II Simposio Internacional de Paleontología del Perú.Lima,27-30 de noviembre 2018-Libro de Resúmenes, pp.021-024
ISBN: 978-612-47898-1-6

PRIMEROS ESTUDIOS PALEOHISTOLÓGICOS SOBRE FÓSILES DE VERTEBRADOS EN EL PERÚ: METODOLOGÍA Y RESULTADOS PRELIMINARES

Manuel BURGA-CASTILLO [1], Santiago GÓMEZ-SALVADOR [2], César CHACALTANA [3] & Rodolfo SALAS-GISMONDI [1, 4]

INTRODUCCIÓN

La descripción macroscópica de los fósiles ha sido la base para estudiar detalles sobre las adaptaciones y características de las especies en el registro geológico, tanto de plantas como de animales. Sin embargo, nuevas técnicas aplicadas a la paleontología (tomografías computarizadas, modelos por computadora, entre otros) están dando luces acerca del desarrollo ontogénico, evolución y respuestas al entorno en el que vivían los organismos del pasado.

El detalle microscópico de los tejidos es abordado por la histología, ciencia que se encarga de estudiar la forma, organización y función de los distintos tipos de tejidos orgánicos. Inicialmente ésta era vista como una ciencia anticuada y de uso exclusivo en el campo de la medicina, cirugía y morfología funcional, con el fin de entender únicamente la anatomía humana. En el campo de la paleontología, los primeros estudios histológicos se realizaron en 1861 sobre un hueso de dinosaurio del dinosaurio *Scelidosaurus* del Jurásico de Europa. En esta experiencia, Richard Owen, experto en cirugía y anatomía comparada decidió realizar una sección delgada de los huesos para incorporarlo a su descripción del espécimen (Owen, 1861).

La Paleohistología es la rama de la paleontología encargada de estudiar la estructura microscópica de los tejidos fósiles mediante técnicas que permiten una descripción detallada (Chinsamy, 1992). A diferencia de otras, es una técnica invasiva, la cual implica seccionar el material fósil sin la posibilidad de recuperar su condición inicial. La mayoría de publicaciones de paleohistología se hicieron con material aislado y fragmentario. Posteriormente a partir de 1960 se infirieron importantes patrones en las estrategias de crecimiento óseo en tetrápodos gracias a la paleohistología, cuyos aportes se mantienen vigentes hasta el día de hoy (Padian & Lamm, 2013).

Actualmente la paleohistología es usada para efectuar diferentes tipos de inferencias paleobiológicas tales como: el estudio de tasas de crecimiento en los vertebrados, adaptaciones acuáticas de los huesos (ej. paquiostosis), desarrollo y efectos de patologías, etc. En este artículo se presentan los primeros resultados sobre la implementación de protocolos paleohistológicos en el Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico (INGEMMET) como parte del convenio de colaboración entre INGEMMET y el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron costillas fragmentarias y aisladas de ballena y cocodrilo de la colección del Departamento de Paleontología de Vertebrados (DPV-MUSM). La costilla de ballena (*Piscobalaena* sp.) procede de los niveles marinos de la formación Pisco (Sacaco, Arequipa (Muizon & DeVries, 1985) y de edad Mioceno tardío (Muizon & Bellon, 1986; Ehret et al. 2012), La costilla de cocodrilo procede de la formación Pebas, cuyos sedimentos están ubicados en la región de Iquitos (Loreto) y fueron acumulados en ambientes lacustres disóxicos, predominantes en el Mioceno medio de la Amazonía occidental (Wesselingh et al., 2006; Salas-Gismondi et al. 2016).

Métodos

Se generaron dos protocolos, ambos basándose en los procedimientos para la obtención de secciones delgadas de fósiles descritas por Chinsamy (1992) y por Padian & Lamm (2013). El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Petromineralogía y el Laboratorio de Preparación de Muestras de INGEMMET.

[1] Departamento de Paleontología de Vertebrados, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Avenida Arenales 1256, Lima 14, Perú
[2] Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Cádiz, Fragela 9, 11003 Cádiz, España
[3] Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico (INGEMMET); Av. Canadá 1470, San Borja, Lima 14, Perú
[4] Laboratorio de BioGeoCiencias, Facultad de Ciencias y Filosofía/CIDIS, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú E-mail: manuel.burga.c@upch.com

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron los siguientes materiales:

1. Resina y endurecedor EpoKwick (Epoxy Resin & Epoxy Hardener 20-8138-032).
2. Tacos dpe plástico para cámara de vacío.
3. Cortadora con hoja de diamante recubierta de agua (Struers-Discoplan-TS).
4. Plancha.
5. Cámara de vacío (Struers-Citovac).
6. Pulidora Rotopol-35.
7. Disco magnético (MDPiano-Struers) de 120, 600 y 1000 um.
8. Pasta de polvo abrasivo marca Advance (400, 600 y 1000 um)
9. Barra de Cristalbond 509 Clear.
10. Barra de cemento.
11. Láminas portaobjetos.
12. Microscopio de luz polarizada.

Métodos empleados en ambos protocolos

1. Corte con la hoja de diamante recubierta de agua.
2. Impregnación de resina al vacío en taco de plástico.
3. Impregnación de la cara del corte en resina.
4. Lapeado con discos magnéticos de 120, 600 y 1000 um (Desgastadora Rotopol-35).
5. Pegado de la muestra en lámina portaobjeto.
6. Desgaste con discos y pastas abrasivas.
7. Control de la muestra con el microscopio de luz polarizada.
8. Obtención de muestras histológicas.

Ambos protocolos presentaban diferencias dentro de sus procedimientos, siendo el segundo más controlado que el primero (ver Tabla1).

RESULTADOS PRELIMINARES

Los detalles sobre ambos protocolos se muestran en la Tabla2. Los resultados permitieron identificar problemas y aciertos en cada protocolo, particularmente para evitar pérdida de microestructura. Asimismo, las secciones delgadas generadas permitieron la observación de microestructuras óseas de gran importancia y que indican aspectos del desarrollo óseo del organismo a lo largo de su vida.

El hueso es un tejido conectivo que se compone principalmente de una matriz extracelular mineralizada formado por fibras de colágeno y cristales de hidroxiapatita (Padian & Lamm, 2013). Según la densidad o porosidad de la matriz extracelular, encontramos dos tipos de tejido óseo: esponjoso o

Tabla 1
Diferencias en el procedimiento de ambos protocolos

Protocolo 1	Protocolo 2
Ausencia de encapsulamiento previo con resina Epokwick	Encapsulamiento o sellado total previo de la muestra con resina Epokwick
Corte con hoja de diamante recubierta con agua a paso rápido.	Corte con hoja de diamante recubierta con agua a paso lento.
Pegado con barra de cemento	Pegado con barra de Cristalbond 509 clear
Un sellado de la cara de la muestra con resina Epokwick (lapeado)	Tres sellados en total de la cara de la muestra con resina Epokwick (corte, lapeado, desgaste)
Control medio de la muestra durante el pulido.	Control alto de la muestra durante el pulido.

Tabla 2
Evaluación de los resultados de cada protocolo

Protocolo 1 (Duración de un día)	**Protocolo 2** (Duración de 4 días)
Pérdida de la periferia y en algunos casos de la zona de hueso esponjoso del material fósil.	Conservación de material periférico (periostio) y de la zona de hueso esponjoso.
Secciones delgadas	Secciones un poco más gruesas
Mayor detalle en las pocas estructuras conservadas.	Menor detalle de las estructuras.

trabecular, cuando la matriz presenta numerosas cavidades, y compacto o cortical, cuando la matriz es muy densa y sin cavidades (Megías et al., 2017), en ellos encontramos células especializadas vinculadas al crecimiento del hueso: los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

En ambas costillas se logró reconocer las lagunas osteocitarias (ver Fig.1A), lugar donde se encuentran los osteocitos, células encargadas de incorporar nuevo material óseo al hueso dentro de las osteonas (unidades fundamentales del hueso). Las osteonas pueden ser primarias (OP) o secundarias (OS) dependiendo de su origen, las OP se caracterizan por no presentar límites bien definidos y por extenderse a través de largos trayectos en dirección longitudinal (ver Fig.2C), ésta se encuentra en el hueso primario, mientras que las OS se caracterizan por ser unidades discretas, mucho más cilíndricas y lo más importante, presentar líneas de cemento resultado de la deposición de una capa provocada por los osteoclastos (células encargadas de la reabsorción ósea) (ver Fig.2D)

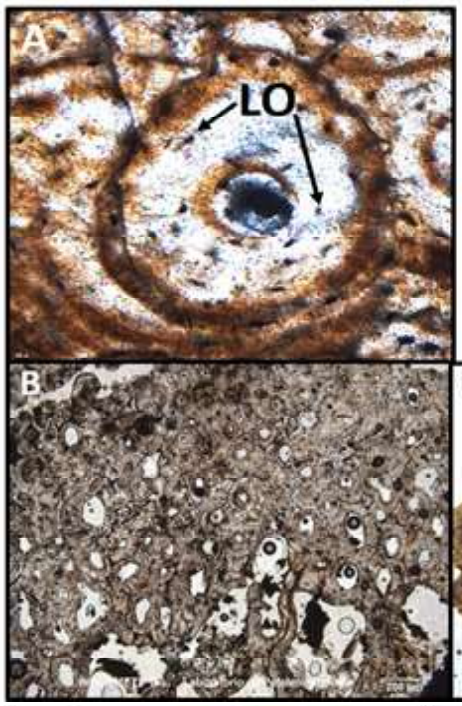

Figura 1. Seccion delgada de costilla de *Piscobalena* sp. **A)** Osteona secundaria de costilla de *Piscobalaena* sp. LO=laguna osteocitaria. **B)** Sección transversal de costilla de *Piscobalaena* sp., zona proximal. **C)** Sección transversal de costilla de *Piscobalaena* sp., zona terminal. HC=Hueso cortical; HE=Hueso esponjoso.

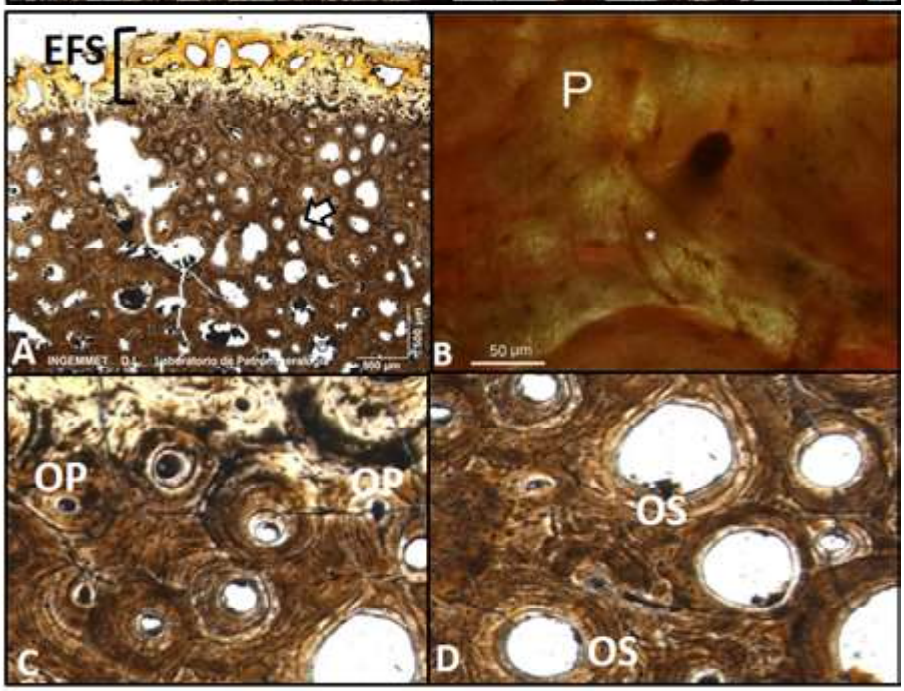

Figura 2 Sección delgada de costilla de cocodrilo (P-2005-4). **A)** Sección transversal de costilla de cocodrilo, zona proximal. EFS= sistema fundamental externo. **B)** Fibras de Sharpey en costilla de cocodrilo. **C)** Presencia de osteonas primarias. **D)** Presencia de osteonas secundarias. P=hueso primario;*=fibras de Sharpey; OP=osteonas primarias; OS=osteonas secundarias.

Según Waskow (2017), en general las costillas poseen un récord de crecimiento más completo en su zona proximal (esto se da de manera inversa en huesos largos donde la zona distal es la más remodelada). Al observar la sección delgada de la parte proximal y terminal de la costilla de *Piscobalaena* sp. se evidencia mayor presencia de osteonas secundarias (indicadoras de remodelación) en la zona proximal que en la distal/terminal, lo que es consistente con lo propuesto por Waskow & Mateus (2017) (ver Fig.1B y Fig.1C).

Tanto el cocodrilo como la ballena, presentaban sistema fundamental externo o EFS (Woodward et al., 2011) y en su mayoría OS, lo que indica que ambos organismos llegaron a su estadio adulto (ver Fig2A). A diferencia de otras costillas de vertebrados, éstos no presentaban marcas de crecimiento definidas.

Por otra parte, la costilla de cocodrilo presentaba las denominadas fibras de Sharpey (ver Fig2B), estructuras importantes para la reconstrucción de esfuerzos biomecánicos en los organismos (Peterman & Sander, 2013). Un mayor desarrollo de las mismas coincide con áreas que soportan mayores tensiones (Cuezva & Élez, 2000), en este caso no presenta fibras muy anchas, razón por la cual la costilla analizada probablemente no estaba expuesta a esfuerzos biomecánicos significativos.

CONCLUSIONES

- Las secciones delgadas originadas con ambos protocolos mostraban microestructuras de relevancia para el estudio de vertebrados.
- El protocolo 2 permitió mantener toda la sección delgada de los fósiles, aunque no el grosor necesario para la observación ideal de microestructuras.
- Las fibras de Sharpey encontradas en el cocodrilo representan una evidencia de estrés en la costilla.
- La costilla de ballena presenta mayor remodelación ósea en la zona proximal que en la distal, como fue sugerido por Waskow & Mateus (2017).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la jefa del Laboratorio de Petrominerología del INGEMMET, la ingeniera Ana Condorhuaman por las coordinaciones realizadas con el Laboratorio de Preparación de Muestras y sus integrantes, a Edilberto Mena Peña, José Herlfers Asto y Juan Aylas Laureano.

BIBLIOGRAFÍA

Chinsamy A. & Raath M. A. (1992). Preparation of fossil bone for histological examination. Palaeont. Afr., 29, 39-44.

Cuezva S. & Élez J. (2000). Estudio preliminar de la microestructura de los huesos fósiles de mamíferos de Somosaguas (Mioceno Medio, Madrid). *Coloquios de Paleontología.* 51. 137-157.

Ehret D. J., Macfadden B. J., Jones D. S., Devries T. J., Foster D. A. & Salas-Gismondi R. (2012). *Origin of the white shark Carcharodon (Lamniformes: Lamnidae) based on recalibration of the Upper Neogene Pisco Formation of Peru.* Palaeontology. 55(6), p. 1139-1153.

Megías M., Molist P. & Pombal M. (2017). *Atlas de histología animal y vegetal-Tejidos animales: Conectivo óseo.* Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

Muizon C. de & Bellon H. (1986). Nouvelles données sur l'âge de la Formation Pisco (Pérou). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2, Mécanique, Physique, Chimie, *Sciences de l'univers, Sciences de la Terre,* 303(15), 1401-1404.

Muizon C. de & DeVries T.J. (1985). Geology and paleontology of late Cenozoic marine deposits in the Sacaco area (Peru). *Geologische Rundschau,* 74. 547-563.

Owen R. (1861-1863). *A monograph of a fossil dinosaur (Scelidosaurus harrisoni, Owen) of the Lower Lias.* Monograph of Palaeontographical Society, 13 (56) 1-4, pls 1-6; 14 (60) 1-26, pls 1-11.

Padian K. & Lamm Ellen-Therese (2013). *Bone Histology of Fossil Tetrapods.* Advancing Methods, Analysis, and Interpretation.

Petermann H., & Sander M. (2013). Histological evidence for muscle insertion in extant amniote femora: implications for muscle reconstruction in fossils. *Journal of Anatomy,* 222(4), 419–436.

Salas-Gismondi R., Flynn JJ., Baby P., Tejada-Lara JV., Claude J., Antoine P-O. (2016). A New 13 Million Year Old Gavialoid Crocodylian from ProtoAmazonian Mega-Wetlands Reveals Parallel Evolutionary Trends in Skull Shape Linked to Longirostry. *PLoS ONE* 11(4): e0152453.

Waskow K. & Mateus O. (2017). Dorsal rib histology of dinosaurs and a crocodylomorph from western Portugal: Skeletochronological implications on age determination and life history traits. C. R. *Palevol* 16, 425–439

Wesselingh E.P., Hoorn M.C., Guerrero J., Räsänen M.E., Romero Pittman L. & Salo J.(2006). Stratigraphy of Miocene Amazonian deposits. *Scripta Geol.,* 133.

Woodward H., Horner J. & Farlow J. (2011) Osteohistological Evidence for Determinate Growth in the American Alligator.*Journal of Herpetology.* Vol. 45, No. 3, pp. 339-342