



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

BIOMÉDICAS BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DEL OJO COMO MAGNETORRECEPTOR EN LA TORTUGA MARINA

Chelonia agassizii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ZAN CUIRÍZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JAIME URRUTIA FUCUGAUCHI

INSTITUTO DE GEOFÍSICA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx., ABRIL 2016



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

BIOMÉDICAS BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DEL OJO COMO MAGNETORRECEPTOR EN LA TORTUGA MARINA

Chelonia agassizii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ZAN CUIRÍZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JAIME URRUTIA FUCUGAUCHI

INSTITUTO DE GEOFÍSICA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx.. ABRIL 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno CUIRIZ RIOS ZAN con número de cuenta 51401266-4 con la tesis titulada "CARACTERIZACIÓN DEL OJO COMO MAGNETORRECEPTOR EN LA TORTUGA MARINA *Chelonia agassizii*", realizada bajo la dirección del DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA:

Presidente: DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO
Vocal: DR. GUSTAVO CASAS ANDREU
Secretario: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Suplente: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DIAZ
Suplente: DRA. MARGARITA MARTINEZ GÓMEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de marzo del 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- o *Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.*
 - o *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca de manutención; con No. de CVU 545207 y número de registro de becario 294495 y .por financiar el presente proyecto (CONACYT No. 258747) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT (N203912-3)*
 - o *A mi tutor el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su asesoría y apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto.*
 - o *Dra. Rocío Salceda Sacanelles por las valiosas aportaciones y enseñanzas para la realización de este trabajo.*
 - o *Dr. Jaime Urrutia Facugauchi por las valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.*
 - o *Dr. Sylvia Leticia Verdugo Díaz por las valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.*
-

Agradecimiento a título personal

- ∂ A mi tutor el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por apoyar mi desarrollo profesional en todos los ámbitos.
- ∂ Al Dr. Jesús Ramírez Santos y a la Dra. Margarita Gómez Chavarín por los apoyos técnicos otorgado en la instrumentación técnica y la gestión administrativa.
- ∂ Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su soporte técnico en el área de Microscopía.
- ∂ Al Pasante Biología Víctor Hugo Olivera Rodríguez por brindar asesoría en técnicas histológicas.
- ∂ Al Dr. David Elías Viñas y al M.C. Esteban Ruiz Hernández por el diseño y la fabricación del estimulador magnético.
- ∂ A los miembros del Jurado Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, Dr. Gustavo Casas Adreu, Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz y Dra. Margarita Martínez Gómez por sus valiosas aportaciones intelectuales que enriquecieron el presente trabajo.
- ∂ Al laboratorio de Eco-fisiología Animal del Instituto de Investigaciones Sobre los Recursos Naturales (INIRENA) bajo la supervisión de las Dra. Alma Lilia Fuentes Farías y Dra. Esperanza Meléndez Herrera. Por el cuidado y alimentación de los organismos que utilizaron en este trabajo.
- ∂ A todos mis compañeros de laboratorio Juan Carlos G., Juan Carlos M, Rodrigo, Fabián, Raquel, Dannia, David, Ximena, Leonora, Cinthia, Itzli, Anita, Luis, Elizabeth y Diana por su apoyo y amistad.

Este trabajo fue realizado en el instituto de investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatoria

A mi Esposa Mense por su apoyo incondicional y por compartir éste camino conmigo.

A mis padres Irma y Paulino por su apoyo y por enseñarme el camino de la educación.

A mis hermanos Lina y Alejandro por su cariño y amistad.

A mis amigos que siempre me apoyaron

"Un científico tiene la libertad, y debe tomársela, de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de buscar cualquier evidencia, de corregir errores."

J. Robert Oppenheimer

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS.....	xi
ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS DE ANEXOS.....	xiv
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES.....	5
4. 1. Sensopercepción: Generalidades.....	5
4.2. Evidencias Conductuales de la magnetocepción.....	6
4. 3. Modelos de Magnetocepción.....	7
4.3.1. Foto-magneto transducción.....	8
4.3.2. Mecano-magneto Transducción.....	10
4.4. El órgano magnetoceptivo.....	12
4.4.1. El órgano magnetoceptivo en la tortuga marina <i>C. agassizii</i>	14
V. HIPÓTESIS.....	15
VI. OBJETIVO GENERAL.....	15
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
VIII. METODOLOGÍA GENERAL.....	17
8.1 Material Biológico.....	17
8.1.1 Preparación de Muestras Biológica.....	18
8.2 Inmunohistoquímica para Ferritina.....	19
8.3 Histoquímica para depósitos férricos: Azul de Prusia.....	20
8.4 Microscopía electrónica transmisión.....	21
IX. RESULTADOS.....	23
9.1. Inmunohistoquímica para Ferritina.....	23
9.2. Histoquímica para depósitos férricos: Azul de Prusia.....	24
9.2.1. Controles para la tinción de Azul de Prusia.....	24
9.2.2. Tinción de Prusia en ojos de <i>C. agassizii</i>	25
9.3. Microscopía electrónica.....	28
X. DISCUSIÓN.....	30
XI. CONCLUSIÓN.....	34
XII. PERSPECTIVAS.....	34

XIII. LITERATURA CITADA.	35
XIV. APÉNDICES	45
APÉNDICE 1: El Campo Magnético Terrestre.	45
APÉNDICE 2: Anatomía del Ojo de las Tortugas Marinas.	47
APÉNDICE 3: Bases Fisicoquímicas de la Técnica de Azul de Prusia	50
APÉNDICE 4: Permisos de Colecta Científica	52

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Rutas de migración construidas con base en el rastreo mediante telemetría satelital de tortugas desplazadas de sus playas de anidación bajo la influencia o no de distorsión magnética. A) Fotografía que muestra el magneto en forma de disco que fue colocado con una varilla semirrígida sobre la cabeza de la tortuga a una distancia de 3 centímetros con lo que el magneto oscilaría provocando un campo magnético aleatorio imposibilitando a la tortuga “recalibrar” su sensor magnético. B) Esquema de la ruta de navegación de tortugas sujetas a distorsión magnética (línea punteada magenta) o no sujetas a distorsión magnética (línea punteada negra). Las estrellas azules representan el sitio de liberación y el punto azul representa su playa de anidación Sazilley Beach en Mayotte Island. Modificado de Luschi et al. 2007. **6**

Figura 2. Bases de la foto magnetotransducción. La proteína Criptocromo 1A (Cry 1A) se ha propuesto como la molécula transductora de la intensidad del campo magnético, en particular las moléculas que se encuentran en la retina (**B**), asociadas a los fotorreceptores denominados conos (**C**), donde se encontrarían anclados a la membrana de los segmentos internos de los fotorreceptores a través de tensores proteínicos (**D**), se ha asociado que el fotociclo del Cry 1A estaría directamente relacionado con la inclinación del campo magnético. El estado de señalización de criptocromo es controlado por el estado de oxidación de su cofactor Flavin (FAD), el cual, existe en tres formas redox interconvertibles, FAD, FADH y FADH⁻. La forma FAD se considera inactiva (no genera señal) y se acumula en la oscuridad. La luz azul desencadena la fotoreducción del FAD para establecer un fotoequilibrio que favorece la permanencia de FADH sobre FAD o FADH⁻. El estado FADH o semiquinona corresponde al estado de señalización de la proteína. Los fotones de luz verde pueden ser absorbidos por el radical FADH y desplazar el fotoequilibrio y cambiarlo a la forma completamente reducida (FADH⁻) (**E**), que es inactiva. El paso de las formas inactivas FAD y FADH⁻ a la forma activa FADH es dependiente de una alineación antiparalela de los electrones de las formas inactivas y un residuo de triptófano en el criptocromo. Debido a esto un cambio en la inclinación del campo magnético externo puede modificar esta alineación antiparalela y por lo tanto la formación de la forma activa. Como resultado de todo ello, el organismo visualizaría sobre la escena observada “ráfagas luminosas”. Las inclinaciones relativas de las “ráfagas” dependerán de los valores de inclinación. Esquema modificado y traducido del Beckman Institute University of Illinois at Urbana Champaign **5**

Figura 3. Modelos de Mecano-magneto Transducción. En el hemisferio celular izquierdo de ambas imágenes se muestran tres modelos (a, b y c) basados en magnetita superparamagnética (SPM) y en el extremo derecho se muestra uno basado en magnetita de dominio simple (SD). Bajo una condición de campo magnético, todos los sistemas muestran una célula polarizada, en la que canales iónicos mecanosensibles cerrados, se encuentran ligados a la magnetita a través de filamentos del citoesqueleto anclados a la membrana (cm) o a la compuerta (fg) del canal iónico. Ante un cambio en la condición de intensidad de campo magnético (B), los rasgos de magnetita SPM provocan tensión en los filamentos del citoesqueleto, los cuales transferirían esta tensión a la membrana en los modelos a y c deformándola, en a esta deformación de la membrana abriría los canales iónicos, y en c la deformación en la membrana activaría la producción de un segundo mensajero (sm) que al ligarse al canal provoca la apertura del mismo, en el modelo b, la tensión sobre los filamentos del citoesqueleto abriría la compuerta dando como resultado la apertura del canal. En el sistema relacionado con la magnetita de dominio simple (b), se muestra una cadena de magnetita, donde la fuerza de torque inducida por el cambio de condición magnética, es transmitida a los filamentos del citoesqueleto dando como resultado la apertura de la compuerta. En todos los casos la despolarización celular, conduce a un potencial de acción que viajando a través del nervio aferente, que conduce a la activación neuronal en el cerebro. Modificado y traducido de Shaw et al 2015. **11**

Figura 4. Estructura rica en hierro localizado en el oído interno del pichón. A) En la parte izquierda se muestra un esquema del oído interno donde se señalan las diferentes estructuras analizadas, todas

corresponden a células ciliadas; en lagena (E), papila basilar (F), sáculo (G) y utrículo (H), y a la derecha se observan los cortes coronales. Mediante la histoquímica de Azul de Prusia. B) Esquema que muestra la posición relativa de los orgánulos (puntos azules) dentro de las células ciliadas. C) Micrografía de la lagena corroborando la presencia de los orgánulos por debajo de los estereocilios. lsc. conducto semicircular lateral, ssc. conducto semicircular superior, psc. conducto semicircular posterior, sc. Estereocilios. La barra de escala en el inserto de C representa 200nm. Modificado y traducido de Lauwers et al. 2013. **13**

Figura 5. Imágenes que corroboran la presencia de magnetita en tortuga marina *C. agassizii*. a) Imagen por resonancia magnética nuclear que muestran artefactos por susceptibilidad magnética (flechas negras), en ojos y nariz b). Espectroscopiograma obtenido mediante difracción de electrones (EDS), que muestra la presencia de oxígeno y hierro inmerso en una matriz orgánica. El análisis se realizó sobre las partículas señaladas con flechas blancas en la micrografía que se encuentra en la parte superior. c) Micrografía por microscopía electrónica de alta resolución mostrando la red cristalina de una nanopartícula de magnetita. Además se muestran en la parte superior de la imagen de difracción por rayos x, donde las distancias interplanares medidas 0.215 nm y 0.167 nm son cercanas a las esperadas en la magnetita (Fe_3O_4). **14**

Figura 6. Fotografías digitales que ilustran dos Western blot en presencia (A) y en ausencia (B) del anticuerpo primario dirigido contra ferritina humana. Se observa la banda correspondiente al peso molecular esperado para la proteína ferritina. Indicadores de Peso Molecular (PM); Ojo de *C. agassizii* (OT); Hígado de *C. agassizii* (HT); Musculo de *C. agassizii* (MT); Bazo de Ratón (BR); hígado de Ratón (HR). **22**

Figura 7. A) Esquema de un ojo (arriba) y tinción de hematoxilina-eosina (abajo) donde se observan la retina, coroides y esclerótica. B) Fotomicrografías que muestran una inmunohistoquímica para ferritina en retina (derecha) y tejido control (izquierda) (no incubado con anticuerpo primario) se observa inmunoreactividad para esta proteína en células ganglionares (G) y fotorreceptores (ph), así como en las capas nuclear externa (CNE) e interna (CNI). **23**

Figura 8. Fotomicrografías de cortes del hígado de *C. agassizii*. A) Se muestran pocas células con precipitados azules posiblemente melano-macrófagos (asteriscos blancos) y algunos hepatocitos (cabezas de flechas), el recuadro muestra magnificación de melano-macrófago en tortuga no sobre cargada con hierro. B) Muestran precipitados azules correspondientes a depósitos férricos en prácticamente todas las células hepáticas (cabezas de flechas) y en una gran cantidad de melano-macrófagos (asterisco blancos), sobrecargados con hierro. Tratados con la técnica de azul de Prusia. Magnificación 32x. **24**

Figura 9. A) Esquema del ojo que muestra el sitio en el que se realizaron los cortes histológicos. B) Fotomicrografías que muestran un corte del ojo de *C. agassizii* teñido con hematoxilina-eosina donde se observan la esclerótica, la coroides y la retina. C) Magnificación de un fragmento de retina teñido con hematoxilina-eosina. D) Magnificación de la retina teñida con Azul de Prusia. No se observan depósitos férricos. **25**

Figura 10. A) Esquema del ojo y tinción de hematoxilina-eosina que muestra la retina, la coroides y la esclerótica. B) Fotomicrografías que muestran un corte del ojo de *C. agassizii* donde se observan células con depósitos férricos en la coroides (flecha negra). C) Se observan células con depósitos férricos en su citoplasma posiblemente macrófagos (magnificación del recuadro amarillo en B). D) Se observa un segundo tipo de células con depósitos férricos que tienen la morfología de los melanocitos (magnificación de recuadro azul en la imagen en B). **26**

Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de transmisión de retina de *C. agassizii* y análisis elemental de partículas de alto peso atómico. A) Muestran partículas compuestas por elementos de peso atómico alto de aproximadamente 500 nm de longitud. B) Micrografía que muestra otro grupo de partículas con alto peso atómico de entre 10 nm y 20 nm de longitud a las cuales se les realizó espectroscopia por difracción de electrones (EDS). C) A la izquierda se muestra un espectrograma de las partículas del panel B, en este se observan los picos característicos para diferentes elementos listados en el cuadro a la derecha así como su porcentaje en la muestra. Aunque algunos picos para otros elementos se observan en el espectrograma, cuando el programa compara los picos obtenidos con el estándar de cada uno de los elementos en sus bases de datos los picos que no coinciden en su totalidad con el estándar son eliminados. El voltaje de aceleración fue de 200KV.

28

Figura 12. A) Esquema que muestra la ubicación de las neuronas del núcleo mesencéfalo del nervio trigémino (TrMe) en el cerebro de la tortuga *C. agassizii*. Fotomicrografías (20X) que muestran la inmunotinción neuronal obtenida para c-Fos en cortes coronales del mesencéfalo de *C. agassizii* sujetas (B) y no sujetas (C) a estímulos magnéticos ambientalmente relevantes (49 μ T). 32

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS DE ANEXOS.

Figura 1.1. Representación esquemática del campo geomagnético. Las líneas de flujo magnético (que se muestra a la derecha), emanan del Núcleo de hierro de la Tierra en el polo sur magnético (Sm), en el hemisferio norte (N) y viajar al polo norte magnético (Nm) en el hemisferio norte (N), a la posición del sur y el norte magnético se le denomina polaridad. Líneas de flujo magnético están más cerca justo en los polos en comparación con el ecuador magnético, (línea curva negro) que resulta en aumento de la intensidad magnética (representado por longitud de la flecha a la izquierda). El ángulo de inclinación de las líneas de flujo magnético al salir o entrar en la superficie de la Tierra varía desde 90 o -90 en los polos magnéticos a 0 en el ecuador magnético. Color blanco línea discontinua representa el ecuador geográfico. Traducido y modificado de Shaw 2015. **44**

Figura 2. 1. Anatomía general del Ojo de las tortugas marinas. Los ojos están localizados dorsal y anterolateralmente. La tapa dorsoventral está queratinizada y es móvil. La tapa secundaria también se encuentra queratinizada pero es inmóvil. (a). Las escamas palpebrales se ubican en los márgenes de la tapa ventral en *Chelonia* pero no en *Dermochelys* (b). El ojo de las tortugas marinas cuenta con tres capas una capa externa en donde localizamos la esclera y la córnea, una segunda capa intermedia donde se encuentra el iris, la coroides, y el cuerpo ciliar y Finalmente la capa más interna denominas retina. Tomado de Bartol, y Musick 2001. **46**

Figura. 2. 2. Fotomicrografía de la retina de un juvenil de tortuga Caguama (*Caretta caretta*) Abreviaciones: G= Capa ganglionar; IP= Capa plexiforme interna; IN= Capa nuclear interna; OP= Capa plexiforme externa; ON= Capa nuclear externa; PR= Capa Fotorreceptora; PE= Epitelio pigmentado. Barra de escala de 10µm. Tomado y traducido de Bartol, y Musick 2001, Morphology and Topographical organization of the retina of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*).

Figura 3. 1. Estructura de la molécula de Azul de Prusia. Los precursores de esta molécula son el ferrocianuro de potasio y el ferricianuro de potasio. **48**

Figura 3. 2. Modelos de interacción de Azul de Prusia con magnetita. Existen cuatro posibles interacciones entre el Azul de Prusia y la magnetita (a), en ellos la magnetita estaría unida al Azul de Prusia con fuerzas electrostáticas negativas (ii y iv) o positivas (i y iii). En algunos modelos (i y ii) la molécula de Azul de Prusia se uniría electrostáticamente a la magnetita mediante sus iones negativos (férricos/ferrosos) o positivos (cianuro). En otros modelos la magnetita sustituiría los iones férricos en el Azul de Prusia (iv) o el oxígeno interaccionaría con los iones férrico/ferrosos (iii) del Azul de Prusia estas últimas dos opciones son más estables. Modificado de Arun et al. 2013. **49**

I. RESUMEN.

Diversos estudios conductuales sostienen que tortugas marinas perciben la intensidad del campo magnético terrestre. Sin embargo, aún ignoramos la identidad de lo (s) órgano (s) sensorial (es) que transducen la intensidad de campo magnético en estos organismos. No obstante, se han realizado conjeturas basadas en estudios realizados en aves, mamíferos y peces. Estas sugieren que magnetorreceptores localizados en el oído, los ojos y la roseta olfatoria, respectivamente, transducen la información magnética ambiental mediante cristales de magnetita (Fe_3O_4). Si bien en tortugas marinas no se tiene certeza del órgano magnetoceptivo, nuestro grupo aportó evidencia utilizando imagenología mediante resonancia magnética nuclear que indica la presencia de artefactos de susceptibilidad magnética en los ojos de crías de la tortuga marina *Chelonia (C) agassizii*, y que los extractos oculares de éstas, contienen partículas de magnetita de dominio simple. También reportamos que las neuronas ganglionares retinales responden a cambios en la intensidad de campo magnético ambiental. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron corroborar la localización y describir la distribución ocular de los depósitos férricos, en crías de la tortuga marina *C. agassizii*, mediante la histoquímica Azul de Prusia, la inmunohistoquímica para ferritina y la microscopía electrónica de transmisión. Los resultados indican la presencia de depósitos férricos en lo que parecen ser melanomacrófagos en la capa coroidea, no así en la retina. En conclusión nuestros resultados sugieren que el ojo podría participar como órgano magnetoceptor en *C. agassizii*.

II. ABSTRACT.

Marine turtles perceive the intensity and inclination of the Earth's Magnetic Field (EMF). We are yet unsure about the identity and location of the magnetosensory organ(s) in these organisms. Nevertheless, previous studies conducted in our laboratory suggest that the eyes might transduce environmental magnetic information through a magnetite. In support of this conclusion, we have been able to map neuronal responses following magnetic stimulation along neural structures associated with the visual pathway. In this work, we then instrumented a morphological strategy aimed at identifying the putative cellular substrate of the magnetic transduction in the eye of *C. agassizii* specimens by searching for ferric deposits by combining Prussian blue histochemical staining, for ferritin rich cellular domains through immunostaining and electron microscopy. Accordingly, we found ferric deposits in cells scattered through the anterior pole of the choroid layer, not in the retina. These cells might be melano-macrophages based on the morphological features. We think that our results support that the eye could participate in magnetic sensory transduction at least in *C. agassizii*.

III. INTRODUCCIÓN.

Una extensa serie de estudios conductuales afirman que diversas especies animales, entre las que destacan las tortugas marinas (revisado en Lohmann, 2007), perciben la inclinación y/o la intensidad del campo magnético terrestre (CMT) (Lohmann y Lohmann, 1994, Wiltschko y Wiltschko, 1995, Lohmann y Lohmann, 1996; Fuentes-Farías, et. al., 2008, Lohmann y Johnsen, 2000). No obstante, las bases neurofisiológicas que subyacen a esta habilidad en la tortuga marina son desconocidas y en otras especies son aún controversiales. Sin embargo, con base en estudios llevados a cabo en aves, mamíferos y peces, se ha propuesto que magnetorreceptores localizados en el pico (Fleissner et al., 2007), los ojos (Wegner et al., 2006) y la mucosa olfatoria (Diebel et al., 2000), respectivamente, transducen la información magnética ambiental a través de cristales de magnetita (Fe_3O_4). (Diebel et al., 2000; Winklhofer et al., 2001; Mann et al., 1988; aunque revisar Treiber et. al. 2012; Edelman, 2015). En contraparte otros estudios han puesto en duda los experimentos realizados en el pico de las aves (Treiber et. al. 2012) y en la mucosa olfatoria de los peces (Edelman et. al. 2015), en ambos estudios se pone en duda los hallazgos de magnetita en ambas estructuras y la posible funcionalidad de las célula que contienen depósitos férricos como transductor de la información magnética.

No obstante, los estudios más destacados son los llevados a cabo, en la rata topo (Wegner et al., 2006), en el cual se identificó la presencia en las células epiteliales de la córnea, de cristales de magnetita; además se ha especulado que dichos cristales transducen la intensidad de campo magnético en estos animales. Al respecto, recientemente nuestro grupo aportó evidencia que indica que los ojos pudiesen fungir como magnetorreceptores primarios en las tortugas marinas (Cuiriz-Ríos, 2015; Fuentes-Farías, 2008). En particular reportamos que las neuronas ganglionares retinianas responden a cambios en la intensidad de campo magnético ambiental y que extractos de ojos contienen partículas de magnetita de dominio simple (Fuentes-Farías, 2008). No obstante, aún desconocemos la localización subcelular de dichas partículas y la identidad *in situ* de las mismas. Establecer ambas condiciones es

importante puesto que algunos teóricos presumen que los mecanismos de transducción de la información magnética dependerán de la localización subcelular de los cristales de magnetita (Kirschvink, 1992; Kirschvink, 1994; Binhi, 2006). Así, la evidencia ultraestructural podría ayudarnos a esclarecer cuál de los modelos es el más adecuado. Con base en estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo fueron corroborar la localización y describir la distribución ocular de la magnetita en el ojo de la tortuga marina *C. agassizii*.

IV. ANTECEDENTES.

4. 1. Sensopercepción: Generalidades.

En general, se acepta que para que la sensopercepción tenga lugar se requiere de al menos tres fases que involucran la adquisición, el procesamiento y la interpretación de la información sensorial que corresponda (revisado en Goldstein, 2011). La primera etapa, llevada a cabo por receptores especializados, consiste en “extraer” y transducir la información fisicoquímica contenida en el estímulo, para codificarla en señales electroquímicas que el sistema nervioso pueda “entender” y con las que pueda “trabajar”. La segunda etapa, que consiste en el filtrado, clasificación, selección, recodificación e integración de la información, es llevada a cabo de manera jerárquica y secuencial en distintos nodos o relevos sinápticos a lo largo de una vía neural específica. Generalmente, en esta vía, cada nodo contiene ensambles de neuronas, elementos vasculares y gliales que al interactuar transforman las cualidades de la información que reciben “refinándolas” antes de pasarla al siguiente relevo de forma más depurada. Finalmente, durante la tercera etapa, las operaciones de los ensambles neuronales de mayor jerarquía permiten categorizar, interpretar y darle un significado a la información recibida, lo que a su vez permite al organismo tomar decisiones y proceder de acuerdo a ellas.

Si uno pretende entender la morfo-fisiología de la magnetocepción en cualquier vertebrado, y en particular en la tortuga marina, deberá avocarse a identificar cada una de las fases del proceso magnetoceptivo y caracterizar los elementos celulares involucrados en él. Por lo cual, identificar las células responsables de transducir la información magnética constituye la meta principal de la presente propuesta.

4.2. Evidencias Conductuales de la magnetocepción.

Como se mencionó en la introducción, una variedad de estudios conductuales en diferentes grupos de especies animales tales como langostas (Lohmann et. al.

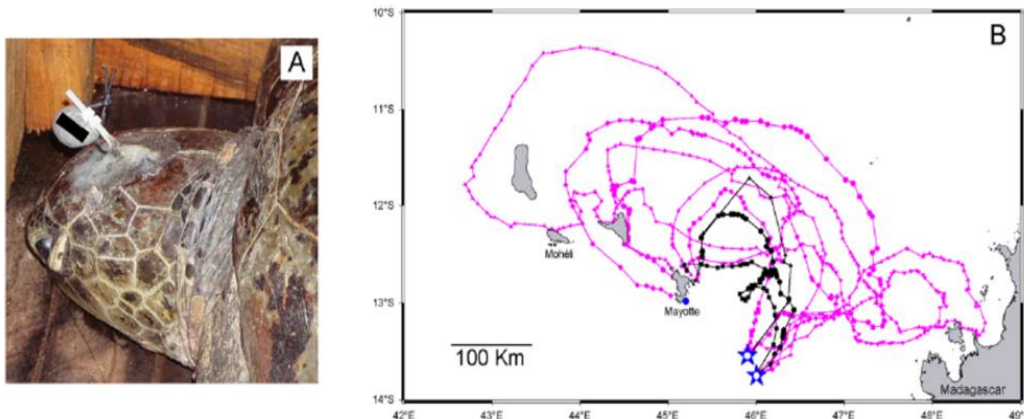


Figura 1. Rutas de migración construidas con base en el rastreo mediante telemetría satelital de tortugas desplazadas de sus playas de anidación bajo la influencia o no de distorsión magnética. A) Fotografía que muestra el magneto en forma de disco que fue colocado con una varilla semirrígida sobre la cabeza de la tortuga a una distancia de 3 centímetros con lo que el magneto oscilaría provocado un campo magnético aleatorio imposibilitando a la tortuga “recalibrar” su sensor magnético. B) Esquema de la ruta de navegación de tortugas sujetas a distorsión magnética (línea punteada magenta) o no sujetas a distorsión magnética (línea punteada negra). Las estrellas azules representan el sitio de liberación y el punto azul representa su playa de anidación Sazilley Beach en Mayotte Island. Modificado de Luschi et al. 2007.

1995), ratas topo (Kimchi y Telker, 2001) aves (Ritz et al., 2010; Ritz, 2011; Wiltschko et al., 2011), y tortugas (Lohmann 1990, 1992) perciben tres componentes del campo magnético terrestres la polaridad, la inclinación y la intensidad ver (**Apéndice 1**).

De acuerdo con ello, en particular en tortugas marinas, se ha mostrado que la colocación de imanes sobre la cabeza de hembras adultas (Figura 1) y en crías de ambos sexos conduce a la desorientación de su navegación acuática o terrestre (Irwin y Lohmann, 2002; Luschi et. al., 2007; Fuentes-Farías et. al, 2008 y 2011). También se ha documentado que la exposición de crías de tortugas marinas a campos magnéticos pulsátiles conduce a la desorientación de su nado en ausencia de señales visuales que pudiesen guiar su navegación (Irwin y Lohmann, 2002, 2003). Estas observaciones apoyan el concepto de que en las tortugas marinas en verdad existe un

sentido magnetoceptivo, si bien los estudios conductuales han mostrado que las tortugas marinas pueden percibir los campos magnéticos y probablemente decidir una ruta a partir de ellos, poco se sabe sobre el sustrato neurofisiológico que subyace a la magnetocepción en las tortugas marinas. No obstante, durante los pasados 45 años se han propuesto varias de hipótesis que tratan de explicar cómo es que los organismos pueden detectar el campo magnético terrestre pero únicamente dos han sido respaldados por evidencias experimentales: la magnetocepción basada en magnetita o mecano-magneto transducción, y la magnetocepción dependiente de luz o foto-magneto transducción.

4. 3. Modelos de Magnetocepción.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de detectar un estímulo, un receptor sensorial debe transformar la energía química o física del estímulo en un código eléctrico que al transmitirse, permite la transferencia de información al cerebro. En el caso más simple, un estímulo puede ser detectado directamente por un canal iónico (como en el caso de sensación térmica; ver Dhaka et al 2006). Se ha mostrado que la actividad del canal mecanosensible de larga conductancia (MscL) puede ser afectado directamente por los campos magnéticos de alta intensidad a través de una acción sobre los fosfolípidos de membrana (Petrov y Martinac 2007), sin embargo, las intensidades de campo requeridas tienen valores muy por encima de los campos magnéticos de la tierra. Si bien, el presente trabajo se centra en demostrar la presencia de magnetita, que apoyaría el modelo de la mecano-magneto transducción, me parece importante revisar de manera general la otra propuesta que ha sido respaldada con evidencia experimental: la foto-magneto transducción.

4.3.1. Foto-magneto transducción.

La foto-magneto transducción es un modelo que ha sido altamente estudiado principalmente en aves y anfibios, particularmente en pichones (*Columbia livia domestica*), y en el petirrojo europeo (*Erithacus rubecula*). Se ha mostrado que, estas especies se orientan magnéticamente de manera efectiva con iluminación en azul y verde, y se desorientan ante impulsos magnéticos al ser expuestos a iluminación roja y amarillo-naranja (Wiltschko y Wiltschko, 1981, 1995, 1999, 2001; Wiltschko et al., 2001). Los resultados mencionados apoyan que las aves pueden orientarse utilizando la inclinación del campo magnético, posiblemente a través de modular el spin de los electrones no apareados durante las reacciones de transferencia de éstos (Ej., reacción de óxido-reducción) que ocurren como resultado de la incidencia de luz sobre pigmentos visuales ubicados en los fotorreceptores y/o neuronas ganglionares retinianas (Solov'yov et al., 2010). Este proceso aparentemente requiere del fopigmento criptocromo 1A (Cry 1A), y de la flavina-adenina dinucleótido como aceptor (FAD)/donador (FADH) de electrones y como aceptor transitorio de electrones, donde los valores de inclinación del campo magnético terrestre influirán sobre dicha reacción (Solov'yov et al., 2010). Hipotéticamente, la aceptación o donación de electrones no pareados por/desde FAD, inducido por la incidencia de luz, conllevaría al cambio de orientación de las moléculas de criptocromo 1A (las cuales están orientadas de manera aleatoria; Lau et al., 2012) ancladas a la membrana de los discos del segmento externo de los fotorreceptores, lo que interferiría con el proceso de isomerización reversible de las opsinas al ser también activadas por los fotones (figura 2) (Solov'yov et al., 2010). Como resultado de todo ello, el organismo “visualizaría” el campo magnético como “sombras” impuestas sobre la escena observada. La ubicación relativa de la “sombra magnética” en el escenario visual dependerá de la localización relativa de los fotorreceptores afectados por el campo magnético en la retina (Ritz et al., 2000; Solov'yov et al., 2010; Deutschlander et al., 1999 para modelos alternativos).

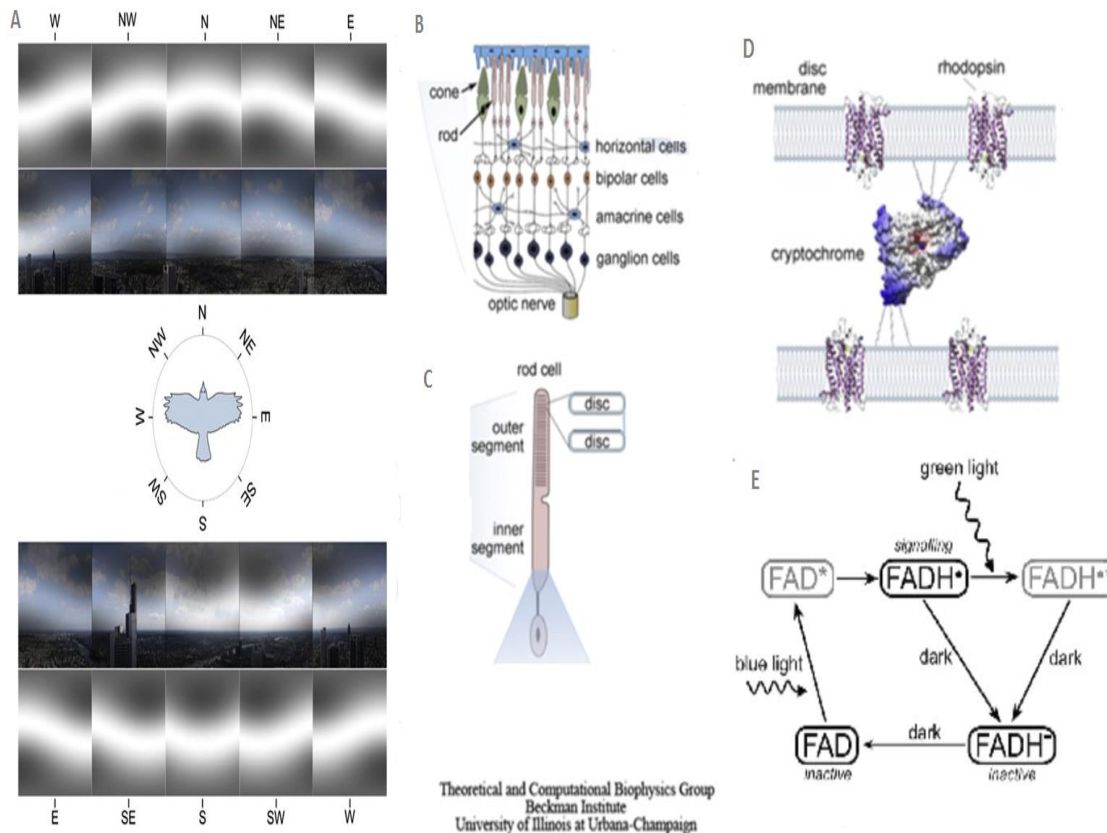


Figura 2. Bases de la foto magnetotransducción. La proteína Criptocromo 1A (Cry 1A) se ha propuesto como la molécula transductora de la intensidad del campo magnético, en particular las moléculas que se encuentran en la retina (**B**), asociadas a los fotorreceptores denominados conos (**C**), donde se encontrarían anclados a la membrana de los segmentos internos de los fotorreceptores a través de tensores proteínicos (**D**), se ha asociado que el fotociclo del Cry 1A estaría directamente relacionado con la inclinación del campo magnético. El estado de señalización de criptocromo es controlado por el estado de oxidación de su cofactor Flavin (FAD), el cual, existe en tres formas redox interconvertibles, FAD, FADH y FADH⁻. La forma FAD se considera inactiva (no genera señal) y se acumula en la oscuridad. La luz azul desencadena la fotoreducción del FAD para establecer un fotoequilibrio que favorece la permanencia de FADH sobre FAD o FADH⁻. El estado FADH o semiquinona corresponde al estado de señalización de la proteína. Los fotones de luz verde pueden ser absorbidos por el radical FADH y desplazar el fotoequilibrio y cambiarlo a la forma completamente reducida (FADH⁻) (**E**), que es inactiva. El paso de las formas inactivas FAD y FADH⁻ a la forma activa FADH es dependiente de una alineación antiparalela de los electrones de las formas inactivas y un residuo de triptófano en el criptocromo. Debido a esto un cambio en la inclinación del campo magnético externo puede modificar esta alineación antiparalela y por lo tanto la formación de la forma activa. Como resultado de todo ello, el organismo visualizaría sobre la escena observada “ráfagas luminosas”. Las inclinaciones relativas de las “ráfagas” dependerán de los valores de inclinación. Esquema modificado y traducido del Beckman Institute University de Illinois at Urbana Champaign.

4.3.2. Mecano-magneto Transducción.

Estudios realizados en algunas especies de mamíferos, aves y peces, pero sobre todo modelos teóricos, han conducido a la idea de que mecano-receptores especializados denominados magneto-receptores, transducirían la información sobre la intensidad y/o la polaridad del campo magnético ambiental (Edmonds, 1996; Kirschvink y Gould, 1981; Solov'yov y Greiner, 2007; Winklhofer y Kirschvink, 2010; Wiltchko y Wiltchko, 2013). La versión más aceptada y simple de esta concepción sugiere que los canales iónicos se abren en respuesta a las fuerzas de torque producidas por la rotación de las cadenas de cristales de magnetita de dominio simple y/o cristales superparamagnéticos, cuando estos se exponen a cambios en la intensidad del campo magnético ambiental (Ej., Davila et al., 2003; Winklhofer y Kirschvink, 2010). Se cree que las cadenas de cristales de magnetita superparamagnética estarían ubicados en el interior del citoplasma, adyacentes a la membrana de la célula (Cadiou y McNoughton, 2010). Presumiblemente, las fuerzas de torsión se transferirían mediante filamentos proteicos del citoesqueleto a la membrana, deformándola, en algunos modelos la deformación de la membrana abriría los canales iónicos, mientras que en otros la deformación de la membrana activaría la producción de un segundo mensajero que al ligarse a la subunidad del canal iónico promovería su apertura, en otras concepciones, la tensión de los filamentos del citoesqueleto abrirían la compuerta del canal dando como resultado la apertura del mismo.

En los modelos relacionados con la magnetita de dominio simple se transmitiría la tensión de las cadenas de cristales a las subunidades de los canales iónicos membranales a través de tensores proteicos tirados durante la rotación de los cristales de magnetita, similar a lo que ocurre con una aguja de brújula (Figura 3) (para una revisión más exhaustiva revisar Edmonds, 1996; Cadiou y McNoughton, 2010, Shaw et al 2015). No obstante que los modelos descritos son los más aceptados, los cristales de magnetita también podrían dispersarse en la matriz extracelular. Allí, las fuerzas de torque se ejercerían sobre la propia matriz y/o sobre la superficie de las células receptoras deformándolas y activándolas (Sonnier y Marino, 2001; Solov'yov y Greiner,

2007; Binhi y Chernavskii, 2004). En los casos comentados, en ningún momento se hace alusión a los órganos que posiblemente realizan la mecano-magnetocepción. El único autor que se atrevió a especular sobre el órgano mecano-magnetoceptivo ha sido Edmons, 1996, este autor aventuró un modelo que propone que los cristales de magnetita pudiesen estar ubicados en el interior de las gotas lipídicas en los conos. Sugirió que estos cristales pudieran, al ser expuestos a cambios en la intensidad el campo magnético; deformar estos organelos y con ello alterar la percepción del campo visual.

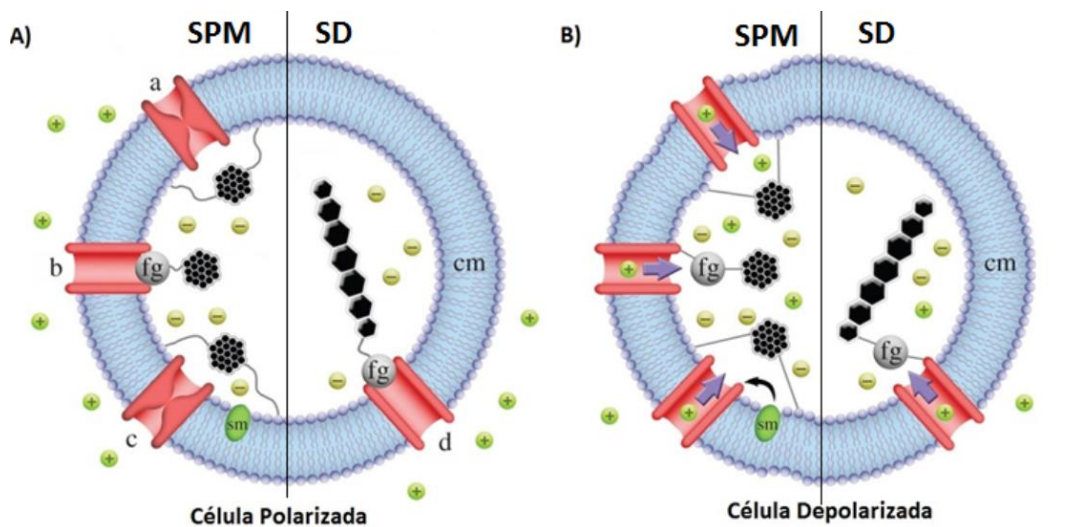


Figura 3. Modelos de Mecano-magneto Transducción. En el hemisferio celular izquierdo de ambas imágenes se muestran tres modelos (a, b y c) basados en magnetita superparamagnética (SPM) y en el extremo derecho se muestra uno basado en magnetita de dominio simple (SD). Bajo una condición de campo magnético, todos los sistemas muestran una célula polarizada, en la que canales iónicos mecanosensibles cerrados, se encuentran ligados a la magnetita a través de filamentos del citoesqueleto anclados a la membrana (cm) o a la compuerta (fg) del canal iónico. Ante un cambio en la condición de intensidad de campo magnético (B), los rasmos de magnetita SPM Provoca tensión en los filamentos del citoesqueleto, los cuales transferirían esta tensión a la membrana en los modelos a y c deformándola, en a esta deformación de la membrana abriría los canales iónicos, y en c la deformación en la membrana activaría la producción de un segundo mensajero (sm) que al ligarse al canal provoca la apertura del mismo, en el modelo b, la tensión sobre los filamentos del citoesqueleto abrirían la compuerta dando como resultado la apertura del canal. En el sistema relacionado con la magnetita de dominio simple (b), se muestra una cadena de magnetita, donde la fuerza de torque inducida por el cambio de condición magnética, es transmitida a los filamentos del citoesqueleto dando como resultado la apertura de la compuerta. En todos los casos la despolarización celular, conduce a un potencial de acción que viajando a través del nervio aferente, que conduce a la activación neuronal en el cerebro. Modificado y traducido de Shaw et al 2015.

4.4. El órgano magnetoreceptivo.

Uno de los misterios más profundos en torno a la magnetorecepción en los vertebrados tiene que ver con la identidad del (los) órgano(s) magnetoreceptor (es). Se ha postulado que el pico, la cavidad nasal, los ojos, el oído y/o el sistema vestibular en aves, la cavidad nasal en peces, la glándula pineal en reptiles y anfibios y los ojos en las ratas topo son estructuras anatómicas que agrupan los receptores especializados responsables de transducir a las variables del campo magnético ambiental. Más específicamente, estudios llevados a cabo en pichones parecían apoyar la idea de que fibras nerviosas libres relacionadas con el nervio oftálmico, una rama del nervio trigémino, distribuidas en la dermis de la base del pico tendrían la capacidad de detectar las modificaciones en la intensidad del campo magnético ambiental, debido a la presencia de cristales de magnetita en ellas (Fleissner et al., 2003; Falkenberg et al., 2010). Estas inferencias, sin embargo, han sido recientemente retadas por datos que muestran que las estructuras consideradas como terminales nerviosas corresponden en realidad a extensiones citoplásmicas de los macrófagos (Treiber et al., 2012, 2013). No obstante la solides de estos últimos datos, algunos grupos de investigación siguen sosteniendo que el nervio trigémino es capaz de detectar cambios en la intensidad del campo magnético en la trucha (Walker et al., 1997; Diebel et al., 2000, Eder et al., 2012), en el topo (Wegner et al., 2004) y en algunas aves (Mora et al., 2004; Kischkinev et al., 2013). En todos los casos, se cree que los magnetorreceptores corresponden a células epiteliales especializadas que parecen contener magnetita. No obstante lo anterior, Lauwers y colaboradores en 2013, localizaron un organelo rico en hierro, de aproximadamente 300 nm a 600 nm de longitud (Figura 4) nunca antes reportado en la capa cuticular de las células ciliadas del oído, en 6 especies de aves. Los patrones de difracción del hierro localizado en dicho orgánulo correspondieron a ferrihidratina, un mineral que presenta propiedades magnéticas débiles, y por ende no pueden torcerse o girar en presencia de campos magnéticos débiles, (Jandacka et. al., 2015) como los emitidos por el campo magnético terrestre. Por otra parte, se ha propuesto que el corpúsculo localizado en el oído interno de las aves funcionaria como un oscilador electromagnético intracelular (Jandacka et.

al. 2015). Tal oscilador generaría un potencial eléctrico adicional al normal de la célula, aunque tal fenómeno no ha sido probado experimentalmente. Este nuevo hallazgo ha generado interés en buscar mecanismos para la magnetorecepción más allá de los tradicionales.

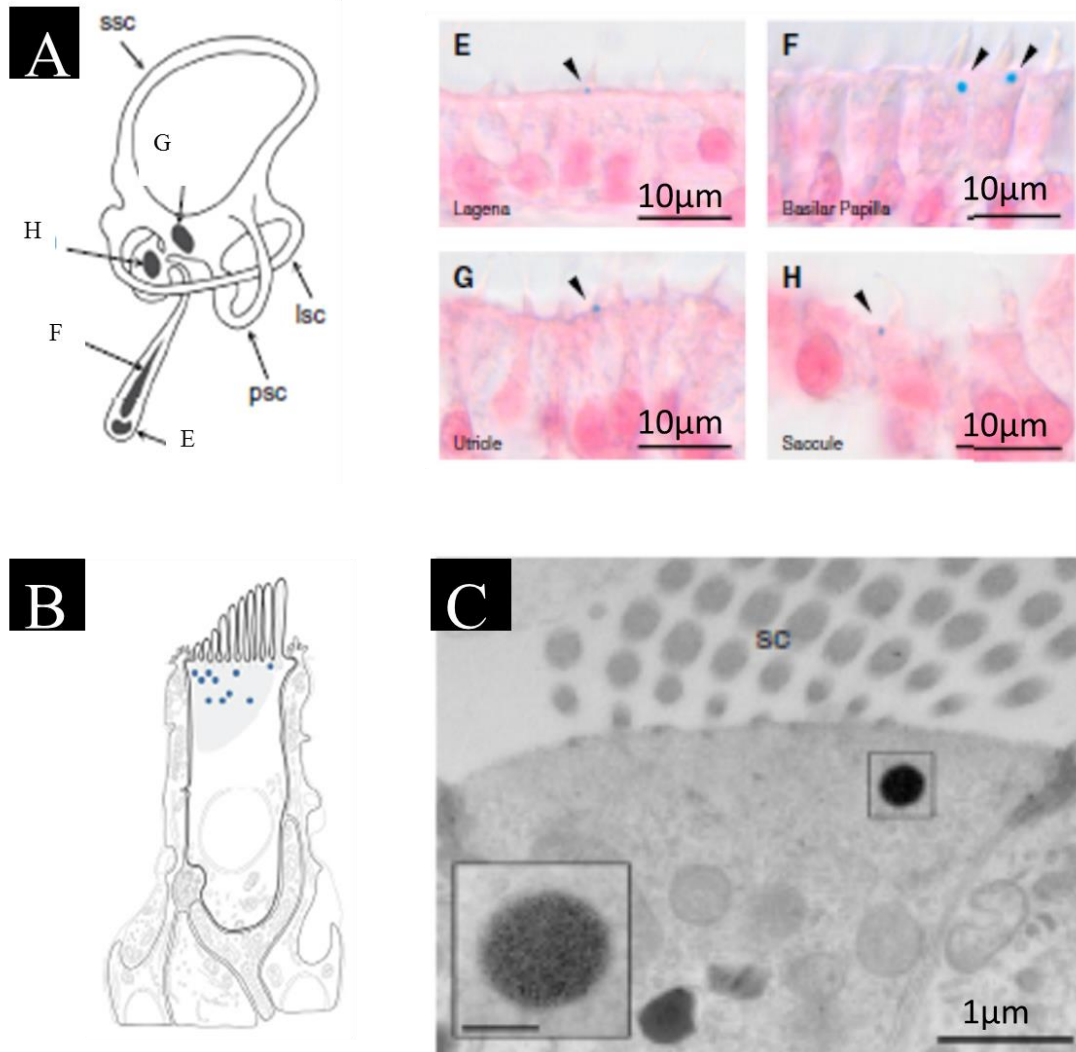


Figura 4. Estructura rica en hierro localizado en el oído interno del pichón. A) En la parte izquierda se muestra un esquema del oído interno donde se señalan las diferentes estructuras analizadas, todas corresponden a células ciliadas; en lagena (E), papila basilar (F), sáculo (G) y utrículo (H), y a la derecha se observan los cortes coronales. Mediante la histoquímica de Azul de Prusia. B) Esquema que muestra la posición relativa de los orgánulos (puntos azules) dentro de las células ciliadas. C) Micrografía de la lagena corroborando la presencia de los orgánulos por debajo de los estereocilios. lsc. conducto semicircular lateral, ssc. conducto semicircular superior, psc. conducto semicircular posterior, sc. Estereocilios. La barra de escala en el inserto de C representa 200nm. Modificado y traducido de Lauwers et al. 2013.

4.4.1. El órgano magnetoceptivo en la tortuga marina *C. agassizii*.

En la tortuga marina *C. agassizii* se han reportado artefactos de susceptibilidad magnética en los ojos de las tortugas marinas en imágenes obtenidas mediante resonancia magnética nuclear (Figura 5. a); (Cuiriz-Ríos, 2011). Además se detectó la activación de fotorreceptores y células ganglionares consecutiva a la estimulación magnética mediante la inmunotinción de C-Fos. También se aislaron cristales de magnetita de dominio simple a partir de extractos de ojos de las de dichas tortugas (Figura 5 c y d); (Fuentes-Farías et al., 2008). Adicionalmente los fotorreceptores en la tortugas marinas poseen gotas lipídicas (Liebman PA, 1971) y tanto éstos como las neuronas ganglionares expresan transportadores de fierro (Park et al., 2009). Con base en ello, en el presente trabajo, se pretende generar evidencia que apoye la idea de que cristales de magnetita ubicados en el ojo pudiesen encargarse de transducir la información magnética ambiental. Para ello, se desarrolló una estrategia que pensamos que permitirá, mediante la combinación de técnicas morfológicas, establecer la presencia de este mineral y de su ubicación celular, en el ojo de crías de la tortuga marina *C. agassizii*.

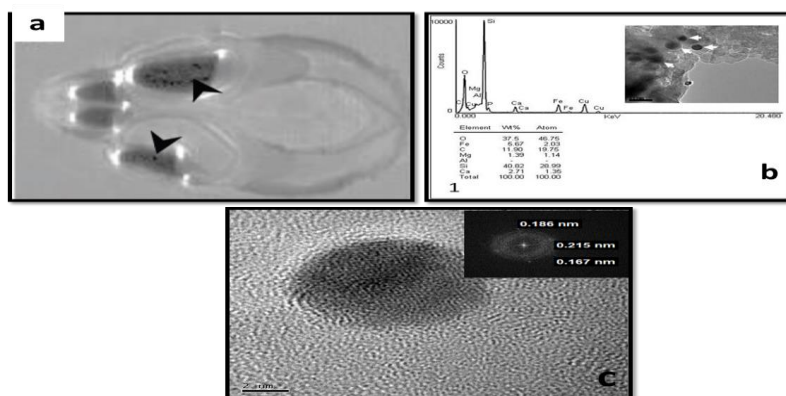


Figura 5. Imágenes que corroboran la presencia de magnetita en tortuga marina *C. agassizii*. a) Imagen por resonancia magnética nuclear que muestran artefactos por susceptibilidad magnética (flechas negras), en ojos y nariz b). Espectroscopiograma obtenido mediante difracción de electrones (EDS), que muestra la presencia de oxígeno y fierro inmerso en una matriz orgánica. El análisis se realizó sobre las partículas señaladas con flechas blancas en la micrografía que se encuentra en la parte superior. c) Micrografía por microscopía electrónica de alta resolución mostrando la red cristalina de una nanopartícula de magnetita. Además se muestran en la parte superior de la imagen de difracción por rayos x, donde las distancias interplanares medidas 0.215 nm y 0.167 nm son cercanas a las esperadas en la magnetita (Fe_3O_4).

V. HIPÓTESIS.

Hipótesis 1: La retina de la tortuga marina *Chelonia agassizii* contendrá depósitos férricos, específicamente en los fotorreceptores y las neuronas ganglionares.

Hipótesis 2: Los depósitos férricos localizados en los fotorreceptores y las neuronas ganglionares serán caracterizados como magnetita.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la presencia de depósitos férricos en forma de cristales de magnetita en la retina de la tortuga marina *C. agassizii*.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES.

-Describir la localización citológica de la proteína ferritina en retina de tortuga marina *Chelonia agassizii* mediante inmunohistoquímica.

-Localizar y caracterizar *in situ* los depósitos férricos en la retina de la tortuga marina *Chelonia agassizii* mediante tinción de Azul de Prusia y microscopía de luz.

-Describir la distribución de las células positivas a la histoquímica Azul Prusia en la retina de tortuga marina *Chelonia agassizii*.

-Describir la localización subcelular de la magnetita en retina de tortuga marina *C. agassizii* mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia por difracción de energía (EDS).

-Caracterizar la estructura de la magnetita en retina de la tortuga marina *C. agassizii* *in situ* mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución y cristalografía de rayos X.

VIII. METODOLOGÍA GENERAL.

8.1 Material Biológico.

Todos los procedimientos de manipulación y experimentación que serán aplicados en los animales fueron aprobados previamente por la SEMARNAT (Permiso SGPA/DGVS/10414, 14340, 5896).

Las crías recién eclosionadas de la tortuga *C. agassizii* fueron colectadas en la playa de Colola, en el Estado de Michoacán, México. Un total de 14 crías fueron transportadas en contenedores desde la playa hasta el laboratorio, cuidando estrictamente su alimentación, su estado de hidratación y temperatura. En el laboratorio, un primer grupo de tortugas (n=3) fue mantenido en un acuario marino bajo temperatura e iluminación controladas, un segundo grupo (n=2) fue sobrecargado con hierro con la finalidad de aumentar el hierro sistémico, mediante inyecciones intramusculares de hierro dextran 24mg/kg (Hi-dex, laboratorio hormona) una vez por semana durante 8 semanas, ambos grupos con una edad de 3 a 4 meses. Fuentes-Farías (2008) reportó en crías de *C. agassizii* que conforme la edad de los individuos aumenta, las concentraciones de materiales ferromagnéticos también aumentan, así como su histéresis magnética. Por dicha razón se dejaron crecer cuatro tortugas hasta la edad de 18 meses, y se dividieron en dos grupos, a uno de ellos se les aplicó el protocolo de sobrecarga de hierro como arriba se menciona. Un tercer grupo de tortugas (n=2) que tenían 2 meses de edad se usaron para realizar la inmunohistoquímica para ferritina. Por último, un cuarto grupo de tortugas (n=2) de 2 meses de edad se utilizaron para realizar la microscopía electrónica, el análisis elemental, mediante espectroscopia por difracción de electrones; y la cristalografía por rayos X.

8.1.1 Preparación de Muestras Biológica.

8.1.1.1 Inclusión en Parafina.

Las crías de *C. agassizii* de menos de 4 meses, fueron perfundidas intracardiamente con una solución amortiguadora de fosfatos (PB) y fijadas con una solución de paraformaldehído 4% (PFA, pH 7.4). Las tortugas de 18 meses, no pudieron ser perfundidas debido a la dificultad para abrir el plastrón antes de que la muerte ocurriera, característica esencial para la perfusión intracardiaca. En todos los casos los ojos se disecaron utilizando instrumentales con revestimiento cerámico. Antes de incluir los ojos en parafina se retiró la córnea y el cristalino (para más información sobre la anatomía ocular en las tortugas marinas revisar **Apéndice 2**), y se colocó dentro de una solución de blanqueo (5 ml de NaCl al 1.8% en agua destilada, 4 ml de H₂O₂ al 30%, 1 ml de agua destilada y una gota de NH₃), de 20 o 30 minutos (Niebner et al 2011).

Para que la parafina penetre en el ojo es necesario sustituir el agua en los tejidos por un solvente orgánico, lo cual se realizó mediante una deshidratación con etanol de forma creciente de 70%, 80% ,90% y 100%, posteriormente el ojo se transfirió en una solución que es miscible tanto en alcohol 100% como en parafina, en este caso se usó xileno, esta sustancia es aclarante por lo que comprobando la translucidez del tejido podemos cerciorarnos de la penetración de esta sustancia. Posteriormente se pasó el tejido a parafina derretida a 60 °C, se realizaron tres pases en parafina líquida, de una hora por pase, con la intención de favorecer de la sustitución del xileno por la parafina en el tejido. Tras la inclusión del tejido se vertió parafina en un molde donde también se colocó el ojo y se dejó solidificar. Las muestras solidificadas se cortaron a un grosor de 10µm para Azul de Prusia y 5 µm para la inmunohistoquímica contra ferritina, por último las rebanadas fueron colocadas en portaobjetos gelatinizados.

Antes de los procesos inmunohistoquímicos e histoquímicos, los tejido ocular y hepático, se desparafinizaron calentándolos en una horno a 60 °C hasta que la parafina se trasparente. Con la parafina aún caliente se coloca en xileno durante 15 minutos en dos ocasiones. Sustituida la parafina por el xileno en los cortes, estos se rehidrataron

con etanol en forma decreciente (100%, 90% 80%, hasta 70°) y por último se hidrataron totalmente con PB.

8.2 Inmunohistoquímica para Ferritina.

La ferritina es una proteína que almacena el hierro en la mayoría de los organismos. En la retina de ratas y salamandras, esta proteína se expresa principalmente en los segmentos interiores de los fotorreceptores, en el epitelio pigmentario, en la coroides, en la capa nuclear interna y en las células ganglionares (He et al 2007 y Hahn et al. 2004). Además se ha observado que el núcleo de hierro en la ferritina está formado por distintos óxidos de hierro principalmente ferrihidrita y magnetita. (Fernández -López 2009). La presencia de magnetita dentro de los núcleos de hierro de la ferritina nos hace pensar que podría estar relacionada con la magnetocepción o indicar dentro de la citoarquitectura de la retina dónde es más probable que exista esta.

Debido a que comercialmente no se vende anticuerpo contra ferritina de tortuga marina los experimentos se realizaron con anti-ferritina humana (abcam, ab7332 anti-conejo), para probar su especificidad se realizó inmunoblot, comprobada su efectividad se procedió a realizar la inmunohistoquímica.

Hidratados los tejidos con buffer salino después de la desparafinación, se procedió a inactivar las peróxidasas endógenas con peróxido de hidrogeno al 1% en PBT (PB+ Tween 20) 0.3% durante 30 minutos, seguido de lavados con PB, posteriormente se desenmascararon los epítopes sumergiendo el tejido en buffer de citratos, durante 30 minutos a 70 °C, finalizado el desenmascaramiento de epítopes se lavó el tejido con PB, después se colocó PBT 0.3% para permeabilizar las membranas. Por último a las laminillas que contenían los tejidos se incubaron en anticuerpo primario anti-ferritina humana (abcam, ab7332 anti-conejo) 1:1000, a 4 °C durante 40 horas.

Transcurrida la incubación del anticuerpo primario se lavó en cuatro ocasiones con PBT 0.3%; posteriormente se incubó en anticuerpo secundario de burro anti-conejo acoplado a Biotina (Merck-Millipore AP182B) en PBT (1: 2500), durante 2 horas, después se retiró el exceso de anticuerpo del tejido con lavados con PB, finalizando los lavados se colocó complejo avidina-biotinaperoxidasa (A+B) en PB, durante 90 min, a continuación se lavó con PB. Finalmente se colocó el cromógeno DAB (3, 3'-diaminobencidina), la reacción fue monitoreada hasta que la marca del anticuerpo fuera visible, evitando que esta se sobre oxide.

8.3 Histoquímica para depósitos férricos: Azul de Prusia.

Se realizaron cortes seriados a lo largo de todo el ojo. Además en cada portaobjetos se colocó un corte de hígado de una tortuga marina que fue inyectada con Hierro Dextrán, que fungió como control positivo. Se obtuvieron entre 300 a 320 portaobjetos por ojo. Con la finalidad de tener una referencia anatómica se realizó la histoquímica hematoxilina-eosina (H & E) en algunos tejidos.

La tinción de Azul de Prusia se realizó para detectar depósitos férricos. En la técnica de AP las partículas férricas libres se marcan de un color azul (Wang, et al 2005). Los cortes histológicos previamente desparafinados fueron incubados en PBT (PB más Tween 20 0.5%) durante 20 minutos, seguido del reactivo de AP que contiene hexacianoferrato de potasio y HCl al 2%, a partes iguales durante 20 min, seguido de lavados con PB, después los cortes se contratiñeron con una solución de "Nuclear Fast Red" (NFR) durante 5 min, por último se retiró el exceso de la solución NFR con dos lavados con PB. Como paso adicional el tejido se deshidrató con alcohol absoluto y se aclaró con xileno (el protocolo es una modificación del Kit abcam numero de lot. ab150674 y Treiber et al., 2011). Para más información sobre la reacción de Azul de Prusia ver **Apéndice 3**.

8.4 Microscopía electrónica transmisión.

8.4.1 Inclusión en EPON.

Se disecaron los ojos de tortugas *C. agassizii* y se fijaron por inmersión en solución de Karnovsky (paraformaldehído 2% y glutaraldehído 2% en buffer de cacodilatos de sodio) durante 48 horas, posteriormente se lavó con buffer de cacodilatos de sodio a 0.1M durante una hora, finalizando el lavado el ojo fue cordado en trozos de 1 x 1 cm. Después se lavó con agua destilada y se deshidrató con etanol de manera creciente 70%, 80%, 90% y 100% durante 15 minutos por solución. Posteriormente se sumergieron en acetonitrilo 20 min en dos ocasiones. Después se cambiaron a una solución que contenía en partes iguales acetonitrilo y EPON, este último activado previamente, durante una hora, seguida de una solución dos en uno de EPON y acetonitrilo durante una hora. Posteriormente se sumergió en EPON puro durante 48 horas. Por último se vació EPON puro y el tejido en moldes de plástico y se dejó solidificar a 60 °C.

Después con el EPON solidificado se talló, con la ayuda del micrótomo, para obtener una pirámide truncada cuadrangular para facilitar así los cortes semifinos y ultrafinos. Primeramente se realizaron cortes semifinos de 1µm para verificar que el tejido se fijó correctamente, y seleccionar la zona del corte que será analizada con el microscopio electrónico. Seleccionada la zona se realizaron los cortes ultrafinos de 100 nm de longitud, con una navaja de diamante y fueron colocados en rejillas de oro para microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras anteriormente colocadas en rejillas para microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) fueron cubiertas por una capa de carbono y observadas mediante imagen convencional de TEM, para localizar la capa celular de interés, ya que se localizó dicha capa, se cambió a modo Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) este tipo de microscopía es muy similar a la microscopía electrónica de transmisión convencional con la diferencia que en la microscopía STEM se enfoca el haz de electrones en un punto de la muestra y se realiza un barrido o escaneo, además si se le acopla un detector de ángulo alto es

posible realizar imágenes con resolución atómica donde el contraste está directamente relacionado con el número atómico (denominado contraste Z), por tanto aquellos objetos compuestos por elementos más pesados, como el hierro, dan una intensidad más elevada. En la zona ya identificada se realizó el contraste Z para localizar los objetos identificados con el contraste Z se les realizó un análisis elemental con un espectroscopia por difracción de electrones (EDS).

IX. RESULTADOS.

9.1. Inmunohistoquímica para Ferritina.

Con la intención de evaluar si el anticuerpo contra ferritina humana era efectivo contra ferritina de tortuga *C. agassizii*, se realizaron Western Blots utilizando como controles positivos muestras de bazo e hígado de ratón donde se ha reportado que el anticuerpo funciona (Naumova, et. al. 2014). En mamíferos, la ferritina es una proteína tetramérica cuyas subunidades tienen un peso molecular que está entre los 19kD y 21kD. Si bien el blot mostró un patrón de bandas abundante. En el ojo de la tortuga y en el bazo e hígado del ratón se determinó la presencia de una banda que corresponde al peso molecular reportado para las subunidades de ferritina (**Figura 6**).



Figura 6. Fotografías digitales que ilustran dos Western blot en presencia (A) y en ausencia (B) del anticuerpo primario dirigido contra ferritina humana. Se observa la banda correspondiente al peso molecular esperado para la proteína ferritina. Indicadores de Peso Molecular (PM); Ojo de *C. agassizii* (OT); Hígado de *C. agassizii* (HT); Musculo de *C. agassizii* (MT); Bazo de Ratón (BR); hígado de Ratón (HR).

Verificada la efectividad del anticuerpo contra ferritina se realizó la inmunohistoquímica en la retina de *C. agassizii*. El experimento mostró inmunoreactividad predominantemente en la capa de neuronas ganglionares, en capa nuclear externa y en la capa de fotorreceptores (Figura 7).

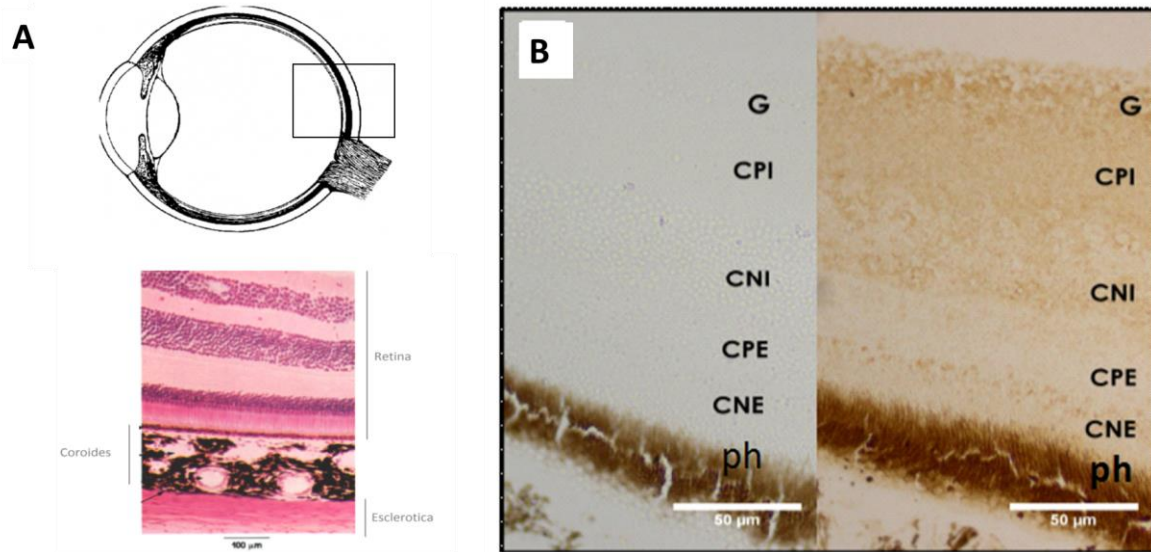


Figura 7. A) Esquema de un ojo (arriba) y tinción de hematoxilina-eosina (abajo) donde se observan la retina, coroides y esclerótica. B) Fotomicrografía que muestra una inmunohistoquímica para ferritina en retina (derecha) y tejido control (izquierda) (no incubado con anticuerpo primario) se observa inmunoreactividad para esta proteína en células ganglionares (G) y fotorreceptores (ph), así como en las capas nuclear externa (CNE) e interna (CNI).

9.2. Histoquímica para depósitos férricos: Azul de Prusia.

9.2.1. Controles para la tinción de Azul de Prusia.

Con el objeto de instrumentar y validar la técnica de Azul de Prusia, se tiñeron muestras de hígados obtenidos de tortugas que no fueron sobrecargadas con hierro e hígado de tortugas tratadas con hierro dextrán. En el tejido control se detectaron depósitos férricos sobre todo en melano-macrófagos hepáticos (Figura 8 A), no así en los hepatocitos. En contraste, tanto los melano-macrófagos como los hepatocitos mostraron abundantes depósitos férricos en los especímenes tratados con hierro dextrán (Figura 8 B).

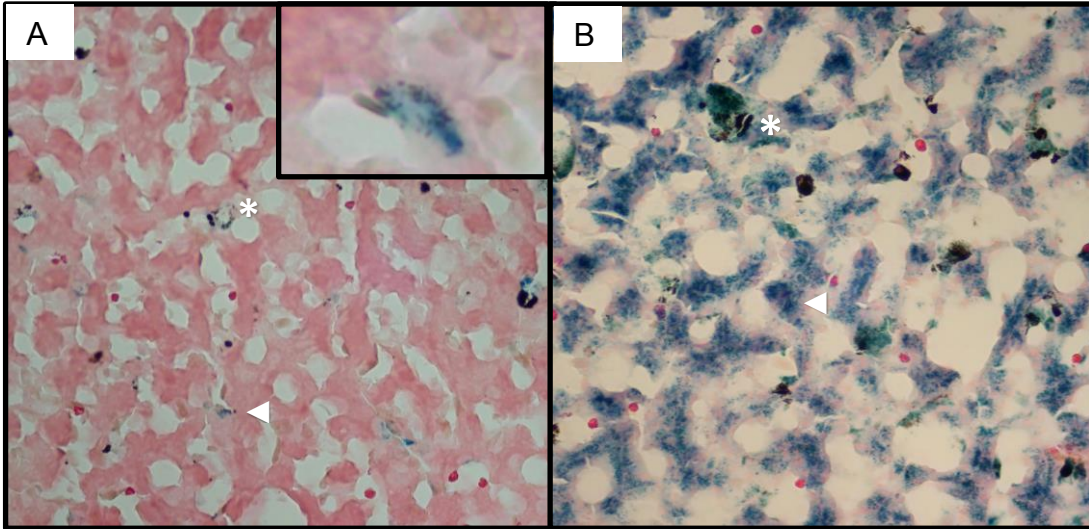


Figura 8. Fotomicrografías de cortes del hígado de *C. agassizii* A) Se muestran pocas células con precipitados azules posiblemente melano-macrófagos (asteriscos blancos) y algunos hepatocitos (cabezas de flechas), el recuadro muestra magnificación de melano-macrófago en tortuga no sobre cargada con hierro. B) Muestran precipitados azules correspondientes a depósitos férricos en prácticamente todas las células hepáticas (cabezas de flechas) y en una gran cantidad de melano-macrófagos (asterisco blancos), sobrecargados con hierro. Tratados con la técnica de azul de Prusia. Magnificación 32x.

9.2.2. Tinción de Prusia en ojos de *C. agassizii*.

Una vez instrumentada la técnica de tinción de Azul de Prusia en el hígado, se aplicó la misma a cortes seriales del ojo de la tortuga *C. agassizii*. En contra de lo predicho por el modelo, no se observaron células positivas a la tinción de Azul de Prusia en ninguna de las capas de la retina, no importando la edad, o si tuvieron sobrecarga de hierro o no (Figura 9).

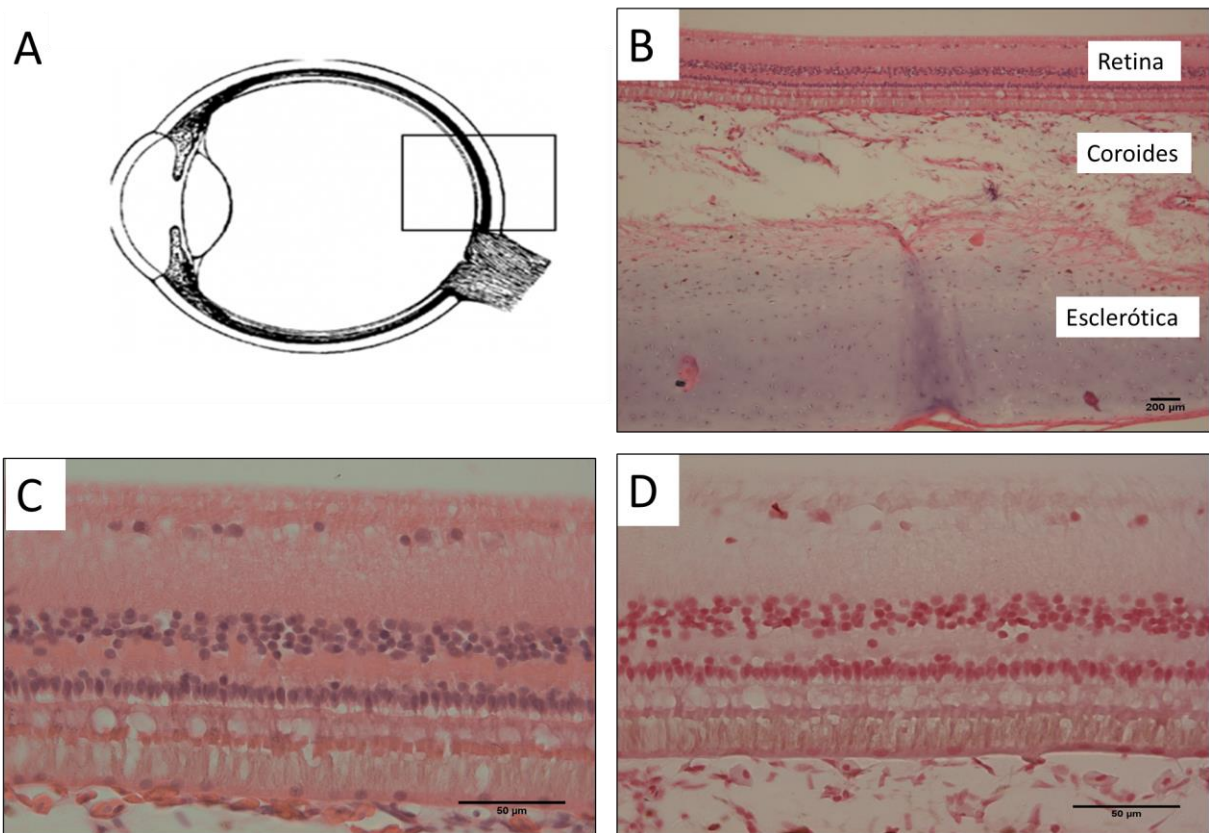


Figura 9. A) Esquema del ojo que muestra el sitio en el que se realizaron los cortes histológicos. B) Fotomicrografías que muestran un corte del ojo de *C. agassizii* teñido con hematoxilina-eosina donde se observan la esclerótica, la coroides y la retina. C) Magnificación de un fragmento de retina teñido con hematoxilina-eosina. D) Magnificación de la retina teñidas con Azul de Prusia. No se observan depósitos férricos.

No obstante ello, se observaron 371 células que contenían depósitos férricos citoplásmicos en el segmento medio de la coroides en tortugas de 18 meses, no así en las que contaban con 4 meses de edad. Por su morfología general pudimos determinar que algunas células marcadas pertenecen al linaje de melano-macrófagos, y/o melanocitos (Figura 10). A diferencia de lo que ocurrió en el hígado, el tratamiento con hierro dextrán no modificó en forma aparente la intensidad de la tinción ni la cantidad de células marcadas.

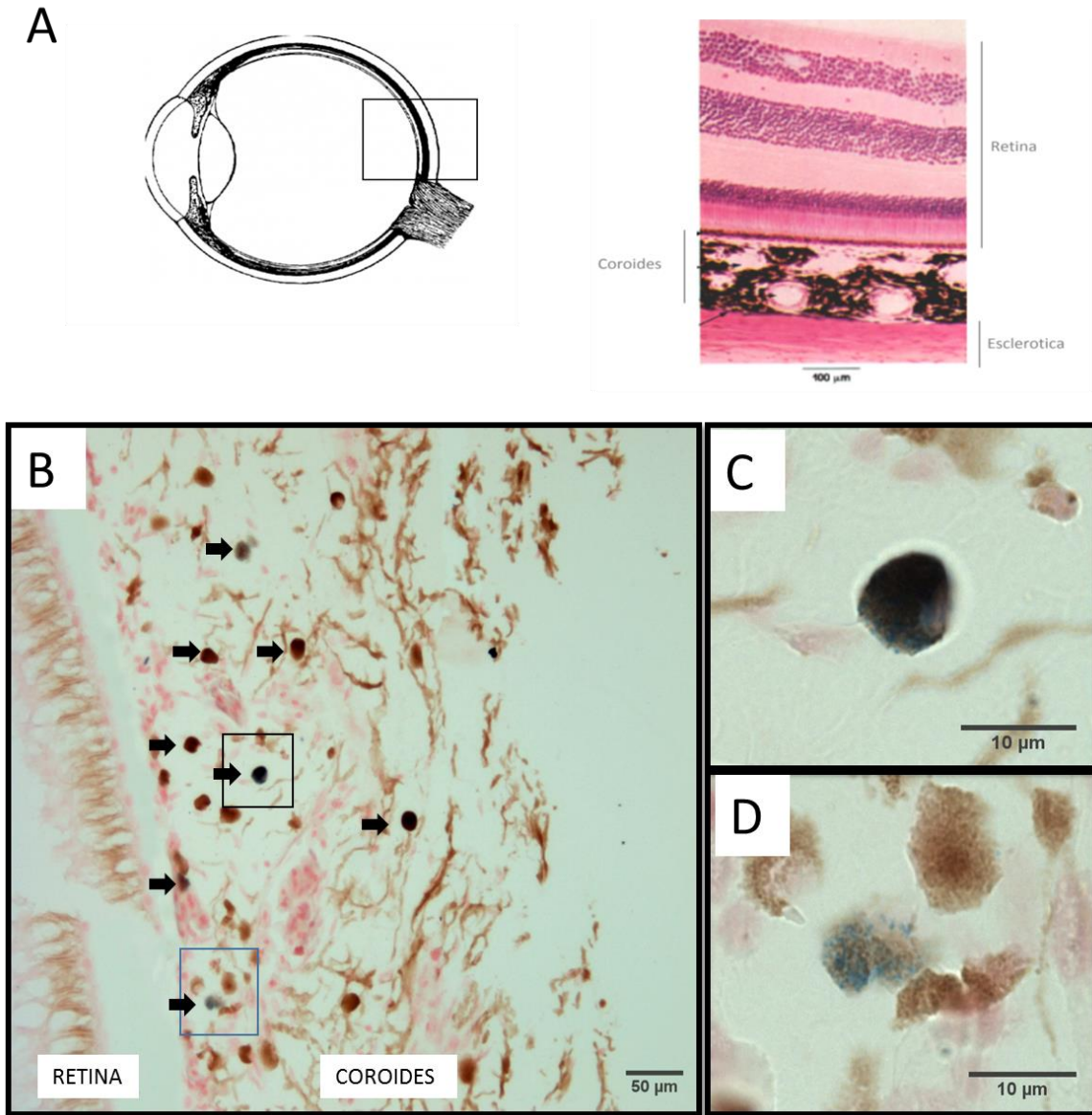


Figura 10. A) Esquema del ojo y tinción de hematoxilina-eosina que muestra la retina, la coroides y la esclerótica. B) Fotomicrografías que muestran un corte del ojo de *C. agassizii* donde se observan células con depósitos férricos en la coroides (flecha negras). C) Se observan células con depósitos férricos en su citoplasma posiblemente macrófagos (magnificación del recuadro negro en B). D) Se observa un segundo tipo de células con depósitos férricos que tienen la morfología de los melanocitos (magnificación de recuadro azul en la imagen en B).

9.3. Microscopía electrónica

En cortes de retina de *C. agassizii* incluidos en EPON se realizó la técnica de Contraste Z, que como mencionamos anteriormente nos permite identificar partículas con un alto peso atómico. En la retina de la *C. agassizii* pudimos localizar muchas partículas que tenían altos pesos moleculares en la zona de las células ganglionares (Figura 11 A y B). Al realizar el análisis elemental, con EDS, en las partículas se localizaron los picos correspondientes a los siguientes elementos: aluminio, azufre, silicio, cobre, cromo, calcio y fierro (Figura 10 C). Si bien se identificó uno de los picos correspondientes para el fierro, sin embargo, para identificar positivamente el fierro es necesario por lo menos identificar dos de los tres picos correspondientes a dicho elemento, no obstante solo uno de los picos fue localizado. Por lo tanto, hay duda de si estas partículas realmente contiene fierro, además en las partículas de alto peso atómico no se encontró oxígeno, por tanto, es poco probable que dichas partículas contengan magnetita. Para aumentar la incertidumbre de la presencia de cristales de magnetita en las partículas analizadas, al tratar de realizar la cristalografía de rayos X en dichas partículas estas se desintegraron, tal reacción es coherente en las partículas que son principalmente cristales de alguna sal; no así en las partículas compuestas con óxidos férricos.

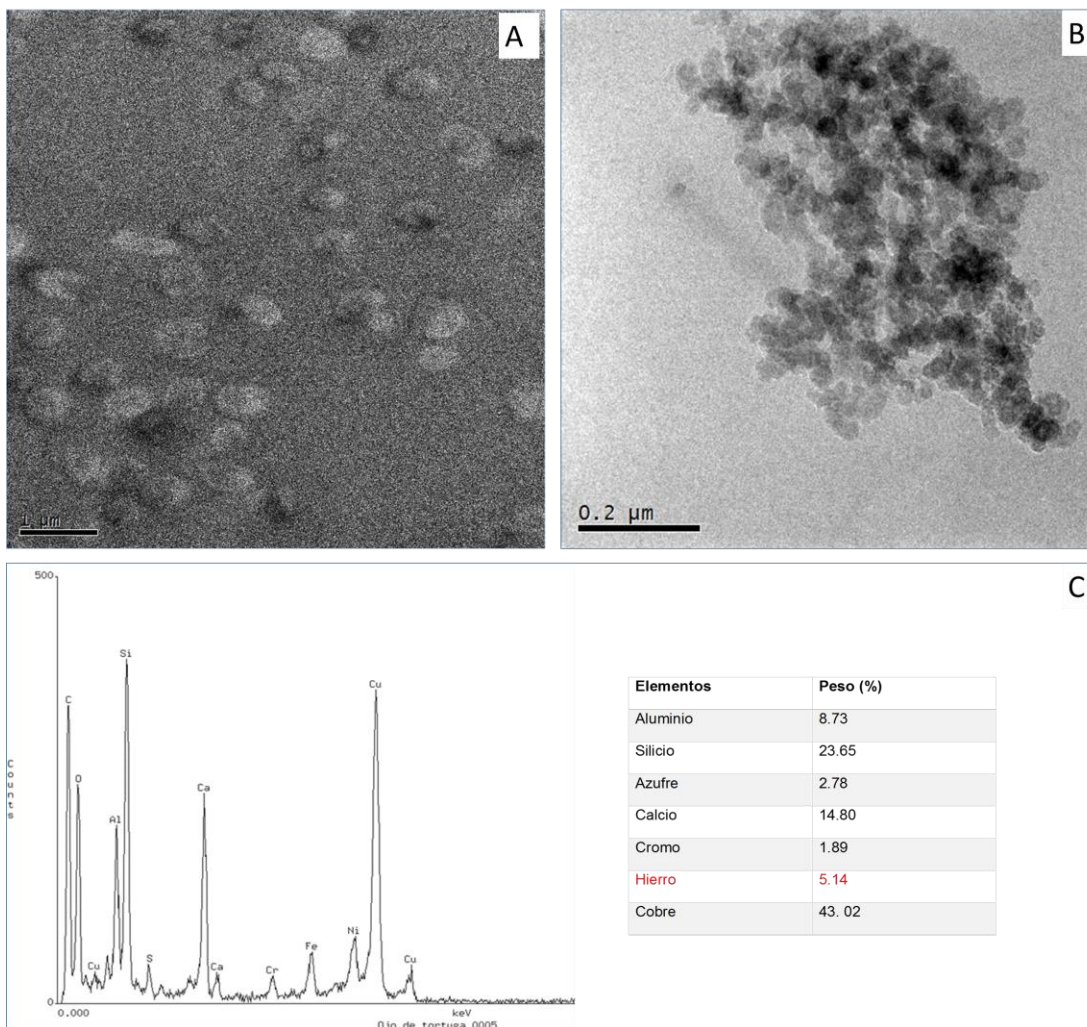


Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de transmisión de retina de *C. agassizii*. y análisis elemental de partículas de alto peso atómico. A) Muestran partículas compuestas por elementos de peso atómico alto de aproximadamente 500 nm de longitud. B) Micrografía que muestra otro grupo de partículas con alto peso atómico de entre 10 nm y 20 nm de longitud a las cuales se les realizó espectroscopia por difracción de electrones (EDS). C) A la izquierda se muestra un espectrograma de las partículas del panel B, en este se observan los picos característicos para diferentes elementos listados en el cuadro a la derecha así como su porcentaje en la muestra. Aunque algunos picos para otros elementos se observan en el espectrograma, cuando el programa compara los picos obtenidos con el estándar de cada uno de los elementos en sus bases de datos los picos que no coinciden en su totalidad con el estándar son eliminados. El voltaje de aceración fue de 200KV

X. DISCUSIÓN.

Estudios conductuales afirman que las tortugas marinas perciben la inclinación y la intensidad del campo magnético terrestre. Edmons en 1996 propuso que posiblemente las células fotorreceptoras, y específicamente los conos, sirven como magnetoreceptores primarios valiéndose de las gotas lipídicas que contienen. A pesar de esta propuesta las bases neurofisiológicas que subyacen a esta habilidad son aún motivo de controversia. Sin embargo, recientemente se generaron evidencias que sugieren que los ojos pudiesen fungir como magnetoreceptores primarios en las tortugas marinas *C. agassizii* (Fuentes-Farías, 2008). Estudios previos de nuestro laboratorio, llevados a cabo mediante el uso de imagenología por resonancia magnética nuclear, revelaron la presencia de artefactos por susceptibilidad magnética en la cámara posterior del ojo (Cuiriz-Ríos 2011). Estos artefactos parecen ser generados por partículas de magnetita, compuesto que se postula media la magnetotransducción en otros vertebrados (Kirschvink y Walker, 1985). Además mediante inmunohistoquímica contra c-fos se observó que las neuronas ganglionares retínales responden a cambios en la intensidad de campo magnético ambiental (Fuentes-Farías, 2008). En el presente trabajo se localizó la proteína ferritina en las neuronas retínales de la tortuga *C. agassizii*. Esta proteína almacena hierro en forma de magnetita cuando las concentraciones citoplásmicas del metal son bajas (Fernández-López, 2009). A pesar de lo anterior, la localización de ferritina no puede ser directamente relacionada con la presencia de magnetita, además de que su localización en el citoplasma es distante a la membrana plasmática (Elizabeth, 2003), condiciones ambas que no se ajusta al modelo de mecano-magneto transducción, el cual requiere que la magnetita se encuentre cercana a la membrana celular (Kirschvink 1994; Binhi 2006). Aun así, la localización de la ferritina nos ayuda a identificar de manera general las capas celulares implicadas en la homeostasis del hierro en la retina.

La histoquímica de Azul Prusia ha sido ampliamente utilizada para localizar depósitos férricos citoplasmático no proteínicos en una variedad de neuronas

(Schipper, 2004, Kress et. al., 2002). Idealmente si la ferritina que localizamos en la retina estuviera almacenando hierro en forma de magnetita, esperaríamos encontrar dicha proteína en las mismas células que presenten reacción positiva a Azul de Prusia. Sin embargo, no se localizaron depósitos férricos en la retina. Al respecto, es poco probable que se trate de un error metodológico debido a que los cortes de hígado sobrecargado con hierro, preparados en paralelo a los ojos, fueron positivos a dicha tinción. Adicionalmente, mediante microscopía electrónica no se logró corroborar la presencia de depósitos férricos en la retina. Las observaciones antes reportadas son contrarias a lo esperado, tomando como base los hallazgos reportados por Fuentes-Farías en el 2008, quien observó que los fotorreceptores y las neuronas ganglionares de *C. agassizii*, se activan en respuesta a estímulos magnéticos. Tomando en cuenta lo anterior, nos preguntamos ¿qué posibilidad existe de que las tortugas marinas detecten el campo magnético ambiental con un mecanismo no dependiente de magnetita?, como lo es la foto-magneto transducción. Al respecto, estudios realizados en aves, mostraron que los fotorreceptores (Mouritsen et. al., 2004; Niebner et. al., 2011, 2016) y las neuronas ganglionares (Mouritsen et. al., 2004), que expresan la proteína Cry 1a, molécula que transducen la información magnética ambiental (Wiltchko et. al., 2001), se activan en respuesta a cambios de inclinación del campo magnético terrestres. En las tortugas marinas, evidencias conductuales han mostrado que éstas pueden percibir la inclinación del campo magnético (Lohmann y Lohmann, 1994). Además se determinó la presencia de la proteína Cry 1a y de su ARN mensajero, en la retina de crías de la tortuga *C. agassizii* (Higareda-Magaña 2015).

Pese a que no logramos localizar depósitos férricos en la retina de *C. agassizii*, identificamos precipitados férricos citoplásmicos, presumiblemente magnetita, en células ubicadas en la capa coroidea. Sin embargo, aunque aún desconocemos el linaje de las mismas, presumimos que pudiesen ser melano-macrófagos por su forma, tamaño y ubicación; estas células se presume concentran fierro (Johansson 2005). Si bien los resultados presentados abren la posibilidad de que los ojos transducen la información magnética ambiental a través de estas células, en el futuro nuestros estudios deberán corroborar la estructura química *in situ* del depósito mineral y su función en el contexto de la magnetocepción.

Una hallazgo importante de nuestro trabajo fue que los depósitos ferromagnéticos en fueron observados en tortugas con edades de 18 meses. Esto es coherente con lo reportado por Fuentes-Farías (2008) quien muestra que conforme aumenta la edad de las tortugas incrementa la cantidad de material ferromagnético al menos en extractos de la cabeza. No obstante ello, a primera vista, los resultados obtenidos son difíciles de conciliar con la evidencia conductual que indica que alrededor del 60% de la crías de tortuga marina recién eclosionadas re-direccionan su conducta de desplazamiento en agua (Brothers y Lohmann, 2015) y en tierra (Fuentes-Farías et al., 2011) en respuesta a distorsiones del campo magnético local. Cabe destacar, que no todas las tortugas responden a dichas distorsiones por lo que es posible que un alto porcentaje de ellas carezcan de cristales ferromagnéticos transductores de la información magnética ambiental al momento de la eclosión. Además desconocemos si existe dimorfismo sexual en el sistema magnetoceptivo. Con respecto se ha reportado una tasa de migración mayor en las hembras adultas con respecto a los machos (Bartol y Musick, 2002). Adicionalmente estudios preliminares de nuestro grupo de investigación documentaron la presencia de genes homólogos a aquellos involucrados en la síntesis de magnetita en bacterias magnetotácticas en el ADN extraído del ojo de la tortuga *C. agassizii*, (Rodríguez-Jiménez, 2014). También se ha mostrado la activación del núcleo trigémino principal de forma consecutiva a la aplicación de estímulos magnéticos ambientales (Fig. 12; resultados no publicados). Tales hallazgos sumados a la presencia de depósitos férricos en la coroides y que ésta se encuentra inervada por el nervio trigémino, sugieren que la vía trigeminal podría participar en paralelo con la visual para, en conjunto, transducir la información magnética ambiental.

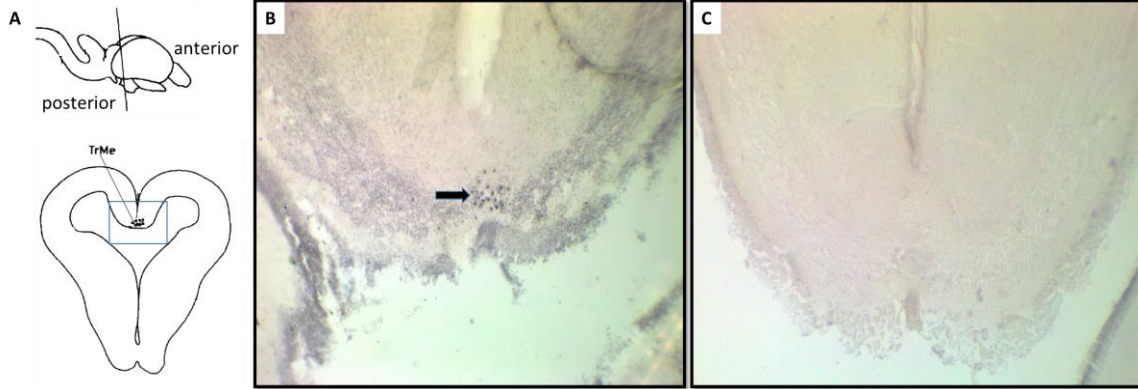


Figura 12. A) Esquema que muestra la ubicación de las neuronas del núcleo mesencéfalo del nervio trigémino (TrMe) en el cerebro de la tortuga *C. agassizii*. Fotomicrografías (20X) que muestra la inmunotinción neuronal obtenida para c-Fos en cortes coronales del mesencéfalo de *C. agassizii* sujetas (B) y no sujetas (C) a estímulos magnéticos ambientalmente relevantes (49 μ T).

XI. CONCLUSIÓN.

- Las neuronas ganglionares y los fotorreceptores, a pesar de ser inmunoreactivos a ferritina, no contienen depósitos de material ferromagnético.
- Células ubicadas en las coroides contienen depósitos de material ferromagnético.

XII. PERSPECTIVAS.

Estudios futuros deberán:

- Establecer la identidad de las células coroidales que contienen a los depósitos férricos.
- Caracterizar la estructura molecular y fisicoquímica de los depósitos ferromagnéticos *in situ*.
- Documentar la participación de los elementos celulares y moleculares anteriormente mencionados en la transducción magnetoceptiva mediante ensayos funcionales.

XIII. LITERATURA CITADA.

- Ali, M. A., & M. A. Klyne. (1985). Vision in vertebrates. Plenum Press, New York.
- Arun, T., Prakash, K., Kuppusamy, R., & Joseyphus, R. J. (2013). Magnetic properties of Prussian blue modified Fe³O₄ nanocubes. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 74(12), 1761-1768.
- Bartol, S. M., & Musick, J. A. (2001). Morphology and topographical organization of the retina of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Copeia*, 2001(3), 718-725.
- Bartol, S. M., & Musick, J. A. (2002). 3 Sensory Biology of Sea Turtles. The biology of sea turtles, 2, 79.
- Bartol, S. M., Musick, J. A., & Lenhardt, M. L. (1999). Auditory evoked potentials of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Copeia*, 836-840.
- Binhi, V. N., & Chernavskii, D. S. (2005). Stochastic dynamics of magnetosomes in cytoskeleton. EPL (Europhysics Letters), 70(6), 850.
- Bloxham, J., Gubbins, D., & Jackson, A. (1989). Geomagnetic secular variation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 329(1606), 415-502.
- Brothers, J. R. & K. J. Lohmann. (2015). Evidence for geomagnetic imprinting and magnetic navigation in the natal homing of sea turtles. *Current Biology*. 25: 392-396.
- Cadiou, H., & McNaughton, P. A. (2010). Avian magnetite-based magnetoreception: a physiologist's perspective. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl 2), S193-S205.
- Copenhaver, W. M. (1964). Bailey's textbook of histology. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.

- Cuiriz-Ríos, Z. (2011). Ubicación de sitios con presencia de magnetita en elementos cefálicos de *Chelonia agassizii*, mediante imágenes por resonancia magnética nuclear de alta resolución. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Davila, A. F., Fleissner, G., Winklhofer, M., & Petersen, N. (2003). A new model for a magnetoreceptor in homing pigeons based on interacting clusters of superparamagnetic magnetite. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 28(16), 647-652.
- Deutschlander, M. E., Phillips, J. B., & Borland, S. C. (1999). The case for light-dependent magnetic orientation in animals. *Journal of Experimental Biology*, 202(8), 891-908.
- Dhaka, A., Viswanath, V., & Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 135-161.
- Diebel et al (2000) Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406: 299-302.
- Edelman, N. B., Fritz, T., Nimpf, S., Pichler, P., Lauwers, M., Hickman, R. W., Papadaki-Anastasopoulou A., Ushakova L., Heuser T., Resch G. P., Saunders M & Keays, D. A. (2015). No evidence for intracellular magnetite in putative vertebrate magnetoreceptors identified by magnetic screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 262-267.
- Eder, S. H., Cadiou, H., Muhamad, A., McNaughton, P. A., Kirschvink, J. L., & Winklhofer, M. (2012). Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(30), 12022-12027.
- Edmonds, D. T. (1996). A sensitive optically detected magnetic compass for animals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1368), 295-298.

- Elizabeth CT (2003). Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr.* 133:1549-1553.
- Falkenberg, G., Fleissner, G., Schuchardt, K., Kuehbacher, M., Thalau, P., Mouritsen, H., Heyers D., Wellenreuther G. & Fleissner, G. (2010). Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. *PLoS One*, 5(2), e9231-e9231.
- Fernández López, María Belén, (2009), Ferritinas naturales y sintéticas. Aplicaciones nanobiomédicas. Tesis Doctoral. Universidad de granada.
- Fleissner, G., Holtkamp-Rötzler, E., Hanzlik, M., Winklhofer, M., Fleissner, G., Petersen, N., & Wiltshko, W. (2003). Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *Journal of Comparative Neurology*, 458(4), 350-360.
- Fleissner, G., Stahl, B., Thalau, P., Falkenberg, G., & Fleissner, G. (2007). A novel concept of Fe-mineral-based magnetoreception: histological and physicochemical data from the upper beak of homing pigeons. *Naturwissenschaften*, 94(8), 631-642.
- Fuentes-Farías, A. L. (2008), Magnetorrecepción en la tortuga negra *Chelonia agassizii* del área de reserva Colola-Maruata, Michoacán, México. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fuentes-Farías, A. L., Gutiérrez-Ospina, G., Herrera, E. M., Camarena-Ramírez, V., Ochoa-Tovar, G., Mendoza-Torreblanca, J., Báez-Saldaña A., Martínez-Méndez R., Urrutia-Fucugauchi J & Zepeda, M. L. G. (2011). Marine turtle hatchlings use multiple sensory cues to orient their crawling towards the sea: biological and conservation policy implications. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2(02), 47.
- Goldstein (2011) *Sensación y Percepción*. Cengage Learning Editores. Octava edición, México.

- Granda, A. M. (1979). Eyes and their sensitivity to light of differing wavelengths, p. 247-266. In: Turtles: perspectives and research. M. Harless and H. Morlock (eds.). John Wiley and Sons, New York.
- Hahn, P., Dentchev, T., Qian, Y., Rouault, T., Harris, Z. L., & Dunaief, J. L. (2004). Immunolocalization and regulation of iron handling proteins ferritin and ferroportin in the retina. *Mol Vis*, 10, 598-607.
- He, X., Hahn, P., Iacovelli, J., Wong, R., King, C., Bhisitkul, R., Massaro-Giordano, M. & Dunaief, J. L. (2007). Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Progress in retinal and eye research*, 26(6), 649-673.
- Higareda-Magaña V. (2015) Identificación del Criptocromo 1A en la retina de la tortuga *Chelonia agassizii* Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Irwin, W. P., & Lohmann, K. J. (2002). Magnet-induced disorientation in hatchling loggerhead sea turtles. *Journal of experimental biology*, 206(3), 497-501.
- Irwin, W. P., Horner, A. J., & Lohmann, K. J. (2003). Magnetic field distortions produced by protective cages around sea turtle nests: unintended consequences for orientation and navigation? *Biological Conservation*, 118(1), 117-120.
- Jandacka, P., Burda, H., & Pistora, J. (2015). Magnetically induced behaviour of ferritin corpuscles in avian ears: can cuticulosomes function as magnetosomes? *Journal of The Royal Society Interface*, 12(102), 20141087.
- Kimchi, T., & Terkel, J. (2001). Magnetic compass orientation in the blind mole rat *Spalax Ehrenberg*. *Journal of Experimental Biology*, 204(4), 751-758.
- Kirschvink, J. L. (1994). Rock magnetism linked to human brain magnetite. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 75(15), 178-179.

- Kirschvink, J. L., & Gould, J. L. (1981). Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Biosystems*, 13(3), 181-201.
- Kirschvink, J. L., & Walker, M. M. (1985). Particle-size considerations for magnetite-based magnetoreceptors. In *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms* (pp. 243-254). Springer US.
- Kirschvink, J. L., Kobayashi-Kirschvink, A., & Woodford, B. J. (1992). Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7683-7687.
- Kischkinev D., Chernetsov N., Heyers D., & Mouritsen H. 2013. Migratory reed warblers need intact trigeminal nerves to correct for a 1,000 km eastward displacement. *PLoS ONE*, Vol.8: 65847.
- Kress, G. J., Dineley, K. E., & Reynolds, I. J. (2002). The relationship between intracellular free iron and cell injury in cultured neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience*, 22(14), 5848-5855.
- Lauwers, M., Pichler, P., Edelman, N. B., Resch, G. P., Ushakova, L., Salzer, M. C., Heyers D., Saunders M., Shaw J. & Keays, D. A. (2013). An iron-rich organelle in the cuticular plate of avian hair cells. *Current Biology*, 23(10), 924-929.
- Liebman PA, (1971); Microspectrophotometric measurements of visual pigments in two species of turtle, *Pseudemys scripta* and *Chelonia mydas*. *Vision Research* 11(2):105-114).
- Lohmann, K. J. (1992). How sea turtles navigate. *Scientific American*. 266(1): 100-106.
- Lohmann, K. J. (2007). Sea turtles: navigating with magnetism. *Current Biology* 17(3): R102-R104.
- Lohmann, K. J., & C. M. F. Lohmann. (1996). Detection of magnetic field intensity by sea turtles. *Nature*. 380: 59-61.

- Lohmann, K. J., & C. M. F. Lohmann. (2003). Orientation mechanisms of hatchling loggerheads. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. A. B. Bolten and B. E. Witherington), pp. 44-62. Smithsonian Books: Washington.
- Lohmann, K. J., & Johnsen, S. (2000). The neurobiology of magnetoreception in vertebrate animals. *Trends in neurosciences*, 23(4), 153-159.
- Lohmann, K. J., Pentcheff, N. D., Nevitt, G. A., Stetten, G., Zimmer-Faust, R. K., Jarrard, H. E., & L. C. Boles. (1995). Magnetic orientation of spiny lobsters in the ocean: experiments with undersea coil systems. *Journal of Experimental Biology*. 198: 2041-2048.
- Lohmann, K. J., Salmon, M., & Wyneken, J. (1990). Functional autonomy of land and sea orientation systems in sea turtle hatchlings. *Biological Bulletin*, 214-218.
- Lohmann, K., & Lohmann, C. (1994). Acquisition of magnetic directional preference in hatchling loggerhead sea turtles. *The Journal of experimental biology*, 190(1), 1-8.
- Luschi, P., Benhamou, S., Girard, C., Ciccione, S., Roos, D., Sudre, J., & Benvenuti, S. (2007). Marine turtles use geomagnetic cues during open-sea homing. *Current Biology*, 17(2), 126-133.
- Mann, S., Sparks, N. H., Walker, M. M., & Kirschvink, J. L. (1988). Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *Journal of Experimental Biology*, 140(1), 35-49.
- Merrill, Ronald T., McElhinny, Michael W., & McFadden, Phillip L. (1996). *The magnetic field of the earth: paleomagnetism, the core, and the deep mantle*. Academic Press. ISBN 978-0-12-491246-5.
- Mora, C. V., Davison, M., Wild, J. M., & Walker, M. M. (2004). Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature* 432(7016), 508-511.

- Mouritsen, H., Janssen-Bienhold, U., Liedvogel, M., Feenders, G., Stalleicken, J., Dirks, P., & Weiler, R. (2004). Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14294-14299.
- Naumova, A. V., Balu, N., Yarnykh, V. L., Reinecke, H., Murry, C. E., & Yuan, C. (2014). Magnetic Resonance Imaging Tracking of Graft Survival in the Infarcted Heart Iron Oxide Particles Versus Ferritin Overexpression Approach. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 19(4), 358-367.
- Nießner, C., Denzau, S., Gross, J. C., Peichl, L., Bischof, H. J., Fleissner, G., Wiltshcko, W & Wiltshcko, R. (2011). Avian ultraviolet/violet cones identified as probable magnetoreceptors. *PLoS One*, 6(5), e20091.
- Nießner, C., Denzau, S., Malkemper, E. P., Gross, J. C., Burda, H., Winklhofer, M., & Peichl, L. (2016). Cryptochrome 1 in Retinal Cone Photoreceptors Suggests a Novel Functional Role in Mammals. *Scientific reports*, 6.
- Park S. W., Lee H. N., Sim K., Cho I & Cho S. (2009). The expression of transferrin binding protein in the turtle nervous system. *Arch. Histol cytol* 72(1). 65-72.
- Petrov, E., & Martinac, B. (2007). Modulation of channel activity and gadolinium block of MscL by static magnetic fields. *European Biophysics Journal*, 36(2), 95-105.
- Ritz, T. (2011). Quantum effects in biology: bird navigation. *Procedia Chemistry*, 3(1), 262-275.
- Ritz, T., Adem, S., & Schulten, K. (2000). A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophysical journal*, 78(2), 707-718.

- Ritz, T., Ahmad, M., Mouritsen, H., Wiltschko, R., & Wiltschko, W. (2010). Photoreceptor-based magnetoreception: optimal design of receptor molecules, cells, and neuronal processing. *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090456.
- Rodríguez-Jiménez, M. G. (2014). Identificación de genes asociados con la síntesis de magnetita en la Tortuga negra *Chelonia agassizii*.
- Roschztardt, H., Conéjéro, G., Curie, C., & Mari, S. (2009). Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant physiology*, 151(3), 1329-1338.
- Schipper, H. M. (2004). Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1995-2011.
- Shaw, J., Boyd, A., House, M., Woodward, R., Mathes, F., Cowin, G., & Baer, B. (2015). Magnetic particle-mediated magnetoreception. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(110), 20150499.
- Skiles, D. D. (1985). The geomagnetic field its nature, history, and biological relevance. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* (pp. 43-102). Springer US.
- Solov'yov, I. A., & Greiner, W. (2007). Theoretical analysis of an iron mineral-based magnetoreceptor model in birds. *Biophysical journal*, 93(5), 1493-1509.
- Solov'yov, I. A., Mouritsen, H., & Schulten, K. (2010). Acuity of a cryptochrome and vision-based magnetoreception system in birds. *Biophysical journal*, 99(1), 40-49.
- Sonnier, H., & Marino, A. A. (2001). Sensory transduction as a proposed model for biological detection of electromagnetic fields. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 20(2), 153-175.
- Treiber, C. D., Salzer, M. C., Riegler, J., Edelman, N., Sugar, C., Breuss M., Pichler p., Cadiou H., Saunders m., Lythgoe M., Shawm J. &Keays, D. A. (2012).

Clusters of iron-rich cells in the upper beak of pigeons are macrophages not magnetosensitive neurons. *Nature* 484, 367–370.

- Treiber, C. D., Salzer, M., Breuss, M., Ushakova, L., Lauwers, M., Edelman, N., & Keays, D. A. (2013). High resolution anatomical mapping confirms the absence of a magnetic sense system in the rostral upper beak of pigeons. *Communicative & integrative biology*, 6(4), e24859.
- Walker, M. M., Diebel, C. E., Haugh, C. V., Pankhurst, P. M., Montgomery, J. C., & Green, C. R. (1997). Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*, 390(6658), 371-376.
- Walls, G. L. (1942). The vertebrate eye and its adaptive radiation. Cranbook Institute of Science, Bloom- field Hills, MI.
- Wang, N., Butler, J. P., & Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111), 1124-1127.
- Wegner, R. E., Begall, S., & Burda, H. (2006). Magnetic compass in the cornea: local anaesthesia impairs orientation in a mammal. *Journal of Experimental Biology*, 209(23), 4747-4750.
- Willans, M. J., Wasylishen, R. E., & McDonald, R. (2009). Polymorphism of potassium ferrocyanide trihydrate as studied by solid-state multinuclear NMR spectroscopy and X-ray diffraction. *Inorganic chemistry*, 48(10), 4342-4353.
- Wiltschko, R., & Wiltschko, W. (2013). The magnetite-based receptors in the beak of birds and their role in avian navigation. *Journal of Comparative Physiology A*, 199(2), 89-98.
- Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (1981). Disorientation of inexperienced young pigeons after transportation in total darkness.
- Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (1995). Migratory orientation of European robins is affected by the wavelength of light as well as by a magnetic pulse. *Journal of Comparative Physiology A*, 177(3), 363-369.

- Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (1999). The effect of yellow and blue light on magnetic compass orientation in European robins, *Erithacus rubecula*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184(3), 295-299.
- Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (2001). Light-dependent magnetoreception in birds: the behaviour of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths and intensities. *Journal of Experimental Biology*, 204(19), 3295-3302.
- Wiltschko, W., Gesson, M., & Wiltschko, R. (2001). Magnetic compass orientation of European robins under 565 nm green light. *Naturwissenschaften*, 88(9), 387-390.
- Wiltschko, W., Wiltschko, R., & Ritz, T. (2011). The mechanism of the avian magnetic compass. *Procedia Chemistry*, 3(1), 276-284.
- Winklhofer, M., & Kirschvink, J. L. (2010). A quantitative assessment of torque-transducer models for magnetoreception. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl 2), S273-S289.
- Winklhofer, M., Holtkamp-Rötzler, E., Hanzlik, M., Fleissner, G., & Petersen, N. (2001). Clusters of superparamagnetic magnetite particles in the upper-beak skin of homing pigeons evidence of a magnetoreceptor? *European Journal of Mineralogy*, 13(4), 659-669.

XIV. APÉNDICES

APÉNDICE 1: El Campo Magnético Terrestre.

El campo magnético terrestre (CMT) es un dipolo magnético más o menos alineado con el eje de rotación de la Tierra (Skiles 1985). Se origina muy probablemente, en la parte más interior de la tierra, que está compuesto principalmente por hierro fluido altamente conductivo (Bloxham y Gubbins 1989). El CMT se genera al formar una línea de corriente en el interior del núcleo de hierro (*Merrill et al 1996*).

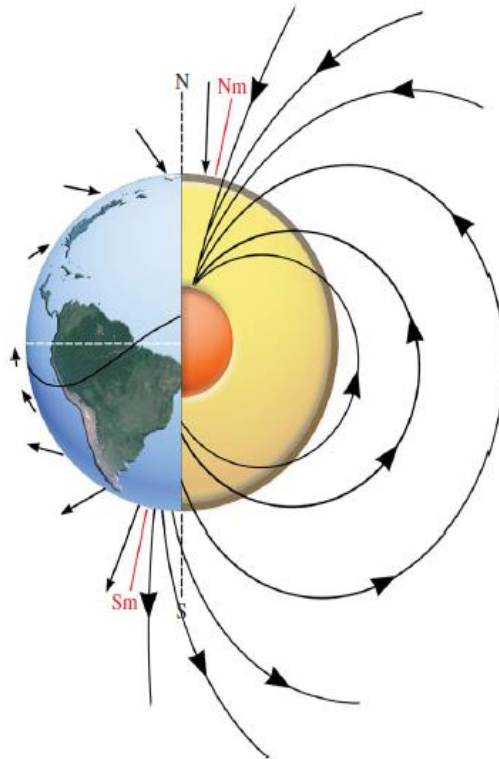


Figura 1.1. Representación esquemática del campo geomagnético. Las líneas de flujo magnético (que se muestra a la derecha), emanan del Núcleo de hierro de la Tierra en el polo sur magnético (Sm), en el hemisferio norte (N) y viajar al polo norte magnético (Nm) en el hemisferio norte (N), a la posición del sur y el norte magnético se le denomina *polaridad*. Líneas de flujo magnético están más cerca justo en los polos en comparación con el ecuador magnético, (línea curva negro) que resulta en aumento de la *intensidad* magnética (representado por longitud de la flecha a la izquierda). El ángulo de *inclinación* de las líneas de flujo magnético al salir o entrar en la superficie de la Tierra varía desde 90 o -90 en los polos magnéticos a 0 en el ecuador magnético. Color blanco línea discontinua representa el ecuador geográfico. Traducido y modificado de Shaw 2015.

En general el CMT puede ser representado por un vector tridimensional. Habitualmente, se puede medir con una brújula, el CMT consta de dos componentes principales denominados *Intensidad* e *inclinación*. La *Intensidad* del campo geomagnético, se interpreta como la fuerza ejercida sobre la brújula y esta varía entre los 68 μT , en los polos magnéticos, y 23 μT , alrededor del ecuador magnético. Debido a los cambios en los patrones de flujo no estacionario, los polos están derivando en varias décimas de grado por año (variación secular) (Skiles 1985). El segundo componente es *la inclinación* la cual se define como el ángulo en el que apunta el campo magnético con respecto al horizonte y este puede variar entre los -90° (cuando apunta totalmente hacia arriba) y 90° (cuando apunta totalmente hacia abajo). El primero corresponde al norte magnético y el segundo al sur magnético, como es de esperarse el 0° se encuentra en el ecuador. (Figura 1). (Wilstchko and Wilstchko, 2013). Habitualmente, en la magneto recepción se ha sugerido un mapa bi-coordenado que funcionaria por un lado por la inclinación y por otro con la intensidad o la polaridad. ¿Qué es *la polaridad*?, simplemente es donde está el norte y donde está el sur magnético.

El campo magnético de la Tierra ofrece un marco de referencia relativamente estable, global y penetrante, que los animales pueden explotar para orientarse en recorridos cortos y largos.

APÉNDICE 2: Anatomía del Ojo de las Tortugas Marinas.

Los ojos de la tortuga son redondos y se encuentra protegido por la una tapa ventral y dorsal, la tapa ventral se encuentra continua a la conjuntiva la cual forma la superficie interna. La membrana nictitante en la esquina ventral y anterior del ojo también se encuentra junto a la conjuntiva. (Figura. 1)

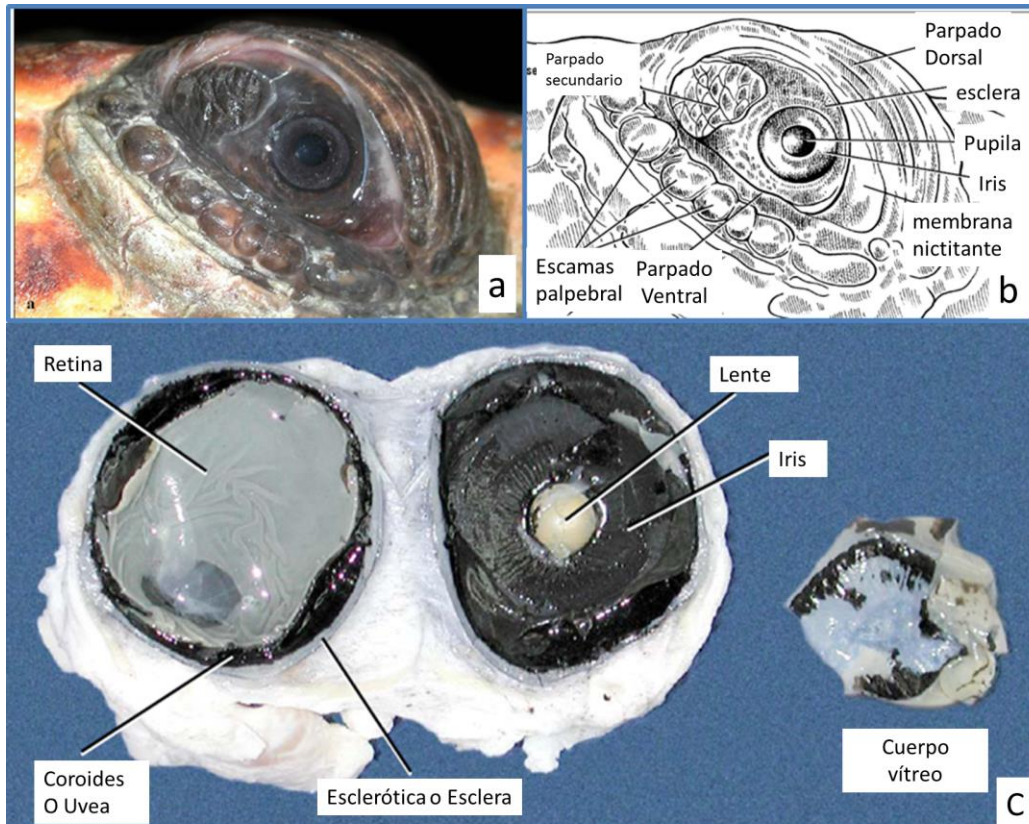


Figura 2. 1. Anatomía general del Ojo de las tortugas marinas. Los ojos están localizados dorsal y anterolateralmente. La tapa dorsoventral está queratinizada y es móvil. La tapa secundaria también se encuentra queratinizada pero es inmóvil. (a). Las escamas palpebrales se ubican en los márgenes de la tapa ventral en *Chelonia* pero no en *Dermochelys* (b). El ojo de las tortugas marinas cuenta con tres capas una capa externa en donde localizamos la esclera y la córnea, una segunda capa intermedia donde se encuentra el iris, la coroides, y el cuerpo ciliar y Finalmente la capa más interna denominada retina. Tomado de Bartol, y Musick 2001.

El ojo de los vertebrados está organizado en tres capas: 1) Una capa externa de sostén donde se encuentra esclera o esclerótica y la córnea, 2) Una capa media que contiene la coroides, el cuerpo ciliar y el iris, y finalmente 3) La más interna denominada retina.

La esclera es pigmentada en las tortugas marina. La esclera es transparente al frente del ojo, ahí se le denomina córnea. La córnea tiene como principal función la refracción de la luz, está es virtualmente transparente en el agua. Entre la esclera y la córnea se encuentra un tejido que los separa denominado Limbo.

La capa intermedia también llamada úvea, y está compuesta por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides se extiende desde el iris hasta la retina, se encuentra inervada por el nervio-trigémino, además se está altamente pigmentada y vascularizada; su pigmentación desvía la luz difusa que entra al ojo y previene las reflexiones internas. Además cuenta con material refractivo que mejora la sensibilidad del ojo bajo condiciones de poca luz.

La capa más interna denominada retina contiene varios tipos de células, entre las que destacan: los fotorreceptores, (bastones y conos) y las células ganglionares, cuyos axones componen el nervio óptico. (Walls, 1942; Copenhaver, 1964; Granda, 1979; Ali y Klyne, 1985; Bartol, 1999). En esta capa se detecta la luz. En las tortugas Marinas, las capas retinianas son afines con la descripción generalizada para los vertebrados y consiste en siete capas que describiré a continuación (desde el exterior del ojo hacia el centro): (1) el epitelio pigmentado, (2) capa fotorreceptora, (3) capa nuclear externa, (4) capa plexiforme externa, (5) capa nuclear interna, (6) capa plexiforme interna y por ultimo (7) Capa ganglionar. 1) En el epitelio pigmentado, es la capa más externa de la retina se encuentra firmemente conectado con la coroides, contiene procesos cargados de pigmentos que se infiltran con los segmentos externos de las células fotorreceptoras. 2) En la capa de células fotorreceptoras se encuentran dos tipos celulares, los conos y los bastones. En vertebrados los conos se encargan de la visión en colores y los bastones de la visión en baja iluminación. En general los conos son más pequeños que los bastones, pero en las tortugas marinas presenta homogeneidad, tanto en diámetro como en peso (Bartol y Musick, 2001). 3) En la capa

nuclear externa, están localizados los núcleos de las células fotorreceptoras. 4) En La capa plexiforme externa, se encuentra las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y las neuronas bipolares y amacrinas. 5) La capa nuclear interna está compuesta por los núcleos de las neuronas bipolares, y horizontales. 6) La capa plexiforme interna es similar a la capa plexiforme externa y está compuesta por conexiones sinápticas entre las neuronas de la capa nuclear interna y las de la capa ganglionar. Finalmente, 7) la capa de neuronas ganglionares es relativamente grande (23% del diámetro total de la retina) y está formada por los núcleos de las neuronas ganglionares y sus axones. (Bartol y Musick, 2001). (Figura 2)

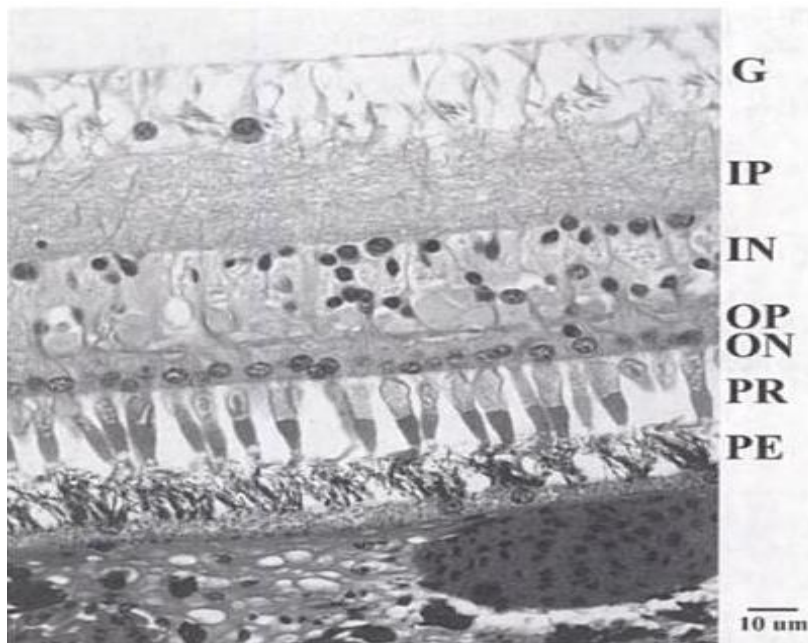


Figura. 2. 2. Fotomicrografía de la retina de un juvenil de tortuga Caguama (*Caretta caretta*)
Abreviaciones: G= Capa ganglionar; IP= Capa plexiforme interna; IN= Capa nuclear interna;
OP= Capa plexiforme externa; ON= Capa nuclear externa; PR= Capa Fotorreceptora; PE=
Epitelio pigmentado. Barra de escala de 10µm. Tomado y traducido de Bartol, y Musick 2001,
Morphology and Topographical organization of the retina of juvenile loggerhead sea turtles
(*Caretta caretta*).

APÉNDICE 3: Bases Fisicoquímicas de la Técnica de Azul de Prusia

El azul de Prusia es una sal moderadamente soluble en agua; formada del ion ferrocianuro de hierro ($+2$) y ion ferricianuro ($+3$). Al combinar los reactivos se forma el Azul de Prusia (Figura 1) (Willans et al., 2009) Para que este reacción con los compuestos férricos es necesario que se hallen en su forma iónica, esto se logra cuando el compuesto se encuentra en una solución de pH ácido. El azul de Prusia es un catión ($+3$) muy grande que al entrar en contacto con los depósitos férricos forma precipitados de color azul insolubles en agua. Esta propiedad ha sido de utilidad en patología e histología donde se usa para detectar el hierro férrico (Fe^{+3}) en los tejidos. Esta técnica se denomina azul de Prusia, como mencionamos anteriormente esta

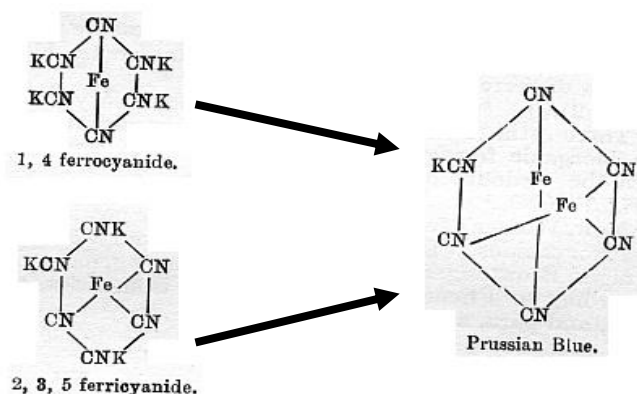


Figura 3. 1. Estructura de la molécula de Azul de Prusia. Los precursores de esta molécula son el ferrocianuro de potasio y el ferricianuro de potasio.

reacción permite localizar depósitos férricos pero no otras formas de hierro. La reacción química aún no se ha dilucidado en su totalidad pero se ha propuesto que los iones de ferrocianuro de potasio son atraídos por fuerzas electrostáticas en la superficie del hierro férrico (Arun et al., 2013, Roschztardt et al., 2009). Este mismo mecanismo se ha propuesto en su interacción con nanopartículas de magnetita, pero debido a que se conoce la estructura y composición de estas las especulaciones que se han realizado son más profundas. Al respecto se han planteado cuatro escenarios; (1) se ha propuesto que la magnetita cargada positivamente (mediante de protonación) se uniría al enlace cianuro (CN) en el Azul de Prusia, (2) que la magnetita cargada negativamente (por la hidrólisis de iones metálicos o desprotonación) se una a los iones ferrosos/férricos del Azul de Prusia; (3) los iones férricos en la superficie de la magnetita remplazarían los iones férricos/ferrosos del Azul de Prusia; por ultimo (4) los oxígeno de la magnetita se unirían a los iones férrico/ferroso del azul de Prusia. (Arun et al 2013)

a

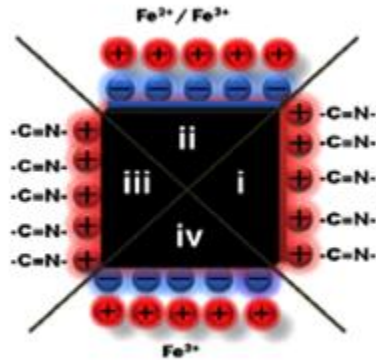



Figura 3. 2. Modelos de interacción de Azul de Prusia con magnetita. Existen cuatro posibles interacciones entre el Azul de Prusia y la magnetita (a), en ellos la magnetita estaría unida al Azul de Prusia con fuerzas electrostáticas negativas (ii y iv) o positivas (i y iii). En algunos modelos (i y ii) la molécula de Azul de Prusia se uniría electrostáticamente a la magnetita mediante sus iones negativos (férricos/ferrosos) o positivos (cianuro). En otros modelos la magnetita sustituiría los iones férricos en el Azul de Prusia (iv) o el oxígeno interaccionaría con los iones férrico/ferrosos (iii) del Azul de Prusia estas últimas dos opciones son más estables. Modificado de Arun et al. 2013

APÉNDICE 4: Permisos de Colecta Científica


SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

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

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/02900 /12
MÉXICO, D. F., A 11 ABR 2012

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIRCUITO EXTERIOR ESCOLAR S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA
COPILCO UNIVERSIDAD, C.P. 04510
COYOACAN, MÉXICO, D.F.
TEL. (55) 56 22 89 59, E-MAIL: gabo@biomedicas.unam.mx


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, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 31, fracción VI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, 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-2010, 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 licencia de colecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto de investigación denominado "**Neurofisiología de la magnetocepción en la tortuga marina *Chelonia agassizi***".

- Captura de hasta cincuenta (50) crías de "Tortuga prieta" *Chelonia agassizi* recién eclosionadas para realizar estudios sobre la vía magnetoceptiva.

Las actividades se llevarán a cabo en la **Playa de Colola que pertenece al Área Natural Protegida SANT. Playa de Maruata y Colola, Municipio de Aquila, Estado de Michoacán**. Esta autorización tendrá una **vigencia de un (01) año a partir de la emisión de la presente**.

La presente se expide con el aval del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, **debiendo sujetarse obligatoriamente a las siguientes condiciones:**

- 1.- Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.



Continúa al reverso.../
Hoja 1 de 2

Av. Revolución 1425, Nivel 1, Col. Tlacopac San Ángel,
Delegación Álvaro Obregón, C. P. 01040, México, D. F.
Teléfono 01(55) 56-24-33-09, Fax 01(55)56-24-36-42

2. – Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo en Áreas Naturales Protegidas, deberá contactar al C. Humberto Gabriel Reyes Gómez, Director de la Región Occidente y Pacífico Centro, Av. Acueducto No. 980, Col. Chapultepec Norte, C.P. 58260, Morelia, Michoacán, Tel. (01 (443) 314 6222), e-mail: hreyes@conanp.gob.mx y occidente@conanp.gob.mx, lo anterior para coordinar las actividades de campo con el ANP, presentar su programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretende ingresar al Parque; asimismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal.

3. - En todo momento el investigador será responsable de los impactos significativos que haya 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 el riesgo es alto.

4. -- 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 (433) 322 6001), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

5. - **La totalidad del material colectado 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, los ejemplares de "Tortuga prieta" serán depositados en las siguientes instituciones: laboratorio de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, laboratorio de Ecofisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al INIRENA de la UMSNH y **el titular de la autorización asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(los) depósitos(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado.**

6. - Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

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

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/02900 /12

MÉXICO, D. F., A 11 ABR 2012

7. - 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 Áreas Naturales Protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8. - De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente 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-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

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
EL DIRECTOR GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

M. Vargas Prieto

MVZ. MARTÍN VARGAS PRIETO

- C.c.p- C. Joel González Moreno.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros, PROFEPA. e-mail: vida_silvestre@profepa.gob.mx
- C. Humberto Gabriel Reyes Gómez.- Director de la Región Occidente y Pacífico Centro. e-mail: hreyes@conanp.gob.mx y occidente@conanp.gob.mx
- C. Luis Juan Martínez Armas.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Michoacán. e-mail: luis.martinez@michoacan.semarnat.gob.mx
- C. David Gutiérrez Carbonell.- Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- e-mail: daguti@conanp.gob.mx
- C. Fernando Sánchez Camacho.- Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. e-mail: fsanchez@semarnat.gob.mx

Archivo General 09/K5-2432/03/12

MACG/FSC/OCT

c.oscar/colecta cientifica/permiso especial_Gabriel Gutiérrez

"Por uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este asunto son remitidas vía electrónica".

Hoja 2 de 2