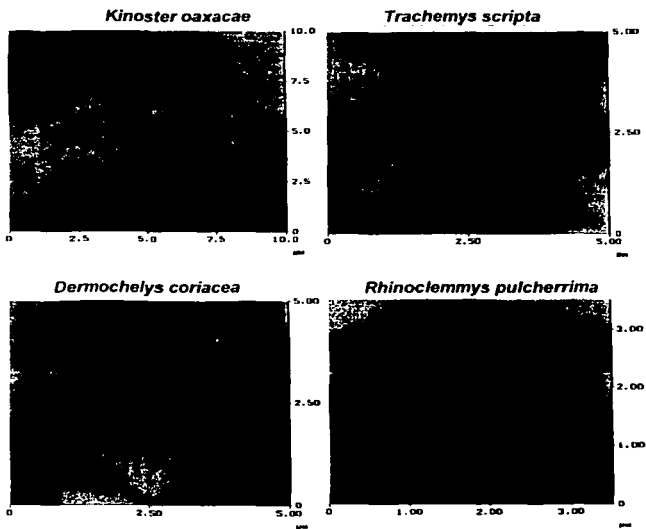


Figura 5.4.1 Profundidad de los poros en cascarones de huevo de tres especies diferentes de tortugas. A. *Rhinoclemmys pulcherrima*, B *Lepidochelys olivacea* y C *Dermodochelys coriacea*. La profundidad varía con la especie

Se realizaron también barridos con escalas menores a 15nm para obtener más información acerca de los poros y del crecimiento mineral en forma de cono de su periferia y se ha corroborado que este crecimiento proviene de un centro común de nucleación en el cual la deposición de aragonita tiene un crecimiento bidireccional que permite el crecimiento en "v". Este comportamiento cristalográfico se observa en poros de las tortugas dulceacuicolas *Rhinoclemmys pulcherrima* y *Trachemys scripta*. Con cascarones de *Kinosternon oaxacae* el poro parece estar embebido por material amorfo cuya presencia podría ser determinante en las propiedades biomecánicas de este biomaterial. En este material se observa también el crecimiento de cristales alargados rodeando al poro embebido

En un barrido a baja escala realizado en cascarones de la tortuga *Dermodochelys coriacea* se observa una extraña mezcla cristalográfica que podría corresponder al polimorfismo del carbonato de calcio reportado en la difracción de rayos X.

Las figuras 5.4.2 muestran las micrografías que ejemplifican estos comportamientos.



Figuras 5.4.2. Con diferentes distancias de bando, estas micrografías obtenidas en modo contacto mediante AFM muestran los comportamientos descritos en el texto.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6. CONCLUSIONES.

---

Sin duda, la biomineralización del cascarón de las tortugas marinas esta influenciada en gran medida por el medio ambiente y la profundidad a la cual viven, son estos factores los que provocarían cambios inusuales en la composición mineral de los biomateriales, además, dada la "simplicidad" de la acción de las proteínas solubles de la matriz en estos materiales el papel de otros minerales como el magnesio y otros iones presentes en el agua del mar también podrían influenciar la formación predominante de aragonita en estos biomateriales. Por otra parte, no debe descartarse el papel estructural de la fracción insoluble y su posible contribución en las propiedades mecánicas de los cascarones estudiados.

La simplicidad del perfil electroforético de estas biocerámicas – SMP de 51, 55 y 15kDa- podría permitir el desarrollo de modelos de biomineralización controlada por una matriz orgánica "sencilla" ya que con sólo tres proteínas se guía un intrincado polimorfismo de carbonatos de calcio. Esta bioformación mineral es otra muestra de la avanzada ingeniería de materiales de la naturaleza.

En algunas tortugas dulceacuicolas la biomineralización parece ser además dependiente de la alimentación considerando que en cascarones de *Rhinoclemmys pulcherrima* hay incidencia de un mineral característico de los vegetales que se alimenta, la vedelita. Su perfil electroforético es muy complejo ya que tiene seis bandas más que los otros cascarones estudiados, al parecer sus proteínas podrían ser homólogas en peso a las estudiadas en aves. Dos de estas proteínas, de 41 y 170kDa podrían tener afinidad por el oxalato de calcio dihidratado.

Aparentemente, todas las tortugas tienen tres o cuatro proteínas encargadas de darle soporte, funcionalidad, protección y propiedades a sus cascarones además de que su estructura (y cantidad de magnesio en el fluido acelular del oviducto seguramente) y acomodo espacial confieren sitios de epitaxia para la precipitación de aragonita, la cual esta en función de las características medioambientales (presión, temperatura) y al estrés metabólico del organismo (hábitos alimentarios y carencia de minerales), puede ocasionar polimorfismo, cambiando a estructuras más estables como la calcita y en menor proporción a otras menos estables como la vetenta. Todo esto de acuerdo a un control biológico riguroso y jerárquico en donde el organismo ha respondido al medio ambiente induciendo la producción de otras proteínas para adecuar los minerales de su alimentación como estructuras complementarias de soporte que cambian las propiedades

biomecánicas del cascarón. Las tortugas marinas son más antiguas que las dulceacuícolas y es posible que estas últimas hayan desarrollado una mejor adaptación a ambientes no acuosos y que al cambiar su hábitat, hayan aprendido a adaptar compuestos minerales obtenidos de su alimentación como estructuras de soporte y protección embrional.

Al parecer, el papel regulador de las proteínas sobre el polimorfismo del carbonato de calcio está distribuido en todas las tortugas estudiadas.

La caracterización estructural mediante AFM permite la observación de comportamientos cristalográficos diferentes en la aragonita de los biomateriales. Se observa además crecimiento mineral en forma de "v" a partir de centros de epitaxia en la parte interna del cascarón. En la mayoría de estos materiales se encontraron poros cuya profundidad presenta variaciones de acuerdo a la especie. Se sugiere que estos cambios están relacionados con el transporte de calcio del cascarón al embrión durante el desarrollo de este último.

El presente estudio, resultó útil para demostrar que la biomineralización en cascarones de tortugas es un proceso regulado por numerosos factores que afectan de manera diferente las propiedades del cascarón. Las tortugas, al igual que todos los organismos, reflejan ritmos exógenos y/o endógenos que permiten la adaptación y regulación de su biomineralización de acuerdo a las características de su entorno y de la disposición alimentaria en este. La biomineralización del cascarón de las tortugas es un proceso que la evolución ha modificado y adaptado permitiendo el éxito evolutivo de las tortugas.



## 7. REFERENCIAS

---

- Abalengelo et al, *Calcified Tissue Research* 26 (1978) 247.
- Acuña-Mesén, R. A. et al. *Rev. Biol. Trop.* 49:3-4 (2001) 1121.
- Acuña-Mesén, R. A. *Rev. Biol. Univ. Oviedo* 8 (1990) 13.
- Acuña-Mesén, R. A. *Rev. Biol. Trop.* 35 (1987) 41
- Acuña-Mesén, R. A. *Rev. Biol. Trop.* 37 (1989) 193.
- Dr Acuña-Mesén, Catedrático de la Universidad de Costa Rica, (2003) **comunicación personal.**
- Addadi & Weiner *Ann. Chem. Inter. Ed. Eng.* 31 (1992) 153.
- Arias, J. et al. *International Review of Cytology.* 45 (1993) 217.
- Baird & Solomon, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 36 (1979) 295.
- Baker & Balch, *Biochemical Journal* 102 (1986) 1878.
- Baretzky, *Metallkunde* 87 (1996) 332.
- Binning et al, *Phys.Rev. Lett.* 56 (1986) 930.
- Binning et al. *IBM J. Res. Dev.* 30 (1986) 355.
- Binning et al. *Rev. Sci. Instrum.* 57 (1986) 1688.
- Borelli et al *Calcified Tissue International.* April 3 (2003).
- Bull J J & Vogt R C. *Science* 206 (1979) 1186.
- Carr, A. *Anim. Kingdom* 87:6 (1985) 11.
- Carr. *A. Sciences* 24:4 (1984) 44.
- Carr. *A. So Excellent as fishe: a natural history of sea turtles*, Natural History press, EUA (1967) p247.
- Colton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 (1997) 370.
- Chow, G-M. & K, Gonsalves. (ed). *Nanotechnology. Molecularly designed materials.* ACS Symposium series 622. American Chemical Society EUA (1996). 413pp.
- DeRose et al. *Thin Solid films* 331 (1998) 194.
- Dominguez Vera et al, *Poultry Science* 79 (2000) 901.
- Drake et al. *Science* 243 (1989) 1586.
- Dyson, V. *Forgotten tales of the ancient China.* Comercial press, Shangai, China (1927) p 26.
- Ehrenfeld DW & Carr A. *Anim. Behav.* 15 (1967) 25.

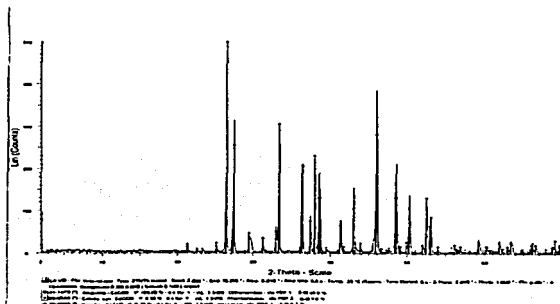
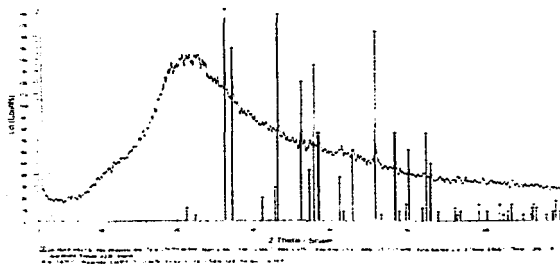
- Ernst, Carl H. y Roger W. Barbour. *Turtles of the World* (1989) Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. y Londres. 313 páginas. ( ISBN 0-87474-414-8 y 1-56098-212-8 ).
- Ewert, M. *The embryo and its egg: Development and natural history*, en M. Harless & H. Morlock (ed). *Turtles: perspectives and research*. John Wiley, Nueva York EUA (1979). 333-413.
- Fallini et al. *Science* 271 (1996) 67.
- Frisbie et al. *Science* 265 (1994) 2071.
- Frank, Norman y Erica Ramus. *A complete guide to scientific and common names of reptiles and amphibians of the world* (1996) N G Publishing Inc. Pottsville, Pennsylvania. 377 páginas. ( ISBN 0-9641032-3-0 )
- Garfield, Eugene. *Current Comments* 39 (1986) 3.
- Gaub, J. *Struct. Biol.* 119 (1997) 83.
- Gautron et al. C.r. 5<sup>ème</sup> symp. européen sur la qualité de l'œuf et des ovoproduits. eds. Yves Nys y Tours (1994), 4-8/10/1993 p134-140.
- Gautron et al. *Bull. Institut. Oceanograph. Mónaco*, 14:2 (1995) 151.
- Gautron et al. *British Poultry Science*, 37 (1996) 853.
- Grutter et al. *Ultramicroscopy* 47 (1992) 393.
- Heaney & Robinson *Biochima Biophysica Acta* 451 (1976) 258.
- Hincke et al. *British Poultry Science*. 33 (1992) 505.
- Hincke et al. *Calcified Tissue International*. 56 (1995a) 578.
- Hincke et al. *Connect. Tissue Research*. 31 (1995b) 227.
- Hincke et al. *Matrix Biology*. 19:5 (2000) 443.
- Hudson DM & Lutz PL. *Physiologist* 28 (1985) 343.
- Hull, D. (ed). *An introduction to composite materials*. Cambridge University Press. EUA (1981). 246pp.
- Jandt, Mat. Sci. Eng. R21 (1998) 216.
- Jandt et al. *Macromolecules* 26 (1993) 6552.
- Jandt *Surf. Sci.* 491 (2001) 303.
- Jobs, G. *Dictionary of mythology, folklore and symbols*. Scarecrow press. Nueva York, EUA (1961). p1610.
- Kaas et al. *I. J. Imag. Sys. Techn.* 8 (1997) 151.
- Klinov et al. *Nucl. Acids Res.* 26 (1998) 4603.
- Krutch J.W. *The world of animals*. EUA (1961) p403-404.
- Kirschvink J. *Marine Turtle News*1. 15(1980) 7.

- Lorens & Bender, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44 (1980) 1265.
- Lowenstam H A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1954) 39-48.
- Maiwald et al, *Nanotechnology* 2 (1991) 103.
- Mark, J.E & Y-C, Lee (ed). *Hybrid organic-inorganic composites*. ACS Symposium series 585. American Chemical Society, EUA (1995). 378pp.
- Male et al, *Phys Rev. Lett.* 59 (1987) 1942.
- Mann, Stephen *Biomineralization: principles and concepts in Biomineral materials chemistry*. (2001) Oxford University press. EUA.
- Medakovic et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (2002)
- Medakovic et al. Ph. D. Thesis. Universidad de Zagreb, Ruder Boskovic Institute (1995)
- Mrosovsky N & Kingsmill S F. Z. *Tierpsychol*, 67 (1985) 237.
- Nys, Yves, *Comunicación personal con el Dr. Abel Moreno Cárcamo*.
- Nys Yves et al, *Poultry and Avian Biology Reviews* 10:3 (1999) 143.
- Oberhauser et al, *Nature Struct. Biol.* 6 (1999) 1025.
- Ohnesorge et al. *Science* 160 (1993) 1461.
- Orizaka et al. *Appl. Surf. Sci.* 140 (1999) 243
- Packard, M., K. Hirsch & J. Iverson. *J. Morph.* 181 (1984) 9.
- Packard, M. & K. Hirsch. *Scanning Electron Microscopy* 4 (1986) 1581.
- Packard, M., K. Hirsch & V. Meyer-Rochow. *J. Morph.* 174 (1982). 197.
- Parsons JJ. *The green turtle and the man*, Florida State University press, EUA (1962) 126pp.
- Parsons citado por Eugene Garfield (1986)
- Perry A. *Pacific Sci.* 36 (1982) 514
- Pines et al, *Matrix Biology*, 14 (1995) 765.
- Pritchard, P C H. *Comunicación con Eugene Garfield* 3 agosto 1986.
- Pritchard. *Enciclopedia de las Tortugas*, Editorial Neptuno, EUA (1979). p895.
- Raymond PW, *Sea turtle hatchling disorientation and artificial beachfront lighting*. Center for Environmental Education, EUA (1984), p72.
- Reimer, WJ, *Catalogue of american amphibians and reptiles*. American society of ichtologists and Herpetologists, (1963).
- Reyes-Grajeda et al. *Protein and Peptide Letters* 9:3 (2002) 253.
- Sahoo et al, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 121 (1998) 91.
- Sahoo et al. *Current Science* 70.3 (1996) 246.

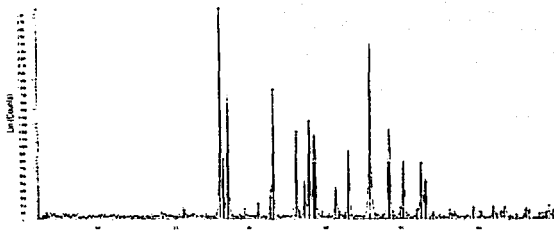
- Sarikaya, M. 1994. *Microscopy research and technique*. 27 (1994) 360.
- Silyn-Roberts, H. & R. Sharp. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 225(1985) 445.
- Silyn-Roberts, H. & R. Sharp *Proc. R. Soc. Lond. B*, 227(1986). 303.
- Solomon et al. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 22 (1976) 150.
- Solomon. S. *British poultry science*. 40 (1999) 5.
- Toynbee JMC, *Animals in Roman life and art*. Cornell University press, Nueva York, EUA (1973), p 221-223.
- Unmack & Rowles. *Science*, 42 (1963) 342.
- Vogt R C & Bull J J. *Ecology* 65 (1984) 582.
- Weisenhard et al. *Langmuir* 7 (1991) 8.
- Weisendanger. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*. Cambridge University press (1995).
- Wickramasinghe AIP Conf. Proc. 241 (1992) 9
- Williams. *Concise Encyclopedia of medical and dental materials*. Pargamon Press, Oxford (1990).
- Wheeler & Skies, en *Biomaterialization: Chemical and Biochemical perspectives* pp 95-131 (1989) de Mann, Webb y Williams (Eds).

## 8. ÁPENDICE

## 8.1 Diagramas de difracción de rayos X.

*Dermochelys coriacea.**Lepidochelys olivacea*



*Trachemys scripta*

2 Total: 5046

1. Sample Name: Trachemys scripta  
 2. Sample Weight: 0.5000 g  
 3. Sample Concentration: 100.00%  
 4. Sample Date: 10/10/10  
 5. Sample Location: 10/10/10  
 6. Sample ID: 10/10/10

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 1-6 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Manuel Salmón Salazar y supervisión del Dr. Abel Moreno Cárcamo, con una beca de ayudante de Investigador Nacional SNI-III y por el proyecto Allied-Domecq-Sauza durante el periodo 2001-2003. Debido a este financiamiento extendo un agradecimiento tanto al SNI como al Dr. Manuel Salmón Salazar, responsable del proyecto Allied-Domecq-Sauza.

