



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Geofísica

**Magnetorecepción en la tortuga negra  
*Chelonia agassizi* del área de reserva Colola-  
Maruata, Michoacán, México**

Tesis que para obtener el título de

**Doctora en Ciencias de la Tierra**

Presenta la Maestra en Conservación y Manejo de Recursos Naturales

**Alma Lilia Fuentes Farías**

Director de tesis

**Dr. Jaime Urrutia Fucugauchi**

México DF, 2008



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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Dedicatoria.**

A mi madre guerrera incansable, ejemplo de fortaleza y amor por la vida

A todos mis hermanos, con mucho cariño

A mis hijos Mao y Andrés cuya comprensión, apoyo y amor han sido fundamentales para alcanzar esta meta

A Gabriel.

## **Agradecimientos.**

Agradezco a mi tutor, Dr. Jaime Urrutia, su compromiso, paciencia y disposición para orientarme durante el desarrollo de este trabajo, También quiero agradecerle su respaldo y el alentarme para continuar en esta línea de investigación

De manera muy especial al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por su interés en el trabajo, su invaluable apoyo intelectual y técnico que sin duda enriqueció de manera sustancial el presente trabajo.

Al Dr. Víctor Hugo Garduño por sus valiosas aportaciones al trabajo pero principalmente por su amistad.

Al Dr. Avto Goguichaisvili y Dra. Tila Ma. Perez Otrtiz por su apoyo, aportaciones y tiempo

Al Dr. Agostino Rizi, por su hospitalidad y apoyo técnico en el trabajo de microscopia electrónica en mi estancia en Milán. Gracias también por su amistad e interés de seguir colaborando en este trabajo.

A Martín Espinoza Pérez por su apoyo técnico en las mediciones magnetométricas

A Patricia Padilla por el apoyo técnico administrativo en la realización de este trabajo

A mis alumnos Gerardo, Janette y Vero, por su apoyo y agradable tiempo compartido

Muchas gracias a Ángel Ontiveros Aquino y a todo el equipo de trabajo responsable de brindar protección a la tortuga marina en el campamento de Colola Mich., por el permiso y apoyo brindado en el desarrollo del trabajo de campo.

Se agradece también a la SEMARNAT y CONANP los permisos otorgados para poder llevar a cabo el trabajo de campo y colectas.

Finalmente a PROMEP por la beca otorgada para la realización de este doctorado.

**Este trabajo fue apoyado por CONACyT 45872 GGO., y CTIC. UNAM.**

## Índice

<b>I. Introducción</b> .....	8
<b>II. Antecedentes</b> .....	12
i. Generalidades sobre la migración animal y mecanismos que la subyacen .....	12
ii. Sistemas sensoriales y migración animal .....	14
iii. El campo magnético terrestre .....	16
iv. El campo magnético terrestre y la magnetorecepción .....	21
v. Posibles órganos y estructuras magnetoreceptoras .....	26
v.i El ojo como magnetoreceptor. Criptocromos .....	26
v.ii El sistema trigeminal y la magnetorecepción. Magnetita de dominio simple (DS) y superparamagnética (SP) .....	27
vi. Comportamiento migratorio de las tortugas marinas .....	36
vi.i Localización de las áreas de reproducción, playas natales y sitios de desove.....	36

vii.	La tortuga marina <i>Chelonia agassizi</i> y el área de reserva Colola-Maruaata como modelos para el estudio de la magnetorecepción.....	39
vi.i	<i>C. agassizi</i> y el CMT, ¿en realidad lo sensa?, ¿a partir de que momento? y ¿de que manera? .....	40
III.	<b>Justificación del estudio</b> .....	44
IV.	<b>Hipótesis</b> .....	46
V.	<b>Objetivos</b> .....	47
VI.	<b>Materiales y Métodos</b> .....	49
i.	Animales .....	49
<b>Fase 1.</b>	<b>Bases Físicas de la Magnetorecepción</b> .....	50
1.1	Magnetometría .....	50
1.1	Aislamiento y caracterización del material ferromagnético de y en la cabeza de <i>C. agassizi</i> .....	55
<b>Fase 2.</b>	<b>Bases Neurobiológicas de la Magnetorecepción</b> .....	57
2.1	Detección histoquímica de la magnetita biogénica.....	57
2.2	Experimentos conductuales .....	58
2.2.1	Animales y diseño experimental .....	58
2.2.2	Descripción de la arena de prueba conductual.....	60
2.2.3	Diseño y parámetros de referencia de los ensayos conductuales.....	61

2.2.4	Análisis de datos.....	63
2.3	Identificación de las estructuras neurales involucradas en el procesamiento de la información asociada al estímulo magnético ..	63
2.3.1	Inmunocitoquímica para c-fos y estimulación sensorial... ..	63
<b>Fase 3. Magnetismo del área de Reserva Colola-Maruata</b>	.....	66
3.1	Descripción del área de estudio .....	66
3.2	Diseño experimental.....	68
<b>VII. Resultados</b>	.....	72
<b>Fase 1. Bases Físicas de la Magnetorecepción</b>	.....	72
1.1	Magnetometría en cabeza de la tortuga <i>C. agassizi</i> y sus diferentes componentes viscerales .....	72
1.2	Aislamiento y caracterización del material ferromagnético en la cabeza de la tortuga negra.....	79
1.3	Discusión y conclusiones de la fase 1 .....	81
<b>Fase 2. Bases Neurobiológicas de la Magnetorecepción</b>	.....	84
2.1	Identificación del material férrico en la cabeza de <i>C. agassizi</i> mediante técnicas histoquímicas y microscopia de luz .....	84
2.2	Comportamiento de desplazamiento en respuesta a estimulación y privación de estímulos.....	87

2.3 Caracterización de la vía neural involucrada en el procesamiento de la información magnética. ....	93
2.4 Discusión y conclusiones de la fase 2.....	100
<b>Fase 3. Magnetismo del área de Reserva Colola-Maruata .....</b>	<b>107</b>
3.1 Propiedades magnéticas generales y locales de las playas natales y no natales de <i>C. agassizi</i> .....	107
3.2 Parámetros magnéticos locales de las playas natales: áreas de preferencia y no preferencia de desove .....	117
3.3 Discusión y Conclusiones de la fase 3 .....	118
<b>IX. Literatura Citada.....</b>	<b>127</b>

## Índice de tablas, figuras y anexos.

<b>Tabla 1.</b> Medidas de intensidad magnética obtenidas de los componentes viscerales de la cabeza de <i>C. agassizi</i> .....	65
<b>Tabla 2.</b> Valores de histéresis obtenidos de cabezas completas de embriones y crías de <i>C. agassizi</i> .....	68
<b>Tabla 3.</b> Valores de histéresis obtenidos de diversas partes del cerebro de embriones y crías de 3 y 8 meses de edad de <i>C. agassizi</i> .....	69
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de desplazamiento determinados en las pruebas experimentales aplicadas a crías de <i>C. agassizi</i> sujetas a diferentes tipos de manipulación sensorial.....	82
<b>Tabla 5.</b> Funciones y relación de las estructuras cerebrales que mostraron inmunoreactividad positiva a C-fos en los diferentes grupos experimentales .....	86
<b>Continuación de la tabla 5</b> .....	87
<b>Tabla 6.</b> Valores de los parámetros del campo magnético terrestre y su variación secular en Colola, Maruata, La Llorona y La Ticla .....	96
<b>Tabla 7.</b> Análisis de lámina delgada de muestras de roca tomadas en la vecindades de las playas de Colola y Maruata .....	99

<b>Tabla 8.</b> Valores de intensidad y susceptibilidad magnética de las muestras de arena obtenidas en las playas de Colola, Maruata, La Ticla y La Llorona .....	101
<b>Tabla 9.</b> Parámetros magnéticos básicos de la arena en sitios de desove y no desove a lo largo de las playas de Colola y Maruata .....	105
<b>Figura 1.</b> Características del Campo Magnético Terrestre .....	17
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del compás de inclinación utilizado por las aves .....	21
<b>Figura 3.</b> Modelos relacionados con el mapa de ubicación .....	23
<b>Figura 4.</b> El ojo como magnetoreceptor.....	25
<b>Figura 5.</b> El sistema trigeminal y la magnetorecepción .....	29
<b>Figura 6.</b> Las diferentes propiedades magnéticas de cristales DS y SP .....	31
<b>Figura 7.</b> Gráficos que ilustran el circuito de histéresis .....	46
<b>Figura 8.</b> Diagrama de Day.....	47
<b>Figura 9.</b> Fotografías que ilustran algunos de los procedimientos utilizados para alterar la información sensorial en crías de <i>C. agassizi</i> .....	52
<b>Figura 10.</b> Esquema de la arena de prueba conductual .....	54
<b>Figura 11.</b> Ubicación y descripción del área de estudio .....	60
<b>Figura 12.</b> Modelos digitales de terreno de los sitios utilizados para la toma de muestras de roca y arena.....	63

<b>Figura 13.</b> Ejemplos de curvas de histéresis obtenidas para cabeza y mesencéfalo de crías de <i>C. agassizi</i> .....	67
<b>Figura 14.</b> Material ferromagnético aislado de la cabeza de <i>C. agassizi</i> .....	72
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografías que muestran cortes longitudinales de tejido de glándula de sal, mucosa olfatoria y retina de <i>C. agassizi</i> .....	75
<b>Figura 16.</b> Reconstrucción bidimensional del sistema nervioso central de <i>C. agassizi</i> .....	76
<b>Figura 17.</b> Esquemas de las rutas recorridas por las crías de <i>C. agassizi</i> de cada uno de los grupos experimentales.....	70
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografías de cortes coronales inmunoteñidos para C-fos.....	72
<b>Figura 19.</b> Esquemas que muestran la distribución de células inmunoreactivas para C-fos en cortes coronales de cerebros de crías de <i>C. agassizi</i> .....	76
<b>Figura 20.</b> Gráficos que muestran la composición y proporción mineral en muestras de arena colectadas en las playas de Maruata, Colola y La Llorona.....	89
<b>Figura 21.</b> Diagramas de Day para cada playa y áreas de amidación y no amidación de <i>C. agassizi</i> .....	91
<b>Anexo 1.</b> Permiso SEMARNAT. oficio SGPA/ADGVS/ 14340.....	140
<b>Anexo 2.</b> Permiso SEMARNAT. oficio SGPA/ADGVS/ 10414.....	144
<b>Anexo 3.</b> Permiso SEMARNAT. oficio SGPA/ADGVS/ 11314.....	145

## I. Introducción

La migración es una conducta frecuente en el reino animal que se presenta en gran número de taxa. Esta conducta conlleva alteraciones fisiológicas y de comportamiento y se caracteriza por el desplazamiento periódico o estacional de poblaciones de organismos desde y hacia sus áreas naturales de reproducción y/o alimentación que generalmente se encuentran a cientos de kilómetros unas de las otras. Aunque este desplazamiento parecería poco económico, el cambio de ubicación geográfica brinda a las especies migratorias nichos ecológicos propicios para llevar a cabo las funciones tróficas y reproductivas que garantizan la continuidad de las especies (Mace *et al.*, 2001).

Por años, nos hemos preguntado sobre el tipo y la naturaleza de las claves utilizadas por las especies animales migratorias para guiar sus desplazamientos. Se ha propuesto que las referencias visuales, olfativas y auditivas pudieran ser poco confiables puesto que, con algunas excepciones (e.g., luz polarizada, posición relativa de las estrellas; Gould, 2004) cambian con el tiempo y la distancia. De ser así los organismos migratorios requerirían de claves más constantes para encontrar sus destinos.

Al respecto, el descubrimiento de la magnetotaxia en bacterias influyó significativamente nuestras ideas sobre la naturaleza de las claves utilizadas por las especies animales para desplegar su conducta migratoria. De esta manera, se ha sugerido, que diversas especies migratorias terrestres y acuáticas poseen sistemas sensoriales capaces de detectar variaciones en la intensidad e inclinación del campo magnético terrestre (Lohmann y Lohmann, 1994a, 1996a; Wiltschko y Wiltschko, 1995; Lohmann, *et al.*, 1999). Estos parámetros constituyen una clave de navegación que permanece constante en el tiempo y cambia gradualmente con la distancia permitiendo a los organismos ubicarse y orientarse con respecto a un destino. No obstante el atractivo que tiene esta idea, aún se desconocen los mecanismos físico-biológicos que subyacen la percepción del campo magnético en los animales migratorios.

Teniendo en mente lo anterior, en el presente trabajo se pretendió, dar respuesta a tres interrogantes: **a)** ¿Posee la tortuga marina negra *Chelonia agassizi*, los elementos físicos y neurobiológicos necesarios en su organismo para percibir el campo magnético terrestre como recurso de orientación? **b)** ¿Cómo podemos probar que en realidad lo sensa? y **c)** ¿Que tipo de características magnéticas existen en su área de reproducción y playas natales que puedan ser sensadas y utilizadas como recursos de orientación y encuentro?

En cuanto a la primera interrogante, nuestros estudios magnetométricos apoyan la presencia de material ferromagnético en extractos de diversas regiones

del cerebro, los ojos y la mucosa olfatoria de *C. agassizi*. Las observaciones histológicas muestran la presencia de material férrico en diversas regiones del cerebro, la retina y la mucosa nasal, no así en la glándula de sal, en tortugas recién eclosionadas y en aquellas de 3, 6 y 8 meses de edad. Por otro lado observaciones realizadas con ayuda de microscopia electrónica de transmisión indican que, al menos en el cerebro como conjunto, el material férrico corresponde a magnetita biogénica. La conclusión se sostiene en el hecho de que los depósitos aislados del cerebro poseen partículas de menores a 1  $\mu\text{m}$  en tamaño y patrones de difracción que al parecer corresponden a magnetita biogénica, postulada como la base física de la magnetorecepción en los organismos (kirshvink y Walker, 1986; kirshvink *et al*, 2001). En cuanto a la segunda cuestión, los experimentos conductuales llevados a cabo con crías de *C. agassizi* recién eclosionadas sometidas a estimulación visual, privación de estímulos olfativos, visuales y distorsión de los campos magnéticos circundantes, mostraron que la información visual juega un papel primordial en la orientación de las tortugas hacia el mar. Estas mostraron un intenso fototropismo, sin embargo fue también posible observar que la información sensorial magnética y olfatoria complementa a aquella de origen visual mientras las crías de tortuga negra se desplazan del nido hacia el mar.

La privación del olfato y distorsión del campo magnético tuvo efectos significantes sobre la orientación, definición de la ruta y velocidad de desplazamiento en las crías de *C. agassizi*. Por otro lado, el grupo de crías sometidas a distorsiones magnéticas, observó activación neuronal, principalmente en corteza dorsal (cd), corteza medial (cm) y corteza dorsomedial (cdm) las tres involucradas con el aprendizaje y memoria espacial y la vertiente dorsoventricular (DVR) y el centro nuclear del DVR (CN) involucrados en el procesamiento primario de la información sensorial multimodal. Estos resultados nos hacen deducir que *C. agassizi* es capaz de sensor estímulos magnéticos y con base en ello modificar su conducta de desplazamiento.

Finalmente, los resultados obtenidos al realizar la caracterización magnética del área de reproducción de *C. agassizi*, con base en el análisis de las cartas geológicas y magnéticas y en el estudio de las características magnéticas de los sedimentos de playa, ha sido posible concluir que la idea de que el área de Colola-Maruata provee de señales magnéticas que a larga y a corta distancia podrían facilitar a la tortuga negra su localización y encuentro, es factible. Adicionalmente nuestros resultados sugieren que el contenido de mineral magnético en los sedimentos, pudiera estar influenciando la conducta de preferencia de desove de *C. agassizi* por determinada área de playa.

## **II. Antecedentes**

### **i. Generalidades sobre la migración animal y mecanismos que la subyacen.**

El desplazamiento de comunidades de animales en búsqueda de nichos ecológicos propicios para garantizar su adecuada nutrición, desarrollo y reproducción es una conducta frecuente en el reino animal. Si bien uno podría imaginar que la restricción de recursos ecológicos constituiría el estímulo más importante para promover la migración animal, esta conducta parece también ser instintiva y generada por mecanismos neuro-endocrinos heredables y adquiridos, que se han consolidado a lo largo de la evolución a través de un proceso de selección natural (Ridley, 2003). Como ejemplo, baste mencionar que la conducta reproductiva y migratoria de las mariposas depende de la concentración la influencia de la hormona juvenil. Así, cuando los niveles de la hormona juvenil se elevan hacia el verano, la mariposa entra en su fase de reproducción y la migración es inhibida. Por el contrario durante el otoño, cuando la concentración de la hormona decae, se detiene la reproducción y se induce la migración.

Es interesante hacer notar que los niveles de la hormona son modulados por factores ambientales tales como la temperatura y el fotoperiodo (Barker y Herman, 1976).

La interacción de factores ambientales con aquellos neuroendocrinos del organismo que resultan en conductas de migración no son exclusivas de insectos, sino que se observan en toda la escala filogenética. Con el objeto de ilustrar este punto, se ha documentado que las modificaciones en los niveles de hormonas hipofisarias, tiroideas y adrenales en los salmones, inducen un cambio de su estado reproductivo que se asocia a modificaciones en la pigmentación de la piel, en la fisiología de las branquias y los riñones, y en la afinidad de hemoglobina al oxígeno. Todos estos cambios preceden a la migración del salmón desde los sitios marinos de maduración hacia las zonas altas de los ríos que constituyen sus áreas de reproducción. Así mismo, el aumento en los niveles de testosterona induce incrementos en el almacenamiento de grasa, en la masa muscular y su capacidad oxidativa. De esta forma, parece que “fuerzas internas” disparan y modulan la necesidad de los individuos de una población a migrar, y que esta conducta es reforzada por los factores ambientales y la ganancia que de ella se obtiene. De la información descrita, se deduce que las diversas hormonas parecen cebar a los circuitos neuronales relacionados con la ejecución de la conducta migratoria. Es decir, no solamente se requiere de la presencia de dichos circuitos, sino que se necesita que estén sensibilizados.

## ii. Sistemas sensoriales y migración animal.

Otro aspecto relacionado con la conducta migratoria tiene que ver con los elementos que orientan a los animales durante su migración a una meta en específico “navegación”. La navegación puede ser definida como el proceso mediante el cual el animal primero determina su posición relativa con respecto a una meta y posteriormente establecer un curso para alcanzarla. Estos dos pasos son consistentes con los procesos de “**mapa**” y “**compás**” de la navegación verdadera propuestos por Kramer (1953).

La navegación involucra un proceso neural de entradas sensoriales que después de procesadas determinan una ubicación, dirección y quizá distancia. Así, por ejemplo, la ubicación relativa de los cuerpos celestes y/o características geográficas, sonidos, olores, corrientes eólicas y marinas y cambios en la presión atmosférica constituyen claves de navegación que proveen de información olfativa, vestibular, auditiva y somestésica (Gould, 2004).

Uno de los elementos geofísicos que se ha considerado importante, como potencial clave de navegación para organismos migratorios es el campo magnético terrestre (CMT). Si bien experimentos realizados en trucha (Walker *et al.*, 1997 y Diebel *et al.*, 2000), pichones (Fleissner *et al.*, 2003 y Winklhofer *et al.*, 2001) y tortugas (Lohmann y Lohmann, 1994b, 1996a) parecen apoyar que estas especies utilizan claves de navegación y referencia del campo magnético terrestre.

La mayor parte de la información con la que se cuenta en apoyo a la magnetorecepción es limitada e inferida a partir de escasos estudios conductuales, anatomofisiológicos, y en un sinnúmero de consideraciones teóricas. A este respecto, debemos tener en cuenta que, en general, los sistemas sensoriales poseen diversos elementos celulares (i.e., receptores) cuyas características morfo-funcionales y localización en el cuerpo les permiten extraer información de diversos atributos físicos del medio ambiente en ciertos rangos y con una resolución definida. Estos receptores se relacionan anatómica y funcionalmente con elementos neuronales que se encargan de filtrar, procesar y transferir la información recibida a lo largo de una vía neural. Las redes neuronales responsables de procesar a la información sensorial están organizadas en mapas que reflejan los atributos físicos del estímulo ambiental. Por ejemplo, la vía auditiva está constituida de nodos en los que los elementos neuronales que las conforman se organizan de acuerdo a las frecuencias de sonido a las que responden de manera específica. Así, distintos grupos de neuronas que ocupan diferentes posiciones en el mapa tonotópico del núcleo geniculado lateral, responden a diferentes frecuencias de sonido (Nicholls *et al.*, 1992). De esta forma, para poder mostrar que en el cerebro de los animales migratorios existe una vía neural capaz de sensor información del campo magnético terrestre se requeriría de identificar a los receptores especializados, una vía neural asociada a éstos y centros de procesamiento de información organizados magneto-

tópicamente. Desafortunadamente, ninguno de estos elementos ha sido identificado ni caracterizado con un grado alto de certeza.

No obstante la carencia de información acerca de la vía neuronal responsable de procesar información magnetoceptiva, existen algunos estudios que establecen directrices que permiten proponer la existencia de magnetoreceptores en los ojos (Ritz *et al.*, 2000), en la glándula pineal (Semm y Demaine, 1986), así como en la piel y la mucosa olfatoria (Winklhofer *et al.*, 2001) asociados con terminales especializadas relacionadas con ramas del nervio trigémino en aves y peces. A continuación resumiremos la información que sugiere que los ojos y el sistema somatosensorial trigémino pudieran ser transductores primarios de la información magnética asociada con el CMT y sus anomalías. Esto se debe a que la mayor parte de la información recabada al respecto se ha centrado en estos sistemas. Se discutirán además, las ideas en torno a las bases biofísicas de dicho proceso de transducción, así como las características del campo magnético terrestre que son susceptibles a ser sensadas e interpretadas como claves de navegación por las distintas especies de animales migratorios. Comenzaremos por esta última.

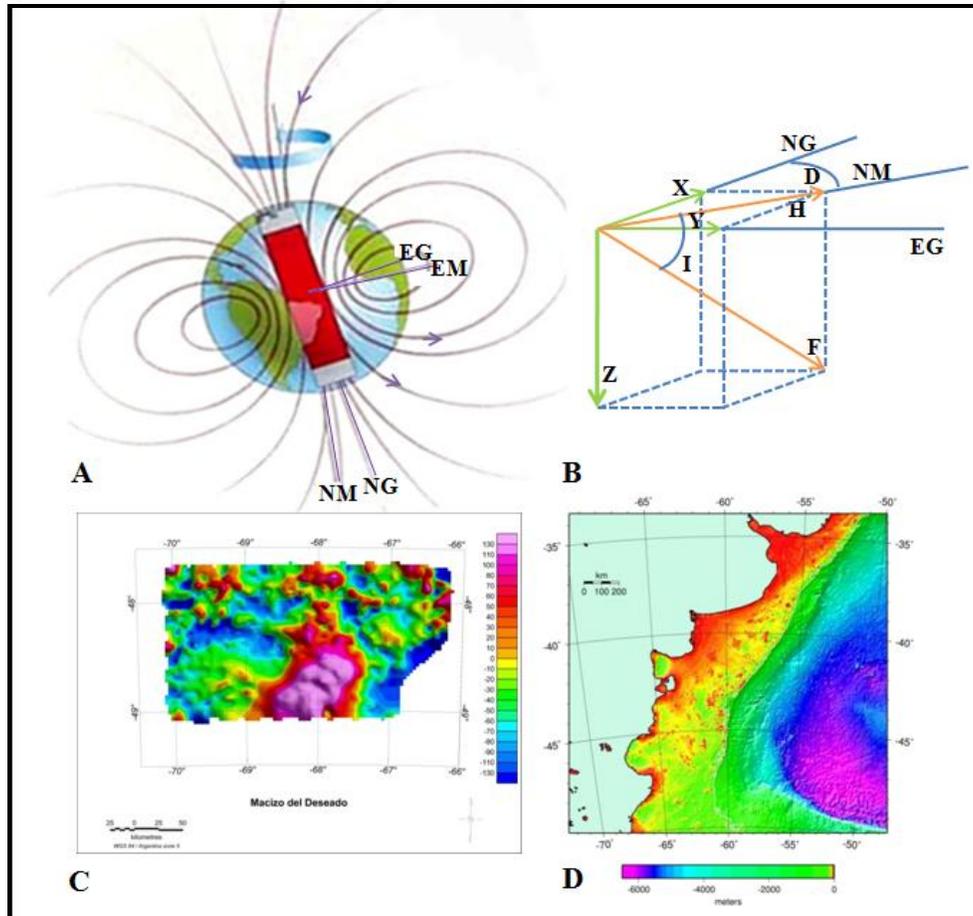
### **iii. El campo magnético terrestre.**

El campo magnético tiene su origen en tres fuentes. La fuente primaria o campo principal genera el 97% del campo total y se origina en el núcleo de la

tierra, contiene componentes dipolares y no dipolares o residuales. El campo principal es por lo tanto casi dipolar, el dipolo se asemeja a una barra magnética gigante que genera más del 95 % del campo observado (Figura 1A). La segunda fuente o campo cortical también conocido como anomalías magnéticas, proviene de la magnetización de las rocas en la corteza terrestre y representa 1 a 2% del campo total (Figura 2C y D). Finalmente la tercera denominada también campo exterior, es originada por el viento solar y representa al igual que el anterior 1 a 2% del campo ([http://denali.gsfc.nasa.gov/research/mag\\_field/conrad/explain.html](http://denali.gsfc.nasa.gov/research/mag_field/conrad/explain.html)).

En cualquier parte de la superficie terrestre, el campo magnético observado puede ser descrito como un vector en un espacio tridimensional (Skiles, 1985; Figura 1B). El vector total del campo es la suma de los campos provenientes de todas las fuentes, siendo las dos primeras mencionadas arriba (dipolar y cortical) las más relevantes. Las líneas del campo dipolar salen de la parte sur del hemisferio y se curvan alrededor del globo reentrando en el hemisferio norte causando la magnitud (intensidad) y dirección del vector, ambas varían sistemáticamente entre el ecuador magnético y los polos. La intensidad del campo principal varía de 25 a 65-70 microTesla (mT) ó entre el ecuador magnético y los polos y 2 a 5 nanoTesla/Kilometro (nT/Km). De manera similar, la inclinación ( $I$ ) del campo magnético terrestre (el ángulo entre la dirección del vector o líneas del campo y la componente horizontal del campo) varía de paralelo a perpendicular a

la superficie terrestre entre el ecuador magnético y los polos. En el ecuador magnético, las líneas del campo son paralelas a la superficie de la tierra y el ángulo de inclinación toma un valor de 0. En el polo magnético del hemisferio norte las líneas del campo se dirigen hacia abajo, hacia la superficie de la tierra y el ángulo de inclinación toma un valor de 90 grados. Finalmente La declinación (D) del campo magnético es el ángulo entre las direcciones del norte magnético y norte geográfico que no coinciden el uno con el otro. (Walker *et al.*, 2002; Figura 1A). La segunda fuente del campo magnético terrestre o campo cortical causa ligeras variaciones en el campo magnético total en un rango de escalas espaciales. Las concentraciones de minerales ferromagnéticos en la corteza terrestre a menudo generan anomalías del campo locales, aunque estas variaciones son típicamente menos del 1% del campo total, sus gradientes (variación por distancia) pueden ser más significativos a corta distancia que las variaciones del dipolo principal y pueden también alinearse en diferente dirección (Walker *et al.*, 2002; Figura 1C). Son también de interés las bandas o anomalías producidas por la actividad de expansión del piso oceánico. Las bandas del nuevo piso oceánico son magnetizadas en la dirección del campo magnético al tiempo que se enfrían por debajo de la temperatura de Curie a la cual la magnetita en el magma adquiere espontáneamente un campo magnético (Walker *et al.*, 2002; Figura1D).



**Figura 1.** Características del Campo Magnético Terrestre (CMT). **A.** Representación diagramática del CMT. El campo magnético terrestre (producido en el núcleo) consta de componentes dipolares y no dipolares. El componente dipolar (representado por la barra magnética en el núcleo de la tierra) es mucho mayor que el componente no dipolar (no mostrado) y se representa por líneas del campo que emergen del hemisferio sur, rodeando el globo terráqueo y reentrando en la tierra en el hemisferio norte. **B.** Elementos del vector del campo magnético total (F) en la superficie de la tierra. El vector total puede derivarse en componentes (flechas) de los ejes X (norte geográfico), Y (este geográfico) y Z (vertical). El vector componente (H) del plano horizontal apunta en la dirección de una aguja de compás. La declinación (D) es el ángulo entre los elementos H y X mientras que la declinación inclinación (I) es el ángulo entre los elementos H y F del campo. **C.** Representación de un mapa aeromagnético. Las concentraciones de minerales ferromagnéticos en la corteza terrestre generan anomalías del campo locales. Aunque estas variaciones son típicamente menos del 1% del campo total, sus gradientes (variación por distancia) pueden ser más significativos a corta distancia que las variaciones del dipolo principal y pueden también alinearse en diferente dirección. **D.** Bandas o anomalías producidas por la actividad de expansión del piso oceánico. (C y D tomadas de [ftp://topex.ucsd.edu/pub/global\\_topo\\_2min](ftp://topex.ucsd.edu/pub/global_topo_2min)).

Como en el espacio, el campo magnético terrestre varía en escalas de tiempo que van de segundos a décadas. Las variaciones a corto plazo son producidas por la interacción del viento solar y corrientes de partículas cargadas flotando en la ionosfera (Skiles, 1985). Similarmente en cualquier punto de la Tierra el campo observado varía ligeramente en periodos de 24 hrs (variaciones diurnas) ya que los vientos solares varían conforme a la rotación de la tierra. Sobre largos periodos de tiempo, los valores de inclinación, intensidad y declinación del campo varían como consecuencia del proceso de convección dentro del núcleo terrestre que genera el campo (variaciones seculares). Este proceso de convección puede causar variaciones en la declinación del campo de 30 minutos de arco por año mientras que la intensidad e inclinación del campo pueden variar arriba de 120 nT y 20 minutos de arco por año respectivamente. Aunque pudiera pensarse que las variaciones del CMT constituirían fuentes de error en las migraciones de los organismos, se cree que la presión selectiva actúa a fin de asegurar un ajuste continuo entre la respuesta de los organismos y la variación de los campos que marcan locaciones críticas dentro de las rutas migratorias (Lohmann *et al.*, 1999).

Hasta aquí, con base en la descripción realizada del CMT, es posible darse cuenta, que este, posee características para ser utilizado como un recurso de información navegacional confiable. A pesar de sus variaciones temporales, es capaz de proveer de información consistente que varía sistemáticamente durante

su trayecto y permite ubicar puntos con características únicas. El ¿Cómo el animal hace uso de este recurso para orientar sus rutas migratorias y ubicar sus destinos?, se trata de explicar en el siguiente apartado.

#### **iv. El campo magnético terrestre y la magnetorecepción**

Como se menciona en párrafos anteriores la navegación basada en el campo magnético terrestre y/o otro tipo de recursos, involucra 2 pasos en el proceso de orientación “mapa” y “compás” (Kramer, 1953). En el primero de ellos, el animal establece su posición con respecto a una meta. En el segundo, el sistema de compás es utilizado para definir la dirección que lo conducirá a esa meta o destino. Con base en estas definiciones trataremos de explicar cómo los organismos acuáticos podrían navegar haciendo uso del CMT. Las tortugas y otros organismos marinos como ballenas, tiburones etc., que viajan grandes distancias están propensos a perder contacto sensorial con características persistentes, como señales visuales olfativas y auditivas del ambiente. Estos organismos también deben hacer frente a los efectos del desplazamiento pasivo durante su movimiento en el agua. Estos inconvenientes hacen necesario que el estímulo usado en la navegación provea de información consistente que varíe sistemáticamente durante su trayecto y permita ubicar puntos con características únicas (Walker *et al.*, 2002).

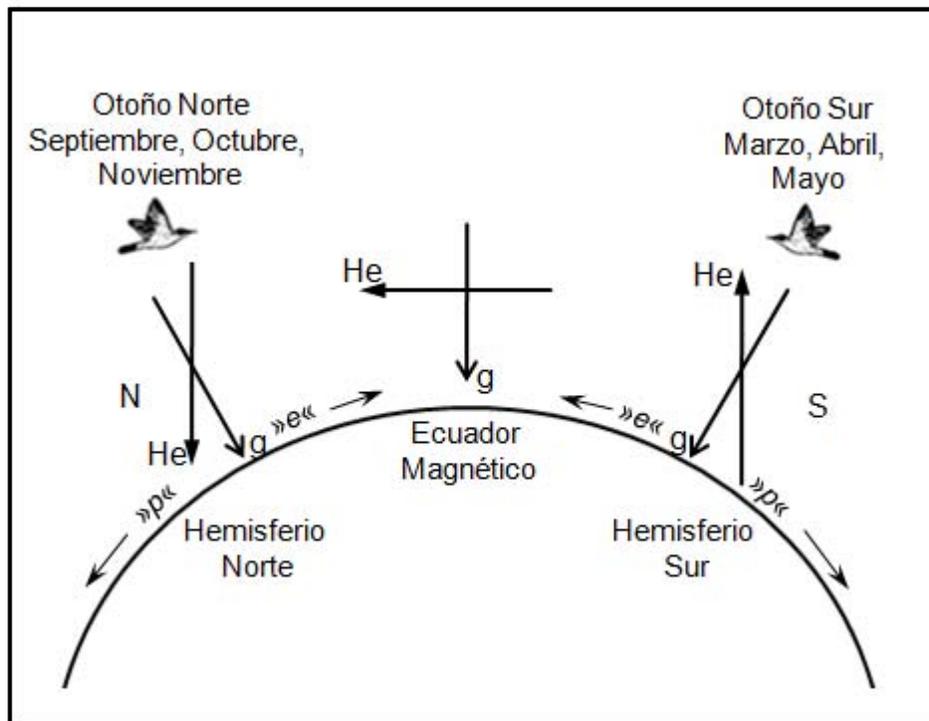
En los pasados 60 años, se ha sugerido que varios grupos de animales migratorios han desarrollado mecanismos neurobiológicos que les permiten extraer información referente al compás de orientación y al mapa de ubicación a partir del CMT. Dos tipos de mecanismos de compás magnético han sido descritos, con diferencias fundamentales en sus características funcionales, el “**compás de polaridad**” y el “**compás de inclinación**”. El compás de polaridad trabaja similarmente al compás comúnmente utilizado para distinguir entre norte y sur magnéticos, usando la polaridad del campo magnético.

El compás de inclinación en contraste, ignora la polaridad y se basa en el curso de las líneas axiales del campo magnético, obteniendo información unimodal al interpretar la inclinación de las líneas de campo con respecto a arriba y abajo es decir distinguen entre la dirección a los polos cuando la líneas del campo se dirigen hacia abajo y la dirección al ecuador cuando estas se dirigen hacia arriba (Wiltschko *et al.*, 1993; Figura 2).

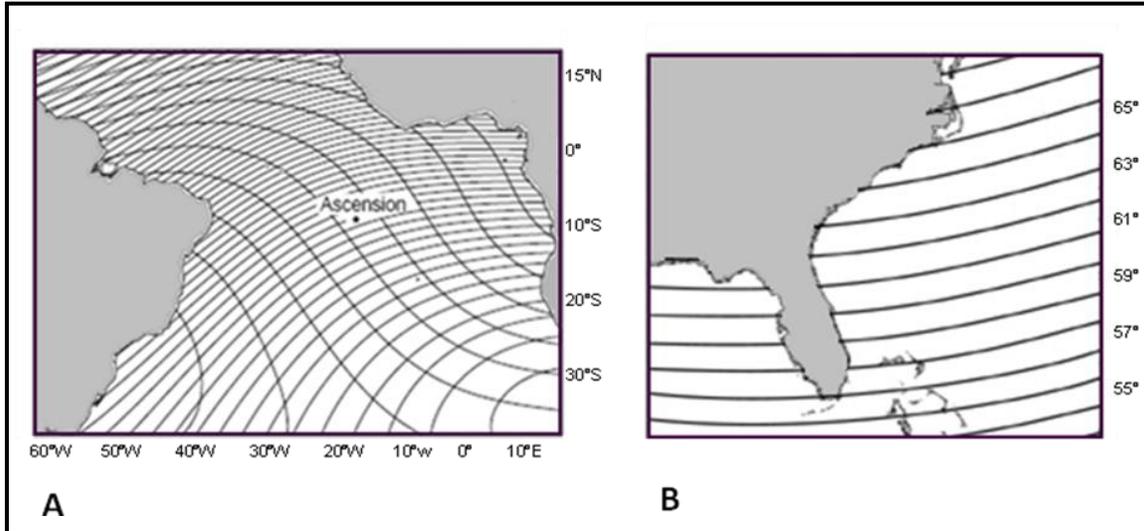
Se ha comprobado en roedores (Nemec, 2001) y en la langosta espinosa (Lohmann *et al.*, 1995a) el uso del compás de polaridad, mientras que aves (Wiltschko y Wiltschko, 1993; Figura 2), salamandras (Phillips, 1996) y tortugas marinas (Light *et al.*, 1993) parecen utilizar el compás de inclinación.

En cuanto al mapa, no hay un modelo ampliamente aceptado para explicar cómo el campo magnético terrestre puede ser utilizado para establecer posición. El modelo más simple sugiere que en la superficie terrestre las isoclinas (líneas de

inclinación) e isodinámicas (líneas de intensidad) forman un sistema pareado de coordenadas en donde la inclinación e intensidad del campo magnético terrestre varían sistemáticamente uno en relación al otro (Walker *et al.*, 2002; Figura 3A).



**Figura2.** Representación esquemática del compás de inclinación utilizado por las aves. Experimentos con juveniles de migrantes "european robins" que fueron criados y probados sin antes haber visto señales celestiales (e.g. W. Wiltschko and Gwinner, 1974; Beck and Wiltschko, 1982 en Wiltschko *et al.* 1993) indicaron que la dirección migratoria es genéticamente codificada como un curso de compás en relación al campo magnético terrestre. En ambos hemisferios las aves comienzan a migrar en el otoño apuntando hacia el ecuador lo cual quiere decir al sur para las aves del hemisferio norte y norte para las del sur. Debido a las diferencias de inclinación los migrantes pueden tener un programa migratorio común que les diga cuando los días se tornan más cortos que deben migrar hacia el ecuador. **He**, vector del campo magnético terrestre; **g**, vector de gravedad; N, S, norte y sur; »p«, hacia el polo (poleward) y »e«, hacia el ecuador (equatorward),  $\gamma$ , ángulo entre la gravedad y las líneas magnéticas del campo. (Figura modificada de Wiltschko *et al.* 1993).



**Figura 3.** Modelos relacionados con el mapa de ubicación. **A.** Modelo bicoordenado de posición basado en contornos de igual intensidad e inclinación en la región oceánica circundante en este caso, a la isla Ascensión. Los dos parámetros del campo magnético terrestre forman una malla no ortogonal que podría proveer a las tortugas de la Isla Ascensión de un sistema de posicionamiento bicoordenado mientras migran entre Ascensión y la costa de Brasil. Los contornos de igual intensidad están separados por 1000 nT y están alineados en dirección noroeste-sureste. Los contornos de igual inclinación están separados por 1° y están alineados en dirección noreste-suroeste. **B.** Modelo de posicionamiento latitudinal. Mapa que muestra las isolíneas de igual inclinación del campo magnético terrestre (isóclinas) que corren este-oeste con respecto de la costa sureste de Estados Unidos alineada norte sur aproximadamente. Como resultado cada área de la línea de costa se encuentra marcada por un ángulo de inclinación único, un patrón similar existe para las isolíneas de intensidad total. Una tortuga navegando a lo largo de la costa sureste de los Estados Unidos hacia una área costera particular de alimentación o reproducción puede hipotéticamente hacerlo a través de un solo elemento magnético tal como inclinación o intensidad, ya que estos le proveen de una forma posicionamiento latitudinal.(Figuras tomadas de Lohmann *et al.*, 1999).

Este modelo, sin embargo, no puede generalizarse ya que las isolíneas de inclinación e isoclinas de intensidad magnéticas interceptan una con la otra con valores elevados de ángulo solo sobre regiones muy locales en la superficie

terrestre. En regiones en donde las líneas corren casi en paralelo, el modelo bi-coordenado no es viable para la determinación de posición. Un segundo modelo de determinación de posición, sugiere que las tortugas marinas pueden utilizar la intensidad o inclinación magnética o ambas para determinar su “latitud magnética” (Lohmann *et al.*, 1999, 2007; Figura 3B).

Como tercer modelo de mapa, se plantea que la determinación de la posición relativa se basa en la detección de variaciones sistemáticas de la intensidad y dirección en función del gradiente de intensidad del campo geomagnético provocado por las concentraciones de minerales ferromagnéticos en la corteza terrestre (anomalías magnéticas) que pueden ser utilizadas como marcas terrestres o para identificar localidades (Walcot, 1978; Figura 1C).

Finalmente en un cuarto modelo se toman en cuenta a los patrones regulares de las anomalías magnéticas originadas por las rocas en corteza oceánica, durante la expansión del piso oceánico (Kirshvink *et al.*, 1986; Figura 1D). Aunque estas anomalías, no se presentan en la corteza continental, pudieran ser utilizadas por animales marinos para guiar migraciones a larga distancia. El proceso de expansión del piso oceánico resulta en anomalías magnéticas lineales dispuestas simétricamente a los lados de las crestas en expansión. Si los animales usan estas anomalías como se propone uno supondría que el animal seguiría anomalías lineales que están en la dirección de su ruta migratoria.

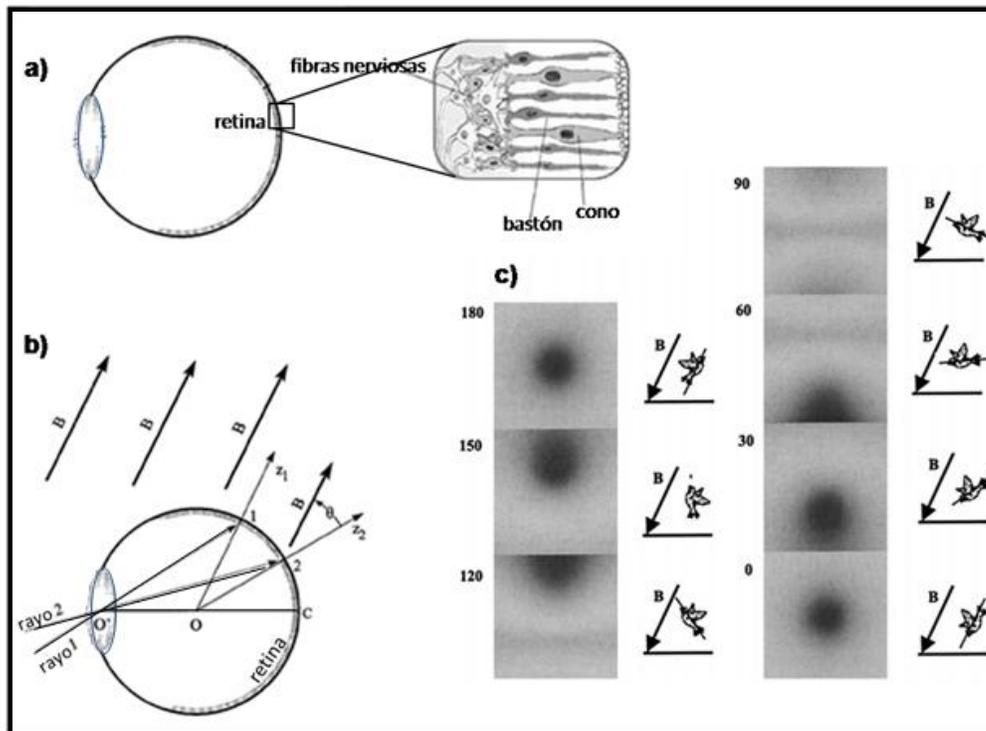
Como puede verse y ya que el mapa de ubicación debe entenderse como un sistema multifactorial que obtiene información del entorno, los modelos descritos no son mutuamente excluyentes sino complementarios. Cada grupo de organismos debe haber desarrollado diferentes estrategias que les permiten obtener información a partir de diferentes parámetros del CMT bajo un diseño semejante del sistema, pero de acuerdo a sus necesidades, características y condiciones del CMT en sus áreas de partida, desplazamiento y destino. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que, el rango de detección, percepción e interpretación del estímulo magnético requerido por los organismos debe ser muy fino. En párrafos siguientes discutiremos los órganos sensoriales y estructuras minerales propuestos como magnetoreceptores.

## **v. Posibles órganos y estructuras magnetoreceptoras**

### **v.i El ojo como magnetoreceptor. Criptocromos**

En la mayor parte de los vertebrados, el ojo está constituido de tres túnicas, La más interna de ellas, conocida como la retina, está formada por una población heterogénea de células generalmente dispuestas en láminas sobrepuestas. La capa más externa de células se conoce con el nombre de fotorreceptora y contiene a las células responsables de transducir los estímulos luminosos en electroquímicos a través de la transformación, mediante reacciones que involucran la transferencia de electrones (Ritz *et al.*, 2000; Schulten, 1982 y Timmel y

Henbest, 2004), de pigmentos fotosensibles en moléculas que controlan el flujo de iones a través de los canales correspondientes (Figura 4a).



**Figura. 4.** El ojo como magnetoreceptor. **a)** Túnicas del ojo de vertebrado en la que destaca la retina formada por células heterogéneas dispuestas en láminas. La capa más externa es la fotorreceptora. **b)** Modelo del ojo utilizado para el cálculo de los patrones de modulación visual. Los rayos 1 y 2 penetran a través de un abertura infinitesimal  $0^\circ$  y se proyectan en una retina esférica. Las moléculas receptoras se asumen orientadas de manera normal hacia la superficie de la retina en (direcciones  $z_1$  y  $z_2$ ), formando entonces diferentes ángulos con la dirección del vector de campo magnético. **c)** Patrones de modulación visual a través del campo magnético (0.5G) para una ave mirando en diferentes direcciones a ángulos  $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $150^\circ$  y  $180^\circ$  con el vector del campo magnético. Los patrones han sido evaluados asumiendo receptores radicales pares. Las ilustraciones esquemáticas a lado de los patrones de modulación indican la dirección correspondiente, en la cual el ave pudiera volar en Urbana-Champaign USA. (Campo geomagnético de  $68^\circ$ ). (Figura modificada de Wiltschko y Wiltschko, 1993).

Debido a que la luz es un fenómeno electromagnético, no sería sorprendente el pensar que estas células fotorreceptoras también pudieran sentir el campo magnético terrestre y/o sus anomalías. En apoyo a esta posibilidad se ha descrito la presencia de criptocromos en los fotorreceptores de la retina y la glándula pineal en diversos animales (Mouritsen *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2004 y Cashmore *et al.*, 1999). Estos pigmentos fotoreducibles son importantes en el control de la ritmicidad circádica en animales (Mouritsen *et al.*, 2004 y Moller *et al.*, 2004), además de mostrar una marcada homología con las fotoliasas enzimas responsables de la formación de pares de radicales después de la fotoexcitación relacionada con el daño potencial del ADN (Giovani *et al.*, 2003). Además se ha observado que la actividad de un subtipo de neuronas ganglionares en la retina del ave incrementa en la noche cuando estas parecen realizar actividades de orientación asociadas a su desplazamiento; estas neuronas son particularmente ricas en criptocromo 1.

La observación descrita, aunada a las diferencias observadas en la actividad neuronal y distribución de los criptocromos en aves no migratorias, llevó a la suposición de que estos pigmentos en verdad constituyen transductores potenciales de la información magnética en el ojo (Mouritsen *et al.*, 2004). Estos hallazgos son, sin embargo, más anecdóticos que causales, y aún queda mucho por estudiar antes de hacer afirmaciones poco sustentadas. Siguiendo en la misma línea de pensamiento, un aspecto importante por dilucidar es como los

fotopigmentos transducen la información magnética en potenciales electroquímicos interpretables por el cerebro (Ritz *et al.*, 2000). Esto es particularmente crítico si uno considera que el campo magnético terrestre es extremadamente débil (Leask, 1977), por lo que el uso del proceso de la transducción asociado con la visión como metáfora válida para suponer como ocurre la transducción magnética es inadecuado.

No obstante ello, se ha propuesto que el campo magnético terrestre pudiera modificar las reacciones de transferencia de pares de electrones (i.e., pares de radicales (Grissom, 1995 y Adair, 2000); en pigmentos fotosensibles (i.e., magnetosensibles) a través de afectar el spin de éstos (Ritz *et al.*, 2000; Leask, 1977; Schulten, 1982 y Weaver *et al.*, 2000). Esto se traduciría en códigos de información electroquímica válidos para los componentes neuronales del sistema visual. En este modelo, una condición que debe cumplirse es que la velocidad de la reacción y la fuerza de interacciones entre los espines de los electrones y los núcleos en las moléculas de pigmento deben estar correlacionadas para que la orientación y la fuerza del campo magnético de la Tierra tengan un efecto significativo (Adair, 2000).

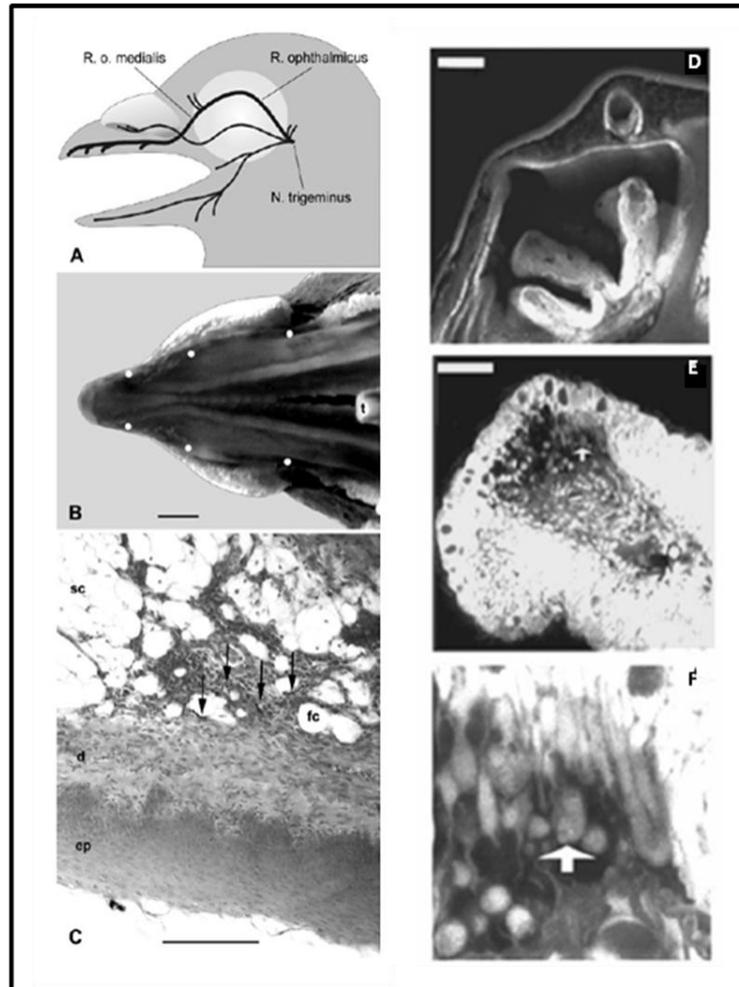
## **v.ii El sistema trigémino y la magnetorecepción. Magnetita de dominio simple (DS) y/o superparamagnética (SP)**

El sistema sensorial denominado somestésico es responsable de introducir información derivada de la interacción del cuerpo con el medio ambiente (i.e., exterocepción) y de aportar información de las distintas partes del cuerpo y de las vísceras (i.e., interocepción) al cerebro. A manera de ilustración cabe mencionar que de las submodalidades de somestesia, el tacto es la más familiar para la mayor parte de los seres humanos. El sistema de somestesia en la mayor parte de los vertebrados está constituido por dos subdivisiones mayores: la subdivisión caudal que recoge la información somestésica del cuerpo; la subdivisión cefálica que recoge la información somestésica de la cabeza y del cuello. En términos generales, y aunque los nervios facial, glossofaríngeo y espinal proveen de información sensorial de la cara al cerebro, es el denominado nervio trigémino el que aporta el mayor porcentaje de información sensorial proveniente de la cabeza. A su vez, el nervio del trigémino da origen a tres ramas denominadas como oftálmica, submaxilar y submandibular nombradas así en correspondencia con el territorio al cual inervan (Wolf *et al.*, 2006).

Una de las ideas más aceptadas en el área de la magnetorecepción es que los transductores moleculares de la información magnética en especies de animales migratorias contienen magnetita. Esta idea surgió de la observación de que las bacterias magnetotácticas orientan su nado utilizando, aparentemente,

organelos especiales conocidos como magnetosomas, ricos en magnetita. A la fecha, se han realizado diversos intentos por identificar magnetita en diversas áreas de la cabeza y cuerpo de diversas especies migratorias de tortugas marinas, truchas, palomas, mariposas, abejas y hormigas entre otras (Gould *et al.*, 1978; Gould, 1982; Walcot *et al.*, 1979; Ueda *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1984; Mann *et al.*, 1988; Avalos *et al.*, 1999; Hanzlik *et al.*, 2000 y Winklhofer *et al.*, 2001). Quizá los estudios más cuidadosos han sido llevados a cabo en pichones y truchas (Figura 5). Con base en ellos, se ha propuesto que terminales especializadas de los axones que constituyen a la rama oftálmica del nervio trigémino de los pichones contienen o están asociados con magnetorreceptores que contienen magnetita biogénica (Winklhofer *et al.*, 2001 y Fleisnner *et al.*, 2003; Figura 5A, B y C).

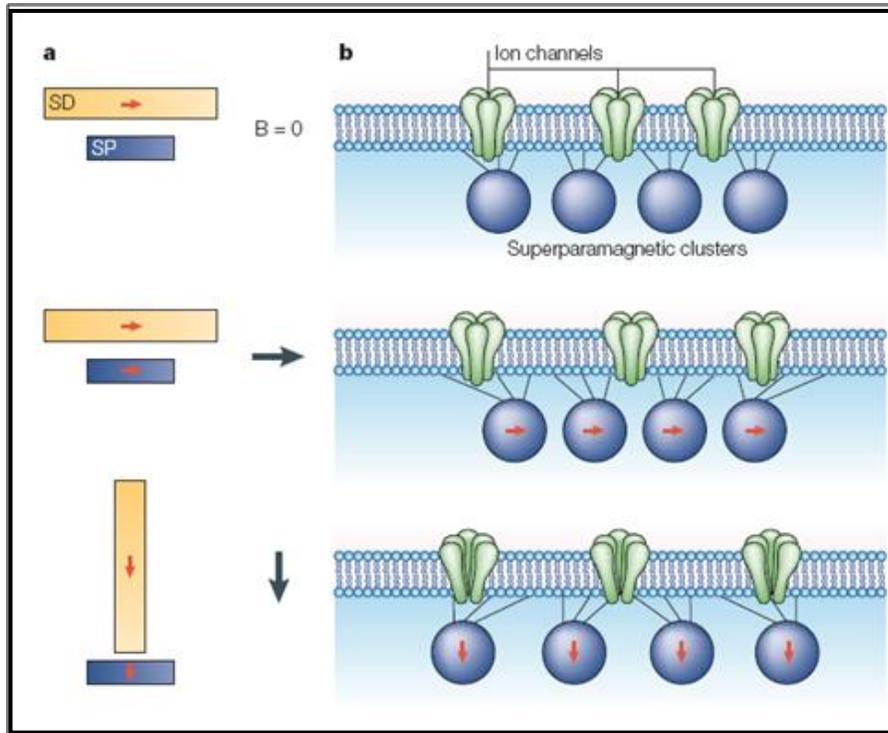
Por otro lado, en la trucha se reportó que algunas células de la lámina olfatoria inervadas por la rama oftálmica contienen cristales de magnetita biogénica del tipo dominio simple (DS) (Walker *et al.*, 1997 y Diebel *et al.*, 2000; Figura 5D, E y F). En pichones, los cristales registrados como magnetita son del tipo superparamagnético (SP) y han sido detectados en la base del área superior del pico, dentro de terminaciones nerviosas de la rama oftálmica (Winklhofer *et al.*, 2001 y Hanzlik *et al.*, 2000).



**Figura 5.** El sistema trigémino y la magnetorecepción. A. Dibujo esquemático del cráneo del pichón mostrando el curso de la rama oftálmica del nervio trigémino que da lugar mediante su rama oftálmica medial (Ro medialis) a la innervación somatosensorial entera de la punta del pico superior. B. Vista macroscópica del interior del pico. Los puntos blancos indican los sitios de las terminales del nervio magnetoreceptor candidato (escala de la barra 2nm). C. Sección sagital del tegumento interior del pico, mostrando depósitos de Fe positivos a la tinción con azul de Prusia (PB). Las terminales reactivas a PB (flechas) se encuentran por debajo de las capas sólidas de la epidermis (ep) y dermis (d) dentro de estrato laxo del subcutis (sc) que obtiene su nombre de la textura esponjosa de las células adiposas (fc). (escala de la barra 100nm). D. Sección de la capsula nasal de la trucha en donde es posible observar las tres lamelas que la constituyen (escala de la barra 250 mm). E. Sección de la porción distal de la lamela media en donde se observa la célula magnetoreceptora (flecha), (escala de la barra 50 mm). F. Imagen de reflectancia contenida en la célula sobrepuesta a la imagen de autofluorescencia (CLSM overlay 60-mm cuadrados tomados alrededor de la célula magnetoreceptora) (A B y C tomadas de Fleissner *et al.*, 2003; D E y F tomadas de Diebel *et al.*, 2000.).

Sin embargo, la sola presencia de magnetita DS o SP en el tejido animal no es prueba de su papel en la magnetorecepción. Al respecto, es interesante mencionar que estudios electrofisiológicos llevados a cabo en la rama infraorbitaria del nervio trigémino registran potenciales de acción en ella cuando los pichones fueron expuestos a campos magnéticos (Demaine y Semmm, 1985). Estos resultados apoyan la idea de que el sistema trigeminal pudiera constituir la aferente primaria de la vía magnetoceptiva, y que la magnetita biogénica pudiera participar en la transducción de los estímulos magnéticos.

Al igual que para el ojo, el otro aspecto importante por dilucidar es como la magnetita biogénica, transduce la información magnética en potenciales electroquímicos interpretables por el cerebro. Al respecto, se han sugerido dos modelos que pretenden explicar cómo los depósitos de magnetita podrían abrir canales iónicos ubicados en la membrana de los mecano- y/o magnetoreceptores al ser expuestos al campo magnético terrestre, a través de generar un estrés mecánico (Figura 6). El primero de ellos, basado en la existencia de partículas de magnetita de dominio simple (DS), supone que en regiones circunvecinas de los mecanoreceptores existen cadenas de magnetita cuya orientación se modifica al ser expuestos al campo magnético. Dicho cambio de orientación, genera una modificación de la tensión en el tejido circundante a los mecanoreceptores lo que conlleva a activación (Walker *et al.*, 1997 y Diebel *et al.*, 2000; Figura 6a).



**Figura 6.** Las diferentes propiedades magnéticas de cristales DS y SP. **a.** Cristales de magnetita DS Y SP tienen diferentes propiedades magnéticas. Los cristales de DS tienen momentos magnéticos permanentes (indicado por flechas rojas), aún en ausencia de un campo magnético externo ( $B=0$ ). Si un campo magnético externo se hace presente (flecha negra) y el cristal es libre de rotar, entonces se alineará con el campo externo. En contraste, cristales superparamagnéticos no tienen momento magnético en ausencia de un campo externo. Si un campo externo se hace presente, sin embargo, los cristales desarrollan un momento magnético que los mueve, aunque el cristal no rota sobre su eje. **b.** Un mecanismo hipotético de transducción basado en clústeres interactuantes de cristales SP localizado en las membranas neuronales. Dependiendo de la orientación externa del campo, los clústeres se atraerán o repelerán entre sí deformando la membrana y posiblemente abriendo o cerrando canales iónicos. Por ejemplo cuando el campo externo es paralelo a la membrana celular los campos en cada cristal (flechas rojas) se alinean de tal manera que los clústeres adyacentes se atraen uno con otro como una línea de barras magnéticas alineadas extremo a extremo (parte media de la figura). La membrana por lo tanto, será ligeramente comprimida. En contraste un cambio en la orientación de 90 grados del campo externo (parte inferior de la figura) resulta en diferentes interacciones entre clústeres, ya que los clústeres adyacentes se arreglan ahora como una línea de barras magnéticas de lado a lado. Las interacciones resultantes estrecharán la membrana y abrirán canales iónicos. Este modelo fue inspirado por el descubrimiento de cristales SP en el nervio trigémino de pichones (Figura tomada de Jhonsen y Lohmann, 2005).

Un segundo modelo basado en la existencia de partículas de magnetita superparamagnéticas (SP) (Shcherbakov y Winklhofer, 1999; Figura 6b), supone que los cristales superparamagnéticos son capaces de generar campos lo suficientemente grandes para atraer o repeler cristales vecinos. Esta interacción entre cristales es capaz a su vez de deformar la matriz en la cual el clúster está embebido (Kirshvink y Gould, 1981 y Bacri *et al.*, 1996), en adición, clústeres enteros de cristales SP se pueden atraer o repeler entre sí bajo ciertas condiciones (Dávila *et al.*, 2003). Cuando los magnetorreceptores son expuestos a un campo magnético, la orientación de los componentes de los conglomerados se modifica de manera acorde a la orientación del campo magnético, lo que genera tensiones en la membrana que pueden o no conducir a la apertura de canales iónicos (Figura 6b).

Hasta aquí, una vez discutidas las ideas en torno a las bases biofísicas de dicho proceso de transducción, así como las características del campo magnético terrestre susceptibles a ser sensadas e interpretadas como claves de navegación por las distintas especies de animales migratorios, es momento de abordar el comportamiento migratorio de las tortugas marinas y finalmente a *Chelonia agassizi* y el área de reserva Colola-Marúata como modelos para el estudio de la magnetorecepción.

## **vi. Comportamiento migratorio de las tortugas marinas.**

### **vi.i Localización de las áreas de reproducción, playas natales y sitios de desove**

La migración de las tortugas marinas ha despertado gran interés entre expertos de diversas áreas debido a que estos animales navegan en vastas extensiones de océano sin aparentes puntos de referencia para alcanzar destinos estrictamente específicos. Durante su época de reproducción las tortugas marinas realizan migraciones oceánicas a larga distancia, desde sus áreas de forrajeo a sus áreas de reproducción (Carr, 1972; Bowen *et al.*, 1989; Marc *et al.*, 1994; Meylan *et al.*, 1990; Luschi *et al.*, 2003), en donde después de aparearse, las hembras deben localizar su playa de desove. Al respecto, resultados obtenidos en estudios que involucran telemetría, marcaje de especímenes y métodos genéticos, prueban que la mayoría de las tortugas hembras retornan fielmente no solo a sus áreas de reproducción sino a su playa natal. (i.e filopatria precisa a su playa natal FPN), con solo una pequeña proporción que anida en playas diferentes de aquellas en donde nació (Peare y Parker, 1996; Schroth *et al.*, 1996; Hatase *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007). Una vez en su playa natal, las hembras de tortuga seleccionan un sitio de desove (lugar de anidación preferente NP). Esta selección no es al azar y es de alguna manera predecible (Camhi, 1993 en Wood and Bjorndal, 2000; Nordmoe *et al.*, 2004; Weishampel *et al.*, 2006; Xavier *et al.*,

2006). Finalmente al nacer la cría debe emprender de manera inmediata su retorno al mar para asegurar su supervivencia.

Mientras que las consecuencias ecológicas de la localización de las áreas de reproducción, playas natales y sitios de desove, han sido extensamente analizadas, la naturaleza y fuente de los recursos ambientales utilizados a corta y larga distancia para desplegar tales comportamientos son todavía materia de intensa controversia. En este sentido, como lo hemos mencionado, ha sido propuesto que la posición de las estrellas (señales visuales), gradientes químicos (probablemente señales olfativas) emanados de las áreas de reproducción y corrientes marinas (posiblemente señales somestésicas o vestibulares) pudieran ayudar a las tortugas en el encuentro con sus sitios de reproducción. Similarmente gradientes químicos de corta distancia emanados de las playas natales, se piensa, pueden proveer información necesaria a las tortugas para realizar FNP (Koch *et al.*, 1969; Manton *et al.*, 1972; Carr, 1988; Lohmann *et al.*, 1990, 1999; Grassman, 1993; Lohmann y Lohmann, 1996b; Papi y Mencacci, 1999; Avens y Lohmann, 2003; también revisado en Freake *et al.*, 2006). Por otro lado aunque NP aparenta estar influenciado por elementos del microhábitat tales como cubierta vegetal, pendiente de playa, humedad de la arena, tamaño de grano, pH y temperatura (Stancyk y Ross, 1978, Mortimer, 1982, 1990; Alvarado y Figueroa, 1989; Flores, 1992; Wood y Bjorndal, 2000; Kamel and Mrosovsky, 2004, 2005, 2006; Weishampel *et al.*, 2006), el hecho de que la magnitud de la influencia de cada

uno de estos elementos sobre NP varié grandemente en los diferentes estudios impide generar un conclusión sólida al respecto.

La información posicional necesaria para localizar áreas de reproducción y playas de anidación pueden también ser extraída del campo magnético terrestre. Al respecto la capacidad de sensor inclinación e intensidad del campo magnético terrestre por las tortugas para orientar su migraciones entres sus áreas de reproducción y forrajeo (Lohmann, 1992, 1993; Light *et al.*, 1993; Lohmann *et al.*, 1999; Lohmann and Lohmann, 1994a y b, 1996a y b; Luschi *et al.*, 2007), nos permite pensar que estas pudieran usar información proveniente de las anomalías magnéticas locales así como gradientes magnéticos provenientes de la playa natal en adición a los gradientes químicos a corta distancia para realizar FNP y NP. Dadas las dificultades técnicas y financieras que suponen tratar de distorsionar el sentido magnético de las hembras de tortuga mientras se aproximan a sus playas natales, ningunas de estas dos posibilidades han sido probadas aún. Nosotros pensamos que una manera de, en parte, solventar esta dificultades técnicas y costos de tales experimentos de comportamiento, es evaluar si las playas natales en efecto presentan características magnéticas que pudieran estar actuando como faros de orientación que guíen la aproximación final de las tortugas a su playa natal y puedan además proveer de marcas magnéticas sutiles que le ayuden a decidir en donde desovar a lo largo del cinturón de playa. Aunque a primera vista, no haya ninguna razón obvia por la que las tortugas deban buscar por secciones

de playa enriquecidas con minerales magnéticos, el alto contenido de estos puede influenciar algunas características del microhábitat tales como temperatura, humedad y tamaño de grano (US Fish and Wildlife Service, 1999; Byrd, 2004).

### **vii. La tortuga marina *Chelonia agassizi* y el área de reserva Colola-Maruata como modelos para el estudio de la magnetorecepción**

La tortuga marina negra *C. agassizi* constituye, un excelente modelo para estudiar los procesos neurobiológicos que subyacen a la magnetorecepción. Esto se debe a que es una de las pocas especies de organismos migratorios que han mostrado una alta fidelidad a sus rutas de migración, a lo largo de su historia evolutiva. Prueba de ello es su restringido rango de distribución en contraste, por ejemplo, con otras especies de tortugas marinas cuya distribución es mucho más amplia. Las principales poblaciones reproductivas de *C. agassizi* se restringe a 2 localidades en el mundo: Colola-Maruata, Michoacán en el Pacífico Mexicano y en las islas Galápagos. Colola y Maruata, constituyeron el principal sitio de desove de *C. agassizi* a nivel mundial hasta 1980. Después de este año, el número de hembras anidadoras decayó dramáticamente por sobreexplotación. Sin embargo el hecho de que cerca del 80% de la población anidadora de *C. agassizi* arriba cada año a Colola-Maruata sostiene la idea de que las tortugas hembras despliegan FNP (Alvarado y Figueroa, 1992, Delgado y Alvarado 2001; aunque ver Chasin-Noria *et al.*, 2004).

En adición, la tortuga negra muestra NP preferencial. Registros históricos revelan su preferencia por el tercio oeste y parte este de las playas de Colola y Maruata, respectivamente (Alvarado y Delgado, Base de datos del Proyecto Tortuga Negra 1985-2000, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Es por lo anterior, que también consideramos que, un escenario geológico apropiado para estudiar si las playas natales de *C. agassizi* poseen faros y marcas magnéticas sutiles, está constituido por la unidad de playas Colola-Maruata en la costa Michoacana.

**vii.i *C. agassizi* y el CMT, ¿en realidad lo sensa?, ¿a partir de qué momento? y ¿de que manera?**

Las crías de tortuga marina se desplazan hacia el mar tan pronto como emergen del nido, a fin de asegurar su supervivencia. Debido a que este comportamiento es desplegado por crías que no han tenido experiencia previa de su contexto ambiental, uno pudiera pensar que el comportamiento de desplazamiento del nido hacia el mar esta improntado -y por lo tanto genéticamente especificado- en los circuitos cerebrales antes de que la eclosión de las crías ocurra. Sin embargo evidencia empírica ha mostrado que dicho comportamiento puede ser perturbado por la exposición de la cría a siluetas brillantes, horizontes o luces artificiales (Salmon *et al.*, 1992, 1995; Tuxbury y Salmon, 2005), lo que sugiere que este comportamiento no está “codificado” en el

cerebro antes de su eclosión y que su expresión es constantemente ajustada conforme estas se desplazan del nido hacia el mar, basándose en la experiencia sensorial inmediata. Así, aparentemente, en el mejor de los escenarios lo que las tortugas han heredado es el tropismo hacia los objetos brillantes, pero no el comportamiento de desplazamiento hacia el mar como un todo.

En la mayoría de los vertebrados la definición de una ruta de desplazamiento desde un punto de origen hacia una meta, puede ser llevada a cabo por dos mecanismos cognoscitivos básicos. Por un lado, si el sujeto está completamente familiarizado con el área circundante puede generar mapas cognitivos basados en la memorización de las relaciones espaciales y de los atributos físicos de los objetos de referencia existente en el área en donde la ruta de desplazamiento será o ha sido definida. La elaboración de mapas cognitivos provee a los animales con cerebros complejos de la oportunidad de planear la ruta de desplazamiento o modificarla continuamente conforme va experimentando el ambiente sin perder el rumbo que lo llevará finalmente a su destino (Bennet, 1996; Collet y Graham, 2004). El otro mecanismo, referido como integración de vías, es desplegado cuando el sujeto está tratando de definir la ruta de desplazamiento pero no ha experimentado las características del área previamente. En este caso el sujeto define la ruta de desplazamiento conforme a la secuencia de aparición y la posición relativa de los objetos de referencia mientras se va moviendo a lo largo de la ruta. Este mecanismo es utilizado por los organismos con sistema nervioso

complejo y relativamente simple y no permite ir planeando conforme se avanza o modificando la ruta ya definida. De hecho, si uno de los objetos de referencia es perdido o no reconocido, el sujeto se confundirá o desorientará (Samsonovich y McNaughton, 1997; Collet y Graham, 2004)

Cualquiera que sea la estrategia cognitiva utilizada para definir la ruta de desplazamiento, los sujetos moviéndose, siempre requerirán de información sensorial para delinear dicha ruta. Aunque estudios de comportamiento han revelado que muchos organismos usan un solo canal sensorial o estímulo predominante (unimodal) para introducir la información que ayudará en la definición de las rutas de desplazamiento (Samsonovich y McNaughton, 1997), es también claro que información complementaria entrando al sistema a través de otros canales sensoriales no preferentes (multimodal), puede necesitarse para asegurar el encuentro eficiente de los sitios de destino (Walcot, 2005). Al respecto, existe abundante información sobre el rol de los estímulos visuales en la modulación del comportamiento de desplazamiento de crías de tortuga marina hacia el mar (Salmon *et al.*, 1992, 1995; Tuxbury y Salmon, 2005), pero se sabe muy poco sobre señales sensoriales complementarias que pudieran ser utilizadas por las crías para aproximarse a la rompiente.

Con el fin de responder en primera instancia a una de las interrogantes centrales del presente trabajo, en cuanto a si en realidad *C. agassizi* es capaz de sensor el campo magnético terrestre, investigamos también el rol de los diversos

estímulos visuales, olfativos, y/o magnéticos que pudieran estar influenciando el comportamiento de desplazamiento de las crías de tortuga *C.agassizi* hacia el mar, esto a su vez, nos proporcionó información acerca de los mecanismos -mapa cognitivo o integración de vías- y canales sensoriales utilizados - unimodal o multimodal- por las crías de la tortuga negra. Finalmente, para tener una visión más completa del aparato sensorial y la vía neural relacionadas con la magnetorecepción, se mapearon los ensambles de neuronas responsivos a cada tipo de estímulo, mediante el uso de la técnica C-fos, muy utilizada en el campo de las neurociencias.

### III. Justificación del estudio

Es ampliamente aceptado que los organismos vertebrados recopilan información del medio ambiente a través de cinco sistemas sensoriales, y que es el procesamiento e integración de la información relacionada con la naturaleza y las propiedades físico-químicas, temporales y espaciales de los estímulos correspondientes a dichas modalidades lo que permite a los organismos generar percepciones que son utilizadas para ajustar su conducta a los requerimientos impuestos por el entorno. No obstante el predominio de la concepción de los “cinco sentidos” como fuentes primarias de información útil en la interacción del los organismos con su medio, desde los años 50’s se viene acumulando evidencia que fortalece la idea de que la electrocepción y la magnetocepción en verdad constituyen modalidades sensoriales a través de las cuales los organismos extraen información valiosa del medio ambiente. Estos sistemas sensoriales “no convencionales” han sufrido, sin embargo, de cierto grado de menosprecio, impopularidad y hasta de descrédito entre los neurobiólogos quizás porque su aparente utilidad en los mamíferos, particularmente en el ser humano, parece

limitada (aunque ver Baker, 1988; Sandyk *et al.*, 1991; Partonen, 1998). Afortunadamente, esta situación ha empezado a revertirse. De esta forma, la presente propuesta pretende dar inicio a un estudio sistemático, multidisciplinario que permita identificar las bases biológicas y geofísicas de la magnetocepción en la tortuga marina *Chelonia agassizi*, una de las especies de tortugas marinas que arriban a las playas mexicanas y que se encuentra en peligro de extinción. De esta forma, desde el punto de vista científico y hasta donde tenemos conocimiento, la presente propuesta constituirá el primer esfuerzo realizado en nuestro país por establecer las bases neurobiológicas y geofísicas de la magnetocepción en la tortuga marina, por lo que la información obtenida tendrá un impacto mayor tanto en el área de trabajo de la ecología de los sistemas sensoriales, como en otras áreas tales como la etología y en el manejo y conservación de recursos naturales animales. Consideramos que, caracterizar los diversos aspectos relacionados con la biología y el hábitat de *C. agassizi*, podría facilitar el diseño de medidas de protección y rescate de las poblaciones. Adicionalmente, nuestro estudio podría sentar las guías y servir como modelo para la realización de otros estudios en otras especies migratorias de gran importancia ecológica y económica (e.g., la mariposa monarca, abeja mielera, langosta marina).

## V. Hipótesis

Dado todo lo expuesto con anterioridad el presente trabajo parte de la siguiente hipótesis:

La tortuga marina *Chelonia agassizi* es capaz de sensar el campo magnético terrestre para obtener información posicional, orientar sus rutas migratorias y ubicar sus playas natales, gracias a la presencia en su organismo de cristales de magnetita biogénica relacionadas con elementos del sistema nervioso encargados de transducir la información.

## V. Objetivos

### Objetivos Generales.

1. Identificar y caracterizar la magnetita en distintos elementos cefálicos de la tortuga marina negra *Chelonia agassizi*.
2. Identificar y caracterizar el aparato sensorial y la vía neural relacionadas con la magnetocepción en la tortuga marina *C. agassizi*.
3. Identificar las características magnéticas de Colola-Maruata que pudieran ser susceptibles de ser sensadas por *C. agassizi* para su ubicación y encuentro.

### Objetivos Específicos.

#### FASE 1. Bases Físicas de la Magneto percepción en *C. agassizi*

- 1.1 Realizar estudios de magnetometría en diferentes componentes cefálicos viscerales en la tortuga *C. agassizi*.

- 1.2 Aislar y caracterizar el material ferromagnético de los diferentes componentes viscerales cefálicos en la tortuga negra.

**FASE 2.** Bases Neurobiológicas de la Magnetopercepción en *C. agassizi*

- 2.1 Identificar la magnetita biogénica en *C. agassizi* y elementos celulares que constituyen el posible aparato de magnetorecepción en *C. agassizi*, mediante técnicas histoquímicas y microscopía de luz.
- 2.2 Describir el comportamiento de desplazamiento de crías de *C. agassizi* hacia el mar, en respuesta a estimulación con magnetismo comparado con aplicación de otros estímulos y privación de ellos.
- 2.3 Mapear la vía neural involucrada en el procesamiento de la información magnética mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica y análisis digital de imágenes.

**FASE 3.** Magnetismo en el Área de Reserva Colola-Maruata

- 3.1 Evaluar las propiedades magnéticas de las playas natales de *C. agassizi* que las distinguen de sus playas vecinas, no natales.
- 3.2 Determinar si las áreas de preferencia de desove y no desove dentro de las playas natales poseen marcas magnéticas sutiles que influyan en este comportamiento.

## VI. Materiales y Métodos

### i. Animales

Se colectaron crías de tortuga negra *C. agassizi* durante la estación reproductiva noviembre o diciembre y se transportaron al laboratorio de Invertebrados de la Universidad Michoacana en Morelia, en donde se mantuvieron vivas en un acuario de 1 a 8 meses hasta su sacrificio. Los especímenes se mantuvieron bajo ciclos de 12 horas iluminación, 12 horas oscuridad y alimentados *ad libitum* con carne de pescado, también fueron colectados embriones no logrados. Finalmente crías recién eclosionadas fueron utilizadas en experimentos de estimulación y /o privación de estímulos. Todos los procedimientos de manipulación y experimentales aplicados en los animales se diseñaron siguiendo las normas publicadas por los Institutos Nacionales de Salud, en Estados Unidos, y fueron aprobadas por la SEMARNAT, permisos SGPA/DGVS/10414, 11314, y 14340, (ver en anexos).

## **FASE 1. Bases Físicas de la Magnetopercepción.**

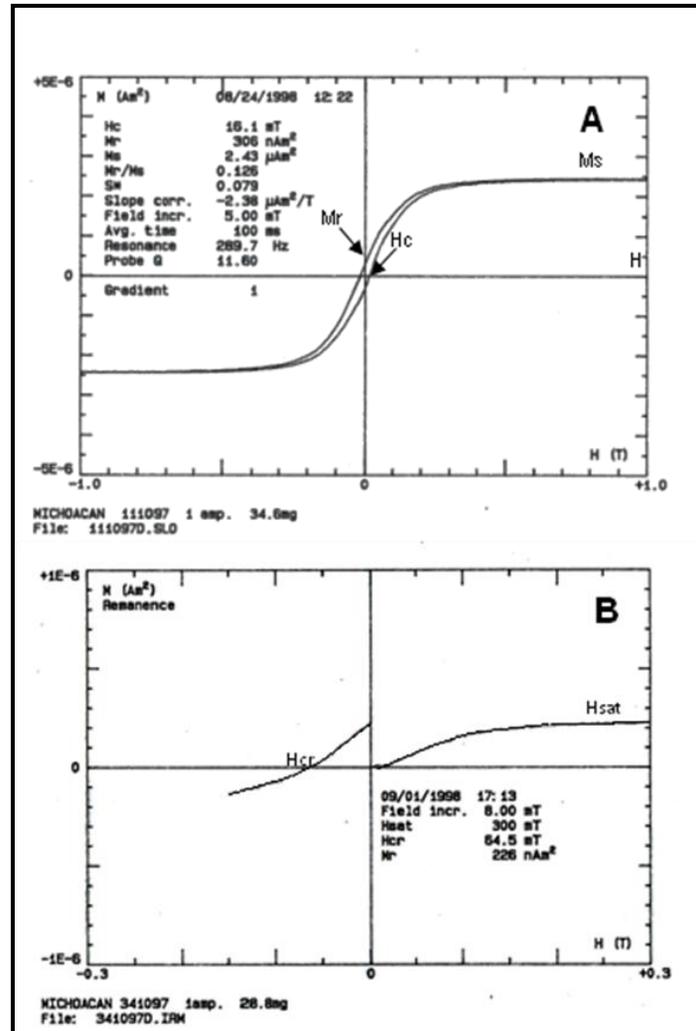
### **1.1 Magnetometría**

Ya que este manuscrito puede ser del interés de científicos no familiarizados con la terminología geofísica, aquí proveemos de una breve explicación de terminología técnica utilizada a través del mismo. Los métodos de la mineralogía magnética conducen a la identificación del tipo de minerales magnéticos presentes en las muestras, ya sea biológicas o geológicas y ayudan en la evaluación de su contribución al magnetismo remanente natural (mrn; el valor del magnetización que el material magnético adquiere durante su formación y posterior historia) en la muestra como un todo. En adición la interpretación de los parámetros magnéticos de las muestras proveen información sobre la concentración y tamaño y tipo del material magnético contenido en la muestra.

En este trabajo, los métodos directos utilizados para identificar los minerales magnéticos en las muestras de arena fueron microscopía de luz de transmisión (i.e., análisis de lámina delgada) y difracción de rayos X (Kerr, 1965). Las muestras de roca fueron analizadas utilizando microscopía de luz de transmisión. Por otro lado, también fueron utilizados métodos indirectos de mineralogía magnética para identificar minerales magnéticos en las muestras de arena y roca obtenidas. A través de estas mediciones magnetométricas, se obtuvieron los valores de susceptibilidad magnética, intensidad del la mrn, histéresis y magnetización remanente isotérmica (irm).

La susceptibilidad magnética se define como la habilidad de un compuesto dado a ser magnetizado en respuesta a la aplicación de un campo magnético externo. La histéresis corresponde al patrón de magnetización y desmagnetización del material bajo escrutinio cuando se somete a campos magnéticos isotérmicos en dirección opuesta. Este comportamiento puede ser graficado en una curva de histéresis (Figura 7A) que conlleva a determinar la magnetización de saturación ( $M_s$ ; el valor que representa el punto al cual el material está completamente magnetizado después de aplicar un campo magnético externo de continuo incremento en intensidad), la magnetización remanente ( $M_r$ ; el valor del magnetismo que permanece en el material después del decaimiento del campo magnético externo aplicado a cero) y la fuerza coercitiva ( $H_c$ ; el valor de la fuerza campo magnético necesaria para desmagnetizar por completo el material de estudio). Finalmente la irm corresponde al patrón de magnetización, inducida por la aplicación un campo magnético externo de incremento continuo en intensidad al material objeto de estudio después de haber sido sujeto al proceso de histéresis. Este comportamiento puede ser graficado como una curva de adquisición de la irm que permite definir el campo de saturación ( $H_{sat}$ ; el valor del campo magnético necesario para alcanzar el punto de saturación en un material que ha sido sujeto previamente a un proceso de histéresis) y la fuerza coercitiva remanente ( $H_{cr}$ ; el valor de la fuerza del campo magnético requerido para desmagnetizar por

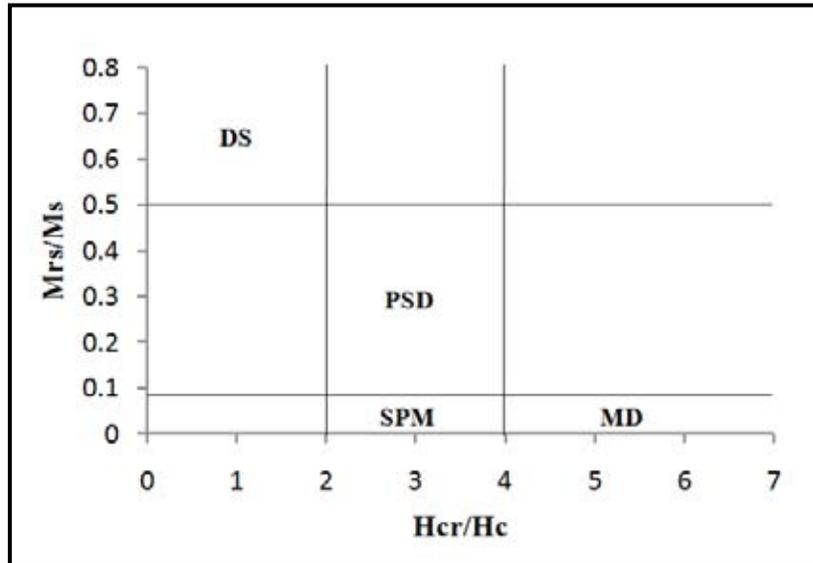
completo un material que ha sido previamente sometido a un proceso de histéresis (Figura 7B).



**Figura 7.** Ejemplos de gráficos que ilustran el circuito de histéresis (A) y de una curva de adquisición de magnetización isotérmica remanente (irm) (B), obtenidas de muestras de arena de la playa de Maruata (Ms, magnetización de saturación; Mr, magnetización remanente; Hc, fuerza coercitiva; Hsat, campo de saturación y Hcr, fuerza coercitiva remanente)

Los valores de los radios de magnetización  $M_r/M_s$  pueden ser graficados como una función del radio de coercitividad  $H_{cr}/H_c$  en un Diagrama de Day (Figura 8). El diagrama de Day permite identificar el número de dominios magnéticos en las partículas magnéticas que forman el material de estudio.

Los materiales ferromagnéticos están formados por átomos que tienen momentos magnéticos orientados en direcciones particulares. Cuando varios átomos vecinos alinean sus momentos magnéticos en la misma dirección, forman lo que se conoce como dominio magnético. Las partículas magnéticas de una roca o muestra de arena pueden tener números diferentes de dominios magnéticos dependiendo de su tamaño. Cuando una partícula magnética tiene el tamaño suficientemente grande para acomodar dos o más dominios magnéticos estos son separados uno del otro por paredes de dominio. Si el tamaño de la partícula está por debajo de los 80 nm, esta será capaz de contener solo un dominio, razón por la cual es denominada de dominio simple (DS); partículas DS están por lo tanto uniformemente magnetizadas. Partículas multidominio (MD) alcanzan tamaños mayores de 50  $\mu\text{m}$ , y no contribuyen mucho a la magnetización estable de las rocas. Partículas de pseudodominio simple (PSD) tienen tamaños que van de 100nm-20 $\mu\text{m}$ . Su comportamiento magnético es por lo tanto intermedio que aquel observado en partículas DS y MD. Finalmente, partículas superparamagnéticas (SPM) alcanzan el tamaño de 10 nm. Estas partículas no están permanentemente magnetizadas; solo se magnetizan en presencia de un campo magnético externo.



**Figura 8.** Diagrama de Day que permite clasificar las partículas medidas según sus tipos de dominios magnéticos, con base en las relaciones  $M_{rs}/M_s$  vs.  $H_{cr}/H_c$ .

La explicación detallada de los métodos geofísicos utilizados en este trabajo pueden ser consultados en Collinson (1983), Dunlop y Ozdemir (1997) y Butler (1998). Las técnicas magnetométricas arriba descritas pueden ser adaptadas para identificar y caracterizar las propiedades de la magnetita biogénica dado que como resultado de una síntesis controlada, las partículas de magnetita biogénica poseen características intrínsecamente distintas de su contraparte inorgánica. Así, las muestras para medir susceptibilidad magnética y la intensidad de la magnetización remanente ( $m_{rn}$ ), fueron colocadas en cubos de acrílico de 12

cc. para paleomagnetismo. La susceptibilidad magnética fue medida a través de un sistema Bartington MS-2 equipado con un sensor de frecuencia dual. Las mediciones fueron realizadas a baja (Hz) y alta (kHz) frecuencia a fin de determinar la frecuencia dependiente de la susceptibilidad, la cual fue estimada a su vez, en términos del factor de frecuencia dependiente (fd). Los datos de susceptibilidad son reportados en términos de masa de la susceptibilidad. La intensidad de la mrn fue medida con un magnetómetro JR-5 rotatorio. Finalmente, muestras de solo unos cuantos miligramos (0.01 a 0.04) fueron utilizadas para determinar histéresis e irm en el sistema MicroMag.

## **1.2 Aislamiento y caracterización del material ferromagnético de y en la cabeza de la tortuga negra**

En esta parte metodológica, los organismos utilizados corresponden a embriones no logrados, con el fin de evitar el sacrificio de crías vivas. Se revisaron huevos en nidos en donde las crías ya habían eclosionado, se obtuvieron los embriones no logrados y se decapitaron. Las cabezas fueron conservadas en paraformaldehído al 4% y transportadas al laboratorio. En el laboratorio, se procesaron las cabezas completas o se disecaron sus cerebros, ojos, órganos olfatorios, glándulas de sal y porciones de piel. Posteriormente las muestras de tejido fueron lavadas con agua destilada y colocadas en un mortero a fin de ser trituradas lo más finamente posible agregando nitrógeno líquido. El polvo

obtenido de cada una de las muestras fue liofilizado y dividido en dos series tubos de 1.5 ml. Una serie de muestras fue utilizada para realizar la extracción y análisis mediante microscopia electrónica como se menciona en las siguientes oraciones, mientras que la otra serie se usó para realizar los procedimientos magnetométricos (ver magnetometría). Para el caso de la serie de muestras destinadas a la extracción, esta se incubaron con una solución al 6% de hipoclorito de sodio toda la noche a 4 °C; este tratamiento oxida la materia orgánica liberando al componente inorgánico de residuos de tejido. Transcurrido este periodo, los tubos se centrifugaron a 15,700 g por 8 minutos a temperatura ambiente. Al final de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y el material decantado se resuspendió una vez más mediante sonicación por 15 minutos a temperatura ambiente en 0.75 ml de hipoclorito de sodio. Después de una segunda sonicación, el sobrenadante se descartó y el material decantado se resuspende en cloroformo y centrifuga en varias ocasiones hasta que el material decantado final muestra una coloración blanca uniforme. Este color indica que la muestra está libre de grasas. Finalmente, se substituyó el cloroformo por agua destilada y se centrifugó una vez más para obtener el material inorgánico decantado que se uso, posteriormente, para su observación al microscopio electrónico tanto de transmisión como de barrido.

## **FASE 2. Bases Neurobiológicas de la Magnetopercepción.**

### **2.1 Detección histoquímica de la magnetita biogénica**

Tortugas de tres y ocho meses post-eclosión fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (45mg/Kg de peso corporal) y perfundidas por vía cardiaca con una solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH7.4) seguida de una solución fijadora también amortiguada con fosfatos que contenía 3% de paraformaldehído y 1.5% de glutaraldehído. Una vez concluida la perfusión, las tortugas fueron decapitadas sus cerebros, ojos, órganos olfatorios, glándulas de sal, y piel fueron cuidadosamente disecadas y postfijadas en la misma solución por una semana a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron incluidas en parafina por métodos convencionales y cortadas a 8um en un micrótopo. Una vez desparafinizadas, las muestras se incubaron en una solución de azul de Prusia al 1% y ácido clorhídrico al 2% por 10 minutos a temperatura ambiente. Este colorante identifica sitios enriquecidos en el ión férrico, por lo que utiliza frecuentemente para evidenciar probables depósitos de magnetita y algunos otros compuestos con núcleos férricos (Bancroft, 1990). Después de varios lavados en agua corriente, los cortes se deshidrataron y montaron con cytoseal. Las observaciones y fotomicrografías digitales fueron realizadas en un microscopio Nikon Optiphot equipado con una cámara digital.

## **2.2 Experimentos conductuales**

### **2.2.1 Animales y diseño experimental**

Tortugas recién eclosionadas (23-25 gramos de peso corporal) de la especie *Chelonia agassizi* obtenidas de nidos artificiales de la zona protegida llamada “vivero” de la playa de Colola, fueron divididos en 6 grupos experimentales (n=10-16 / grupo experimental) (véase Figura 9). Los especímenes fueron colectados tan pronto como emergieron del nido y transportados a una zona de la playa en donde los nidos naturales eran abundantes, uno fue escogido arbitrariamente como nido de partida. Este se ubicaba aproximadamente a 122 m de la rompiente. Una sola prueba conductual fue llevada a cabo por cada individuo de los seis grupos experimentales. Las pruebas fueron llevadas a cabo de 10:00 PM a 2.00 AM. El grupo de crías no sujetas a ninguna manipulación constituyó el grupo control.

El segundo grupo estuvo formado por crías a las que durante su desplazamiento se le aplicó de forma alternada periodos de foto-estimulación de 9 volts con una linterna de baterías colocada a 30 cm frente a la ruta de desplazamiento. La linterna se mantuvo encendida por 2 minutos cada 3 minutos una vez que la cría abandonó el nido de partida. Para probar el fototropismo el experimentador se movió al azar alrededor de la cría mientras la linterna se mantenía encendida.

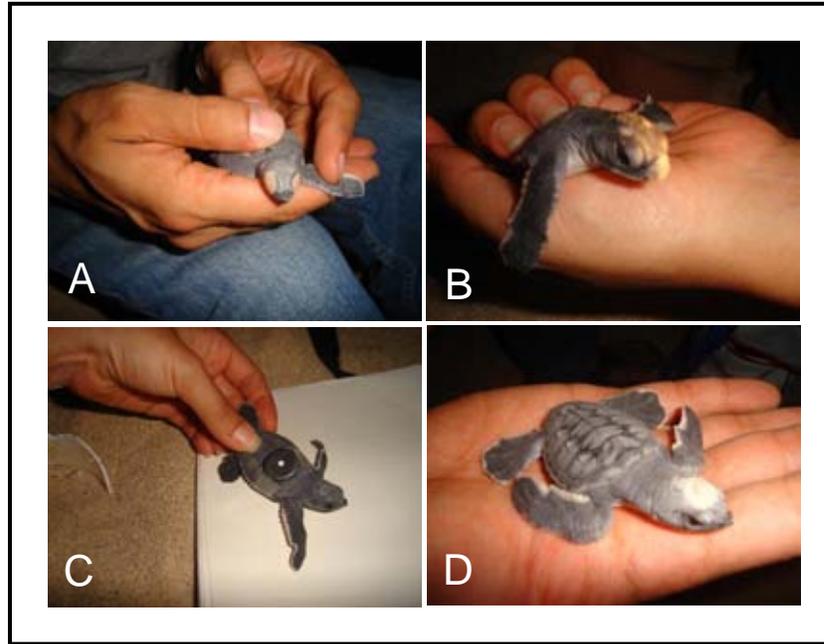


Figure 9. Fotografías que ilustran algunos de los procedimientos utilizados para alterar información visual (A), olfatoria (B) y magnética (C, 350 mT y D, 85 mT) en crías de *Chelonia agassizi* mientras se desplazan del nido hacia el mar. Los círculos encierran los parches adhesivos utilizados para mantener los ojos de las crías cerrados (A), La cera utilizada para obliterar los nostrilos (B), el imán de 350 mT colocado en el caparazón (C) y el parche adhesivo utilizado para fijar el imán de 85 mT al cráneo de las crías.

Las crías, cuyos ojos se mantuvieron cerrados con cinta millipore colocada sobre los párpados cerrados constituyeron el grupo con privación visual (tercer grupo). (Figura 9A). La privación olfativa se llevo a cabo mediante la obliteración transitoria de las narinas con cera dental en el cuarto grupo (Figura 9B). Finalmente, la distorsión del campo magnético se efectuó mediante la colocación

de imanes de 350 mT (4.5 gr de peso) al quinto grupo y 85 mT al sexto, sobre el caparazón y cráneo de las crías respectivamente (Figura 9C y D).

### **2.2.2 Descripción de la arena de prueba conductual**

Los experimentos se llevaron a cabo en la zona media de la playa en donde la densidad de los nidos fue alta. En esta sección, la playa se dividió en tres sectores (Figura 10).

El primer sector denominado como zona de anidación cubrió una longitud de aproximadamente 100 metros. En este primer sector, se ubicó el denominado nido de origen o partida, en el cual fueron colocadas las crías para iniciar sus desplazamientos al mar. El segundo sector o de transición, caracterizado por la ausencia de nidos y de arena húmeda, alcanzó una longitud aproximada de 60 metros. Finalmente, el tercer sector o frente de playa, caracterizado por la ausencia de nidos pero la presencia de arena húmeda, alcanzó una extensión aproximada de 40 metros hasta la zona de rompiente. La arena conductual abarcó por lo tanto, un segmento de playa de 122 metros. Las crías se siguieron una a una durante su desplazamiento y los experimentos fueron realizados por cuatro observadores diferentes.



Se estimó cualitativamente la trayectoria de desplazamiento con relación a nido de partida y el tiempo (i. e latencia) que transcurrió para que las crías recorrieran la distancia entre el nido y la zona de rompiente en el frente de playa (aproximadamente 122 metros). Debido a que las crías control realizaron la tarea con una latencia promedio de  $15.35 \pm 3.21$  minutos, a aquellas incluidas en los grupos experimentales se les dió una tolerancia de 5 minutos para alcanzar la rompiente de la playa antes de darle fin a la prueba y considerarla como un ensayo fallido. En algunos casos, sin embargo, se registró el tiempo en el que finalizaban la tarea para tener un registro del tiempo de ejecución. En aquellos casos en los que no se concluyó la prueba, también se obtuvieron estimados de la distancia total recorrida por individuo al término de los 20 minutos periodo de duración de la prueba. Adicionalmente se determinó el vector de orientación mediante el trazo de una línea a partir de nido de origen hasta la posición final ocupada por cada cría en la playa al final de la prueba. Este vector nos permitió: 1) establecer la dirección de la ruta de desplazamiento de cada cría en relación al norte magnético y 2) estimar la dispersión del desplazamiento del sujeto dentro y entre grupos desde el punto de origen con respecto al norte magnético. El vector de orientación fue también utilizado para estimar la distancia línea que fue recorrida por cada cría en los diferentes grupos experimentales. Aunque este último parámetro pudiera generar subestimaciones, pensamos que provee de una medida objetiva de la efectividad del desplazamiento hacia la meta, a través de

los 122 m, mismo que se esperaría ser efectuado por las crías con la mayor rapidez posible a fin de evitar posibles depredadores. Al final de las pruebas, cada una de las crías fue liberada directamente al mar.

#### **2.2.4 Análisis de datos.**

La comparación para variables cuantitativas (latencia y distancia recorrida) obtenida para el grupo control y cada uno de los grupos experimentales, fue llevada a cabo utilizando la prueba de Mann-Whitney. Para las variables cualitativas (pruebas de comportamiento y orientación preferida) fue utilizada la prueba de Chi-cuadrada y prueba exacta de Fisher como se indica en la tabla 4. En todos los casos, el nivel de significancia fue de  $p < 0.01$ .

### **2.3 Identificación de las estructuras neurales involucradas en el procesamiento de la información asociada al estímulo magnético.**

#### **2.3.1 Inmunocitoquímica para c-fos y estimulación sensorial**

Para el cumplimiento de este objetivo, empleamos una técnica anatómica, frecuentemente utilizada en el área de neurociencias para mapear la activación de ensambles de neuronas en el sistema nervioso central. Esta técnica permite la identificación en el tejido de la proteína conocida como c-fos cuya expresión depende de la activación neuronal relacionada con la estimulación.

Una vez en el laboratorio, las cabezas fijadas fueron hemi-seccionadas sagitalmente, lo que facilitó la separación de ambos hemisferios cerebrales. A continuación, cada hemisferio fue colocado en cápsulas de inclusión, previamente llenadas con el compuesto O.C.T. (Tissue-tek). Posteriormente cada cápsula fue sumergida por dos minutos en 2-metilbutano a  $-66^{\circ}\text{C}$  en un ultra-congelador. Las capsulas se retiraron del 2-metilbutano y se almacenaron en el ultracongelador hasta su uso.

El día del experimento, los bloques fueron extraídos de las cápsulas, montados en los porta-muestra y colocados en la cámara del criostato (Microm 520) a  $-22^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron entonces cortes coronales seriados ( $14\ \mu\text{m}$  de grosor) de cada hemisferio, separados entre sí por  $250\ \mu\text{m}$ . Los cortes se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina, y se incubaron con suero de bloqueo (albúmina bovina 1%, tritón x-100 0.3 % y asida de sodio 0.012% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron incubados con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% diluido con amortiguador de fosfatos adicionado con tritón X-100 (0.3%; pbt) durante 15 minutos para desactivar peroxidasas endógenas. Después de tres lavados de 10 minutos con pbt, se agregó a las laminillas amortiguador de citrato de sodio precalentado a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con pbt, y se incubó con el anticuerpo primario de conejo dirigido contra C-fos humano (1:500) diluido en suero de bloqueo

durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se retiró el excedente de anticuerpo primario, y se realizaron tres lavados con pbt de 15 minutos cada uno. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo (1:500) acoplado a biotina diluido en suero de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con pbt de 15 minutos cada uno. Enseguida, los cortes se incubaron con biotina peroxidada diluida en pbt durante 1:30 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados en amortiguador de fosfatos, la actividad de peroxidasa se reveló utilizando como sustrato peróxido de hidrógeno (0.05%) y como cromógeno 3,3-diamino bencidina (0.01%) en amortiguador de fosfatos durante siete minutos a temperatura ambiente. La reacción de revelado se detuvo lavando las laminillas en tres ocasiones con amortiguador de fosfatos. Una vez finalizado el procedimiento de tinción, los cortes se dejaron secar por 10 minutos a temperatura ambiente y se montaron con Cytoseal (Fisher).

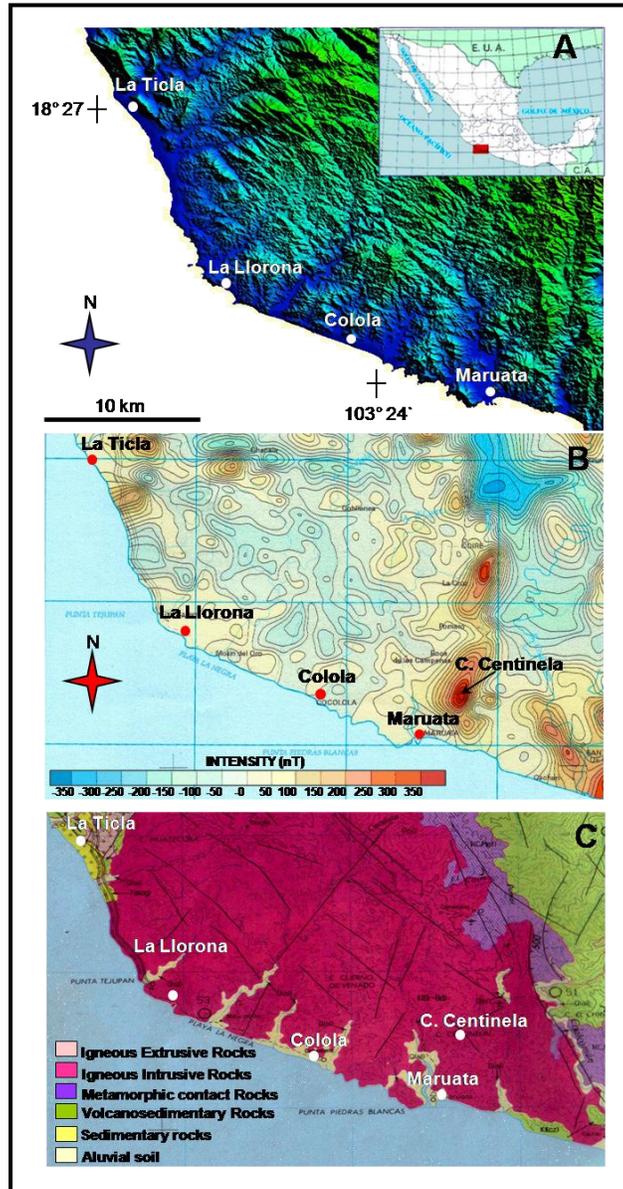
Posteriormente, las laminillas fueron observadas mediante un microscopio de campo claro Nikon Optiphot y algunas imágenes capturadas y digitalizadas con ayuda de una cámara Nikon Coolpix. Finalmente, y con ayuda de un atlas del cerebro de la tortuga *Chrysemys picta picta* (Powers y Reiner, 1980), se identificaron y se ubicaron dentro de las diferentes áreas cerebrales a los grupos de neuronas inmunoteñidas para C-fos.

### **FASE 3. Magnetismo en el área de reserva Colola-Maruata**

#### **3.1. Descripción básica del área de estudio.**

El área de reserva Colola-Maruata corre a lo largo de la costa del océano Pacífico en el estado de Michoacán, con una extensión de 12.4 kilómetros. Maruata se localiza a 18° 16' de latitud norte y 103° 20' de longitud oeste. Colola, por otro lado, se localiza a 18° 18' de latitud norte y 103° 26' de longitud oeste (Figura 11A). En conjunto, ambas playas representan uno de los dos sitios principales a nivel mundial en los cuales la tortuga marina negra encuentra sus áreas de reproducción y desove. Se calcula que el 80% de las tortugas que desovan en la costa Michoacana lo hacen en Colola y Maruata (Alvarado y Figueroa, 1989). Colola es una playa abierta, desprotegida de 4.8 kilómetros de longitud y una anchura promedio de 150 metros, mientras que Maruata es una playa protegida ubicada en la bahía del mismo nombre, tiene una longitud de 2.24 kilómetros y su anchura máxima es de 40 metros (Alvarado y Figueroa, 1992)

La playa La Llorona se localiza al norte de Colola-Maruata a 18° 26' de latitud norte y 103° 30' de longitud oeste, esta playa es eventualmente visitada por la tortuga negra. La Ticla es una playa localizada más al norte de la Llorona a 18° 27' de latitud norte y 103° 33' de longitud oeste, en la cual no se tienen registros de desove de tortuga negra (Figura 11A). La Llorona y La Ticla son playas abiertas de casi 6 kilómetros de longitud y más de 200 metros de ancho.



**Figure 11** Ubicación y descripción del área de estudio. **A.** Modelo digital de terreno de la costa suroeste de Michoacán (MDE 1032000 and 1034000 INEGI). Se muestra la posición geográfica de la Ticla, La Llorona, Colola y Maruata. El mapa de la república Mexicana en el recuadro superior derecho ilustra la localización del cuadrante de donde el modelo digital fue generado. **B.** Mapa geomagnético de de Lázaro Cárdenas, Michoacán, que ilustra las anomalías magnéticas asociadas con las playas natales (Colola-Maruate) y no natales (La Llorona-La Ticla). Nótese la presencia de la anomalía (>350 nT) relacionada con el Cerro Centinela. **C.** Mapa Geológica de Lázaro Cárdenas que ilustra los tipos de roca que constituyen las formaciones geológicas en el área de estudio. Nótese el frente de contacto de colisión entre rocas de tipo ígneo intrusivo y rocas volcanosedimentarias. Este tipo de condiciones geológicas dan origen a depósitos ricos en magnetita.

### 3.2 Diseño experimental

Para evaluar las propiedades magnéticas de las playas natales de la tortuga negra que las distinguen de sus playas vecinas no natales. Primero comparamos los valores de declinación, inclinación, intensidad horizontal, intensidad vertical, intensidad total y variación secular del campo magnético Terrestre entre Colola-Maruata (playas natales) y La Llorona/La Ticla (playas no natales). Se ha sugerido que los parámetros de inclinación, declinación e intensidad total proveen de información a las tortugas marinas para establecer un mapa de gradiente a larga distancia (Lohmann, 1992; Light *et al.*, 1993; Lohmann y Lohmann, 1994a y b, 1996a y b, 2003; Lohmann *et al.*, 1993; también revisado en Freake *et al.*, 2006). Los parámetros fueron estimados para el año 2007 consultando la base de datos del World's Magnetic Model of the British Geological Survey (<http://www.geomag.bgs.ac.uk/navigation.html>).

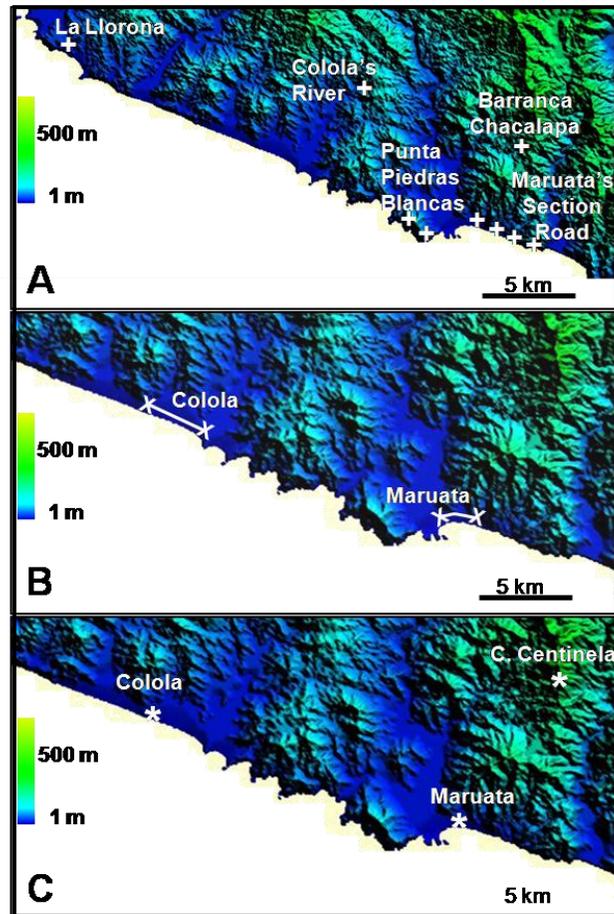
Como un segundo paso, y con el objetivo de evaluar la presencia de anomalías magnéticas reconocibles en el área geográfica de las playas natales y no natales que pudieran estar actuando como faros magnéticos, utilizamos la carta magnética regional de campo total de la parte sureste de la Costa Michoacana (Consejo de Recursos Minerales. Escala 1:250 000, código: Lázaro Cárdenas E-13-6-9, 1994; Figura 11B). La carta magnética fue construida con base en vuelos aéreos realizados a 350 metros de altura. Buscamos entonces por anomalías arriba de 200nT, ya que estudios electrofisiológicos documentan que la vía neural

magneto-sensitiva del sistema trigémino sensorial en aves responde a estímulos magnéticos de esta magnitud (Semm y Beason, 1990), por otro lado, por arriba de este límite se ha probado que los pichones son capaces de percibir la presencia de anomalías magnéticas (Walcot, 1974, 1977).

Una vez identificada la posición geográfica de la anomalía magnética (Cerro Centinela Figura 11B) en la carta geológica (Lázaro Cárdenas E-13-6-9 Figura 11C), el sitio fue visitado y muestras de roca superficiales fueron tomadas (n=5) de Barranca Chacalapa y a lo largo de la carretera (Carretera No. 200/ kilómetros 145-148) que conecta Colola con Maruata. Esta sección de carretera atraviesa parte de la anomalía (Figura 12C).

También fueron colectadas muestras de roca en donde no se detectaron anomalías magnéticas, áreas cercanas a Colola (cauce del río Colola n=1), Punta Piedras Blancas (n=2) y la Llorona (n=1) (Figura 12A).

Estas muestras fueron sujetas a análisis de lámina delgada (Hutchinson, 1974). Como tercer paso, muestras de arena de Colola (n=11; Figure 2B), Maruata (n=9; Figura 12B), La Llorona /La Ticla (n=6; no se muestra en el mapa) fueron tomadas a través de transectos longitudinales a lo largo de la zona de berma de las playas. Tales muestras fueron sujetas a análisis de mineralogía magnética (ver sección de magnetometría).



**Figura 12.** Modelos digitales de terreno que ilustran la posición geográfica de los sitios utilizados para la toma de muestras de roca (A), muestras de arena (B y C) dentro y fuera del área de estudio principal.

Para determinar si las áreas de desove y no desove dentro de las playas natales poseen marcas magnéticas sutiles, se colectaron muestras de arena en

las áreas preferidas (n=5) y no preferidas (n=5) por las tortugas para desovar en la playa de Colola. Aunque los registros históricos indican que las áreas de desove preferidas corresponden al tercio oeste en Colola y la partes este en Maruata (Figura 12B y C), la intensa actividad humana en Maruata hace que las muestras de arena de esta playa sean menos confiables. Las muestras de arena colectadas en Colola y Maruata fueron analizadas utilizando métodos de mineralogía magnética (ver sección de magnetometría).

## VII. Resultados

### FASE 1. Bases Físicas de la Magnetopercepción en *C. agassizi*.

#### 1.1 Magnetometría en cabeza de la tortuga *C. agassizi* y sus diferentes componentes viscerales.

Debido a que las muestras obtenidas de las partes de cerebro y cabeza de la tortuga negra dieron valores negativos, los valores de susceptibilidad magnética que se describen corresponden únicamente a aquellos relativos a la cabeza como un todo. De esta forma, el análisis de las cabezas de embriones registró un valor promedio de  $2$  a  $4 \times 10^6$ , mientras que aquellas de crías con dos meses de edad generaron valores promedio de entre  $6$  y  $7 \times 10^6$ . Las diferencias de valores registradas entre estos dos grupos de edad, sugieren un incremento del contenido de material ferromagnético con la edad.

Por otro lado, y con relación a la intensidad magnética, las cabezas completas de embriones registraron valores promedio de  $85/-26/.0749$  mA mientras que estos mismos valores obtenidos en las cabezas de tortugas de 2

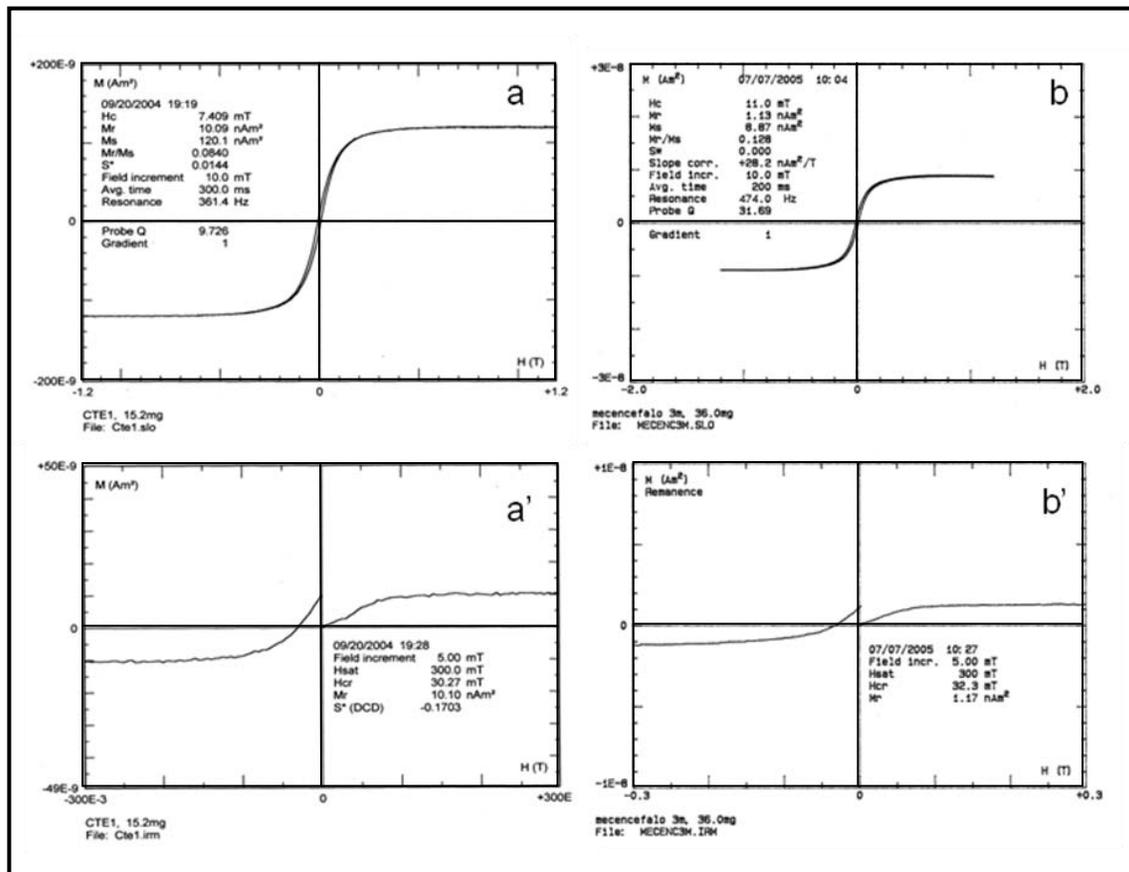
meses de edad fueron de 16/-75/0.1312 mA. Estos valores son compatibles con los descritos para la susceptibilidad y sugieren que la intensidad magnética también incrementa con la edad.

Con el objeto de complementar los datos ya mencionados, se obtuvieron las mediciones de intensidad magnética en los diferentes componentes de la cabeza de la tortuga negra de diferente edad (Tabla 1). Estos valores son en extremo variables por lo que es difícil establecer patrón claro por componentes y por edades. Lo destacable de estos datos, sin embargo, es que en todas las regiones estudiadas, con la excepción de las placas epidérmicas, se detecta material ferromagnético. Para consolidar estos datos se requerirá a futuro de repetir estas mediciones con un número mayor de muestras y por lo tanto mayor cantidad de precipitados obtenidos mediante el proceso de aislamiento, para cada una de las partes. Cabe aclarar que los resultados presentados en el presente trabajo son fruto del trabajo con el mínimo de muestras colectadas permitidas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), por tratarse de una especie en peligro de extinción.

Por último, en las curvas de histéresis obtenidas de las muestras correspondientes a diversas regiones viscerales de la cabeza de la tortuga negra a distintas edades, la forma de trazo del circuito es compatible con la presencia de cantidades pequeñas de material ferromagnético contenido en una matriz diamagnética (Figura 13).

**Tabla 1.** Medidas de intensidad magnética obtenidas de diferentes componentes de la cabeza de la tortuga marina *C. agassizi*.

<b>Cabeza</b>	<b>Intensidad (x10<sup>6</sup>mA)</b>	
	<b>3 meses</b>	<b>8 meses</b>
Ojo (c/líquido)	6.120	28.45
Ojo (s/líquido)	14.755 n=2	7.276 n=2
Bulbo olfativo	4.010	7.538
Glándula de sal	3.219 n=2	6.471 n=2
<b>Cerebro</b>		
Bulbo y protuberancia	3.035	4.578
Lóbulo oftálmico	7.50 n=2	4.145 n=2
Cerebelo	7.008	7.865
Diencéfalo	5.645	5.792
Mesencéfalo	6.944	5.28
Corteza	4.521	6.08
<b>Epidermis</b>		
Nariz	14.88	3.931
Oído	3.835	2.816
Ojo	5.08	6.634



**Figura 13.** Ejemplos de curvas de histéresis e irm. a) obtenidas para cabeza de cría de 0 meses de edad y b) obtenidas para mesencéfalo de cría de tortuga negra de 3 mese de edad.

Estos resultados corroboran por un lado la presencia del mineral magnético en el tejido analizado y por otro la necesidad de trabajar con precipitados de la fracción mineral aislados de dichos tejidos.

El ciclo de histéresis de materiales ferromagnéticos, así como los valores numéricos de los parámetros que lo caracterizan, dependen tanto del tamaño y la forma del conjunto de partículas presentes en la muestra, como de la disposición de los dominios magnéticos a través de los radios de magnetización ( $M_r/M_s$ ) y coercitividad ( $H_{cr}/H_c$ ). Cálculos teóricos sugieren que el radio  $M_r/M_s$  ideal para un ensamble de partículas de DS es de 0.5, para partículas de multidominio es de menor a 0.1 (MD) y para partículas SP menor a 0.1. En cuanto al radio  $H_{cr}/H_c$ , el modelo de Stoner y Wolfarth predice un radio de coercitividad 1.09 para los granos DS (Thompson y Oldfield, 1986). A este respecto, y no obstante los resultados obtenidos con la microscopía electrónica, los valores registrados en nuestro trabajo para los radios de magnetización ( $H_{cr}/H_c$ ) y coercitividad ( $M_r/M_s$ ) del material ferromagnético están dentro del rango que corresponde a aquellos considerados para las partículas de multidominio, y no a aquellos correspondientes a las partículas DS y SP (Tablas 2 y 3). Estos resultados, no sorprenden, pues algo similar fué reportado en estudios previos en la hormiga migratoria *Pachycondyla marginata*. En esta se confirmó la presencia de magnetita DS y SPM por métodos no magnetométricos, a pesar de que mediante las mediciones de las propiedades de histéresis solamente fue posible detectar las partículas de multidominio (Darci *et al.*, 2004).

La aparente contradicción entre los observado mediante métodos directos y los resultados obtenidos a través de los radios de magnetización ( $H_{cr}/H_c$ ) y coercitividad ( $M_r/M_s$ ), pudiera explicarse por las concentraciones extremadamente bajas de magnetita biogénica, características de los tejidos animales en combinación con la baja resolución de los equipos utilizados, los cuales, como lo mencionamos en párrafos anteriores están diseñados para estudios con muestras de roca, en las cuales la cantidad del mineral magnético es mucho más abundante. Una posible solución a este problema sería, como ya también lo expresamos, preparar extractos enriquecidos en donde solo la fracción mineral magnética de la muestra sea sometida a medición.

**Tabla 2.** Valores de histéresis obtenidos de las cabezas completas de de embriones y crías de tortuga negra. (Ct2m1I, Ct2m3, Ct2m4D, cabeza de cría tortuga de 2, 3 y 4 meses de edad respectivamente; Cte, cabeza de embrión).

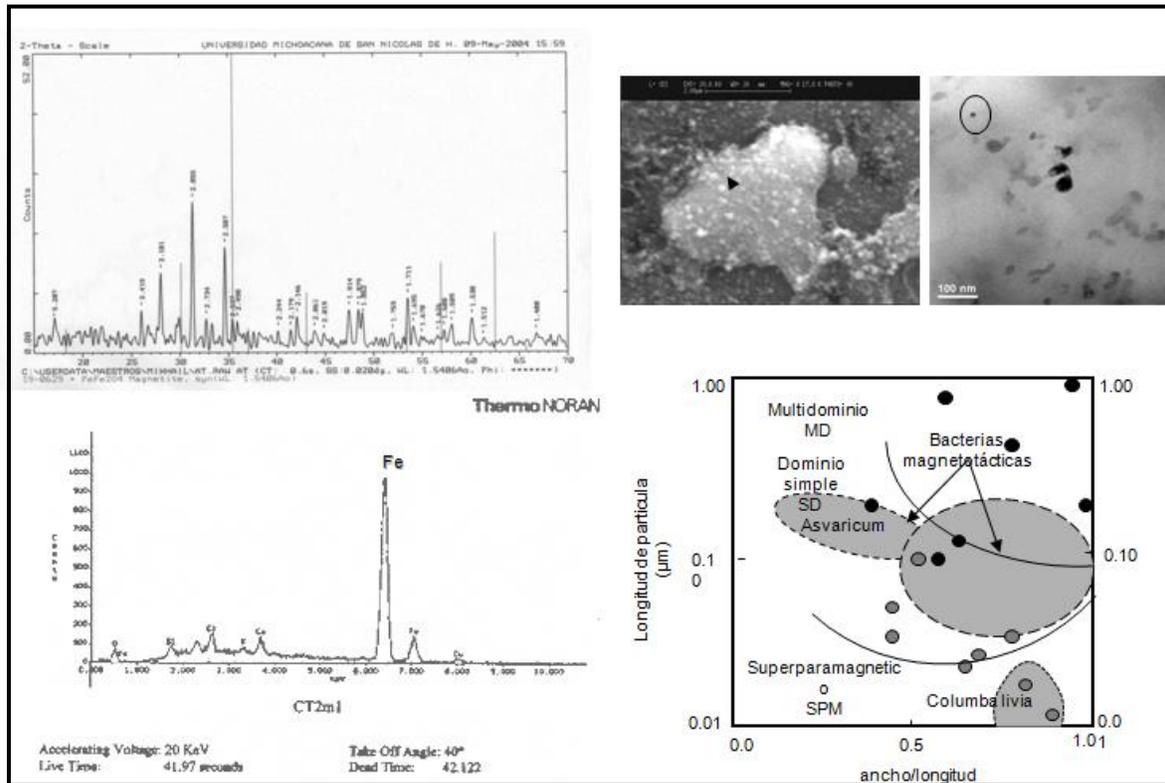
<b>Muestra</b>	<b>Mr</b> nAm2	<b>Hc</b> mT	<b>Ms</b> nAm2	<b>Hcr</b> mT	<b>Hcr/Hc</b>	<b>Mr/Ms</b>
<b>Ct2m1I</b>	5.399	6.628	135.5	29.87	4.506	0.0723
<b>Ct2m3</b>	8.064	7.707	106.6	37.02	4.803	0.0757
<b>Ct2m4D</b>	9.427	7.548	114.5	33.19	4.397	0.0823
<b>Cte</b>	10.09	7.409	120.1	30.27	4.085	0.0840

**Tabla 3.** Valores de histéresis obtenidos de diversa partes de cerebro de crías de tortuga negra de 3 y 8 meses de edad

<b>Muestra</b>	<b>Mr nAm<sup>2</sup></b>	<b>Hc mT</b>	<b>Ms nAm<sup>2</sup></b>	<b>Hcr mT</b>	<b>Hcr/Hc mT</b>	<b>Mr/Ms nAm<sup>2</sup></b>	<b>Peso mg</b>
Bulbo y protuberancia 3m	3.12	7.90	34.7	20.3	2.57	0.09	18.1
Diencefalo 3m	942 pAm <sup>2</sup>	4.08	17.4	22,2	5.44	0.05	17.2
Diencefalo 8m	748 pAm <sup>2</sup>	5.44	-24.8	28	5.14	0	28.3
Mesencefalo 3m	1.13	11	8.87	32.3	2.94	0.12	36
Mesencefalo 8m	12.3	7.39	173	22.1	2.41	0.07	38.6
Corteza 3m	77 pAm <sup>2</sup>	9.17	-44.3 pAm <sup>2</sup>	75.9	8.27	0	13
Bulbo olfatorio 3m	4.33	7.86	50.4	26.5	3.37	0.08	36
Lóbulo oftálmico 3m	5.20	1.36	-318	22.3	16.39	0	10.1
Epitelio ojo 3m	5.45	7.04	75.8	139	19.74	0.07	33.8
Epitelio oído 3m	4.49	4.38	-41.3	15	3.42	0	13.6

## **1.2 Aislamiento y caracterización del material ferromagnético en la cabeza de la tortuga negra.**

Después de realizada la extracción correspondiente de la cabeza, el precipitado obtenido como se mencionó en la parte metodológica, se analizó mediante difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido y de transmisión. En la figura 14a, el patrón de difracción de rayos X sugiere la presencia de magnetita en la cabeza de la tortuga negra. En apoyo a los resultados obtenidos con el uso de la difracción de rayos X, una parte del material ferromagnético identificado con microscopio electrónico de barrido resulto constituido por partículas de tamaño menor a una micra de longitud (Figura 14b). Esta dimensión corresponde a aquella reportada para las partículas DS o SP de magnetita biogénica en otros organismos (Diebel *et al.*, 2000 y Fleissner *et al.*, 2003). Adicionalmente, este hallazgo fue corroborado en los estudios que realizamos mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión (Figura 14c), con el cual también se detectaron partículas menores a la micra de longitud. Con la idea de comparar nuestras observaciones con aquellas reportadas previamente, traspolamos los valores del tamaño de las partículas encontradas en nuestro estudio sobre diagrama elaborado en función del radio de longitud y ancho para partículas DS observadas en otras especies tales como bacterias magnetotácticas (Figura 14d).



**Figura 14.** Material ferromagnético aislado de la cabeza de *C. agassizi*. a) Espectro de difracción de rayos X; b) Fotografía microscopio electrónico de barrido en donde se muestran granos de Fe sobre materia orgánica c) Fotografía microscopio electrónico de transmisión, dentro del círculo se observa partícula presumiblemente de magnetita biogénica; d) Espectro de microsonda para partículas observadas por microscopio electrónico de barrido e) Diagrama de Butler y Banerjee<sup>78</sup> en donde se compara el tamaño de partículas observado en el presente estudio con el tamaño de las observadas para otros animales (los círculos negros corresponden a tamaños de partículas observadas mediante microscopía electrónica de transmisión; los círculos grises a partículas observadas mediante microscopía electrónica de barrido).

En este diagrama se puede observar claramente que para el caso de las partículas identificadas con el microscopio electrónico de barrido, sus valores son más cercanos a los observados en las partículas SD de magnetita

en bacterias (0.1 – 1µm). En contraste, el tamaño de las partículas observadas en las muestras analizadas con el microscopio electrónico de transmisión es equiparable al de aquellas SP reportadas en pichones (menores a 0.1µm). Cabe mencionar que las diferencias en el tamaño de las partículas observadas con las dos clases de microscopía electrónica utilizadas en el presente estudio pudieran resultar de las diferencias en el poder de resolución de ambos tipos de microscopios. Esto sin embargo, no invalida la conclusión de que existe magnetita biogénica en la cabeza de la tortuga negra.

Finalmente, en ambos microscopios, los análisis con la microsonda revelan picos de gran amplitud que corresponden a compuestos férricos asociados con un escaso contenido en manganeso y óxidos de calcio, y ausentes de contaminación de titanio, níquel y cromo. Esto apoya que la magnetita encontrada en la cabeza de la tortuga negra no es de origen geológico.

### **1.3 Discusión y conclusiones de la fase 1.**

La primera evidencia de los que animales producen partículas magnéticas, con características para su uso en la magnetorecepción, viene de estudios de propiedades magnéticas de las rocas en tejidos animales. A pesar de lo bien establecida que se encuentra la metodología para la determinación de las propiedades magnéticas de las rocas, la identificación y caracterización de la magnetita biogénica en muestras de tejido implica un gran reto. La concentración y

volumen de las partículas de la magnetita biogénica en los tejidos de los organismos es típicamente muy baja, a menudo por debajo del nivel de sensibilidad de los instrumentos. En adición, el tamaño de las partículas de magnetita biogénica generalmente cae en el rango del dominio simple a superparamagnético, esta condición las hace fácilmente alterables por las condiciones químicas del ambiente circundante cambiando sus propiedades magnéticas. Esto sumado al hecho de que, los instrumentos han sido diseñados para la medición de muestras de origen geológico, limita la efectividad al tratar de detectar dichas partículas en las muestras biológicas. Esto explica los valores obtenidos, de las mediciones realizadas a las partes disecadas de cerebro y cabeza de la tortuga y la necesidad de realizar las mediciones de la cabeza como un todo. Una posible solución a este problema, sería, la preparación de extractos, en donde solo la fracción magnética de la muestra sea analizada, sin embargo, en muestras orgánicas, aun los extractos magnéticos no alcanzan a menudo la suficiente concentración de material para su análisis. En adición debemos recordar que la colecta de individuos de *C. agassizi* para tal efecto se encuentra muy restringida, por su estatus de especie en peligro de extinción. Así, el uso de las mediciones magnetométricas en su caso puede ayudar a ubicar de manera gruesa, las áreas del cuerpo con mayor contenido del mineral, para proceder posteriormente a purificarla y caracterizarla a través de métodos directos como microscopía electrónica y difracción de rayos X.

Aunque se tienen registros previos de la presencia de magnetita en la cabeza de la tortuga marina, esta no ha sido identificada como viable para la magnetorecepción, ya que el tamaño aparente es mucho mayor que aquel que pudiera producir un comportamiento DS (Perry *et al*, 1985), así el presente trabajo sería el primero en ofrecer evidencia de la presencia de magnetita DS en la cabeza de la tortuga marina.

Sin embargo, es preciso mencionar, que la sola presencia de cristales de magnetita DS o SPM en el cuerpo del animal, no implica necesariamente, su uso en la magnetorecepción. Para que esto suceda, como ya lo hemos mencionado, además de la presencia del cristal, se necesita estar en contacto con una vía neural capaz de transducir la información, aunque tal relación ha sido sugerida hace más de dos décadas, la evidencia anatómica y neurológica directa sigue siendo escasa. En el caso de la tortuga marina, en específico, no existe trabajo alguno, que haya tratado de identificar la magnetita *in situ*, su relación con terminales nerviosas y/o el sustrato neurológico involucrado en la respuesta a estímulos magnéticos. Es por lo anterior que en la segunda fase del presente trabajo, nos enfocamos en tratar de aportar información al respecto.

## **FASE 2. Bases Neurobiológicas de la Magnetopercepción en *C. agassizi*.**

### **2.1 Identificación del material férrico en la cabeza de *C. agassizi* mediante técnicas histoquímicas y microscopia de luz**

Se obtuvieron cortes histológicos de los distintos órganos que constituyen los tejidos blandos en la cabeza de la tortuga negra (Figura 15). Con excepción de la glándula denominada de sal cuyas muestras de tejido no mostraron inclusiones positiva para el azul de Prusia (Fig. 15a), el resto de los tejidos tuvieron diversos tipos celulares que contuvieron inclusiones positivas para este colorante. De esta forma, en los cortes obtenidos de la mucosa olfatoria se distingue un epitelio cilíndrico ciliado que muestra precipitados positivos para el colorante sobre su cara luminal (Fig. 15b).

En el ojo (Fig. 15c), se observan precipitados positivos para el azul de Prusia en las capas retinianas que corresponden a los segmentos externos de los fotorreceptores, a las uniones sinápticas de los fotorreceptores con las células bipolares (i.e., capa plexiforme externa) y de éstas con las ganglionares (i.e., capa plexiforme interna). Las neuronas ganglionares, que son las que originan al nervio óptico, también muestran inclusiones citoplasmáticas positivas para el azul de Prusia.

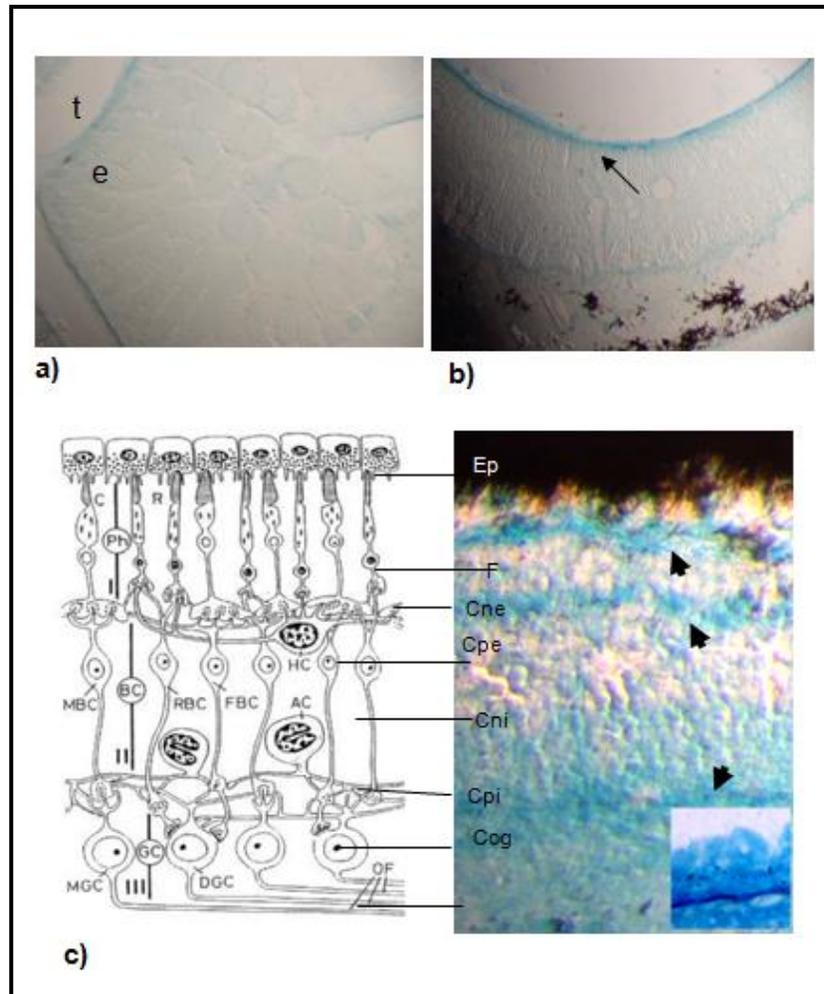
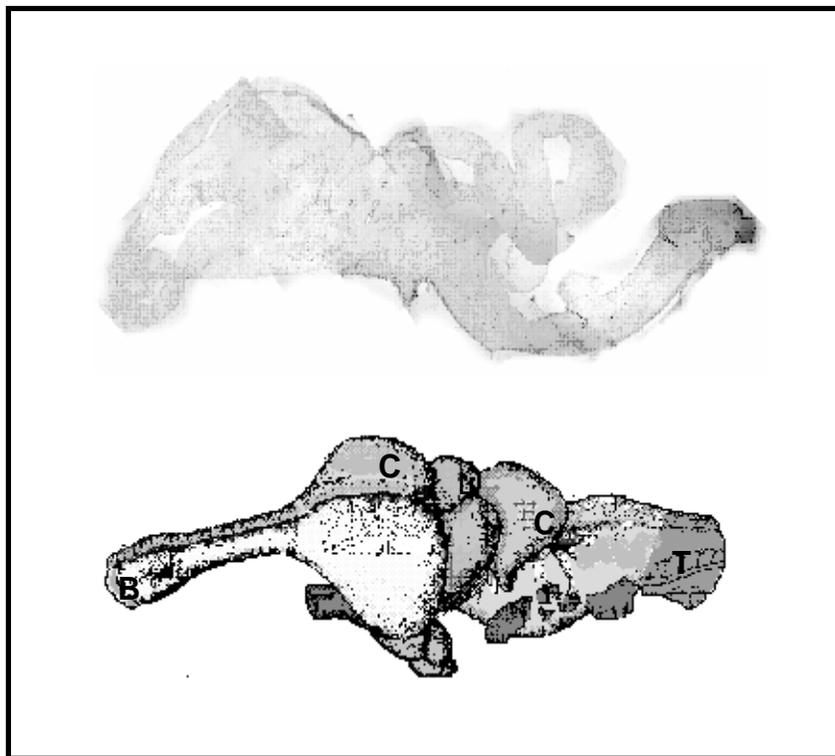


Figura 15. Fotomicrografías que muestran cortes longitudinales de la glándula de sal (A), de la mucosa olfatoria (B) y del ojo (C) de la tortuga negra teñidas con azul de Prusia. Nótese la falta de tinción en la glándula de sal, y la presencia de precipitados (flechas) teñidos con azul de Prusia en la cara luminal del epitelio de la mucosa olfatoria y en las capas de fotorreceptores y plexiformes externa e interna. Las neuronas ganglionares también mostraron precipitados (ver inserto). El esquema en C, muestra la organización celular de la retina. E-epitelio; t-trabéculas de tejido conjuntivo; Ep- epitelio pigmentario; F-fotorreceptores; Cne-capa nuclear externa; Cpe; capa plexiforme externa; Cni- capa nuclear interna; Cpi- capa plexiforme interna; Ccg-capa células ganglionares; Cfo-capa fibras ópticas.

Es interesante el hallazgo de depósitos de Fe en células fotorreceptoras, lo que nos hace considerar la posibilidad de la participación del ojo en la magnetorecepción sin embargo para llegar a tal afirmación aún queda mucho por estudiar. Finalmente, en el cerebro, se observan precipitados positivos al azul de Prusia en grupos neuronales localizados en el bulbo olfatorio, el diencefalo, la corteza cerebral, los lóbulos ópticos, el cerebelo y a lo largo del tallo cerebral (Fig. 16).



**Figura 16.** Reconstrucción bidimensional del sistema nervioso central de *C. agassizi* que muestra la distribución general de las neuronas que contienen inclusiones férricas reveladas con azul de Prusia. Bo-bulbo olfatorio; Cx-corteza cerebral; Di-diencefalo; Lo-lóbulo óptico; Ce-cerebelo; Tc-tallo cerebral. B) Esquema que lustra las regiones anatómicas mayores de cerebro de la tortuga.

Dados lo anterior y con el fin de saber si los depósitos de hierro identificados coinciden con áreas del cerebro involucradas con el comportamiento de orientación espacial se procedió al diseño de experimentos de comportamiento y posterior mapeo de la vía neural responsiva a diferentes estímulos, entre ellos magnéticos de diferente intensidad. Los resultados de dichos experimentos se describen a continuación.

## **2.2 Comportamiento de desplazamiento en respuesta a estimulación y privación de estímulos.**

A inicio todas las crías independientemente del grupo experimental al que pertenecían, fueron colocadas en dirección contraria al mar en el nido de partida.

**Condición control.** En nuestros experimentos, las crías control corrigieron su posición de arranque orientándose rápidamente en dirección al mar para dar inicio al desplazamiento, treparon vigorosamente por las paredes del nido de partida. Los movimientos de las crías de este grupo siempre fueron rápidos, vigorosos y firmes, sin vacilación alguna mientras avanzaban por la playa, evadiendo de manera muy efectiva, dunas de pasto espinoso. Las crías de grupo control se desplazaron en vectores de orientación en dirección sur-sureste predominantemente, casi en línea recta desde el nido de partida hasta la zona de rompiente. El tiempo promedio que les llevo recorrer la distancia de 122m desde el

nido de partida hasta la zona de rompiente fue de 15:35 min. (Figura 17A, Tabla 4). Cabe hacer mención que, las crías de este grupo parecen aumentar su velocidad de desplazamiento al llegar al frente de playa.

**Estimulación Visual.** Las crías sometidas a estimulación visual intermitente corrigieron rápidamente su posición inicial e inmediatamente comenzaron su desplazamiento hacia el mar, trepando las paredes del nido de origen y siguiendo rutas casi rectas. Desplegaron movimientos rápidos, firmes y vigorosos durante toda la prueba. Una vez fuera del nido de partida, cuando la linterna fue encendida todas las crías mostraron intenso fototropismo, siguiendo fielmente los movimientos azarosos de la linterna y el experimentador en la playa. Esta condición interrumpió tajantemente la dirección del vector neto de orientación, la magnitud de la distancia recorrida, y el despliegue total de la prueba. En consecuencia ninguna de las crías terminó la prueba adecuadamente. Sus movimientos siguieron vectores altamente influenciados por la posición del experimentador al final de la prueba. Cuando la luz de la lámpara fue colocada sobre las dunas de pasto espinoso, las crías no solo no las evitaron, sino que trataron de pasar a través de ellas para seguirla. Tan pronto como la linterna se apagó, las crías corrigieron su desplazamiento en dirección al mar independientemente de su posición. El promedio de distancia recorrida en este

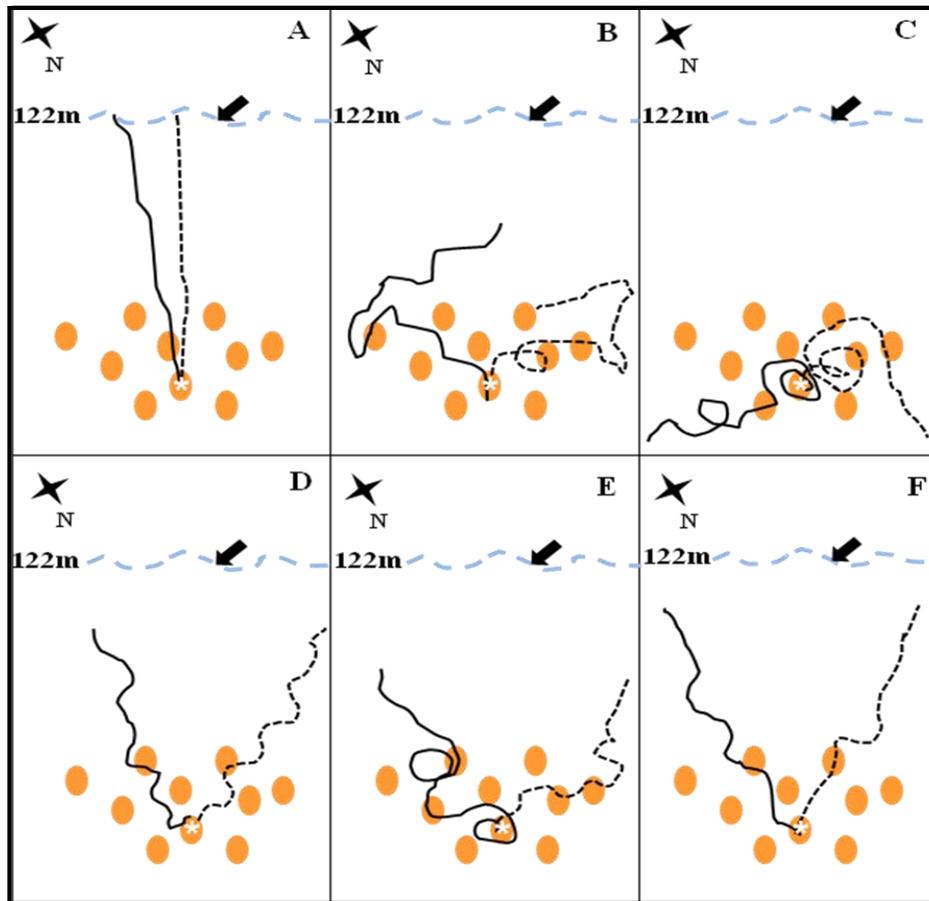
grupo fue de 69. 61 metros, lo que constituye un 54% de la distancia recorrida tomando como referencia aquella de las crías control. (Fig. 17B, Tabla 4).

**Privación Visual.** Las crías privadas de visión se mostraron totalmente desorientadas desde el inicio de la prueba experimental. Una vez colocadas en el nido de partida, nunca corrigieron su posición inicial y se movieron siguiendo la circunferencia del nido por varios minutos. Afuera del nido, siguieron rutas tortuosas en diferentes direcciones; rara vez hacia el mar. Aunque sus movimientos eran muy erráticos, fueron también rápidos. Las crías de este grupo se desplazaron en direcciones opuestas al mar, noreste y noroeste y nunca evitaron las dunas de pasto espinoso. Como resultado ninguna de las crías privadas de visión alcanzó el mar, solo se alejaron del nido unos 30 metros en promedio. (Fig. 17C, Tabla 4).

**Privación Olfativa.** Las crías sujetas a privación del sentido del olfato, se mostraron confusas desde el inicio. Solo en raras ocasiones corrigieron su orientación en el punto de partida. Treparon por las paredes del nido de partida desplazándose en diferentes direcciones. Una vez fuera del nido, aunque sus movimientos fueron rápidos, el desplazamiento hacia el mar se mostro errático y

titubeante en cuanto a la dirección de sus movimientos con frecuentes encuentros con dunas de vegetación. Las crías sometidas a privación del olfato se movieron a lo largo de vectores orientados hacia el este, oeste y suroeste. Solo cuatro de las catorce crías de este grupo finalizaron satisfactoriamente la prueba. El promedio de la distancia recorrida antes de dar por concluida la prueba fue de 100.07 metros. (Figura 17D, Tabla 4)

**Distorsión Magnética.** Las crías sometidas a distorsiones del campo magnético a través de la colocación de imanes de 350mT (Figura 9E) sobre el escudo dorsal anterior del caparazón mostraron conductas de orientación y desplazamiento titubeantes, lentas y erráticas. Se notó un retraso en el inicio de la puesta en marcha una vez colocadas en el punto de partida y mostraron dificultad en definir la ruta de salida del nido hacia el mar. En lugar de iniciar su camino orientado hacia el mar como fue el caso para las crías control, la mayoría de las correspondientes a este grupo iniciaron su desplazamiento en dirección sureste de manera paralela al frente de playa. La orientación de sus vectores de desplazamiento, fue muy variada, hacia el este, sur, noreste y oeste. Ninguna de las crías de este grupo experimental concluyó la prueba satisfactoriamente. El promedio de la distancia total recorrida fue de 83.1 metros (Fig. 17E, Tabla 4).



**Figura 17.** Esquemas de las rutas recorridas por las crías de tortuga *Chelonia agassizi* de cada uno de los grupos experimentales. A) Las crías de grupo control se desplazaron en vectores de orientación en dirección sur-sureste predominantemente, casi en línea recta desde el nido de partida hasta la zona de rompiente; B). Las del grupo sujeto a estimulación visual siguieron vectores que apuntaron a diferentes puntos cardinales, altamente influenciados por la posición relativa del experimentador al final de la prueba; C) La condición de privación visual, resultó en una franca y total desorientación de las crías, estas se desplazaron en direcciones opuestas al mar, noreste y noroeste; D) En cuanto al grupo de crías sometidas a privación del olfato, estas, se movieron de manera titubeante a lo largo de vectores orientados hacia el este, oeste y suroeste, en un ángulo mucho más amplio que el trazado por los vectores de las crías del grupo control. E) Las crías sometidas a distorsiones del campo magnético a través de la colocación de imanes de 350mT mostraron franca desorientación, ninguna de las crías del este grupo pudo concluir la prueba satisfactoriamente. Los vectores de desplazamiento mostraron direcciones muy variadas, hacia el este, sur, noreste y oeste. F) Finalmente las crías a las que se les colocaron imanes 85mT, apuntaron también en diferentes direcciones cardinales, este, sur, noreste y suroeste aunque 8 de las 15 en este caso lograron concluir la prueba satisfactoriamente.

**Tabla 4.** Parámetros de desplazamiento determinados en las pruebas experimentales aplicadas a crías de *Chelonia agassizi* sujetas a diferentes manipulaciones sensoriales.

Grupo	Latencia	Distancia Recorrida	Prueba	Dirección preferida* (No. de animales)					
	media±SD	media±SD		E	S	NE	W	SW	NW
Control	15.35 ± 3.21	122	15/15		14			1	
Luz Intermitente	Prueba Fallada*70 ± 21*		0/14 <sup>θ</sup>	9			4	1	
Deprivación Visual	Prueba Fallada*48 ± 16*		0/10*	7					3
Deprivación Olfatoria	16.82 ± 1.85 Prueba Fallada*90±16*	122	4/14* 10/14	8				4	2
Distorsión Magnética (350 mT)	Prueba Fallada*83 ± 13*		0/16*	5	2	1	7	1	
Distorsión Magnética (85mT)	17.02 ± 3.0 <sup>³</sup> Prueba Fallada*104±8 <sup>δ</sup>	122	8/15 <sup>θ</sup> 7/15	2	6			2	2

Estadística:

Prueba de Mann-Whitney Rank Sum versus control: \* p<0.001, <sup>³</sup> p<0.01, <sup>δ</sup> p<0.003

Chi-cuadrada=53.784, Df=5, <sup>θ</sup> p<0.001; Chi-cuadrada=27.125, Df=1, <sup>•</sup> p<0.001; Chi-cuadrada= 66.7, Df=10, <sup>♦</sup> p<0.001

Prueba exacta de Fisher: \*p<0.001, <sup>θ</sup> p<0.006

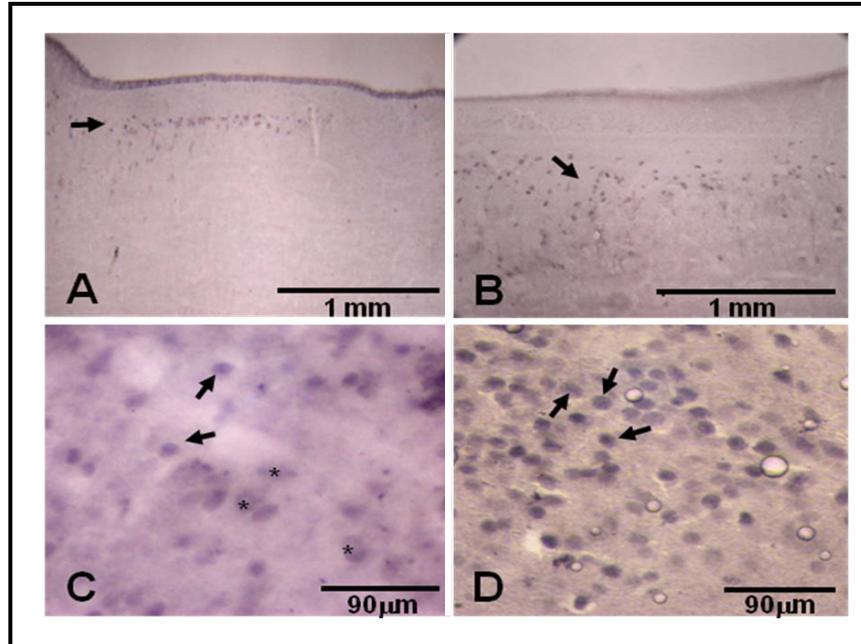
Latencia en minutos: distancia recorrida en metros; Prueba: como una fracción de pruebas terminadas o no terminadas satisfactoriamente/número total de crías evaluadas por grupo

Símbolos: **E**, Este; **S**, Sur; **NE**; Noreste; **W**, Oeste; **SW**, Suroeste; **NW**, Noroeste

Una observación importante, en las crías a las que se les colocó el imán en el caparazón, fue que la actividad para tratar de escapar de las manos del experimentador decaía drásticamente, lo cual retardo el inicio a sus desplazamientos. Finalmente las crías a las que se les colocaron imanes 85mT (Figura 9D) sobre las escamas frontales del cráneo, al ser colocadas en nido de partida, rápidamente se orientaron hacia el mar, sin embargo una vez fuera del nido, aunque con movimientos rápidos y vigorosos, cambiaron constantemente la dirección de su desplazamiento mientras atravesaron la playa. Como resultado los vectores de orientación resultantes, apuntaron en diferentes direcciones cardinales, este, sur, noreste y suroeste. De las 15 crías evaluadas, solo ocho terminaron la prueba satisfactoriamente pero con un retraso significativo en el tiempo de latencia comparado con el tiempo del grupo control. (Figura 17 F y Tabla 4).

### **2.3 Caracterización de la vía neural involucrada en el procesamiento de la información magnética.**

En la figura 18 se presentan ejemplos del tipo de inmunotinción obtenida con el anticuerpo para C-fos en la corteza cerebral dorso-medial y en el núcleo central de la vertiente ventricular dorsal de crías control y de aquellas sometidas a estimulación luminosa alternada.

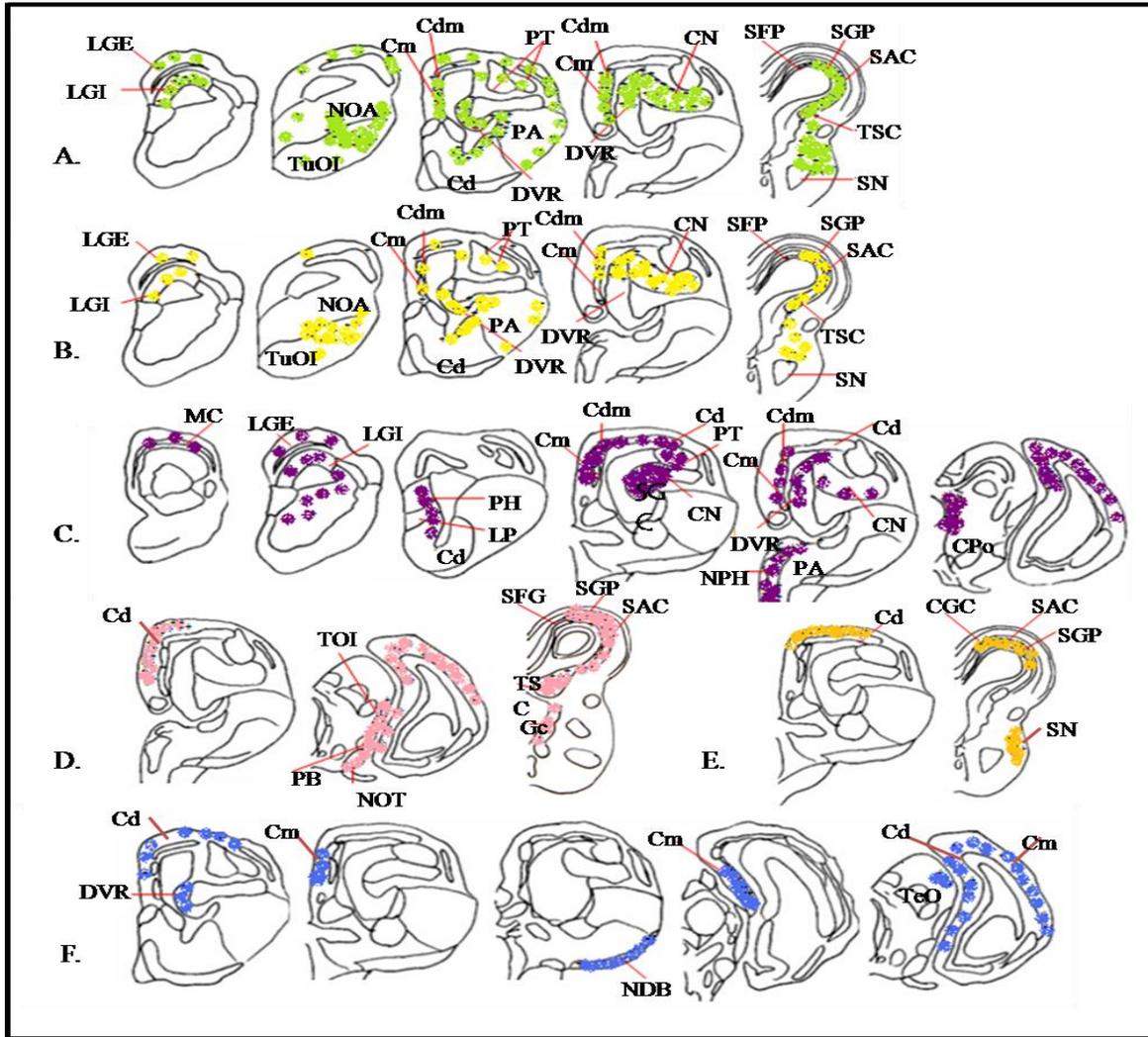


**Figura 18.** Fotomicrografías de cortes coronales inmunoteñidos para C-fos en la corteza dorso-medial (A y B) y en el núcleo central de la vertiente ventricular dorsal (C y D) de cerebros de crías de tortuga negra *C. agassizi* consideradas como control (A y C) y sujetas a estimulación visual intermitente (B y D). Note las diferencias en la intensidad y distribución de la marca (flechas en A-D) y en el número de núcleos neuronales teñidos (flechas en C y D). Los asteriscos en C indican neuronas cuyos citoplasmas se observan marcados.

El tipo de inmunotinción utilizada nos permitió observar no solo diferencias en el número e intensidad de la marca en los núcleos neuronales inmunoteñidos, sino también en el patrón de distribución de los mismos. Así, en la figura 19 y la tabla 5, se resumen los hallazgos morfológicos obtenidos para los distintos grupos experimentales evaluados.

En los animales control y aquellos estimulados con luz artificial de forma intermitente se observaron grupos de núcleos neuronales inmunoteñidos para C-fos en una gran cantidad de estructuras. De entre ellas, cabe destacar a la vertiente ventricular dorsal (DVR) y su núcleo central (CN), que corresponden a zonas de procesamiento primario de la información sensorial multimodal. También se observaron núcleos de neuronas positivas a C-fos en la corteza dorsal (cd), corteza dorso-medial (cdm) y corteza medial (cm), a las cuales se les considera estructuras homólogas de la formación hipocampal de los mamíferos y aves, y cuyas funciones están relacionadas con la integración de vías y la generación de mapas cognoscitivos (Figura 19A, B y Tabla 5).

Otras estructuras que mostraron inmunoreactividad para C-fos en animales control y en aquellos estimulados visualmente de forma intermitente fueron las relacionadas con el procesamiento de información sensorial olfativa y visual, así como con el control de la motricidad (Sustancia Negra; SN) y senso-percepción de la temperatura (Torus Semicircular; TSC). Los resultados descritos hasta el momento son compatibles con la idea de que las estructuras visuales y aquellas relacionadas con la ejecución de los programas motores de marcha participan de manera significativa en la conducta de desplazamiento de las crías hacia el mar (Figura 19A, B y Tabla 5).



**Figura 19.** Esquemas que muestran la distribución de células inmunoreactivas para C-fos en cortes coronales de cerebros de crías de *Chelonia agassizi*, en especímenes A. control, sujetos a B. fotoestimulación y de magnetocepción distorsionada C. 350 mT y D. 85 mT; privadas de E. olfacción y F. visión. Los puntos en color representan no solamente la ubicación de las células positivas para C-fos sino también su cantidad relativa. Nomenclatura de las claves referentes a las distintas áreas cerebrales: **cd**, Corteza Dorsal; **cdm**, Corteza Dorso-Medial; **cm**, Corteza Medial; **CN**, Núcleo Central de la Vertiente Ventricular Dorsal; **CPo**, Comisura Posterior; **DpMe**, Núcleo Profundo Mesencefálico Ventral; **DVR**, Vertiente Ventricular Dorsal; **ISPC**, Núcleo Isthmi Pars Parvocellularis; **LGE**, Lámina Granular Externa; **LGI**, Lámina Granular Interna; **LP**, Lóbulo Paraolfatorio; **MC**, Células Mitriles; **N IV**, Núcleo Nervio Troquelar; **NDB**, Núcleo de la Banda Diagonal de Broca; **NOA**, Núcleo Olfatorio Anterior; **NPH**, Núcleo Periventricular Hipotalámico; **PA**, Paleostriatum Augmentatum; **PH**, Primordio Hipocámpico; **PT**, Engrosamiento Palial; **RS**, Núcleo Reticular Superior; **SAC**, Stratum Album Centrale; **SFG**, Stratum Fibrosum et Griseum Superficiale; **SGC**, Stratum Griseum Centrale; **SGP**, Stratum Griseum Periventricular; **SGPA**, Sustancia Gris Periacueductual; **SN**, Sustancia Nigra; **TSC**, Torus Semicircular; **TuOI**, Tubérculo Olfatorio.

**Tabla 5.** Funciones y Relación de las Estructuras Cerebrales que presentaron inmunoreactividad positiva a C-fos en los diferentes grupos experimentales. Funciones de las estructuras cerebrales que presentaron células positivas para C-fos en crías de la tortuga negra *C. agassizi* agrupadas como control (**C**), foto-estimuladas (**FE**), privadas de visión (**PV**), distorsionadas de magnetocepción (**PMg**) y privadas de olfacción (**PO**).

<b>ESTRUCTURA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>C</b>	<b>FE</b>	<b>PV</b>	<b>DMg</b>	<b>PO</b>
<b>Corteza Dorsal (cd)</b>	Involucrada con el aprendizaje y discriminación espacial			X	X	X
<b>Corteza Medial (cm)</b>	Involucrada con memoria y aprendizaje espacial	X	X	X	X	
<b>Corteza Dorso-Medial (cdm)</b>	Involucrada con memoria espacial	X	X		X	
<b>Vertiente Dorso Ventricular (DVR)</b>	Involucrado con el procesamiento primario de la información sensorial multimodal	X	X	X	X	
<b>Centro Nuclear del DVR (CN)</b>	Involucrado con el procesamiento primario de la información sensorial multimodal	X	X		X	
<b>Comisura Posterior (CPo)</b>	Comunicación entre hemisferios en la parte posterior del cerebro				X	
<b>Núcleo Isthmi Pars Parvocellularis (ISPC)</b>	Relacionado con atención espacial selectiva y con el procesamiento derivado de las interacciones de claves locales y globales espaciales				X	
<b>Lámina Granular Interna (LGI)</b>	Involucrada con olfacción	X	X		X	
<b>Lámina Granular Externa (LGE)</b>	Involucrada con olfacción	X	X		X	
<b>Lóbulo Paraolfatorio (LP)</b>	Relacionado con olfacción				X	
<b>Células Mitrals (MC)</b>	Relacionadas con la olfacción				X	
<b>Núcleo Nervio Troquelar (N IV)</b>	Involucrado con los músculos oculares del Oblicuo Superior				X	
<b>Núcleo de la Banda Diagonal de Broca (NDB)</b>	Involucrado en la senso-percepción de la temperatura			X		
<b>Núcleo Olfatorio Anterior (NOA)</b>	Sensorial: del epitelio olfatorio de la cavidad nasal superior	X	X		X	
<b>Núcleo Periventricular Hipotalámico (NPH)</b>	Relacionado con el control Hormonal y Temperatura				X	
<b>Núcleo Profundo Mesencefálico Ventral (DpMe)</b>	Involucrado con el procesamiento de la propiocepción de la cabeza enviada al cerebro a través del nervio trigémino, participa en el control motor de los movimientos de la cabeza y con el motor ocular, encargado del movimiento de ojos y parpados				X	

Continuación tabla 6

<b>Engrosamiento Paliar (PT)</b>	Relacionado con olfacción	X		X
<b>Paleostriatum Augmentatum (PA)</b>	Involucrado con respuestas somáticas		X	X
<b>Primordio Hipocámpico (PH)</b>	Relacionado con la memoria espacial			X
<b>Stratum Album Centrale (SAC)</b>	Relacionado con reflejos visuales	X	X	X
<b>Stratum Fibrosum et Griseum Superficiale (SFG)</b>	Relacionado con reflejos visuales			X
<b>Stratum Griseum Centrale (SGC)</b>	Relacionado con reflejos visuales			X
<b>Stratum Griseum Periventricular (SGP)</b>	Relacionado con reflejos visuales	X	X	X
<b>Sustancia Nigra (SN)</b>	Controla las actividades musculares subconscientes del cuerpo	X	X	X
<b>Sustancia Gris Periacueductal (SGPA)</b>	Relacionada con la modulación de percepción dolorosa			X
<b>Torus Semicircular (TSC)</b>	Relacionado con la sensación de temperatura	X	X	
<b>Tubérculo Olfatorio (TuOI)</b>	Involucrado en el procesamiento olfatorio	X	X	
<b>Tegmento Óptico (TeO)</b>	Encargado del procesamiento primario de información sensorial multimodal			X

En contraste a lo observado en los grupos control y estimulados con luz, las crías que fueron privadas de estímulos visuales mostraron una activación neuronal muy escasa. Las áreas cerebrales relacionadas con la recepción y procesamiento visual y olfativo no mostraron activación de neuronas.

Dentro de las pocas áreas cerebrales que presentaron activación neuronal consistente cabe destacar al DVR y las *cm* y *cd*. Estructuras tales como el núcleo de la banda diagonal de Broca (NDB) y el tegmento óptico (TeO) también mostraron núcleos neuronales inmunoteñidos para C-fos. Estos resultados sugieren que ante la ausencia de información visual, las crías parecerían tratar de utilizar claves somestésicas basadas en la discriminación de la temperatura para encontrar su camino al mar. Estas claves en este caso, no fueron suficientes para compensar la falta de visión, pues los estudios conductuales muestran que las crías privadas de visión nunca marchan de manera orientada hacia el mar bajo estas condiciones experimentales. Es interesante destacar el hecho de que la ausencia de información visual conduzca a un “silenciamiento” de las estructuras olfativas.

Con relación al grupo de crías sometidas a distorsiones magnéticas, se observó activación de estructuras olfativas, como lo son el Núcleo Olfatorio Anterior (NOA), las Células Mitradas (MC), las láminas granulares (LGE, LGI), el Lóbulo Parolfatorio, (LP) y visuales como lo es la zona del colículo superior, así como de las *cd*, *cm* y *cdm*. El DVR y el CN también mostraron inmunoreactividad para C-fos. Estos resultados sugieren la llegada de información multimodal, quizás olfativa, visual y magnética al cerebro de los animales sujetos a distorsiones del campo magnético.

## 2.4 Discusión y conclusiones de la fase 2

Uno de los aspectos importantes relacionados con la biología de la tortuga marina corresponde a los mecanismos que utilizan para orientar sus desplazamientos tanto en tierra como en el mar. Se ha sugerido que información visual, magnética u olfativa pudiera ser utilizada por las tortugas para orientar sus desplazamientos a corta y largas distancia. De hecho, la información magnética u olfativa parece ser utilizada durante los viajes de trayectos largos, mientras aquella visual proveería de referentes en desplazamientos cortos. Un modelo ampliamente utilizado para tratar de estudiar la naturaleza de información utilizada por las tortugas para orientarse hacia el mar es la cría recién eclosionada. Observaciones hechas en este modelo sugieren que los estímulos visuales relacionados con contraste y siluetas ayudan a la cría de la tortuga a orientarse y desplazarse hacia el mar así como a evitar obstáculos sobre la playa (Salmon *et al.*, 1992, 1995; Tuxbury y Salmon 2005). En este escenario las crías parecen alejarse de siluetas que imponen al campo visual zonas de ausencia de luz, mientras que son atraídas por áreas del escenario visual que muestran un grado mayor de claridad los resultados aquí presentados son compatibles con estas ideas puesto que aquellas crías de *C. agassizi* a las que se les privó de visión bilateralmente muestran una profunda desorientación así como aquellas estimuladas con luz artificial. De manera interesante, estudios previos han mostrado que el mecanismo neurobiológico de fototropismo depende de la integridad de la vía retino-tectal

pues lesiones del tecto óptico mesencefálico conduce a su disrupción; crías lesionadas bilateralmente del tecto óptico muestran grandes dificultades para orientarse hacia el mar (Mrosovsky *et al.*, 1979).

Por otro lado, también se ha propuesto que el campo magnético terrestre pudiera orientar a las tortugas durante su navegación oceánica. Para llevar a cabo este proceso de orientación se supone que las crías de las tortugas “imprimen” un mapa magnético en sus cerebros de forma tal que desarrollan una “impronta geográfica” conductual (Irwin y Lohmann, 2004). Incluso se ha propuesto que el desarrollo cerebral in ovo es influenciado por el campo magnético terrestre (Levin y Ernst, 1998). La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento con relación a la capacidad de las tortugas marinas para utilizar claves magnéticas de navegación han utilizado crías recién eclosionadas. En estos estudios se analizan los efectos de los cambios en la inclinación e intensidad del campo magnético sobre la orientación del nado en las crías (Lohmann y Lohmann 1994a). Hasta el momento no se ha hecho un estudio equivalente durante el desplazamiento de las crías en la playa. En nuestro trabajo abordamos este último aspecto mediante la colocación de imanes sobre el caparazón y la cabeza de las crías con la finalidad de generar una distorsión del campo magnético terrestre durante el desplazamiento desde los nidos hacia el mar. Nuestros resultados sugieren que las crías de tortuga pudieran utilizar claves magnéticas para definir la secuencia de sus movimientos y no la orientación global del desplazamiento.

Esta conclusión se basa en la observación de que las crías visualmente intactas resulto en una dispersión significativa de las rutas de desplazamiento entre los diferentes puntos cardinales a diferencia de las crías del grupo control. Es interesante destacar que esta acción de conducta de desplazamiento se observo no solamente con los magnetos de mayor teslaje colocados o adaptados sobre el caparazón. El efecto ciertamente fue más drástico en aquellas crías que portaron magnetos de 850 mT, mostrando una franca desorientación y como consecuencia de esto que ninguna terminara la prueba satisfactoriamente. Las crías sometidas a distorsión con magnetos de 85 mT, aunque finalizaron en su mayoría la prueba en el tiempo establecido para la prueba, mostraron también una clara dispersión de sus direcciones de desplazamiento lo cual se vio reflejado en tiempos de latencia significativamente mayores a los realizados por las del grupo control. Esto sugiere que el sistema de sensopercepción en las crías de las tortugas posee un rango dinámico que deberá, en investigaciones futuras, determinarse para mejorar la comprensión de la neurofisiología de este sistema sensorial.

Finalmente, la mayoría de las crías, sometidas a privación del sentido del olfato tampoco alcanzaron el mar en el tiempo establecido para la prueba. Lo anterior nos permite concluir que las referencias magnéticas y olfatorias juegan un papel complementario a las visuales en la definición de rutas

de desplazamiento de las crías recién eclosionadas hacia el mar. Sin embargo es importante resaltar que a pesar de la relativa importancia del olfato y la magnetocepción para la orientación de las crías en su desplazamiento, estas referencias no son suficientes para compensar la falta de visión, lo cual no es de sorprender ya que nosotros probamos crías recién eclosionadas que no tuvieron tiempo para acostumbrarse a la privación repentina de la vista. Compensación en el comportamiento de esta índole, se ha observado en individuos después de horas, días o semanas seguidas a la privación visual (Irwin y Lohmann, 2004). A este respecto sería necesario el diseño de experimentos que nos permitan evaluar los efectos de la privación visual crónica en la compensación sensorial durante el desplazamiento de las crías hacia el mar.

Estudios previos sugieren que las crías de tortuga hacen uso de señales magnéticas hasta su ingreso al mar para orientar sus movimientos de nado (Lohman y Lohmann, 1994a; Samsonovich *et al*, 1997; Irwin y Lohmann, 2004). Nuestros resultados soportan que la habilidad de las crías para percibir señales magnéticas existe ya desde el momento en que nacen y que son utilizadas para orientar su ruta de desplazamiento hacia el mar. El hecho de que las crías sometidas a distorsión del campo magnético mostraran franca dispersión de las rutas de desplazamiento en diferentes direcciones cardinales, comparado con las direcciones predominantes de las rutas de las crías del grupo control, lo demuestra. En adición y como lo mencionamos en párrafos anteriores pareciera

ser que el sistema magnetoceptivo en las crías de *C. agassizi* tiene un rango dinámico de funcionamiento ya que el grado de desorientación asociada con diferencias en la intensidad del magneto utilizado; el número de crías tomando rutas en dirección al mar o sur-suroeste decreció en relación al incremento de la intensidad del magneto utilizado. Finalmente aunque seguramente el sobrepeso que implicó el imán de 350 mT a las crías, podría explicar el aumento en el tiempo de latencia, frecuentes paradas y alteración de la actividad motora, pero esto no explicaría el efecto observado en la dirección de los vectores de orientación. Esta idea es fortalecida por el hecho de que las crías que portaron un magneto mucho más ligero también mostraron dispersión en las direcciones cardinales que siguieron para llegar al mar.

Las crías inician su desplazamiento hacia el mar tan pronto como emergen del nido, esto indica que el comportamiento de encuentro con el mar está de alguna manera improntado en los circuitos del cerebro antes del nacimiento. El fototropismo positivo, junto con los efectos de la alteración del sentido del olfato y distorsión magnética en el comportamiento de las crías prueba que el desplazamiento hacia el mar es constantemente ajustado con base en la experiencia inmediata. Por lo tanto nuestros resultados apoyan la noción de que las crías de tortuga heredan el tropismo por escenas u objetos luminosos, pero no por el comportamiento de desplazamiento hacia el mar como un todo. En adición, ya que las crías de tortuga negra no han tenido experiencia previa de su ambiente

circundante antes y conforme se van siguiendo la luz de la lámpara fielmente, es claro que no tienen un mapa cognitivo preformado antes de su nacimiento. Bajo el mismo argumento parecería por el contrario, que estas integran su vía conforme se van desplazando hacia el mar. Esto no quiere decir que las crías carecen de la habilidad de generar mapas cognitivos. Experimentos en los cuales crías realicen el recorrido del nido al mar varias veces comenzando en diferentes puntos de partida para posteriormente probarlas enceguecidas, podrían ayudar a establecer si las crías de tortuga poseen la habilidad de crear mapas cognitivos basados en la experiencia previa.

Una consideración final con base en nuestros resultados, ya que el comportamiento de desplazamiento de las crías visualmente intactas, hacia el mar se altera al crear distorsiones en el olfato y magnetismo y ya que estas señales no compensan la falta de visión en las crías, pensamos que la información olfativa y magnética pueden proveer de un arreglo psicofísico del sistema visual, (e.g. atención visual) a través de interacciones intermodales o crosmodales (Guo y Guo, 2005). Nuestros resultados entonces, soportan que, el comportamiento de desplazamiento de las crías de tortuga negra hacia el mar involucra un procesamiento multisensorial concordando con los resultados obtenidos a través del mapeo de ensambles de neuronas responsivas a los diferentes estímulos.

Los resultados del mapeo neuronal, sugieren la llegada de información sensorial multimodal, quizás olfativa, visual y magnética al cerebro de los animales

sujetos a distorsiones del campo magnético., esto es apoyado por el hecho de que las crías expuestas a distorsiones magnéticas de 350 mT como ya se menciona, no realizaron la prueba de una manera eficaz, no obstante de tener los receptores visuales y olfativos aparentemente intactos. Pero adicionalmente y de manera interesante, en este grupo de crías, se observó activación de neuronas en el núcleo periventricular hipotalámico (NPH), la sustancia gris periacueductal (SGPA), el complejo nuclear del istmo (ISPC), el núcleo del nervio troquelar (N IV) y el complejo nuclear profundo mesencefálico (DpMe). Lo cual sugiere que en las crías expuestas a distorsiones magnéticas se activan, quizás de manera compensatoria, estructuras relacionadas con la integración de información sensorial y espacial, con la motricidad y con la magnetorecepción, que las llevan a finalizar sus desplazamientos aunque con cierto grado de desorientación.

Es interesante destacar que también se ha propuesto que el nervio trigémino (Wiltschko y Wiltschko, 1972) y el colículo superior (Nemec *et al.*, 2001) parecen estar involucrados en el procesamiento de información magnética en aves y mamíferos. Ambas estructuras muestran activación en los animales expuestos a distorsiones magnéticas.

Finalmente, las crías privadas de olfacción mostraron una activación restringida a centros nerviosos relacionados con el procesamiento de información multisensorial y visual (y/o magnética). También se observó inmunoreactividad para C-fos en la región correspondiente al sistema motor mesencefálico. Estas

crías ejecutaron adecuadamente los desplazamientos hacia el mar, por lo que confirmamos que el olfato no juega un papel fundamental en el establecimiento de la ruta.

### **FASE 3. Magnetismo en el Área de Reserva Colola-Maruata**

#### **3.1 Propiedades magnéticas generales y locales de las playas natales y no natales de *C. agassizi***

Para evaluar si las playas natales y no natales proveen de señales magnéticas a larga y corta distancia que puedan ser reconocidas por la tortuga negra para localizarlas y arribar a ellas, primero estimamos los valores de declinación, inclinación, intensidad total e intensidad de los componentes verticales y horizontales del campo magnético terrestre correspondientes a Colola, Maruata, La Llorona y La Ticla. La tabla 6 muestra los valores de los parámetros magnéticos para las cuatro playas.

De acuerdo a sus posiciones geográficas los valores de inclinación, declinación, intensidad total e intensidad vertical de Colola y Maruata tienden a ser más bajos que aquellos para La Llorona y la Ticla. El valor de la intensidad horizontal, por el contrario, es un poco más elevado en Colola y Maruata. Basados en estos valores y las diferencias entre ellos, el rango de discriminación en cuanto a declinación sería 0.03 (estimado con base en la diferencia entre Colola y Maruata) a 0.065 grados (estimado con base en la diferencia entre Maruata y la

Ticla), para la inclinación sería de entre 0.02 a 0.188 para la intensidad total entre 11 a 94 nT (estimados de igual manera que en el caso de la declinación).

**Tabla 6.** Valores de los parámetros del campo magnético terrestre y su variación secular en Colola, Maruata, La Llorona y La Ticla

	Colola	Maruata	La Llorona	La Ticla
<b>Declinación</b>				
Valor de Campo (Deg.)	7.363	7.333	7.382	7.398
Var. Sec. (arc min/año)	-5.7	-5.7	-5.7	-5.7
<b>Inclinación</b>				
Valor de campo (Deg.)	44.874	44.854	44.901	45.042
Var. Sec. (arc min/año)	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4
<b>Intensidad Horizontal</b>				
Valor de campo (nT)	28605	28606	28602	28579
Var. Sec. (arc min/año)	-49.3	-49.3	-49.3	-49.3
<b>Componente Norte</b>				
Valor de campo (nT)	29369	28372	28364	28341
Var. Sec. (arc min/año)	-42.9	-42.9	-42.8	-42.8
<b>Componente Este</b>				
Valor de campo (nT)	3666	3651	3675	3680
Var. Sec. (arc min/año)	-53.3	-53.3	-53.3	-53.3
<b>Intensidad Vertical</b>				
Valor de campo (nT)	28479	28461	28503	28621
Var. Sec. (arc min/año)	-56.0	-56.2	-55.8	-56.0
<b>Intensidad Total</b>				
Valor de campo (nT)	40364	40353	40379	40447
Var. Sec. (arc min/año)	-74.4	-74.76	-74.4	-74.4

Si uno considera que el cambio de 0.01 grado de inclinación y 7nT de intensidad total ocurre en el campo magnético terrestre aproximadamente cada kilómetro (Walcot, 1992), entonces los valores mínimos y máximos de discriminación serían entre 2 a 18.8 kilómetros basados en la inclinación y entre 1.57 a 13.42 kilómetros basados en la intensidad total.

Ya que los componentes del campo magnético terrestre generados dentro del núcleo terrestre varían a través del tiempo (Skiles, 1985), se hace necesario considerar estas variaciones seculares como una potencial fuente de error en la localización de las playas, especialmente cuando periodos significantes de tiempo separaran los diferentes episodios de migración. (Courtilot *et al.*, 1997). Para Colola, Maruata, La Llorona y La Ticla, las variaciones seculares son similares (Tabla 6), alcanzando valores de -5.7 arc min/año para declinación, de -0.4 arc min/año para inclinación y de -74.4 nT para intensidad total. Aunque estas diferencias no deben ser despreciables, el hecho de que las variaciones seculares de las playas natales y no natales sean similares pueden facilitar el encuentro con las playas a través de los años, especialmente si las playas natales proveen de señales magnéticas locales de relevancia asociadas con anomalías magnéticas que no están sujetas a las variaciones seculares. Así, los parámetros del campo magnético terrestre, tales como inclinación e intensidad pueden proveer información para generar un mapa de posición que puede ser usado por las tortugas para localizar sus áreas y playas natales en un cuadrante geográfico

particular. La tortuga negra puede entonces requerir señales adicionales para localizar con precisión su playa natal. Las anomalías magnéticas pueden en ese sentido, jugar un rol complementario (en adición a gradientes químicos locales) en proveer tales señales adicionales (Freaque *et al.*, 2006).

Después de analizar las cartas magnéticas y geológicas (Figure 11B y C), se identificó una anomalía magnética con valor por arriba de 350 nT asociada con la geofoma conocida como Cerro Centinela. Esta elevación es de 500 m de altura e intrusiva en la línea de costa de Maruata. En esta anomalía se presenta un gradiente que corre aproximadamente desde 50 nT al nivel del mar a más de 350 nT en el pico de la elevación. Tal gradiente ocurre en una distancia de aproximadamente seis kilómetros. Revisando la carta geológica (Figure 11C), se puede notar que el Cerro Centinela está formado por rocas de tipo ígneo intrusivo del terciario que forma un frente de colisión de contacto con rocas volcano-sedimentarias del Cretácico. La interacción de estos dos frentes de roca da origen a depósitos de fierro ricos en magnetita y hematita (Martínez *et al.*, 1995). Al respecto es importante destacar la presencia del Río Maruata y sus tributarios.

Interesantemente, el río Maruata se origina en las inmediaciones del Cerro Coire (Correa, 1974) en donde se forma otra anomalía magnética de cerca de 300 nT también asociada a depósitos de fierro (Figura 11B). Algunos de los tributarios por otro lado, se originan en el Cerro Centinela (Figura 11A).

El curso principal del río y sus tributarios tienen un drenaje de tipo erosivo por lo que el aporte de partículas magnéticas al curso principal del río es abundante y continuo. Ya que el Río Maruata desemboca directamente en la bahía del mismo nombre, puede hacer predecible el hecho de que la playa presente un patrón sedimentológico rico en partículas magnéticas. De acuerdo a los análisis de lámina delgada (Tabla 7), las muestras de roca de Maruata y Barranca Chacalapa localizada en la pendiente norte del Cerro Centinela, muestran un mayor contenido de magnetita que las muestras tomadas de otras zonas.

Los análisis mediante métodos mineralógicos indirectos y directos soportan que Colola, la Llorona y La Ticla contengan también material magnético que corresponde a magnetita (Tabla 7 y Figuras 22). Los valores de proporción relativa de la magnetita, susceptibilidad e intensidad de la nrm medida en estas playas fueron mucho menores que los obtenidos en la muestras correspondientes a la playa de Maruata.

En adición a las características magnéticas y mineralógicas descritas para la anomalía local, los análisis magnetométricos llevados a cabo en Colola, Maruata, La Llorona y la Ticla sostienen que las muestras correspondiente a la playa de Maruata, como se esperaba, presentan valores más elevados y altamente significativos de susceptibilidad magnética e intensidad de la nrm con respecto a las otras playas (Tabla 8).

**Tabla. 7.** Análisis de lámina delgada de muestras de roca tomadas en las vecindades de las playas de Colola y Maruata.

<b>Muestra</b>	<b>Asociación de minerales (en orden de relativa abundancia)</b>
La Llorona	Plagioclasa-Oligoclasa, Cuarzo, Biotita, Anfíboles, Feldespatos potásicos, Hornblenda, <b>Magnetita</b> y Apatita
Maruata Sección carretera	Calcita, <b>Magnetita</b> , Ilmenita, Hematita Cuarzo y Feldespatos
Maruata Sección carretera	Plagioclasa, Piroxenos-Augita, <b>Magnetita</b> -Hematita, Calcita.
Maruata Sección carretera	Calcita, <b>Magnetita</b> , Hematita, Plagioclasas, Cuarzo.
Maruata Sección carretera	Augita, Plagioclasa, Cuarzo, <b>Magnetita</b> , Ilmenita, Hematita, Epidota, Calcita.
Maruata P.P. Blancas	Plagioclasa, Anfíboles, -Hornblenda, Biotita, <b>Magnetita</b> , Ilmenita, Hematita y Cuarzo.
Maruata P. P. Blancas	Plagioclasa, Cuarzo, Biotita, <b>Magnetita</b> , Ilmenita, Hematita, Anfíboles, Feldespatos Potásicos
Barranca Chacalapa	Plagioclasa, Cuarzo, Biotita, <b>Magnetita</b> , Hematita, Anfíboles, Feldespatos potásicos y accesorios como Apatita, Clorita, pequeñas vetas de Calcita, Serisita, Feldespatos alterados.
Río Colola	Plagioclasa, Cuarzo, Biotita, <b>Magnetita</b> , Hematita, Anfíboles, Feldespatos potásicos y accesorios como Apatita, Clorita, pequeñas vetas de Calcita, Serisita, Feldespatos alterados.

**Tabla 8.** Valores de intensidad y susceptibilidad de las muestras de arena obtenidas en las playas de Colola, Maruata, La Ticla y La Llorona.

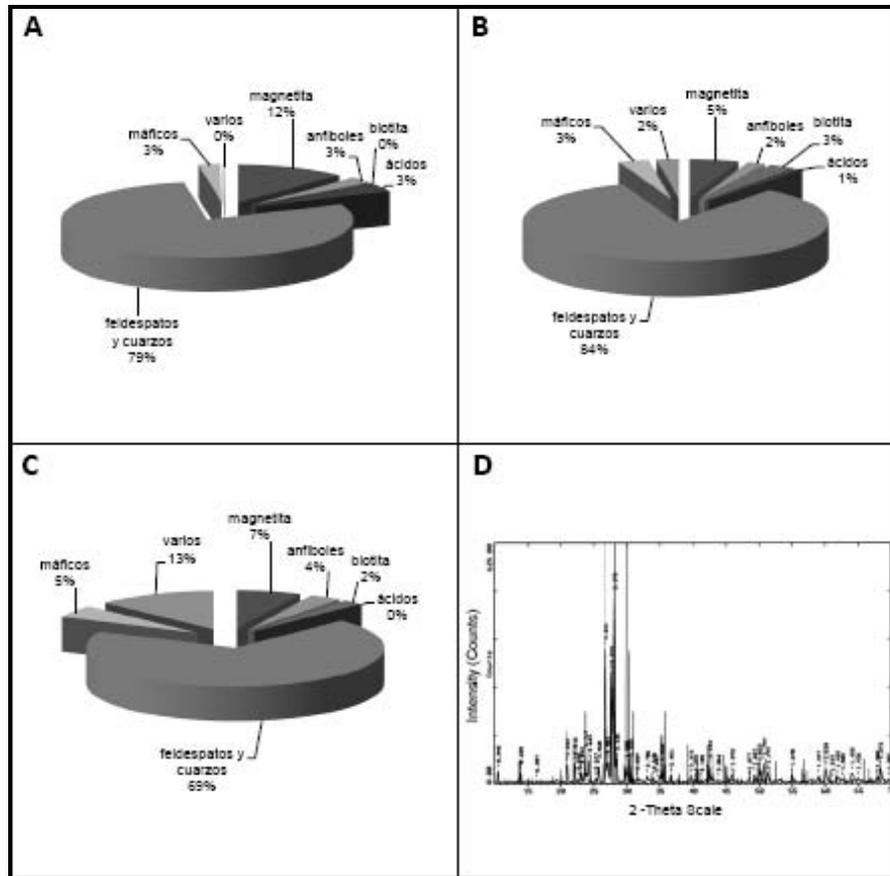
Playa	Susceptibilidad (Por unidad de masa)		Intensidad (A/m x 10 <sup>6</sup> )
	HF	LF	
<b>Maruata</b> n=9	166.8±164.1*	183.7±182.6	68.3±83.1*
<b>Colola</b> n=11	9.2±7.2	9.4±7.3	3.3±2.4
<b>Llorona</b> n=3	19.8±2.3	18.6±2.8	4.2±0.9
<b>La Ticla</b> n=3	17.6±1.92	17.03±1.9	12.1±10.6

Kruskal Wallis ANOVA on ranks:  $p < 0.001$

Dunn's method for multiple comparisons:  $*p < 0.05$  v.s. Maruata

HF, alta frecuencia, LF, baja frecuencia

Los valores altos de susceptibilidad sugieren que los sedimentos de Maruata son ricos en magnetita. Esta última afirmación fue confirmada a través del análisis de microscopía de luz de transmisión y de difracción de rayos X (Figura 20).



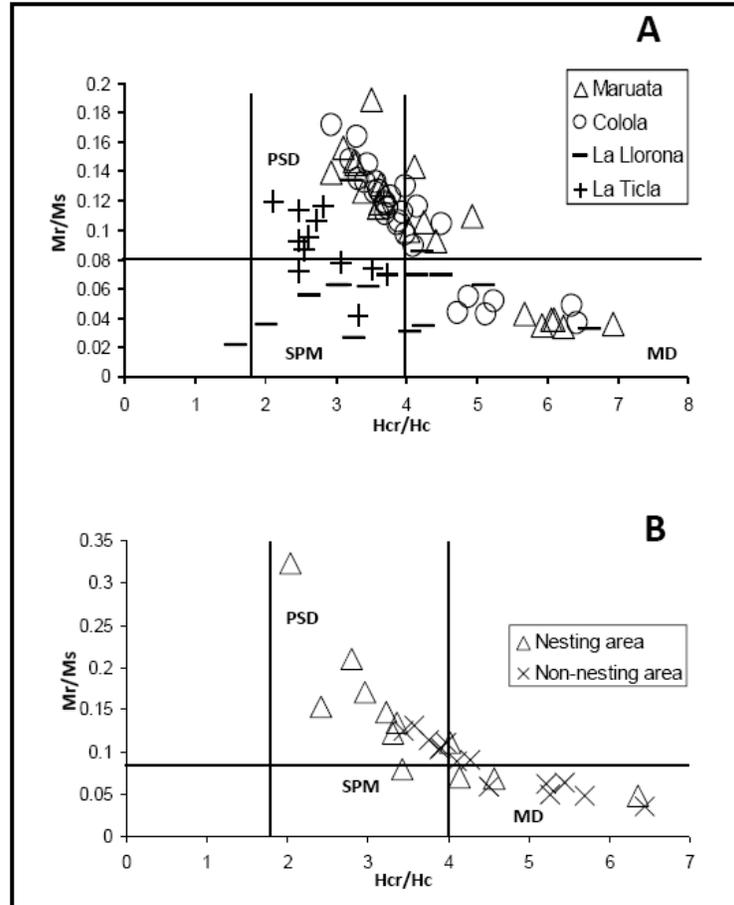
**Figura 20** Gráficos que muestran la composición mineral y proporciones en muestras de arena colectadas en las playas de Maruata **(A)**, Colola **(B)** y La Llorona **(C)**. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de transmisión luz. Nótese el alto porcentaje de magnetita en muestras colectadas a lo largo de la playa de Maruata. El gráfico n (D) ilustra el patrón de difracción de rayos X obtenido de una muestra de arena de Maruata este patrón es característico de la magnetita pura.

Así ambos tipos de análisis revelaron la presencia de magnetita libre de inclusiones, es decir de casi el 100% de pureza en las muestras correspondientes

a la playa de Maruata (Figura 20D). Además, como se ha mencionado en la sección de metodología, los valores de los radios de magnetización  $M_r/M_s$  (derivados de la curva de histéresis; Figura 7A) pueden ser graficados como una función del radio de coercitividad  $H_{cr}/H_c$  (derivado de las curvas de histéresis e  $irm$ ; Figuras 7A y B) en un diagrama de Day. Este diagrama permite estimar el estado de dominio magnético de las partículas presentes en la muestra de estudio. Así, basados en los resultados obtenidos a través del diagrama de Day podemos observar que el tipo de partículas de magnetita predominantes en las muestras de la playa de Maruata corresponden a pseudo dominio simple ( $0.8-1\mu\text{m}$  de diámetro) y partículas multidominio ( $1\mu\text{m}>$ ) (Figura 21A).

Es importante notar en el grafico que la distribución de los estados de dominio de Colola y Maruata son similares mientras que los de la La Llorona y La Ticla se separan (Figura 21A). Estos resultados sugieren que el ensamble de minerales en Colola y Maruata es similar.

Finalmente, ninguna otra anomalía magnética con valor sobre 200 nT fue identificada en las cartas magnéticas en áreas cercanas a Colola, La Llorona y La Ticla. Se identificaron sin embargo, un par de anomalías débiles en la vecindad de la playa La Ticla, estas anomalías asociadas con rocas ígneas extrusivas pero no con depósitos de fierro (Martínez *et al.*, 1995).



**Figura 21.** Como se mencionó en la sección de metodología, todos los valores de histéresis obtenidos de cada una de las muestras obtenidas en Colola, Maruata, La Llorona y La Ticla, fueron utilizados para construir el diagrama de Day para cada playa. Los resultados se resumen en (A). El gráfico muestra los tipos de partículas magnéticas contenidas en las muestras de arena para cada playa. (B) Diagrama de Day que muestra los tipos de partículas magnéticas contenidas en las muestras de arena obtenidas de las áreas de anidación y no anidación en la playa de Colola. PSD, partículas de pseudo dominio simple; SPM, partículas superparamagnéticas; MD, partículas multidominio.

### **3.2 Parámetros magnéticos locales de las playas natales: áreas de preferencia de desove y áreas de no preferencia**

Para evaluar si las áreas de anidación preferentes en Colola y Maruata poseen marcas magnéticas sutiles se midió susceptibilidad e intensidad de la nrm en muestras de arena obtenidas aproximadamente a 30 cm de profundidad a lo largo de un transecto longitudinal que cruzo áreas de preferencia y de no preferencia de desove en las playas. Aunque en general Colola, presentó valores de susceptibilidad magnética e intensidad de la nrm bajos, en las áreas de preferencia de desove estos fueron un poco más altos que aquellos obtenidos para áreas de no preferencia de desove (Tabla 9).

En Maruata por otro lado, en donde la susceptibilidad magnética y la intensidad de la nrm son mucho más elevadas no hubo una tendencia significativa para las áreas de preferencia de desove y valores elevaos de ambos parámetros. Interesantemente, en la playa de Colola, los estados de dominio de los granos en las áreas de preferencia de desove son mucho más cercanos a partículas PSD. Las áreas de no preferencia de desove tuvieron granos más cercano a los tipos de dominio MD (Figura 21B). Esto podría significar que los momentos magnéticos de las partículas contenidas en las muestras de arena de las áreas de preferencia de desove tienden a ser más homogéneos y por ende indicar un micro hábitat de mayor estabilidad.

**Tabla 9.** Parámetros magnéticos básicos de la arena en sitios de desove y no desove a lo largo de las playas de Colola y Maruata.

Playa	Susceptibilidad (Unidades de Masa de la Susceptibilidad)				Intensidad (A/m x 10 <sup>6</sup> )	
	Anidación		No/anidación		Anidación	No/anidación
	HF	LF	HF	LF		
	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Maruata n=6	65±37	66±38	109±112	116±118	10±6	17±24
Colola n=6	20±11* <sup>1</sup>	21±11* <sup>1</sup>	6±1	6±1	5.6±0.2* <sup>2</sup>	2±0.6

Kruskal Wallis ANOVA on ranks:  $p < 0.001$

\*<sup>1</sup> Turkey test for multiple comparisons:  $*p < 0.05$  v.s. no nesting

\*<sup>2</sup> Dunn's method for multiple comparisons:  $*p < 0.05$  v.s. no nesting

HF, alta frecuencia, LF, baja frecuencia

### 3.3 Discusión y Conclusiones de la fase 3.

Una de las hipótesis básicas probadas en este trabajo postula que las playas natales utilizadas por la tortuga marina negra proveen de señales magnéticas que a larga y corta distancia pueden guiar su comportamiento de retorno a casa.

Las señales a larga distancia pueden estar relacionadas con parámetros dipolares del campo magnético terrestre tales como inclinación e intensidad. Los de corta distancia pueden provenir de los componentes de la corteza terrestre, como anomalías magnéticas (Walker *et al.*, 2002; Freake *et al.*, 2006; Phillips *et al.* 2006).

Para evaluar como los componentes dipolares pueden proveer un código regional para Colola y Maruata – las playas de anidación de la tortuga negra- se compararon varios de los parámetros del campo magnético terrestre en localidades geográficas que corresponden a Colola-Maruata y La Llorona /La Ticla. Los valores de inclinación tienden a ser menores en Colola y Maruata que en La Llorona y La Ticla. Aunque esto puede ser considerado obvio ya que las playas ocupan diferente posición geográfica, el hecho de que los valores de las playas de anidación y no anidación no se sobrelapen sugiere que las tortugas buscan por localidades cercanas con un rango de distancia estrecho. Basados en nuestras estimaciones, la tortuga negra debe ser capaz de sensar la inclinación del campo magnético en una longitud de 65 km (el rango funcional dinámico del presunto receptor debe estar entre 0.03 a 0.065 grados). Dentro de este rango, la tortuga negra debe detectar un cambio en la intensidad cada 3 kilómetros (el valor del límite mínimo de discriminación estimado fue de 0.03). Aunque este valor es comparable con aquel estimado para cocodrilos (Freake *et al.*, 2006), difiere de

aqueños estimados para tortugas en estudios de Lohmann (3 grados; ver tabla 1 en Courtillot *et al.*, 1997).

Nosotros no sabemos si la diferencia entre lo mencionado por Courtillot *et al* (1997) y este trabajo proviene de la discrepancia entre los parámetros usados para estimar la sensibilidad del receptor (de comportamiento o geofísicos) o si refleja especificad ecológica (e.g. disponibilidad de estímulos magnéticos locales) y/o biológica (e.g. rangos de discriminación pueden diferir entre especies) de la especie. Es claro que, estudios de comportamiento y electrofisiológicos son necesarios de llevarse a cabo en tortuga negra para resolver esta discrepancia.

En adición nuestras estimaciones también sugieren que la tortuga negra debe tener la habilidad de sensar la intensidad del campo magnético en una distancia de 13.48 kilómetros (el rango dinámico funcional del presunto receptor debe estar entre 11 a 94 nT). Dentro de este rango la tortuga negra debe detecta un cambio en la intensidad total del campo magnético de 1.57 km (el valor del límite mínimo de discriminación estimado fue de 11nT). Una vez más los rangos de discriminación para la intensidad total aquí 11-94nT) están dentro del rango sugerido para ballenas (50nT; Kirschvink *et al.*, 1986; Kirschvink, 1990, Walker *et al.*, 1992); ave bobolink (50-200nT Semm and Beason, 1990, Beason, 2005) y abejas (26 nT, Kirschvink *et al.*, 1997). comportamiento realizados por Lohmann (1-3 $\mu$ T; ver tabla 1 in Courtillot *et al.*, 1997).

Nuestras estimaciones, sin embargo difieren con los cálculos realizados para tortugas con base en los experimentos de Estos números predicen que las tortugas detectan cambios en la intensidad total del campo cada 142.8 kilómetros en una distancia de 285.77 kilómetros. Sin embargo, el hecho de que las hembras de tortuga desplazadas 120 kilómetros de sus playas natales pierdan dramáticamente su ruta de regreso a ellas cuando su sentido magnético es turbado (Luschi *et al.*, 2007), sugiere que las señales magnéticas pueden ser también usadas por las tortugas en rangos de distancia más cortos de lo que previamente se había pensado; nuestros resultados son entonces, compatibles con esta idea. Así, las tortugas deben tener una mayor sensibilidad a las señales magnéticas de lo que previamente se esperaba. Teniendo en mente estas observaciones, nosotros creemos que nuestros resultados son compatibles con el concepto de que las áreas de reproducción o playas natales de la tortuga negra proveen de información magnética suficiente para que las tortugas puedan ubicarlas con alta precisión. Por lo tanto las tortugas negras migrando entre sus playas natales en Michoacán y sus áreas de alimentación en América Central y Baja California México (Alvarado and Figueroa, 1992) puede usar variaciones en la inclinación o intensidad del campo magnético dentro del rango de 65 kilometro para establecer la ubicación regional de las áreas reproducción y playas natales conforme se mueven a lo largo del eje norte sur de la costa Michoacana.

Finalmente, las variaciones seculares, como una posible fuente de error (Skiles, 1985; Courtillot *et al.*, 1997; Freake *et al.*, 2006), en la localización de Colola-Maruata, La Llorona y La Ticla fueron similares. Aunque estas diferencias pueden desorientar a tortugas inexpertas en su camino y encuentro con Colola-Maruata, el hecho de que las variaciones seculares de las playas natales y no natales sean similares y que estas playas en particular estén localizadas en la línea de costa en un eje norte sur, puede disminuir los efectos potenciales de las variaciones seculares en el encuentro del área reproductiva a través de los años (ver también Lohmann *et al.*, 1999).

La segunda parte de esta primera hipótesis exploró la posibilidad de que las playas natales de la tortuga negra presentaran anomalías magnéticas locales que pudiesen proveer de señales para su ubicación precisa en un rango de distancia más corto, tal vez en adición a posibles gradientes químicos. Para evaluar esta posibilidad, se analizaron las cartas magnéticas de campo total del área de estudio. Fue claramente identificada una anomalía magnética que intrusión en la playa de Maruata. La intensidad de dicha anomalía alcanza un valor por arriba de 350 nT con un gradiente de 50 nT por kilómetro. El estudio del área revela que la anomalía asociada al cerro Centinela encajona un depósito de fierro. El análisis mineralógico de las muestras de arena de Maruata indica que los sedimentos de esta playa son ricos en magnetita cuyo origen puede ubicarse en el Cerro Centinela y ser transportada por el río Maruata.

El pico de la anomalía magnética se localiza aproximadamente a 6 kilómetros tierra adentro y de acuerdo a nuestras estimaciones la tortuga negra es capaz de sensar la intensidad total del campo en un rango de 13.48 km, entonces es posible que las tortugas puedan percibir la presencia de la anomalía mientras se acerca a la costa ya sea de Colola o Maruata; ambas playas están separadas 2 kilómetros una de la otra.

En conclusión pensamos que nuestras observaciones son compatibles con la idea de que las playas natales de *C. agassizi*, pueden proveer de señales magnéticas a corta distancia que pueden ayudar a la tortuga a ubicarlas con un alto grado de precisión. Esta información magnética puede complementar señales visuales y olfativas (Ganzhorn, 1990; Walker *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2006). En adición, las anomalías magnéticas que intrusionan en la playa como ocurre en Maruata, pueden proveer no solo un punto de referencia tierra adentro. Por años los geofísicos han hecho mención de la existencia del proceso de inducción electromagnética lateral asociado con el denominado vector de Parkinson que genera gradientes de campos electromagnéticos en planos verticales y horizontales en la borde océano-continental (Campbell, 2001). Estos gradientes alcanzan valores de cerca de 100 nT y 50 nT en los componentes horizontal y vertical respectivamente, y pueden entonces influir el ambiente magnético dentro de un rango de 50 kilómetros ([Stefan.Maus@noaa.gov](mailto:Stefan.Maus@noaa.gov)). Ya que el curso del río Maruata rico en sedimentos magnéticos desemboca directamente en la bahía de

Maruata, puede ser posible que el constante aporte de magnetita por el río pueda incrementar la conductividad del agua de mar en la bahía y/o generar “tracks” de sedimentos magnéticos bajo el agua que pueden incrementar también el efecto costero lateral de vector de Parkinson. Tal circunstancia en turno puede generar gradientes de voltaje o magnéticos que puedan ser detectados por el sentido de compás electromagnético de la tortuga mientras se acerca a la playa natal. Aunque reconocemos que nuestras conclusiones son aun especulativas. Los datos presentados aquí pueden sentar las bases para llevar a cabo experimentos diseñados de campo y laboratorio diseñados de manera adecuada en un cercano futuro.

Un punto interesante que necesita ser discutido es el hecho de que en años recientes, se ha registrado un mayor número de tortugas negras desovando en Colola mas que en Maruata (Brand, 1958 *citado en* Alvarado y Figueroa, 1989), aunque Colola no muestre una asociación directa con una anomalía magnética como es el caso para Maruata. Esta evidencia no excluye la idea de que Maruata puede estar funcionando como el faro magnético para la tortuga negra ya que la distancia que separa a ambas playas es de dos kilómetros, un valor que cae dentro del rango hipotético (13.48 kilómetros) y el mínimo rango de discriminación (1.57 kilómetros) en el cual la tortuga negra puede ser capaz de sensar cambios en la intensidad total del campo magnético. Además, la proporción de desove entre ambas no siempre ha favorecido a Colola. Registros arqueológicos e

históricos indican que el sitio primario de desove de *C. agassizi* antes de la colonización española fue Maruata (Alvarado and Figueroa, 1989). Parecer ser que con el tiempo, los asentamientos humanos y el incremento de la actividad humana han forzado a la tortuga negra a moverse a Colola en los años 60 (Alvarado and Figueroa, 1989). Este fenómeno no es raro ya que procesos similares parecen haber ocurrido con otras especies de tortugas marinas (Witham, 1995; Bell *et al.*, 2007).

La literatura a menudo comenta sobre la habilidad de las tortugas marinas de regresar a sus playas natales y desovar en sitios no al azar o predecibles dentro de ellas (Camhi, 1993 *citado en* Wood and Bjorndal, 2000; Nordmoe *et al.*, 2004; Weishampel *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2006). Las bases de esta fidelidad son inciertas. Los autores han atribuido dicha fidelidad a varias características tales como humedad del a arena, pH, temperatura, tamaño de grano, presencia de materia orgánica y pendiente de playa (Stancyk and Ross, 1978; Mortimer, 1982, 1990; Flores, 1992; Wood and Bjorndal, 2000; Kamel and Mrosovsky, 2004, 2005, 2006; Weishampel *et al.*, 2006), nosotros entonces evaluamos si había marcas magnéticas sutiles en las áreas de preferencia de desove dentro de las playas natales que pudieran influenciar NP. Interesantemente, encontramos que las muestras de arena obtenidas de las áreas de preferencia de desove tenían una intensidad de la nrm y susceptibilidad magnética significativamente mayor que las áreas de no preferencia de desove en la playa de Colola.

Una tendencia similar no significativa fue observada en Maruata. Aunque nuestros resultados pudieran ser interpretados como la sugerencia de que señales magnéticas pudiesen guiar el comportamiento NP en la tortuga negra tal conclusión esperaría por una confirmación experimental ya que el contenido de minerales magnéticos en los sedimentos de playa puede influenciar directa o indirectamente el tamaño de grano, color, temperatura, humedad y compactación de la arena (U.S. Fish & Wildlife Service, 1999; Byrd, 2004)

Basados en nuestras observaciones parece ser que el concepto de que Colola-Maruata proveen de señales magnéticas de corta distancia que ayudan a las tortuga negra a localizarlas es válida para esta población reproductiva de *C. agassizi*. Las generalizaciones para otras especies y localidades diferentes de Colola-Maruata pueden ser no aceptadas ya que las tortugas pueden combinar el uso de recursos magnéticos a gran escala, locales e intrínsecos de sus áreas de reproducción solo cuando estén disponibles y si se han experimentado previamente. Pensamos que nuestros resultados y especulaciones tienen implicaciones mayores en el diseño de medidas de conservación de la población de *C. agassizi*, solo por mencionar uno de ellos, a la fecha, la extensión del área decretada como protegida se restringe al cinturón de las playas sin prestar atención adicional a las fuentes naturales de realimentación de la playa. El Cerro Centinela claramente es una de esas fuentes y en años recientes está siendo sujeto a agresión humana debido a la necesidad de desarrollar un sistema efectivo

de comunicación entre las comunidades costeras y de tierra adentro. Si el Cerro Centinela es devastado por la intensa actividad humana en los próximos años, se podrían alterar no solo las características magnéticas que rodean el ambiente reproductivo de la tortuga negra sino además los macro y microhábitats ecológicos de sus playas natales.

## VIII. Literatura Citada

Adair, R. K. (2000). Static and low-frequency magnetic field effects: health risks and therapies. *Rep. Prog. Phys.* 63: 415–454.

Alvarado J. and A. Figueroa (1989), *Ecología y Conservación de las Tortugas Marinas en Michoacán, México* (segunda parte), Cuadernos de Investigación 5, 68 pp., Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán México.

Alvarado J and A. Figueroa (1992), Recapturas post/anidatorias de hembras de tortuga marina negra (*Chelonia agassizi*) marcadas en Michoacán México. *Biotropica* 24 (4): 560-566.

Alvarado J. and C. Delgado (1985-2000), Base de Datos del Proyecto Tortuga Negra. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán México.

Avalos, D. A., E. Wajnberg, P. S. Oliviera, I. Leal, M. Farina, and D. M. S. Esquivel. (1999). Isolation of magnetic nanoparticles from *pachycondyla marginata* ants. *J. Exp. Biol.*, 202:2687-2692.

Avens L, and K. J. Lohmann (2003), Use of multiple orientation cues by juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *The Journal of Experimental Biology.* 206: 4317-4325, doi:10.1242/jeb.00657

Bacri, J. C., V. Cabuil, A. Cebers, C. Menager and R. Perzynski. (1996). Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field. *Europhys. Lett.* 33: 235–240.

Bancroft, John D. y Stevens, A. (1990), *Theory and practice of histological techniques* Ed. Churchill Livingstone, ed. 3<sup>a</sup>, 726 pp. USA.

Barker J. F y Herman W. S. (1976). Effect of temperature and photoperiod on reproduction of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Journal of Insect Physiology* 22: 1565-1568.

Beason R.C. (2005), Mechanisms of Magnetic Orientation in Birds. *Integr. Comp. Biol.* 45, 565-573, doi:10.1093/icb/45.3.565.

Beason, R. C. y Semm, P. (1996); Does the avian ophthalmic nerve carry magnetic navigational information? *The Journal of Experimental Biology*, 199: 1241-1244.

Bell, C. D., J. L. Solomon, J. M. Blumenthal, T. J. Austin, G. Ebanks-Petrie, A. C. Broderick, B. J. Godley (2007), Monitoring and conservation of critically reduced marine turtle nesting populations: lessons from the Cayman Islands. *Animal Conservation* 10(1), 39–47, doi:10.1111/j.1469-1795.2006.00068.x

Benett T.D.A. (1996), Do animals have cognitive maps?, *The Journal of Experimental Biology* 199: 219–224.

Bowen B. W., A. B. Meylan, and J. C. Avise (1989), An odyssey of the green turtle; Ascension Island revisited. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86: 573-576

Collinson, D. W. (1983), *Methods in Rock Magnetism and Paleomagnetism*, 503pp., Chapman and Hall, London.

Butler R. (1998), *Paleomagnetism: Magnetic Domains to Geologic Terranes*, 319 pp., Blackwell Scientific Publications, Boston.

Byrd J. (2004), The effect of beach nourishment on loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nesting in south Carolina. M.S. thesis, 154pp., College of Charleston. South Carolina USA.

Campbell W. H. (2001), *Earth Magnetism. A Guided Tour Through Magnetic Fields*, pp., 151, Harcourt Academy Press, California.

Carr, A. and Carr, M. H. (1972), Site Fixity in the Caribbean Green Turtle. *Ecology*, 53: 425-429.

Carr W. (1988), The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment, in *Sensory biology of aquatic animals*, edited by Atema J., R.R. Fay, A. N. Popper, W. N. Tavolga, pp. 3-27, Springer-Verlag, New York.

Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, Y. J. Wu, D. Liu (1999), Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760–765

Chassin-Noria O., A. Abreu-Grobois, PH. Dutton, K. Oyama (2004), Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica*, 121, 195–206.

Collet T.S. and P. Graham (2004), Animal Navigation: Path Integration, Visual Landmarks and Cognitive Maps *Current Biology* 14: R475–R477.

Correa, 1974. *Geografía del estado de Michoacán* 545 pp. Gobierno del estado de Michoacán. Morelia, Mich, Mex.

Courtillot V., G. Hulot, M. Alexandrescu, J-L le Mouë, J. L. Kirschvink (1997), Sensitivity and evolution of sea-turtle magnetoreception: observations, modelling and constraints from geomagnetic secular variation. *Terra Nova*. 9: 203–207.

Darci M. S. Esquivel, Eliane Wajnberg, G. R. Cernicchiaro, O. C. Alves. (2004), Comparative Magnetic Measurements of Migratory ant and its only Termite prey. *Journal of Magnetism and Magnteic Materials* 278: 117-121.

Davila, A. F., M. Winklhofer and N. Petersen (2003), A new model for a magnetoreceptor in homing pigeons based on interacting clusters of superparamagnetic magnetite. *Phys. Chem. Earth* 28: 647–652.

Delgado, C. & J. Alvarado (2001), Recovery of the black seaturtle (*Chelonia agassizii*) in Michoacan, Mexico: an integrated conservation approach. *Final report 2000–2001*. 45 pp., U.S. Fish and Wildlife Service. Michoacán, México.

Demaine, C. & Semm, P. (1985), The avian pineal gland as an independent magnetic sensor. *Neurosci. Lett.* 6: 119–122 .

Diebel, C. E., R. Proksch, C.R. Green, P. Neilson y M. M. Walker (2000), Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406: 299–302

Dunlop D. J., and O. Ozdemir (1997), *Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers*. 573 pp, Cambridge University Press, New York.

Fleissner, G., E. Holtkamp-Rotzler, M. Hanzlik, M. Winklhofer, G. Fleissner, N. Petersen and W. Wiltschko (2003), Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *J. Comp. Neurol.* 458: 350–360.

Flores C. A. (1992), Análisis de la anidación en tortuga negra (*Chelonia agassizi* Bocourt 1868) en relación con algunos factores del ambiente incubatorio en la playa de Colola Michoacán, tesis de licenciatura en biología, 40 pp, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Michoacán México.

Freake M., R. Muheim, J. B. Phillips (2006), Magnetic maps in animals: a theory comes of age?. *The Quarterly Review of Biology*, 81 (4): 327-347, doi: 10.1086/511528

Ganzhorn J. U. (1990), Towards the map of the homing pigeon. *Animal Behaviour*, 40, 65-78

Giovani, B., M. Birdin, M. Ahmad y K. Brettel (2003), Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature Struct. Biol.* 10: 489–490

Gould, J. L., J. L. Kirschvink, and K. S. Deffeyes (1978), Bees have magnetic remanence. *Science*, 201:1026-1028.

Gould, J. L. (1982), The map sense of pigeons. *Nature*, 296:205-211.

Gould, J. L. (2004), Animal navigation. *Curr. Biol.* 14, R221-R224 2

G. Guo and A. Guo, Crossmodal interaction between olfactory and visual learning in *Drosophila*, *Science* 309: 307-310

Grassman M. (1993), Chemosensory orientation behavior in juvenile sea turtles. *Brain, Behavior and Evolution* 41: 224-228.

Grissom, C. B. (1995), Magnetic field effects in biology: a survey of possible mechanisms with emphasis on radical pair recombination. *Chem. Rev.* 95: 3–24

Hanzlik, M., C. Heunemann, E. Holtkamp-Rotzler, M. Winklhofer, N. Petersen, and G. Fleissner (2000), Superparamagnetic magnetite in the upper-beak tissue of homing pigeons. *Biometals*, 13:325-331.

Hatase H., M. Kinoshita and T. Bando (2002), Population structure of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, nesting in Japan: bottlenecks on the Pacific population. *Marine Biology*, 141: 299–305.

Hutchinson, C. H. (1974), *Laboratory handbook of petrographic techniques* 527 pp., John Wiley & Sons. New York.

Irwin WP, Horner AJ, Lohmann KJ. 2004 Magnetic field distortions produced by protective cages around sea turtle nests: unintended consequences for orientation and navigation?. *Biological Conservation* 118: 117–120.

Johnsen S. Y K. J. Lohmann (2005), The Physics and Neurobiology of Magnetoreception. *Nature Reviews Neurosciences*. 6: 703-712.

Kamel S. J., and N. Mrosovsky (2004), Nest site selection in leatherbacks, *Dermochelys coriacea*: individual patterns and their consequences. *Animal Behavior* 68:357-366, doi:10.1016/j.anbehav.2003.07.021

Kamel S. J, and N. Mrosovsky (2005), Repeatability of nesting preferences in the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*, and their fitness consequences *Animal Behaviour* 70 (4): 819-828, doi:10.1016/j.anbehav.2005.01.006

Kamel S. J. and N. Mrosovsky (2006), Inter-seasonal maintenance of individual nest site preferences in Hawksbill Sea Turtles. *Ecology* 87 (11): 2947–2952.

Kerr P. F. (1965), *Mineralogía óptica*. Mc. Graw Hill Book Co. New York.

Kirschvink, J. L. and Gould, J. L. (1981), Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Biosystems* 13:181–201.

Kirschvink, J. L. and Walker, M. M. (1986), Biogenic magnetite in higher organisms and the current status of the hypothesis of ferromagnetic magnetoreception. In *Biophysical Effects of Steady Magnetic Fields* (ed. G. Maret, N. Boccara and J. Kiepenheuer), pp. 180-188. New York: Springer Verlag.

Kirschvink J..L., A. E. Dizon, J. A. Westphal (1986), Evidence from strandings for geomagnetic sensitivity in cetaceans. *J Exp Biol*, 120: 1-24.

Kirschvink J. L. (1990), Geomagnetic sensitivity in cetaceans: an update with live stranding records in the United States. in *Sensory Abilities of Cetaceans Laboratory and Field Evidence*, 639-649pp. Plenum Publishing Corp. New York.

Kirschvink J. L., S. Pasmanabha, C.K. Boyce and J. Oglesby (1997), Measurement of the threshold sensitivity of honeybees to weak extremely low-frequency magnetic fields. *The Journal of Experimental Biology* 20: 1363–1368.

Kirschvink, S. L., Walker, M. M., Diebel, C. (2001); Magnetite-based magnetorecepción. *Elsevier Science*, 11: 462-467.

Koch A.L., Carr A. & Ehrenfeld D.W. (1969), The problem of open-sea navigation: the migration of the green turtle to Ascension Island. *Journal of Theoretical Biology* 22: 163-179.

Kramer G. (1953), Wird die Sonnenhöhe bei der Heimfindeorientierung verwertet? *J Ornith* 94: 201-219

Leask, M. J. (1977), A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature* 267: 144–145.

Lee P. M., P. Luschi, G. C. Hays (2007), Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods *Mol. Ecol.* 16(1): 61–74, doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03115.x

Levin M. and S. G. Ernst (1998), Applied DC magnetic fields cause alterations in the time of cell divisions and developmental abnormalities in early sea urchin embryos. *Bioelectromagnetics* 18: 255-263.

Light P. M., M. Salmon and K. J. Lohmann (1993), Geomagnetic orientation of Loggerhead sea turtles: evidence for an inclination compass. *J. Exp. Biol.* 182: 1–10

Lohmann K. J., M Salmon, and J. Wyneken (1990), Functional autonomy of land and sea orientation systems in sea turtle hatchlings. *Biol. Bull.* 179: 214-218.

Lohmann, K. J. (1992), How sea turtles navigate. *Scientific American* 266 (1): 100-106

Lohmann, K. J. (1993), Magnetic compass orientation. *Nature* 362: 703.

Lohmann K. J. and C. M. F. Lohmann (1994)a, Acquisition of magnetic directional preference in hatchling Loggerhead sea turtles. *J. Exp. Biol.* 190: 1–8

Lohmann K. J., and C. M. F. Lohmann (1994)b, Detection of magnetic inclination angle by sea turtles: a possible mechanism for determining latitude. *J. Exp. Biol.* 194: 23-32.

Lohmann, K. J., Pentcheff, N. D., Nevitt, G. A., Stetten, G., Zimmer-Faust, R. K., Jarrard, H. E., and L. C. Boles (1995), Magnetic orientation of spiny lobsters in the ocean: experiments with undersea coil systems. *J. Exp. Biol.* 198: 2041-2048

Lohmann K. J., and C. M. F. Lohmann (1996)a, Detection of magnetic field intensity by sea turtles. *Nature.* 380: 59-61.

Lohmann K. J., and C. M. F. Lohmann (1996)b, Orientation and open-sea navigation in sea turtles. *Journal of Experimental Biology.* 199: 73-81.

Lohmann, K. J., J. T. Hester, and C. M. F. Lohmann (1999), Long-distance navigation in sea turtles. *Ethology, Ecology, and Evolution.* 11: 1-23.

Lohmann, K. J., Lohmann, C. M. F., Ehrhart, L. M., Bagley, D. A., and T. Swing. (2004). Geomagnetic maps used in sea-turtle navigation. *Nature* 428: 909–910.

Luschi P., C. G. Hays, P. Floriano (2003), A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *Oikos* 103: (2), 293–302. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12123.x

Luschi P., S. Benhamou, C. Girard, S. Ciccione, D. Roos, J. Sudre, and S. Benvenuti (2007), Marine Turtles Use Geomagnetic Cues during Open-Sea Homing. *Current Biology* 17: 126–133. DOI 10.1016/j.cub.2006.11.062

Mace A., Hack y Daniel I. R. (2001), Migration. *Encyclopedia of Biodiversity*, Academic Press. 4: 221-233

Mann, S., N. H. Sparks, M. M. Walker, and J. L. Kirschvink (1988), Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: Implications for magnetoreception. *J. Exp. Biol.*, 140:35-49.

Manton M., A. Karr, and D. W. Ehrenfeld (1972), Chemoreception in the migratory green sea turtle *Chelonia mydas*. *Biol. Bull.* 143: 184-195.

Marc W. Allard, M. M. Miyamoto, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, and B. W. Bowen (1994), Support for Natal Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences *Copeia*, 1: 34-41. doi:10.2307/1446668

Martínez V. A., M. E. Rodríguez, E. J. Núñez, G. J. Bustamante, E. J. Montiel, A. M. Carranza, A. J. Lopez, R. A. Perez, C. F. Yáñez. (Eds.) (1995). *Monografía geológico-minera del Estado de Michoacán*, 176 pp, Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Coordinación General de Minería. Pachuca Hidalgo, México.

Meylan A. B., B. W. Bowen and J. C. Avise (1990), A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* 248:724-727. doi: 10.1126/science.2333522

Möller, A., S. Sagasser, W. Wiltschko, B. Schierwater (2004), Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* 91: 585–588

Mouritsen, H., U. Janssen-Bienhold, M. Liedvogel, G. Feenders, J. Stalleicken, P. Dirks and R. Weiler (2004), Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 101: 14294–14299.

Mortimer J. A. (1982), Factors influencing beach selection by nesting sea turtles. in *Biology and Conservation of Sea turtles* Bjorndal K. A. editor.. 45-51pp., *Smithsonian Institution Press*. Washington.

Mortimer J. A. (1990), The Influence of Beach Sand Characteristics on the Nesting Behavior and Clutch Survival of Green Turtles (*Chelonia mydas*), *Copeia*, 3:802-817. doi:10.2307/1446446

Mrosovsky N, Granda A M y Hay T. (1979), Seaward orientation of hatchling turtles: turning systems in the optic tectum. *Brain Behav. Evol* 16:203-221 (DOI: 10.1159/000121837)

Nemec, P., Altmann, J., Marhold, S., Burda, H. y Oelschlager, H. (2001), Neuroanatomy of Magnetoreception: Superior Colliculus Involved in Magnetic Orientation in Mammal. *Science*, 294: 366-368.

Nicholls J., G. R. Martin and B. G. Wallace (1992), *From Neuron to Brain. A Cellular and molecular approach to the function of the nervous system*. 3a. Ed. Sinauer associates, Inc. 807 pp Sunderland Massachusetts USA.

Nordmoe E.D., A.E. Sieg, P..R. Sotherland, J. R. Spotila, F. V. Paladinos, R. D. Reina (2004), Nest site fidelity of leatherback turtles at Playa Grande, Costa Rica. *Animal Behavior* 68: 387-394, doi:10.1016/j.anbehav.2003.07.015

Papi R. and F. Mencacci (1999), The Green Turtles of Ascension Island: a paradigm of long-distance navigational ability. *Rend. Fis. Acc. Linceis.* 10:109-119.

Peare T., and P. G. Parker (1996), Local genetic structure within two rookeries of *Chelonia mydas* (the green turtle). *Heredity*, 77: 619–628.

Phillips J. B. (1996), Magnetic Navigation. *J theor Biol.* 180: 298-208

Phillips J. B., K. Schmit-Koenig, and R. Muheim (2006), True navigation: Sensory basis of gradient maps in *Animal spatial cognition; Comparative neural & computational approaches*, 1a. ed., [On-line](#), edited by Brown M, R. G. Cook, Comparative cognition press. Massachusetts.

Power S. A. y A.Renier (1980), A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the Eastern Painte turtle (*Chrysemis picta picta*). *J. of Hirnforschung*, 21: 125-159.

Ridley M. (2003), Evolution. 3a. Ed. *Blackwell Pub.* 560 pp.

Ritz, T., S. Adem, and K. Schulten (2000), A Model for Photoreceptor-Based Magnetoreception in Birds *Biophys. J.* 78, 707–718.

Salmon M., J. Wyneken and M. Lucas (1992), Seafinding by Hatchling sea turtles: role of brightness, silhouette and beach slope as orientation cue. *Behaviour* 122: 56-77.

Salmon M., M. Garro, D. Pender, M. Goff, R. Reiners (1995), Behavior of Loggerhead Sea Turtles on an Urban Beach, *Journal of Herpetology* 29(4) 568-576 doi:10.2307/1564740.

Samsonovich A. and B. L. McNaughton (1997), Path Integration and Cognitive Mapping in a Continuous Attractor. Neural Network Model Alexei, *Journal of Neuroscience*, 17(15) 5900–5920.

Schulten, K. (1982), *Festkörperprobleme . Advances in Solid State Physics* Vol. 22 ed. Treusch, J. 61–83 Vieweg, Braunschweig, Germany.

Schroth W., Streit B and Schierwater B. (1996), Evolutionary handicap for turtles. *Nature* 384: 521–522, doi:10.1038/384521a0

Semm, P. & Beason, R. C. (1990), Responses to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. *Brain Res. Bull.* **25**, 735–740.

Semm, P. & Demaine, C. (1986), Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. *J. Comp. Physiol. A* 159: 619–625

Shcherbakov V. P. and M. Winklhofer (1999), The osmotic magnetometer: A new model of a magnetite-based magnetoreceptor in animals. *Eur. Biophys. J.*, 28:380-392.

Skiles, D. D. (1985), The geomagnetic field: its nature, history and biological relevance. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms.*, edited by Kirschvink JL, Jones DS and MacFadden BJ, pp., 43–102. Plenum Press New York.

Stancyk S. and P Ross (1978), An Analysis of Sand of Green Turtle Beaches of Ascencion Island. *Copeia* 1: 93-99, doi:10.2307/1443827

Timmel, C. R. and Henbest, K. B. (2004), A study of spin chemistry in weak magnetic fields. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 362: 2573–2589.

Thompson R. y F. Oldfield (1986), *Environmental Magnetism*. 227 pp., 1a Ed. Allen & Unwin. London.

Tuxbury S.M., and M. Salmon (2005), Competitive interactions between artificial lighting and natural cues during seafinding by hatchling marine turtles, *Biological Conservation* 121: 311–316.

Ueda K., M. Kusunoki, M. Kato, R. Kakizawa, T. Nakamura, K. Yaskawa, M. Koyama, and Y. Maeda (1982), Magnetic remanences in migratory birds. *J. Yamashina Inst. Ornithol.*, 14:166-170.

US Fish and Wildlife Service Southeast Region (1999), *South Florida Multispecies Recovery Plan*. 2172 pp., Atlanta, Georgia.

Walcott C. and R.P. Green (1974), Orientation of homing pigeons altered by a change in the direction of the applied magnetic field. *Science*, 184:180-182.

Walcott, C. (1977), Magnetic fields and the orientation of homing pigeons under sun. *J. Exp. Biol.* 70:105–123.

Walcott, C. (1978), Anomalies in the earth's magnetic field increase the scatter of pigeon's vanishing bearings. In K. Schmidt-König and W. T. Keeton, editors, *Animal Migration, Navigation, and Homing*, pages 99-108. Springer, Berlin.

Walcott, C., J. L. Gould, and J. L. Kirschvink (1979), Pigeons have magnets. *Science*, 205:1027-1029.

Walcott, C. (1992), Pigeons at magnetic anomalies: The effects of loft location. *J. Exp. Biol.* 170:127-141.

C. Walcot (2005), Multi-modal Orientation Cues in Homing Pigeons, *Integr. Comp. Biol.* 45: 574–581

Walker, M.M., J. L. Kirschvink, S.-B. R. Chang, and A. E. Dizon (1984), A candidate magnetic sense organ in the yellowfin tuna, *thunnus albacares*. *Science*, 224:751-753.

Walker M. M., J. L. Kirschvink, G. Ahmed, A. E. Dizon (1992), Fin whales (*Balaenoptera physalus*) avoid geomagnetic gradients during migration. *J Exp Biol*, 171: 67-78.

Walker M. M., Diebel, C. E., Haugh, C. V., Pankhursts, P.M., Montgomery, J.C., Green, C. R. (1997), Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*, 390: 371-376.

Walker, M.M., T.E. Dennis, and J. L. Kirschvink (2002), The magnetic sense and its use in long-distance navigation by animals. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12:735-744.

Weaver, J. C., Vaughan, T. E. and Astumian, R. D. (2000), Biological sensing of small field differences by magnetically sensitive chemical reactions. *Nature* 405: 707–709

Weishampel J. F., D. A. Bagley, and L. M. Ehrhart (2006), Intra-annual Loggerhead and Green Turtle Spatial Nesting Patterns. *Southeastern Naturalist*, 5(3): 453–462.

Wiltschko W. and R. Wiltschko (1972), Magnetic compass of european robins. *Science*, 205:1027-1029.

Wiltschko, W., Munro, U., Ford, H. and Wiltschko R. (1993), Magnetic inclination compass: a basis for the migratory orientation of birds from the northern and southern hemisphere. *Experientia* 49: 167–170.

Wiltschko, R. & Wiltschko, W. (1995), *Magnetic Orientation in Animals* Springer, Berlin, Germany

Winklhofer, M. E., E. Holtkamp-Rotzler, M. Hanzlik, G. Fleissner, and N. Petersen (2001), Clusters of superparamagnetic magnetite particles in the upper-beak tissue of homing pigeons: evidence of a magnetoreceptor. *Eur. J. Mineral.* 13: 659–669

Witham R. (1995), Disruption of Sea Turtle Habitat with emphasis on Human Influence. in: *Biology and Conservation of the Sea Turtles*, 615 pp., edited by Bjorndal K. A., Smithsonian Institute Press. Washington.

Wolf M. J., K. R. Kluender, D.M. Levi (2006), *Sensation and Preception*. 407 pp, Sinauer, Pub. USA.

Wood D. W. and K. A. Bjorndal (2000), Relation of Temperature, Moisture, Salinity, and Slope to Nest Site Selection in Loggerhead Sea Turtles *Copeia* 1: 119–119.

Xavier R., A. Barata, L. Palomo, N. Queiroz, E. Cuevas (2006), Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata* Linnaeus 1766) and greenturtle (*Chelonia mydas* Linnaeus 1754) nesting activity (2002-2004) at El Cuyo beach, México. *Amphibia-Reptilia* 27: 539-547.

**Anexo1.**

Pemiso 14340 (hoja 1)



**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

AV. REVOLUCIÓN No. 1425, NIVEL 1  
COL. TLACOPAC, DELEG. ALVARO  
OBREGÓN C. P. 01040,  
MÉXICO D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 14340

MÉXICO, D. F., A 16 DIC. 2004

**M. EN C. ALMA LILIA FUENTES FARIAS**  
FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
HAITI NO. 164, LAS AMÉRICAS, C.P. 58270  
MORELIA, MICHOACÁN  
TEL. 316 74 12, 56 22 41 30/almafuentes70@hotmail.com

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, V, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 5 fracción XI, 79, fracciones I, II, III, VI y VII, 80 fracción I, 82, 83 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículo 31, fracciones VI y XXVI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Artículos 1º, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; Título Sexto, Capítulo I, Artículo 85, fracciones I, II, III, IV, V y VI, Capítulo II, Artículo 88, fracciones I, II y VI, Capítulo IV, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre autoriza la colecta de hasta cuarenta (40) huevos y cuarenta (40) crías encontradas muertas por causas naturales de "tortuga negra" *Chelonia agassizi*, así como en el caso de encontrar "golfinas" *Lepidochelys olivacea* la misma cantidad de huevos y crías; además de cabezas de adultos encontrados sacrificados por caza furtiva; así como la colecta de hasta trescientos (300) organismos muertos de "mariposa monarca" *Danaus plexippus*. Además, diez (10) crías de tortuga negra *Chelonia agassizi*, serán trasladados al laboratorio y liberados después de un año; dichos ejemplares no podrán ser liberados hasta que tengan una certificación veterinaria de salud. Estas actividades se llevarán a cabo en las localidades Colola y Maruata, Mpio. Aquila y en el Ejido El Rosario, Mpio. Ocampo, todo en el Estado de Michoacán. Esta autorización tendrá una vigencia a partir de la fecha de expedición de la presente y hasta el 31 de diciembre del año 2005.

La presente se expide en apoyo a las actividades inherentes al desarrollo del proyecto denominado "Magnetorrecepción en la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Área de Reservas Colola, Maruata, Michoacán, Mex.", que llevará a cabo la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el Instituto de Geofísica de la UNAM, con la colaboración del Prof. Javier Alvarado Díaz de la WWF, debiendo sujetarse obligatoriamente a todas las condiciones siguientes:

1. - Tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con la autorización expresa de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

Permiso 14340 (hoja 2).



**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**  
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

AV. REVOLUCIÓN No. 1425, NIVEL 1  
COL. TLACOPAC, DELEG. ALVARO  
OBREGÓN C. P. 01040,  
MÉXICO D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 14340

MÉXICO, D. F., A 18 DIC. 2004

- 2 -

2. - Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes, así como con el Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas.

3.- Obligatoriamente y previo al inicio de cualquier actividad de campo, deberá contactar a la Dirección de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (Primera Cerrada de Santos Degollado Oriente No. 4, Col. Héroes Ferrocarrileros, C.P. 61500, Zitácuaro, Michoacán, Tel/Fax. 01 (715) 1 53 00 29/ mmonarca@conanp.gob.mx), para entregarle copia del programa de actividades a desarrollarse, fechas, zonas específicas del monitoreo, lista del personal participante y coordinar las actividades de campo con la Reserva de la Biosfera; además para que se le asigne personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal.

4. - En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo. Se deberá guardar extremo cuidado en no introducir especies de flora y fauna ajenas al ANP y evitar perturbar a la fauna nativa de la misma, además de la contaminación originada por basura, la cual deberá ser depositada fuera del ANP.

5. - Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a la Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el Estado de Michoacán (Tel. 01 (43) 22 60 01, 24 48 91), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. Así mismo, al término de dichas actividades lo notificará de igual manera a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

6. - La totalidad del material colectado, capturado y liberado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el material colectado será depositado en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Geofísica, UNAM, Universidad Tecnológica de California, E.U.A., y en la Universidad Ardito Desio Milán Italia, donde el titular de la investigación, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, constancia original de los depósitos debidamente firmadas, especificando la cantidad de material depositado. El trámite de exportación, deberá ser tramitado ante la Dirección General de Vida Silvestre.

..3/

Permiso 14340 (hoja 3).



**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

AV. REVOLUCIÓN No. 1425, NIVEL 1  
COL. TLACOPAC, DELEG. ALVARO  
OBREGÓN C. P. 01040,  
MÉXICO D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ **14340**  
MÉXICO, D. F., A **18 DIC. 2004**

- 3 -

7. - Con base al Capítulo IV, artículo 96 de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, de la Dirección de la Reserva y de CONANP, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa detalladamente las actividades realizadas, especificado el número de ejemplares capturados y liberados por especie, el material colectado de manera definitiva, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre otros productos de la investigación.

8. - Queda estrictamente prohibido efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en otras áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales.

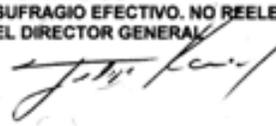
9. - De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales ni de utilización en biotecnología.

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de encontrar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 diferentes a las autorizadas, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades referido en la cláusula número siete de la presente.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

ATENTAMENTE  
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN  
EL DIRECTOR GENERAL

  
  
FELIPE RAMÍREZ RUÍZ DE VELASCO

Copias al reverso...

Permiso 14340 (hoja 4).

C.c.p. C. Francisco Giner De Los Ríos.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Edificio.  
C. José Bernal Stoopan.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA. - Carr. Picacho  
Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México D.F.  
C. Ramón Ponce Contreras.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Michoacán.- Blvd.  
Sansón Flores No. 120, Col. Ejidal Santa María, C.P. 58290, Morelia, Michoacán. Tel. 01 (443) 322 60  
01, 324 48 91, red 36001/ delegado@michoacan.semarnat.gob.mx  
C. Guillermo Ramírez Filippini.- Director de Estudios y Proyectos Técnicos de ANP, Comisión Nacional  
de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, Col. Jardines de la Montaña, Deleg.  
Tlalpan, C.P. 14210, México, D.F.  
Dirección de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca.- Primera Cerrada de Santos Degollado  
Oriente No. 4, Col. Héroes Ferrocarrileros, C.P. 61500, Zitácuaro, Michoacán.  
C. Gabriel Solano Cuéllar.- Jefe del Departamento de Concertación Académica.- Edificio.  
Archivo General (09/CC-1008/11/04)  
Minutario

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The stamp contains the text "R.F. Fuentes" and "17/11/04".

c:colecta/cientifica/alma lilia fuentes (17/11/04)nom

## Anexo 2.

Permiso 10414



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**  
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE  
AV. REVOLUCIÓN No. 1426,  
COL. TLACOPAC,  
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN  
01040-MÉXICO D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 10414

MÉXICO, D. F., A 23 SET. 2005

Septiembre de 2005,  
veinte años de participación solidaria desde los sismos del '85

**M. EN C. ALMA LILIA FUENTES FARIAS**  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
HAITI NO. 164, LAS AMÉRICAS, C.P. 58270  
MORELIA, MICHOACÁN  
TEL. 316 74 12, 56 22 41 30  
almafuentes70@hotmail.com

En alcance al oficio NÚM.SGPA/DGVS/14340 de fecha 16 de diciembre del año 2004, expedido por esta Dirección General y medio por el cual se autorizan las actividades para llevar a cabo el proyecto denominado "Magnetorecepción en la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Área de Reservas Colola, Maruata, Michoacán, México".

Al respecto le informo a usted que, esta Dirección General de Vida Silvestre **no tiene inconveniente** en que además de las actividades autorizadas en el Oficio referido, se colecten máximo de doce (12) crías de "tortuga negra" *Chelonia agassizi* y seis (06) de "tortuga golfina" *Lepidochelys olivacea*; así como la colecta de treinta (30) mariposas monarca vivas *Danaus plexippus*; con la finalidad de realizar diseños experimentales mediante los cuales se pretenderá someter a los ejemplares a campos magnéticos controlados y mediante marcadores tipo anticuerpo lograr un mapeo de las células sensoriales que estén respondiendo a los estímulos aplicados.

Finalmente, le informo que el presente deberá estar acompañado invariablemente del Oficio NÚM/SGPA/DGVS/14340 de fecha 16 de diciembre del 2004 y **queda sujeto estrictamente a las condiciones establecidas en el mismo**.

**ATENTAMENTE**  
**SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.**  
**EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL,**  
**CON FORME AL ARTÍCULO 154 DEL REGLAMENTO**  
**INTERIOR DE LA SEMARNAT, FIRMA EL PRESENTE**  
**SUBDIRECTOR DE GESTIÓN PARA EL APROVECHAMIENTO EN VIDA LIBRE**

  
**FLORENTINO CHILLOPA MORALES**  


- C.c.p. C. Felipe Adrián Vázquez Gálvez.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental - Edificio.  
C. José Bernal Sotopon.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA. - Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México D.F.  
C. Ramón Ponce Contreras.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Michoacán.- Blvd. Sansón Flores No. 120, Col. Ejidal Santa María, C.P. 58290, Morelia, Michoacán.  
C. David Gutiérrez Carbonell.- Director de Estudios y Proyectos Técnicos de ANP, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México, D.F.  
C. Fernando Sánchez Camacho.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies - Edificio.  
Archivo General (09/C2-1117/09/05)



C:\colecta\cientifica\Oficio\oficiofuentesfarias(21/08/05)

### Anexo 3.

Permiso 11314



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**  
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE  
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,  
COL. TLACOPAC,  
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN  
01040-MÉXICO D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 11314

MÉXICO, D. F., A 12 OCT. 2005

**M. EN C. ALMA LILIA FUENTES FARIAS**  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
HAITI No. 164, LAS AMÉRICAS,  
58270-MORELIA, MICHOACÁN  
TEL. 316 74 12, 56 22 41 30  
almafuentes70@hotmail.com

En alcance a los oficios NÚM.SGPA/DGVS/14340 y 10414 de fechas 16 de diciembre del año 2004 y 23 de septiembre del 2005 respectivamente, medio por el cual se autorizan las actividades para llevar a cabo el proyecto denominado "Magnetorrecepción en la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Área de Reservas Colola, Maruata, Michoacán, México".

Al respecto le informo a Usted que, esta Dirección General de Vida Silvestre **no tiene inconveniente** que las actividades de diseño experimental a realizarse en laboratorio, se lleven a cabo en el campamento tortugero de Colola Municipio de Aquila en el Estado de Michoacán. Sin embargo, se le recuerda que antes de realizar las actividades de campo, deberá contar con la autorización expresa del coordinador del campamento tortugero, así mismo, deberá dar a conocer el proyecto y las actividades a realizar a las personas de las zonas aledañas.

Finalmente, le informo que el presente deberá estar acompañado invariablemente de los Oficios antes mencionados y queda sujeto estrictamente a las condiciones establecidas en los mismos.

**ATENTAMENTE**  
**SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.**  
**EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL,**  
**CON FORME AL ARTÍCULO 154 DEL REGLAMENTO**  
**INTERIOR DE LA SEMARNAT, FORME EL PRESENTE**  
**EL DIRECTOR DE CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE**

  
ARIEL ROJO CURIEL



- C.c.p.
- C. Felipe Adrián Vázquez Gálvez.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Edificio.
  - C. José Bernal Stooopen.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México D.F.
  - C. Ramón Ponce Contreras.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Michoacán.- Blvd. Sansón Flores No. 120, Col. Ejidal Santa María, C.P. 58290, Morelia, Michoacán.
  - C. David Gutiérrez Carbonell.- Director de Estudios y Proyectos Técnicos de ANP, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México, D.F.
  - C. Fernando Sánchez Camacho.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies.- Edificio.
- Archivo General (s/r)  
Minutario

C:\colectaciencia\Oficio\oficioAlma-Fuentes\_tortugas(06/10/05)