IDENTIFICACIÓN DE TEJIDO ÓSEO EN TRES EJEMPLARES DEL ORDEN TESTUDINES DEL PERIODO CRETÁCICO HALLADOS EN VILLA DE LEYVA-COLOMBIA

ANDREA CABALLERO SANCHEZ
FREDI LEANDRO BOLIVAR PIRA

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2017

IDENTIFICACIÓN DE TEJIDO ÓSEO EN TRES EJEMPLARES DEL ORDEN TESTUDINES DEL PERIODO CRETÁCICO HALLADOS EN VILLA DE LEYVA-COLOMBIA

ANDREA CABALLERO SANCHEZ
FREDI LEANDRO BOLIVAR PIRA

Proyecto de Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Biología

Director
MSc. CARMEN HELENA MORENO
Co-Director
PhD. EDWIN CADENA

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2017

RESUMEN

El orden testudines ha sobrevivido durante millones de años de manera positiva a eventos de extinción masiva y a cambios climáticos globales de calentamiento y glaciaciones. Sus cambios evolutivos han sido efectivos para la adaptación de este orden a casi todos los ambientes terrestres y acuáticos. Los testudines actuales presentan algunas similitudes estructurales con sus antecesores, como la presencia de una concha constituida por un caparazón y un plastrón, que no solo les brinda un soporte anatómico y estructural sino que también les ha otorgado una barrera defensiva contra sus depredadores.

Los estudios paleohistológicos se han incrementado durante los últimos años, centrándose en la implementación de técnicas que permiten explorar los tejidos y células óseas que se han preservado en los individuos por millones de años. Adicionalmente, los avances tecnológicos y científicos han dado paso a la obtención de una gran cantidad de información que ayuda a comprender la ecología y las posibles relaciones filogenéticas de individuos antiguos.

En la presente investigación se llevó a cabo la identificación y comparación del tejido óseo en tres fragmentos de tres tortugas marinas fósiles de aproximadamente 125 millones de años encontradas en las localidades de Loma la Cabrera y Loma la Catalina ubicadas en los alrededores de Villa de Leyva, Colombia. Se realizó la implementación de dos técnicas paleohistológicas: *In situ* (secciones delgadas para análisis petrográfico y testigos para análisis en microscopía electrónica de barrido) y *Ex situ* (desmineralización y análisis en microscopía óptica de luz transmitida). Para la técnica *In situ* en el análisis petrográfico se determinó la preservación de tejido óseo para las tres muestras estudiadas donde se identificaron estructuras como: osteonas secundarias, hueso laminar, tejido óseo esponjoso, tejido óseo compacto, entre otros. Por otra parte, para el análisis en microscopía electrónica

de barrido no permitió la identificación de estructuras óseas, sin embargo, el análisis EDS realizado evidencio la presencia de elementos relacionados con material orgánico y con procesos de mineralización. En cuanto a la técnica *Ex situ* se evidenció la presencia de células fósiles (osteocitos con canalículos) embebidos en matriz ósea.

Aunque, en los tres especímenes se logró determinar presencia de tejido óseo, dos de ellos presentaban exclusivamente estructuras referentes al hueso esponjoso que presentaban pequeñas acumulaciones de tejido trabecular y claros procesos de mineralización y precipitación de distintos tipos de carbonatos, la nula presencia de tejido óseo de tipo compacto puede deberse a una baja presencia del mismo, lo que puede deberse a los posibles hábitos acuáticos de dichos especimenes. Por el contrario, en el tercer ejemplar se puede describir la mejor preservación microestructural, con presencia de tejido óseo de tipo compacto y de tipo esponjoso.

Se concluye que la metodología de secciones delgadas para analisis petrografico es una importante herramienta para la identificacion de tejido óseo en muestras altamante degradadas, permitiendo la obtencion de mayor cantidad de información y, en el caso de este estudio fue la metodologia que brindo mayores resultados. Sin embargo, la metodología de testigos para analisis en microscopía electronica no solo permite la observacion, sino tambien la cuantificación de las concentraciones de los distintos elementos presentes en las muestras. Finalmente la metodología de desmineralización se centra en el aislamiento de estrucutras fósiles que permiten determinar la preservación organica del material.

Se recomienda la elaboración de varias técnicas paleohistologicas para futuros estudios que permitan la obtención de resultados ma robustos, y que brinden la mayor cantidad de información posible. Ya que al ser técnicas altamente destructivas deben ser aprovechadas de la mejor manera.

Los resultados obtenidos permiten determinar el potencial de preservación microestructural en muestras fósiles en el territorio de Villa de Leyva que hasta el momento era desconocida, dando paso a futuras investigaciones que permitan mayor claridad sobre los procesos fosildiagenéticos en estas áreas sedimentarias, además de caracterizar a mayor profundidad la histología ósea del orden testudines para esta zona.

PALABRAS CLAVE: Testudines, preservación microestructural, tejido óseo, procedimientos paleohistológicos, fósiles, Villa de Leyva.

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN 13
1.1 OBJETIVOS 16
1.1.1 General 16
1.1.2 Específicos 16
2 ESTADO DEL ARTE 17
2.1 Villa de Leyva 17
2.2 Periodo Cretácico 19
2.3 Orden Testudine 21
2.4 Paleohistología 28
2.4.1 Técnicas Paleohistológicas 31
2.5 Tejido óseo. 32
2.5.1 Procesos de fosilización 37
2.6 Paleohistología en Testudines 39
3 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS 42
3.1 MATERIALES O RECURSOS 42
3.1.1 Equipos. 42
3.1.2 Material biológico. 42
3.1.3 Reactivos. 42
3.1.4 Vidriería. 43
3.1.5 Otros. 43
3.2 PROCEDIMIENTOS 44
3.2.1 Selección de material fósil. 44
3.2.2 Realización de técnicas específicas para análisis histológico. 48
4 RESULTADOS 55
4.1 Técnicas específicas para análisis histológico. 55
4.1.1 Técnica In situ. 55
4.1.2 Técnica Ex situ 76
5 ANALISIS DE RESULTADOS 79
6 CONCLUSIONES 85
7 RECOMENDACIONES 87

8 AGRADECIMIENTOS 89
9 OTROS APORTES 90
10 BIBLIOGRAFIA 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica de la ocurrencia de reptiles marinos cretácicos en Colombia. Mapa físico de la República de Colombia a escala 1: 3.000.000, con relieve, Instituto Agustín Codazzi, 1995. Localidades: Lebrija (1); Zapatoca (2); Galán (3); Villa de Leiva, Sáchica y Sutamarchán (4); Guayabal de Síquima (5); Bojacá (6); Piedras (7); Coello (8); Cunday (9); Dolores (10); Yaguará (11); Itaibe (12). Escala= 150 km. Tomado de (Páramo M. , 2015). *18*
Figura 2: Fragmento de la Tabla Cronoestratigráfica Internacional (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017) *19*
Figura 3: A) Mapa de Colombia donde se señala Villa de Leyva. B) Esquema de la ubicación geografica de las tres tortugas fosiles seleccionadas, con codigos de colección FCG-CBP-91 que en este caso corresponde a CIP1; FCG-CBP-60 que en este caso corresponde a CIP2 y FCG-CBP-75 que en este caso corresponde a CIP3. Tomado y modificado de (Cadena & Parham, 2015) *21*
Figura 4: Esquema general de A) caparazón y B) plastrón, de una tortuga moderna. Tomado de (Scheyer T. , 2007) *22*
Figura 5: Esquemas de el esqueleto de A) aves y B) tortuga, donde se muestra la relacion topografica entre escápula y costillas. r) Costillas, sc) escápula. Tomado de (Kuratani, Kuraku, & Nagashima, 2011). *23*
Figura 6: Arbol donde se muestra la hipótesis filogenética de los principales grupos de Testudinata y su interrelacion, basado en los resultados publicados por Gaffney y Meylan (1988), Meylan y Gaffney (1989), Rougier et al. (1995), Gaffney (1996), Hirayama (1998), Sukhanov (2006) y Joyce (2007). Los taxones fósiles estan marcados con una cruz. Tomado de (Scheyer T. , 2007). *24*
Figura 7: Hipótesis filogenética basada en el análisis RAxML de datos UCE mostrando clados de tortugas filogenéticamente definidos coronas (Testudines). Todos los clados fueron apoyados por porcentaje de bootstrap de probabilidad de 100 excepto para la posición de Chelydra en el árbol de especies STAR, que tiene un soporte bootstrap de 68. Tomado de (Crawford, y otros, 2015) *25*
Figura 8: Filogenia UCE mapeada contra la paleobiogeografía intercontinental. Tomado de (Crawford, y otros, 2015) *26*
Figura 9: "Mapa de Colombia mostrando las nueve localidades donde se han encontrado tortugas fósiles hasta el momento y su posición en la escala geológica. Localidad 1. Zapatoca, Santander, primer Cretácico (Valanginian); Localidad 2. Villa de Leyva, Bóyac, cretácico temprano (Barremian-Aptian); Localidad 3. Mina de carbón Cerrejón, Guajira, paleoceno medio-tardío; Localidad 4. Mina de carbón Calenturitas, César, Paleoceno-Eoceno; Localidad 5. Nemocón, Cundinamarca, Paleoceno tardío; Localidad 6. Doña Juana Dump, Bogotá D.C, Paleoceno tardío; Localidad 7. Pubenza, Tocaima, Cundinamarca, Mioceno temprano y Pleistoceno tardío; Localidad 8. Castilletes, Guajira, temprano hasta el Mioceno tardío; Localidad 9. La Venta, Villavieja, Huila, medio a tardío Mioceno." (Cadena E. A., The Record of Turtles in Colombia; A Review of the Discoveries, Research and Future Challenges, 2014) *28*
Figura 10: Tomado de (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016) *34*

Figura 11:Descripción de las disciplinas que estudian las etapas de los individuos fosilizados. (tomado de Patarroyo Gama 2005) *38*
Figura 12. Fotografía del CIP, tomada por Andrea Caballero. *44*
Figura 13. Fotografía del fósil CIP1, tomada por Fredi Bolivar. *45*
Figura 14: A) Fotografía de fósil CIP1, B) Hueso largo (clavicula) extraido. Elaboración propia. *46*
Figura 15: Fotografía de fragmento y ubicación en el fósil de CIP2. Elaboración propia. *47*
Figura 16: Fotografia de fosil CIP3. A) Parte de caparazón encontrado. B) Aleta proximal. Elaboracion propia. *48*
Figura 17: Fotografía de, A) Fragmento seleccionado de CIP3, B) Observacion de caparazón en vista transversal. Elaboración propia. *48*
Figura 18: Planos de corte de CIP1 para los distintos protocolos. Elaboración propia. *49*
Figura 19: Planos de corte de CIP2 para los distintos protocolos. Elaboración propia. *50*
Figura 20: Planos de corte de CIP3 para los distintos protocolos. Elaboración propia. *50*
Figura 21: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida. *57*
Figura 22: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida. *58*
Figura 23: Vista de secciones longitudinales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida. *59*
Figura 24: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio petrografico. *61*
Figura 25: Vista de secciones trasversales de CIP2 en microscopio óptico de luz trasmitida. *62*
Figura 26: Vista de secciones longitudinales de CIP2 en microscopio óptico de luz trasmitida. *62*
Figura 27: Vista de secciones transversales de CIP2 en microscopio petrografico. *63*
Figura 28: Vista de secciones longitudinales de CIP2 en microscopio petrografico. *64*
Figura 29: Vista de secciones transversales de CIP3 en microscopio óptico de luz trasmitida. *65*
Figura 30: Vista de secciones longitudinales de CIP3 en microscopio óptico de luz trasmitida. *66*
Figura 31: Vista de secciones transversales de CIP3 en microscopio petrografico. *67*
Figura 32: Vista de secciones longitudinales de CIP3 en microscopio petrografico. *68*
Figura 33: Muestras para microscopia electronica de barrido. A. Secciones elaboradas con cortadora marca Minosecar con disco diamantado y metalizadas con oro. B. Fragmentos despues de la criofractura y antes del metalizado con oro. *68*
Figura 34: Vista de muestras de CIP1 en corte trasnversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *69*
Figura 35: Vista de muestras de CIP1 en corte longotudinal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *70*
Figura 36: Vista de muestras de CIP2 en corte transversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *71*

Figura 37: Vista de muestras de CIP2 en corte longitudinall observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *72*
Figura 38: Vista de muestras de CIP3 en corte transversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *73*
Figura 39: Vista de muestras de CIP3 en corte longitudinall observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro. *74*
Figura 40: Vista de muestras de CIP1 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida. *77*
Figura 41: Vista de muestras de CIP2 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida. *78*
Figura 42: Vista de muestras de CIP3 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida. *78*
Figura 43. a. Osteocito aplanado: morfotipo dominante de la corteza interna. b. Osteocito semi-aplanado: abundantes en laminilla de osteona primaria y secundaria. c. osteocito radiado: morfotipo dominante de cortezas externas. Tomada de Cadena & Schweitzer (2012). d. Fotografia de seccion trasnversal de CIP3, donde se observa la forma del osteocito en el recuadro negro, en 40x. e. Vista en 100x de un osteocito. *82*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Tabla de comparacion de protocolos para los analisis palehistológicos.....31
Tabla 2: Fotografias de las áreas donde se realizo el analisis EDS 75
Tabla 3: Concentración de cada uno de los elementos presentes en todas las muestras analizadas y promedios de entre la direccion (longitudinal y transversal) de los cortes de cada muestra con cada elemento. 76
Tabla 4: Diferentes investigaciones realizadas con las estrcuturas determinadas en las mismas, mediante la tecnica In Situ, con elaboracion de secciones delgadas. X, Presencia. /, Ausencia. A. Investigación realizada por (Scheyer T. , 2007). B. Investigación realizada por (Scheyer & Sander, Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles, 2007). C. Investigación realizada por (Scheyer & Sánchez, 2007). D. Investigación realizada por (Scheyer & Anquetin, 2008). E. Investigación realizada por (Talevi, 2012). F. Investigación realizada por (Janello, Cerda, & de la Fuente, 2016). I. Presente investigación.....79
Tabla 5: Diferentes investigaciones realizadas con las estrcuturas determinadas en las mismas, mediante la tecnica Ex Situ, con desminaralización con EDTA. X, Presencia. /, Ausencia. G. Investigación realizada por (Cadena & Schweitzer, 2012). H. Investigación realizada por (Cadena & Schweitzer, 2014). I. Presente investigacion. 80

ABREVIATURAS HISTOLÓGICAS

Las abreviaturas histológicas utilizadas están elaboradas y basadas en (Talevi, 2012), (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016) (Ross & Pawlina, 2015).

Canal Haversiano: (CH)

Canaliculo: (CA)

Cortex: (C)

Endostio Osteónico: (EO)

Hueso Laminar: (HL)

Laguna Osteocitica: (LO)

Laminas Circunferenciales Externas: (LCE)

Laminas Circunferenciales Internas: (LCI)

Laminas Intersticiales: (LI)

Laminillas Concentricas: (LC)

Lineas de Cementacion: (LCe)

Matriz Ósea: (MO)

Oseona Secundaria: (OS)

Osteocito: (OC)

Osteona Primaria: (OP)

Tejido Compacto: (TC)

Tejido Esponjoso: (TE)

Tejido Haversiano: (TH)

Tejido Trabecular (TT)

Vestigio Trabecular (VT)

1 INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países más biodiversos del mundo lo cual es el reflejo de su rica historia evolutiva, evidenciada así en la abundancia y riqueza de especies relacionadas con su ubicación latitudinal en el trópico, contando con 2.454.087 de registros biológicos encontrados (SiB Colombia , 2017) (IDEAM, 2017); hecho que se ve confirmado también con el alto número de registros fósiles conservados -entre estos reptiles marinos- que se encuentran a lo largo de la cordillera oriental del territorio nacional (tortugas, plesiosaurios, ictiosaurios y mosasaurios) (Páramo M. , 2015).

El principal problema del trabajo con especímenes fósiles es que en algunas ocasiones no se encuentran anatómicamente articulados, o sólo es posible recuperar fragmentos que muchas veces no presentan rasgos morfológicos taxonómicamente relevantes. Para estos casos el campo de la paleohistología ha aportado datos interesantes respecto a las condiciones paleoecológicas. Cómo, por ejemplo, el estudio realizado por (Scheyer & Sander, Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles, 2007), en el cual se analiza la histología de la concha de tortugas fósiles acuáticas y terrestres, estableciendo comparaciones con representantes actuales con similares hábitats. Allí, concluyen que las características histológicas para tortugas acuáticas y terrestres son distintas y, por lo tanto, se puede realizar un análisis del estilo de vida de las tortugas mediante la microestructura de su concha.

En Colombia los estudios de fósiles se han centrado en los análisis taxonómicos a partir de la morfología externa, así como en los cambios diagenéticos y tafonómicos que han sufrido los diferentes especímenes. Por otra parte, los estudios realizados en el área de paleohistología son escasos, por el momento nuestro país cuenta con un solo estudio reportado, el cual fue llevado a cabo por Cadena y Shweitzer (2014) en un Testudine

perteneciente al Paleoceno-Eoceno, donde describen la variación de osteocitos que hay entre las tres capas de hueso de la concha, las formas de los osteocitos y hacen la primera documentación de vasos sanguíneos encontrados en tortugas fósiles.

La paleohistología no sólo permite el análisis y caracterización de las microestructuras del hueso (sistemas de Havers, conductos de Volkmann, osteocitos, laminillas concéntricas, canalículos óseos, osteonas primarias, secundarias, etc.), sino que, ayuda en la caracterización de especímenes susceptibles de ser analizados mediante secuenciación de proteínas para hacer análisis filogenéticos entre individuos fósiles y actuales, determinar el modo en el que se preservan estas microestructuras mediante análisis morfológicos por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y por último, determinar si la cantidad de osteocitos está relacionada con el tipo de hueso en cual se encuentran (Cadena & Schweitzer, 2012). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, es necesario realizar y promover la investigación en paleohistología para dar explicaciones más profundas acerca de los procesos de fosilización e historias evolutivas de los organismos que poblaron nuestro territorio, constituyéndose en un amplio campo de investigación.

Con base en lo anterior en el presente estudio se pretende determinar mediante técnicas paleohistológicas la preservación de tejido óseo en tres fósiles de tortugas marinas del periodo Cretácico Inferior halladas en Villa de Leyva–Colombia, usando como muestras los fragmentos visiblemente mejor conservados, pertenecientes a tres especímenes diferentes, por medio del análisis estructural en microscopio óptico, microscopio electrónico de barrido (MEB) y microscopio petrográfico. Los cuales fueron donados por el Centro de Investigaciones Paleontológicas de Villa de Leyva (CIP).

En la mayoría de artículos científicos relacionados con paleohistología ósea se toman como sinónimo las expresiones “conservación” y “preservación”, ya sea para hacer alusión

a la fidelidad que tiene el fósil con su estructura original o, del mismo modo para hablar de la microestructura ósea. En este trabajo diferenciaremos estos dos conceptos, y utilizaremos el término de preservación para referirnos a la micro-anatomía del hueso; en cuanto a la conservación, nos referiremos a la apariencia externa de los especímenes de los cuales tomamos las muestras (Dixon, Dawson, & Taylor, 2008) (Dal Sasso, Maritan, Usai, Angelini, & Artioli, 2014).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 General

Determinar la preservación y características de tejido óseo mediante técnicas paleohistológicas en tres fósiles del orden Testudines del periodo Cretácico, hallados en Villa de Leyva, Colombia.

1.1.2 Específicos

- Establecer la preservación de tejido óseo en tres muestras fósiles del orden Testudines empleando microscopio petrográfico, electrónico de barrido y óptico.
- Determinar las características estructurales del tejido óseo de cada una de las muestras analizadas.
- Comparar los protocolos empleados para la identificación de tejido óseo en muestras fósiles.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Villa de Leyva

El municipio de Villa de Leyva, administrativamente pertenece al departamento de Boyacá, y la subregión denominada vertiente y Valle de Moniquirá. Su gradiente altitudinal se encuentra entre los 2.000 y los 3.200 m.s.n.m., está ubicado sobre la Cordillera Oriental de Colombia, y sus límites son: al norte con los municipios de Gachantivá y Arcabuco, al oriente con el municipio de Chíquiza, al sur con el municipio de Sáchica y al occidente con los municipios de Sutamarchán y Santa Sofía. La extensión total del municipio de Villa de Leyva es de 128 kilómetros cuadrados. (Alcaldia de Villa de Leyva, 2015)

En Colombia, se ha encontrado una gran abundancia en restos de reptiles fósiles (Figura 1), especialmente en Villa de Leyva los hallazgos incluyen tortugas, plesiosaurios, ictiosaurios y mosasaurios. Allí se han encontrado concentraciones de material fósil más abundantes que en otras zonas del país, debido a que la presencia de fósiles está ligada a la distribución que presentan los sedimentos cretácicos en la cordillera oriental. (Páramo M. , 2015)

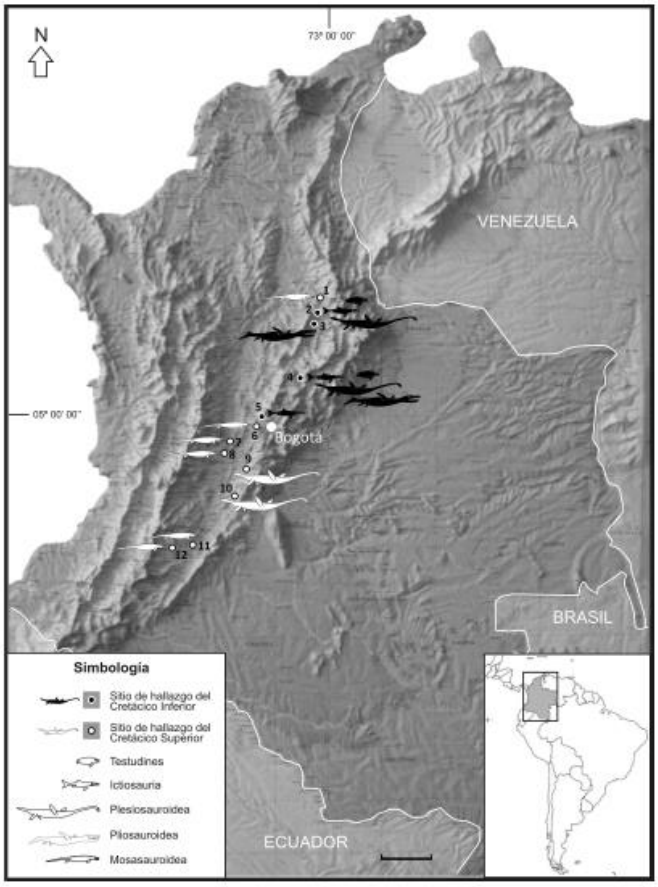


Figura 1: Distribución geográfica de la ocurrencia de reptiles marinos cretácicos en Colombia. Mapa físico de la República de Colombia a escala 1: 3.000.000, con relieve, Instituto Agustín Codazzi, 1995. Localidades: Lebrija (1); Zapatoca (2); Galán (3); Villa de Leiva, Sáchica y Sutamarchán (4); Guayabal de Síquima (5); Bojacá (6); Piedras (7); Coello (8); Cunday (9); Dolores (10); Yaguará (11); Itaibe (12). Escala= 150 km. Tomado de (Páramo M. , 2015).

Dicho periodo geológico fué de vital importancia para la evolución de los reptiles especialmente para las tortugas quienes tuvieron uno de los eventos más importantes de su historia evolutiva; además de su gran diversificación, su colonización en diferentes ambientes y las diversas adaptaciones morfológicas. En el orden testudines (Batsh, 1788) (Plotkin, 2007), especialmente las tortugas marinas se caracterizan por manifestar una morfología altamente derivada con adaptaciones para la vida marina (Hirayama, 1998).

2.2 Periodo Cretácico

El periodo Cretácico se encuentra en el EON (Eonotema) Fanerozoico, a la cual pertenece la ERA (Eratema) Mesozoica que a su vez se divide en los PERIODOS (Sistema) Triásico, Jurásico y Cretácico. El periodo Cretácico se divide en las EPOCAS (Series) superior o tardía e inferior o temprana, en la cual se encuentran las EDADES O PISOS. (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017)

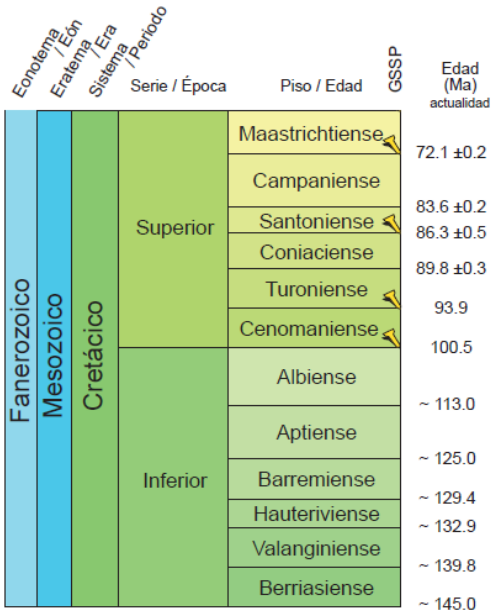


Figura 2: Fragmento de la Tabla Cronoestratigráfica Internacional (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017)

Este período se caracterizó por continuar la fragmentación de La Pangea, que empezó al final del periodo Jurásico en el cual se originaron dos supercontinentes denominados Laurasia y Gondwana hace aproximadamente 140 millones de años, Durante el periodo Cretácico se inició la fragmentación y formación de los continentes, estos tomaron una forma similar a la que poseen hoy en día, y a su vez, también se formaron el océano atlántico y el océano indico. (D' Agostino, 2007)

El periodo Cretácico fue el más largo de la era Mesozoica, además de ser uno de los periodos de mayor actividad geológica, en el cual la deriva continental generó enormes pliegues en la corteza de la tierra, gracias a esto surgieron las montañas y los grandes volcanes. Además, en este periodo, comenzaron las diferenciaciones climáticas de la tierra entre las nuevas zonas que la componían. Las zonas en las cuales se empezaron a diferenciar los veranos y los inviernos fueron desde entonces los lugares más próximos a los polos. En cuanto a los lugares que se encontraban en el ecuador o cerca de él, se generó una sucesión entre periodos secos y húmedos, pero a nivel general su clima fue cálido. Por otra parte, la expansión de los animales acuáticos fue facilitada por el cubrimiento de los mares a secciones que hoy en día son tierra firme. No solo los dinosaurios prosperaron en este periodo, de manera conjunta lo hicieron los lagartos, cocodrilos, primeras serpientes y tortugas. También se diversificaron las aves y se dio el surgimiento de los pequeños mamíferos. (Malam & Parker, 2008)

En cuanto al Sistema Cretacico en la region de Villa de Leyva (Etayo Serna , 1967) se divide en varias secciones estratigraficas cuya distribucion bioestratigrafica abarca desde el Hauteribiense hasta el Albiense, en este caso nos centraremos en la Formacion Paja, donde se ubican los tres registros fosiles seleccionados. Dicha formacion es dividida y caracterizada (Etayo Serna , 1967) en 3 secciones, a) Lutitas negras inferiores; b) Arcillolitas abigarradas y c) Arcillolitas con nodulos huecos.

Las tortugas fósiles fueron halladas en Loma la Cabrera y Loma la Catalina sector Monsalve (Figura 3), pertenecientes a la sección de Arcillolitas abigarradas, asignada por (Etayo Serna , 1967) a la Edad Barremiano (± 129.4 – 125.0 Ma), Aptiense (± 125.0 – 113.0 Ma); que a su vez pertenece al Cretácico inferior, se ubica entre Arcabuco y Chiquinquirá,

mide aproximadamente 2000 metros y tienen un espesor aproximado de 3000 metros. En Villa de Leyva y sus alrededores están las zonas más fosilíferas para la paleofauna y paleoflora. (Huertas, 2003).

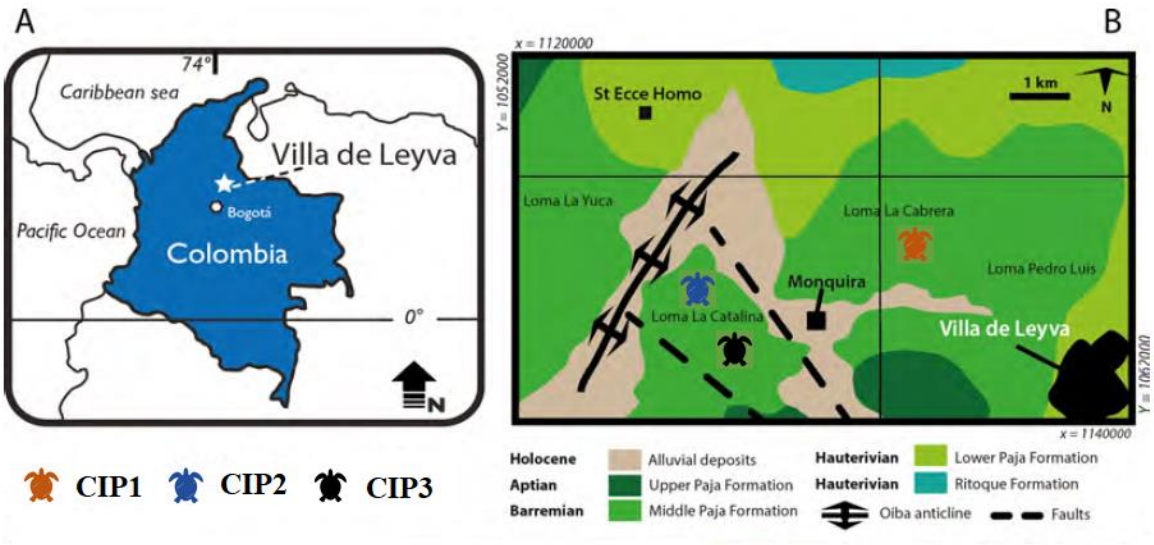


Figura 3: A) Mapa de Colombia donde se señala Villa de Leyva. B) Esquema de la ubicación geografica de las tres tortugas fosiles seleccionadas, con codigos de colección FCG-CBP-91 que en este caso corresponde a CIP1; FCG-CBP-60 que en este caso corresponde a CIP2 y FCG-CBP-75 que en este caso corresponde a CIP3. Tomado y modificado de (Cadena & Parham, 2015)

2.3 Orden Testudine

Las tortugas se caracterizan por presentar una de las estructuras esqueleticas mas especializadas en los vetebrados; una concha, que se compone de un plastrón ventral y un caparazón dorsal, caracteres que son autopomorficos para este grupo (Nagashima, y otros, 2013), lo que a su vez representa un “ejemplo de novedad evolutiva” ya que la concha presenta un rediseño del esqueleto axial, exibiendo una topografia inusual de los elementos musculo-esqueleticos (Kuratani, Kuraku, & Nagashima, 2011).

El caparazón se compone de diferentes placas que la mayoria de veces se distribuyen en 8 neurales, 8 costales, 22 perifericas (11 de cada lado), 1 nucal, 1 o 2 suprapygal y 1 placa pygal. El plastrón esta compuesto por 9 huesos dermicos que contienen elementos que se creen homologos a la clavícula, interclavícula y gastralia que se organizan en 2 epiplastrón, 1 entoplastrón, 2 hyoplastrón, 2 hipoplastrón y 2 xiphiplastrón (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016) (Nagashima, y otros, 2013).

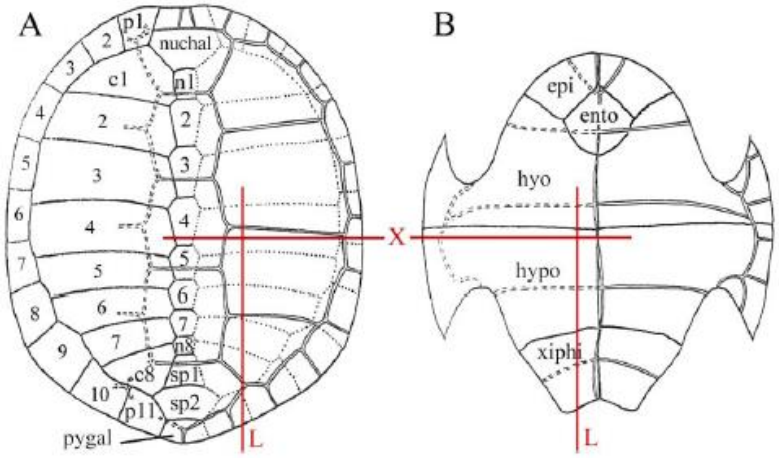


Figura 4: Esquema general de A) caparazón y B) plastrón, de una tortuga moderna. Tomado de (Scheyer T. , 2007)

El caparazón consiste en la columna vertebral (vertebras torácicas) y las costillas, asi mismo su formacion se debe al cambio de posicion de las costillas y la faja pectoral, la comprension de este remodelamiento permite mejor claridad en cuanto a la historia evolutiva del grupo. El patron de desarrollo de las costillas en las tortugas es de crecimiento lateral hacia el primordio del margen del caparzón, mientras que en el resto de tetrapodos crecen ventralmente en la pared lateral del cuerpo, adicionalmente la escápula de las tortugas se encuentra dentro de la caja torácica, en constraste con los demas tetrapodos en donde normalmente se encuentra fuera (Nagashima, y otros, 2013).

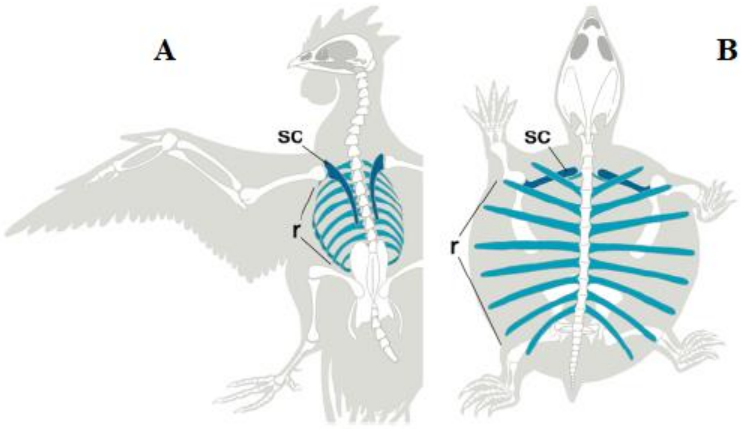


Figura 5: Esquemas de el esqueleto de A) aves y B) tortuga, donde se muestra la relacion topografica entre escápula y costillas. r) Costillas, sc) escápula. Tomado de (Kuratani, Kuraku, & Nagashima, 2011)

Esta serie de caracteres autopomórficos otorga a las tortugas una clasificación taxonómica individual y bastante discutida. El orden Testudines (Batsch, 1788) generalmente se clasificaba a partir de hipótesis morfológicas basadas en análisis osteológicos de material craneal, postcraneal (Scheyer T. , 2007) y macrosestructural de la concha. Sin embargo, se han realizado clasificaciones adicionales a partir del estudio microestructural de la concha (caparazón y plastrón) y de análisis de tipo molecular.

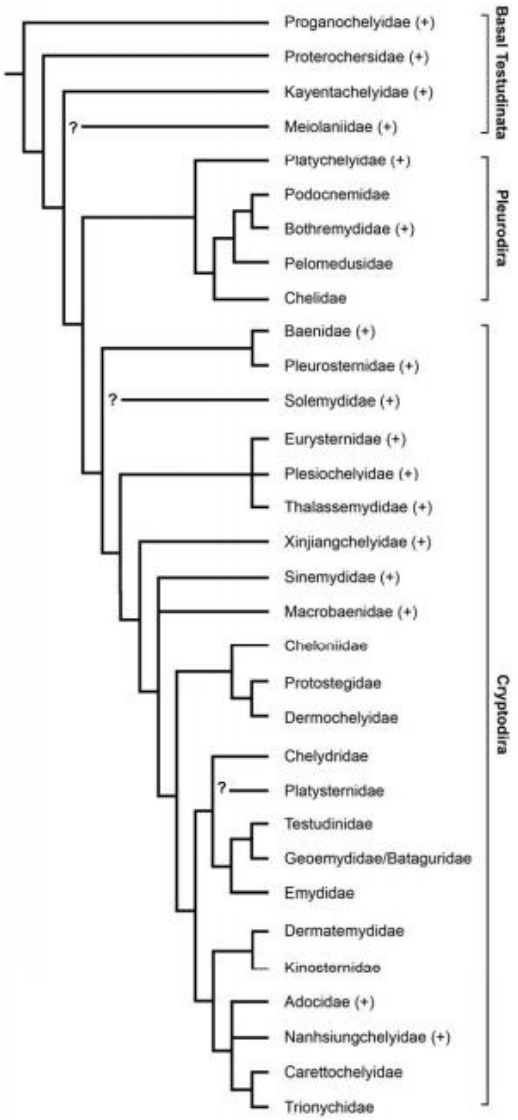


Figura 6: Arbol donde se muestra la hipótesis filogenética de los principales grupos de Testudinata y su interrelacion, basado en los resultados publicados por Gaffney y Meylan (1988), Meylan y Gaffney (1989), Rougier et al. (1995), Gaffney (1996), Hirayama (1998), Sukhanov (2006) y Joyce (2007). Los taxones fósiles estan marcados con una cruz. Tomado de (Scheyer T. , 2007).

Scheyer, 2007, se basa en el árbol filogenético mostrado en la Figura 6 para realizar una descripción microestructural del hueso de la concha, donde se analiza e interpreta cada taxón y grupo, para finalmente elaborar un árbol con todos los taxones muestreados y proponer nuevas posiciones, además de corroborar otras por su fuerte apoyo (Scheyer T. , 2007).

Recientes análisis filogenómicos (Figura 7) confirman que el Orden Testudines se divide en los subordenes monofileticos Cryptodira y Pleurodira. Dentro de Pleurodira se confirman las

familias tradicionales: Chelidae, Pelodusiadea y Podocnemidae donde las dos ultimas son monofileticas, formando un grupo grande y reconocido. En Cryptodira, Trionychia es grupo hermano de todos los demas linajes de Cryptodira (Durocryptodira). Dentro de los cuales Testudinoidea es el grupo hermano de un clado que incluye a todos los otros linajes (Crawford, y otros, 2015).

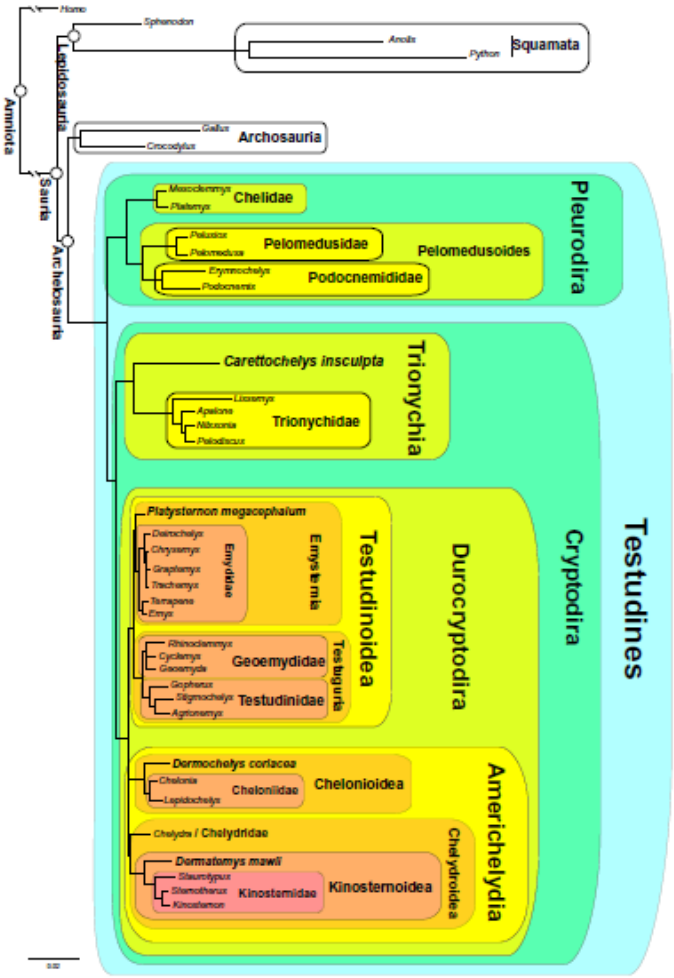


Figura 7: Hipótesis filogenética basada en el análisis RAxML de datos UCE mostrando clados de tortugas filogenéticamente definidos coronas (Testudines). Todos los clados fueron apoyados por porcentaje de bootstrap de probabilidad de 100 excepto para la posición de Chelydra en el árbol de especies STAR, que tiene un soporte bootstrap de 68. Tomado de (Crawford, y otros, 2015)

Adicionalmente (Crawford, y otros, 2015), mediante la combinación de la filogenia UCE y con el amplio registro fósil conocido, reconoce algunos patrones biogeográficos globales,

estos determinados por modelos generales de vicarianza y eventos de dispersión que genera la diversidad de tortugas (Figura 8), donde en términos generales se demuestra que los Cryptodiros tiene un origen euroasiático del Jurásico, lo que se complementa con el origen de Pleurodira en el hemisferio sur. Dada la distribución de los clados y el momento de origen la división geográfica de Pleurodira y Cryptodira puede estar ligada a la desintegración del supercontinente Pangea (Crawford, y otros, 2015).

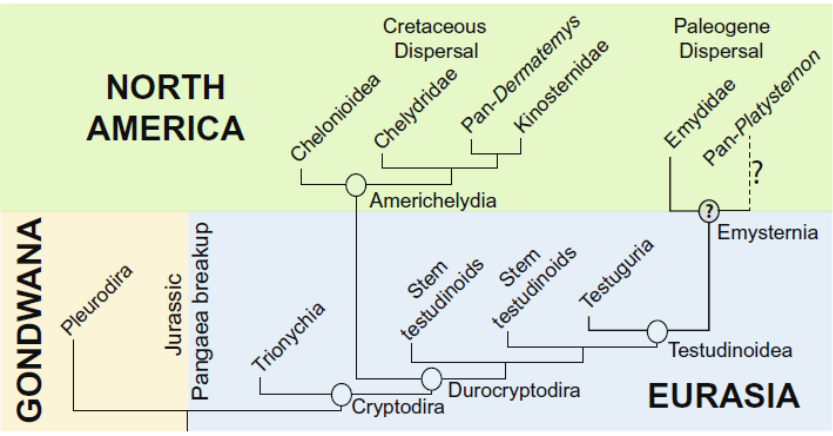


Figura 8: Filogenia UCE mapeada contra la paleobiogeografía intercontinental. Tomado de (Crawford, y otros, 2015)

Sobre las características diferenciales entre Cryptodira y Pleurodira se encuentran el plegamiento del cuello al interior de la concha, en el proceso troclear del hueso ótico y del hueso pteriogoideo, entre otros (Cadena E. , PaLeoT, 2016).

En 1914, Watson propuso a *Eunotosaurus africanus* perteneciente al Guadalupiano Tardío del periodo Pérmico (~260 Ma) como antepasado de las tortugas (Nagashima, y otros, 2013). En el año 2013, se realizó un estudio acerca de la evolución de la concha de las tortugas, en el cual se habla nuevamente de *E. africanus*, este es sugerido como tortuga basal debido a la presencia de algunos caracteres morfológicos que se presentan como únicos en tortugas, estos son: el número reducido de vertebras alargadas, nueve pares de costillas en

forma de T, aparente pérdida de los músculos intercostales, una reorganización de los músculos respiratorios en el lado ventral de las costillas, entre otros (Lyson, Bever, Scheyer, Hsiang, & Gauthier, 2013).

Después de *E. africanus*, las tortugas fósiles más antiguas reportadas son *Odontochelys semitestacea* de China (~220 Ma) y *Proganochelys quenstedti* de Alemania (~208,5 Ma) pertenecientes al Triásico Superior (Nagashima, y otros, 2013). En el periodo Jurásico se encuentra *Condorchelys antiqua* tortuga madre de la Patagonia (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016). En Colombia se encuentra (Figura 9) la tortuga más antigua reportada para el norte de Sur America: *Notoemys zapatocaensis* (~130 Ma) de Cretácico Inferior de Santander (Cadena E. A., 2014). Además, del primer registro de tortuga Sandowind para Suramérica (~120 Ma), perteneciente al periodo Cretácico Temprano (Cadena E. , 2015). Y la más reciente, esta reportada como *Kinosternon sp.* (~16.500 años) del Pleistoceno Tardío (Cadena E. A., 2007).

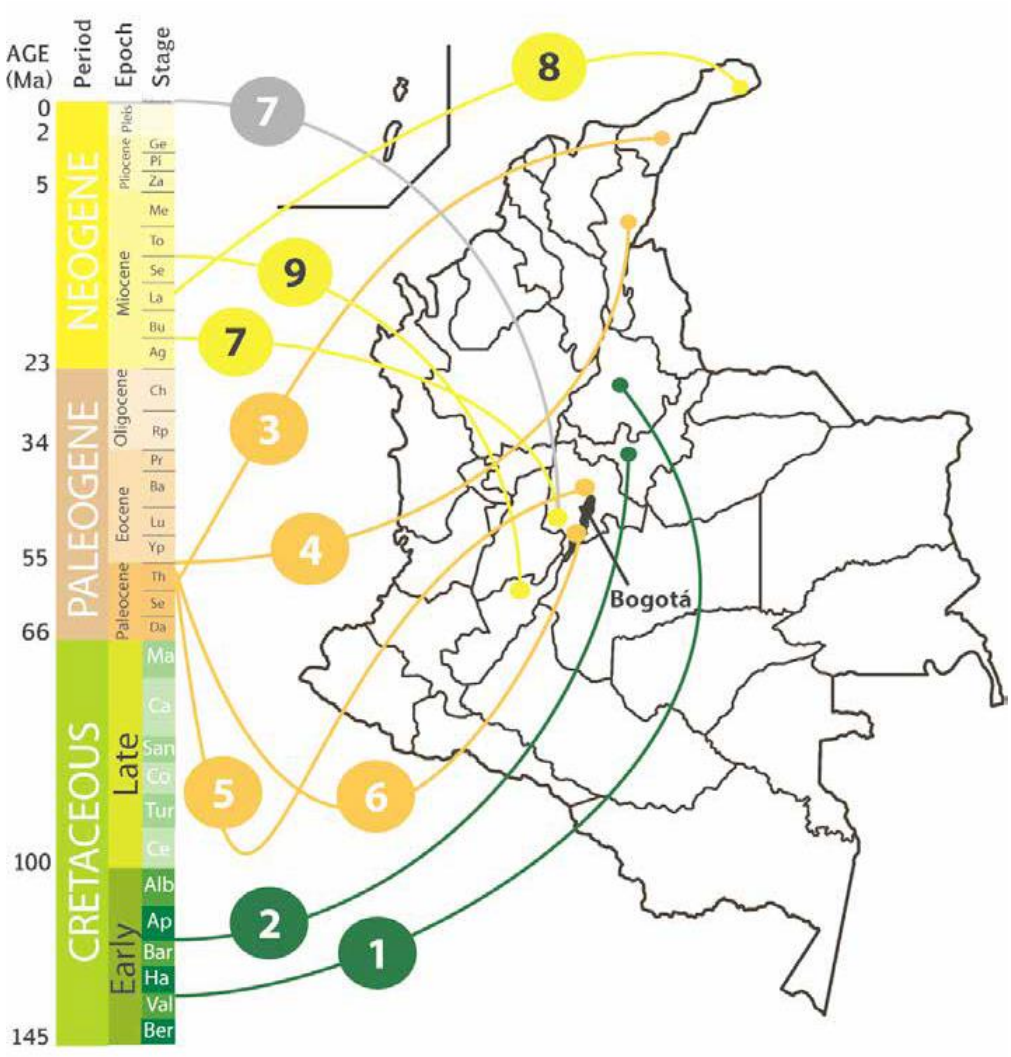


Figura 9: "Mapa de Colombia mostrando las nueve localidades donde se han encontrado tortugas fósiles hasta el momento y su posición en la escala geológica. Localidad 1. Zapatoca, Santander, primer Cretácico (Valanginian); Localidad 2. Villa de Leyva, Bóyac, cretácico temprano (Barremian-Aptian); Localidad 3. Mina de carbón Cerrejón, Guajira, paleoceno medio-tardío; Localidad 4. Mina de carbón Calenturitas, César, Paleoceno-Eoceno; Localidad 5. Nemocón, Cundinamarca, Paleoceno tardío; Localidad 6. Doña Juana Dump, Bogotá D.C, Paleoceno tardío; Localidad 7. Pubenza, Tocaima, Cundinamarca, Mioceno temprano y Pleistoceno tardío; Localidad 8. Castilletes, Guajira, temprano hasta el Mioceno tardío; Localidad 9. La Venta, Villavieja, Huila, medio a tardío Mioceno." (Cadena E. A., 2014)

2.4 Paleohistología

Se refiere al estudio de las microestructuras óseas y dentales de los vertebrados fósiles. La mayoría de investigaciones de este tipo se orientan al análisis de las extremidades y al reconocimiento de los diferentes tipos de tejido óseo, etapas de crecimiento, ontogenia, filogenia, factores biomecánicos que actuaron sobre la muestra (Padian, 2013), las dinámicas

en su desarrollo corporal, tamaño, tasa de crecimiento, longevidad, edad a la cual alcanzaban su madurez sexual, identificación de sexos, modo de histogénesis y relación con tejidos blandos. Durante los últimos 10 años, los estudios realizados en paleohistología han aumentado de manera significativa, esto debido a la gran cantidad de información que se puede encontrar en distintas áreas. (Universidad Nacional de Rio Negro, 2014).

Para el caso de los Testudines estos estudios pueden dar información acerca de los estilos de vida, hábitat y sistemática (Janello, Cerda, & de la Fuente, 2016) ya que, permiten hacer comparaciones histológicas entre especímenes extintos y actuales por medio de la comparación de su microestructura ósea (Scheyer T. , 2007), debido a que hay una variación histológica entre los diferentes tipos de hueso de la concha (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016).

Los estudios paleohistologicos en tortugas empezaron en el año 2007, Scheyer realizó el primer estudio a profundidad de histología ósea comparada en la concha de tortugas marinas y terrestres, resaltando la importancia en el conocimiento de la morfología ósea para la posterior comprensión del desarrollo de la concha (caparazón y plastrón), y afirma que la concha modifica su cito-arquitectura ósea como respuesta a factores filogenéticos, funcionales y ambientales, de tal forma que dichos factores pueden deducirse a partir de la histología ósea y concluye que los estudios paleohistológicos pueden aclarar la historia evolutiva de las tortugas. (Scheyer T. , 2007)

Paralelamente, (Scheyer & Sander, Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles, 2007), realizaron el análisis histológico en tortugas del Triásico superior (201-237 Ma), evidenciando la relación entre la morfología estructural del tejido óseo como resultado de las diferentes adaptaciones de los individuos, determinando que las tortugas acuáticas reducen las capas de hueso cortical y aumentan la vascularización

total del tejido óseo, mientras que las tortugas terrestres presentan una vascularización débil en las capas de hueso compacto.

En el año 2012 Cadena y Schweitzer publican la descripción detallada de la variación morfológica de osteocitos en cada una de las tres capas del caparazón de *Mongolemys elegans*, comparándola con muestras de tortugas actuales y fósiles pertenecientes al Cretácico superior (80 Ma). Reconoció dos morfotipos diferentes de osteocitos: aplanados y estrellados, además demostró que la morfología de estas estructuras se conserva a través de la ontogenia y que las variaciones son filogenéticamente independientes. Finalmente, resalta la importancia de los osteocitos como cápsulas para la preservación de biomoléculas antiguas (Cadena & Schweitzer, 2012)

El paleontólogo Edwin Cadena y su homóloga Mary Schweitzer realizan un estudio acerca de la preservación de vasos sanguíneos de una tortuga perteneciente al Paleoceno-Eoceno hallada en la mina de carbón Calenturitas, Colombia, donde demuestran la preservación orgánica de osteocitos y vasos sanguíneos, y determinan que la preservación de estas estructuras óseas es independiente del tipo de hueso, sitio fósil o localidad en la que se encuentre. (Cadena & Schweitzer, 2014).

Algunos procedimientos paleohistológicos conllevan la destrucción del material que se va a analizar. Los huesos como el fémur y la tibia representan un gran valor en la determinación taxonómica de las especies fósiles, por lo cual, generalmente no se hace uso de estas piezas para los análisis histológicos. Por lo anterior, lo más adecuado (para un primer análisis) siempre será la selección de huesos o fragmentos fósiles que no tengan valor taxonómico alguno. (Talevi, 2012)

2.4.1 Técnicas Paleohistológicas

Para el análisis microestructural de muestras fósiles, se han utilizado diferentes técnicas, que brindan diferentes interpretaciones y conclusiones (Tabla 1).

Tabla 1: Tabla de comparacion de protocolos para los analisis palehistológicos.

PROTOCOLO	USOS	TIEMPO EMPLEADO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Sección delgada en Microscopio petrográfico.	Determinar: • Tasas de Crecimiento (Talevi, 2012) (Orlandi, Jordana, Moncunill Solé, & Köhler, 2016). • Grado de compactación ósea. (Talevi, 2012). • Preservación microestructural (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016). • Atributos tafonómicos (Tomassini, Miño Boilini, Zurita, Montalvo, & Cesaretti, 2015). • Inferencias Paleobiológicas y Paleoecológicas (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016). • Microestructura ósea (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016) (Janello, Cerda, & de la Fuente, 2016). • Cambios ontogénicos (Jordana, Marín Moratalla, Moncunill Solè, Nacarino Menesesa, & Köhler, 2016). • Sistemática (Scheyer T. , 2007). • Entre otros	Aproximadamente 3 días por sección.	• Observación In Situ del tejido. • La sección puede observarse las veces que sea necesario tras su terminación. • La sección puede hacer parte de una colección paleontológica. • Brinda mayor información de las características globales del tejido. • Hasta el momento es la técnica más usada en paleohistología. • En luz polarizada se pueden hace análisis de los minerales presentes.	• La obtención de las secciones es parcialmente destructiva. • Errores en la elaboración pueden generar la perdida irrecuperable de la muestra (por tal razón es importante la conservación de testigos).
Sección delgada en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)	Determinar: • Densidad de lagunas de osteocitos (Bromage, y otros, 2016).	• Elaboración de secciones: 5 horas aprox.	• En algunos casos la destrucción de la muestra es nula, ya que es posible	• Pretratamiento costoso en términos de tiempo, recursos.

	• Preservación microestructural (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016) • Alteraciones microestructurales (López, y otros, 2012) (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016).	• Metalizado: 2 horas aprox. • Observación : 3 horas por muestra aprox.	trabajar a partir de réplicas de resina. • Permite observar superficies y estructuras internas. • Aporta una visión más detallada que con otros microscopios • Obtención De información de tipo cuantitativo.	
Sección delgada en Microscopio óptico de Fluorescencia.	Determinar: • Características histológicas del tejido óseo. (Nacarino Meneses, 2011) • Determinar la presencia de materia orgánica. (Nacarino Meneses, 2011)	• Elaboración de secciones: 5 horas aprox. • Observación : 3 horas por muestra aprox.	• Análisis de procesos celulares. • Morfología de organelos citoplasmáticos. • Cortes ópticos y reconstrucción en 3D	• En la mayoría de casos es necesaria la utilización de flourocromos que pueden destruir las muestras, además de ser costosos y muy específicos
Desmineralización de fragmentos fósiles.	Determinar: • Aislamiento de osteocitos y vasos sanguíneos (Cadena & Schweitzer, A Pelomedusoid Turtle from the Paleocene–Eocene of Colombia Exhibiting Preservation of Blood Vessels and Osteocytes, 2014).	• 20 días	• Aislamiento individual de osteocitos y vasos sanguíneos. • Claridad en la observación. • Determinar la preservación de células fósiles.	• La obtención de las muestras es totalmente destructiva. • Dificultad para conservar estas estructuras. • Observación una única vez.
Análisis de rayos X.	Determinar: • Grado de remodelación ósea (Palombo & Zedda, 2016).	--	• La destrucción de la muestra es nula.	• Es necesaria la buena conservación y preservación fósil.

2.5 Tejido óseo.

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que proporciona a los vertebrados sostén y protección (Nacarino Meneses, 2011). Está conformado por dos matrices diferentes: la inorgánica que le concede dureza, y la orgánica compuesta por sustancia fundamental y

fibras colágenas que le aportan elasticidad (Fortoul & Castell, 2010). Una de las principales disimilitudes con otros tejidos es la capacidad de mineralización que se produce gracias a los cristales de hidroxiapatita, que le otorgan solidez. Por otra parte, cumple la función metabólica de almacenar iones de calcio y fosfato (Ross & Pawlina, 2015).

El tejido óseo se clasifica de dos formas diferentes a nivel macroscopico: el cortical o compacto que no presenta espacios vacios aparentes y se encuentra en la parte externa del hueso; el tejido óseo trabecular o esponjoso esta formado por finas trabeculas dispuestas azarosamente en distintas direcciones dejando un espacio vacio que es ocupado por la medula ósea y se encuentra en la parte interna del hueso. El porcentaje de hueso trabecular con respecto al cortical varia dependiendo de la ubicación y tipo de hueso (Geneser, Brüel, Ilso Christensen, Qvortrup, & Tranum Jensen, 2012).

A nivel microscopico, el hueso se encuentra dispuesto de forma escalonada (Figura 10), en primer lugar se encuentra el nivel sub-nanoestructural, en el cual se encuentra una fase mineral conformada por cristales de hidroxiapatita que estan estrechamente relacionados entre sí y se agrupan con las fibrillas colagenas, estas a su vez forman las fibras de colageno que se encuentran en el nivel nano estrucural (Rogel, Hongjin, & Ameer, 2008), allí ocupan aproximadamente del 80–90% de los compuestos organicos del hueso.

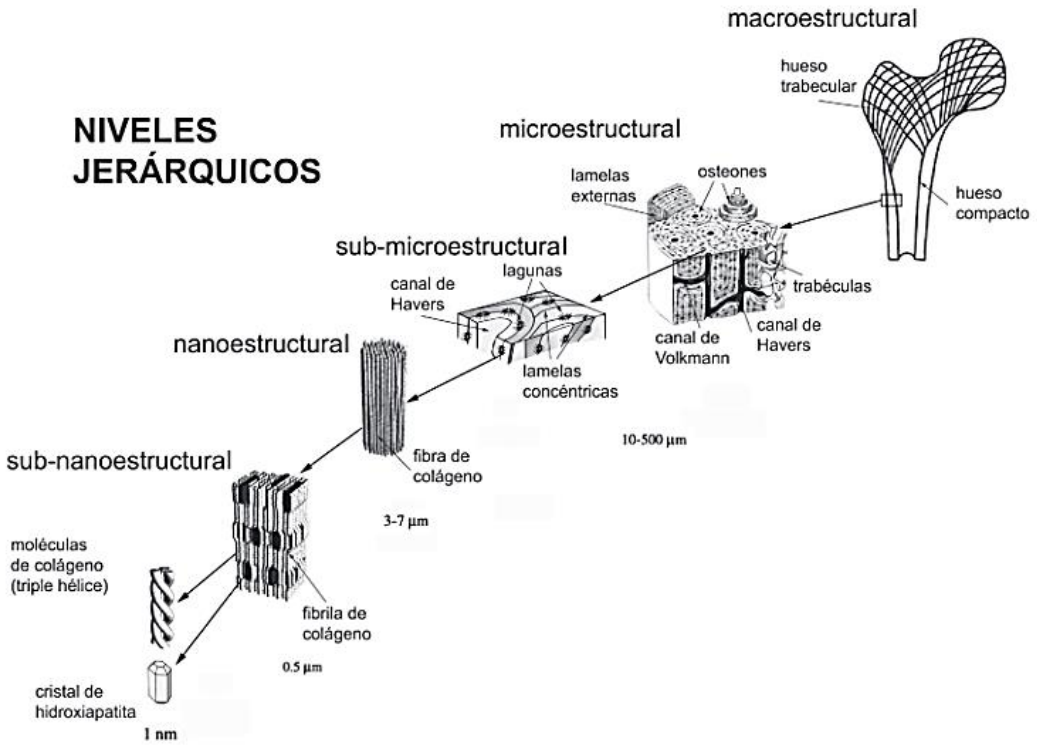


Figura 10: Tomado de (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016)

En el nivel sub-microestructural se encuentran las laminas concentricas (o anillos concentricos) que rodean a los sistemas de Havers (osteonas) y se conectan de manera perpendicular por medio de los sistemas de Volkmann. Estos sistemas permiten el paso de vasos sanguineos; las osteonas se encuentran cercadas por una linea de cementación, las laminas intesticiales que son producto de la reestructuración ósea se encuentran entre estas (Fortoul & Castell, 2010). En el siguiente nivel, se observan las laminas externas que se encuentran anteriormente al periostio, y las laminas internas que se encuentran anteriores al endostio trabecular donde no se encuentran conductos Haversianos ni de Volkmann, debido a que allí no hay paso de vasos sanguineos, pero se observan osteonas trabeculares que presentan forma de disco aplanado. En este nivel se pueden diferenciar las celulas óseas, estas se diferencian en cinco tipos: celulas osteoprogenitoras, osteoblastos, steocitos, celulas

de recubrimiento óseo y ostoeclastos (Geneser, Brüel, Ilso Christensen, Qvortrup, & Tranum Jensen, 2012).

Las células osteoprogenitoras derivadas de las células madre durante la estructuración del hueso se dividen y especializan en osteoblastos, que se ubican en la porción interna del periostio y del endostio, constituyendo los huesos y sintetizando los componentes de la matriz e iniciando el proceso de calcificación. De los osteoblastos se generan los osteocitos, que son células maduras que llevan a cabo aproximadamente 50 procesos celulares, y se encuentran dentro de la matriz celular que produjo el osteoblasto antes de su transformación. Al observar una muestra en microscopio electrónico de barrido se pueden reconocer diversas variaciones en el estado funcional de los osteocitos. En efecto hay indicios histológicos y microradiologicos (p. ej., aumento del tamaño de las lagunas y disminución de la radiodensidad). Se han descrito hasta ahora tres estados funcionales para los osteocitos, cada uno de ellos posee una morfología distinta: (Ross & Pawlina, 2012)

- Osteocitos latentes, presentan escasez de retículo endoplasmático rugoso (RER) y un aparato de Golgi muy reducido. Bien adherido a su membrana celular se ve una lámina osmiófila que corresponde a la matriz calcificada madura. (Ross & Pawlina, 2012)
- Osteocitos formativos, exhiben indicios de formación de matriz y presentan ciertas caracteristicas similares a las de los osteoblastos (RER y aparato de Golgi son abundantes y se observa osteoide en el espacio pericelular dentro de la laguna). (Ross & Pawlina, 2012)

- Osteocitos resortivos, de igual manera que los osteocitos formativos, contienen una gran cantidad de cisternas del retículo endoplasmático y un aparato de Golgi bien desarrollado, Con lisosomas bien visibles. (Ross & Pawlina, 2012)

Adicionalmente se encuentran los osteoclastos que se caracterizan por ser muy grandes, ya que fueron formados por la fusión de 50 monocitos, se ubican en el endostio y su función principal es la destrucción del hueso por medio de enzimas lisosómicas para permitir el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso (Universidad Complutense, 2014).

La formación del hueso se divide en dos clasificaciones: desarrollo intramembranoso y desarrollo endocondral. La primera, se da gracias a la migracion de celulas mesenquimatosas y su establecimiento en areas concretas, en estas zonas se producen los centros de oscificacion donde las celulas se alargan y se especializan en celulas osteoprogenitoras y expresan un factor de transcripcion que es necesario para la diferenciacion de los osteoblastos (Ross & Pawlina, 2012). Estos a su vez, producen espiculas y trabeculas de osteoide, a medida que el osteoide se mineraliza los osteoblastos quedan atrapados y posteriormente se convierten en osteocitos. El tejido circundante se vasculariza a manera de malla lo que da lugar a la medula ósea, las trabeculas y espiculas aumentan su tamaño debido al gran número de osteoblastos (Fortoul & Castell, 2010).

En cuanto al desarrollo endocondral, se da en un principio de la misma manera que el intramembranoso, con acumulacion de celulas mesenquimaticas que son inducidas por factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y proteinas morfogenicas óseas, porteriormente producen colageno tipo II y se transforman en condroblastos productores de matriz cartilaginosa, que modelan una estructura de cartilago hialino con la forma del futuro

hueso. Posteriormente, esta primera estructura crece gracias a la multiplicacion de los osteoblastos y la generacion de matriz cartilaginosa, luego las celulas del pericondrio que se encuentran en el centro de la estructura detienen la produccion de condrocitos y se originan osteoblastos, formando así una capa de tejido óseo alrededor de la estructura cartilaginosa denominada collar óseo que empieza la formacion del periostio (Ross & Pawlina, 2015). Los condrocitos que se encuentran bajo el collar óseo se hipertrofian y se da un proceso de resorcion de la matriz cartilaginosa que posteriormente se calcifica, debido a la calcificacion se da una muerte celular en los condrocitos, dejando lagunas que poseteriomente se vascularizaran a medida que los vasos sanguineos perforen el periostio. Luego de la vascularización, entran celulas osteoprogenitoras y hematopoyeticas (que formaran la medula ósea) (Fortoul & Castell, 2010).

2.5.1 Procesos de fosilización

Hay tres procesos distintivos comúnmente usados para definir las etapas de cualquier fósil: la muerte, el enterramiento y el descubrimiento. Estos sucesos están definidos en dos subcategorias: Bioestratinomia y Diagenesis que se encuentran enmarcados en la definición global de tafonomía (Fernandez, 2000). La tafonomía es el campo de la paleontología que investiga la creación de los yacimientos fósiles y los procesos de fosilización, en los cuales se dan los procesos de mineralización de los restos orgánicos (Fernandez, 1998). La bioestratinomía es el área encargada de estudiar los factores que actúan sobre un organismo desde el momento en el que perece hasta el momento en el que es enterrado (Müller , 1992).

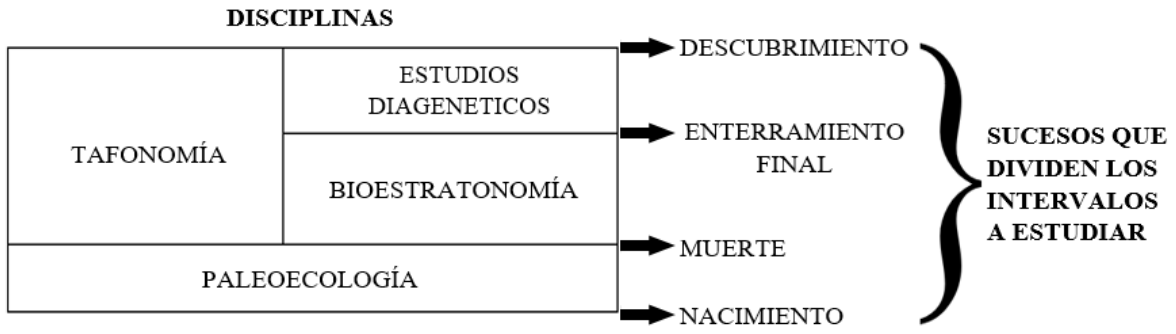


Figura 11:Descripción de las disciplinas que estudian las etapas de los individuos fosilizados. (tomado de Patarroyo Gama 2005)

La diagénesis hace alusión a los eventos de alteración físico-química ocurridos a diferentes profundidades (modificaciones internas y externas) (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016). Los procesos diagenéticos afectan diferentes niveles del hueso actuando en las fases orgánica y mineral, este ciclo es producido por diferentes organismos y condiciones ambientales (Tütken & Vennemann, 2011). Las alteraciones suceden al poco tiempo de la muerte del individuo (Bell, Skinner, & Jones, 1996) y los factores que actúan sobre el individuo son: el tiempo, la temperatura y la presión (Patarroyo Gama, 2005). Una de las primeras y más importantes etapas de alteración diagenéticas en los huesos (Koon, O'Connor, & Collins, 2010) es la hidrolisis y/o acceso microbiano, que genera la pérdida del colágeno (Collins, Nielsen-Marsh, Hiller, & Smith, 2002).

Otra de las fases importantes en la diagénesis ósea en su parte inorgánica es la cristalinidad. Una vez el organismo muere, los cristales de bioapatita entran en un estado de inestabilidad, lo que facilita el intercambio químico con el ambiente que lo rodea (Gutierrez, Martínez, & Nielsen-Marsh, 2001) lo que conlleva a su disolución y recristalización, generando un aumento en el tamaño de los cristales de apatita (Trueman, Behrensmeyer, Tuross, & Weiner, 2004). La integracion de carbonatos en la estructura mineral provoca cambios físicos y químicos en los huesos. La incorporación de calcita en los poros de la

superficie ósea, incrementa los valores de carbono-fosforo aunque no genera modificaciones físicas ni químicas en los huesos (Gutierrez, Martínez, & Nielsen-Marsh, 2001)

2.6 Paleohistología en Testudines

La concha de las tortutgas como carácter autopomorfico ha sido de gran interes para los investigadores, ya que a partir de esta se pueden revelar aspectos de la biologia de las tortugas y su evolucion (Cadena & Schweitzer, 2012), en el caso de los registros fosiles la palehistologia ha sido una herramienta de gran utilidad que ha permitido realizar diferenetes inferencias de tipo paleoecologico (Scheyer & Sander, 2007), sistematico, anatomico y lo relacionado con el origen y desarrollo de la concha (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016); de la cual se tiene un amplio cococimeinto a nivel macroestructural, pero a nivel microestructural era desconocido hasta hace unos años.

(Scheyer T. , 2007) determina que la histología del hueso de la concha (caparazón y plastrón); tomando muestras de tortugas fosiles y actuales, donde encuentra microestructuras caracteristicas que son autopomorfias para ciertos clados de Testudines (Scheyer & Anquetin, 2008); logrando determinar relaciones filogeneticas y aspectos funcionales, proponiendo que la concha es el resultado de dichos factores, que a su vez influyen directamente en las propiedades microestructurales, con lo que la palehistología junto a otras areas puede elaborar clados mucho mas robustos y precisos (Scheyer T. , 2007).

La histología de la concha ha permitido determinar que los huesos de esta consisten en una estructura diploe, donde el tejido esponjoso esta enmarcado por las cortezas internas y externas. La corteza externa en su gran mayoria esta compuesta por haces de fibras estructurales, miestras que la histologia de la corteza interna es más variable, exhibiendo haces de fibras estructurales y/o hueso de fibras paralelas. Esta variación histológica en la

corteza interna tambien, permite discernir entre diferentes tipos de placas. El hueso esponjoso está sobre todo bien desarrollado y está conformado por finas trabéculas compuestas de tejido óseo laminar secundario. El predominio de haces de fibras estructurales en los huesos de la concha indica el importante papel que juega la metaplasia durante el desarrollo de la concha en algunos taxones analizados. (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016), ademas de que la disposicion y la densidad de osteonas tambien permite determinar los habitos que tenial los especimenes fosiles (dulceacuicolas, marinos o terrestres).

A partir de dichas capas establecidas, se han empezado a describir las caracteristicas especificas de cada una, usando diferentes técnicas y metodologias, logrando identificar la presencia de células fósiles (osteocitos) y a su vez determinar caracteristicas morfologicas para cada uno, defininedo que dichas formas son especificas para cada capa (Cadena & Schweitzer, 2012).

Se reconocen dos diferentes morfotipos de osteocitos, (1) Osteocitos aplanado-achatado, abundantes en la corteza interna y en las laminillas de osteonas secundarios; (2) Osteocitos estrellados, presentes en las laminillas intersticiales, entre osteonas secundarias y corteza externa. Demostrando ademas que la morfologia de los ostecitos en cada una de las tres capas de hueso se coinserva a travez de la ontogenia, tambien demuestran que las variaciones morfologicas son filogeneticamente independientes , asi como independientes del origen del hueso (intramembranoso o edocondral) (Cadena & Schweitzer, 2012)

Por otra parte la identificación histologica en fosiles de ortuga a permitido estabecer la preservacion de otras estructuras organicas como vasos sanguineos, permiten estrablecer nuevas preguntas de investigacion en torno a los componenetes moleculares,recuperacion de secuencias de proteinas de dichas estructuras (Cadena & Schweitzer, 2014) (Cadena & Schweitzer, 2012)

(Cadena, Ksepka, & Norell, 2012) tambien determinaron que el uso de la palehistología en tortugas fósiles, especificamente en el analisis de la Densidad Osteocitica por Volumen de Hueso (VOD) podria estar directemenete relacionada con la masa corporal, documentandose una reducción importante en la densidad de osteocitos con el aumento de la masa corporal en mamiferos, ranas, lagartos y serpientes, con implicaciones para vertebrados, esto indica que el VOD podria ser util en el estudio de organismos fosiles, para ayudar a la estimacion de la masa corporal de muestras que se encuentran desarticuladas.

3 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

3.1 MATERIALES O RECURSOS

3.1.1 Equipos.

Cortadora marca Ingram, modelo 135

Cortadora marca Minosercar

Devastadora marca Ingram, modelo 400

Dremel con disco pequeño

Martillo hidráulico

Micropipeta de 10-100µl

Microscopio biológico, marca Leyca

Microscopio electrónico de barrido, marca FEI-Quanta 200, modelo 2000

Microscopio petrográfico, marca Motic referencia, BA310 Pol Binocular

Spputtering de recubrimiento cátodo de oro, marca Quorum 150r, modelo 2015

3.1.2 Material biológico.

Fragmento fósil, ejemplar CIP1

Fragmento fósil, ejemplar CIP2

Fragmento fósil, ejemplar CIP3

3.1.3 Reactivos.

Carbono 1000 (30gr)

Carbono 400 (50gr)

Carbono 600 (50gr)

EDTA 0.5M-pH 8.0 (4Lt)

Nitrogeno líquido (2Lt)

Resina epoxica (1Lt)

Termoplástico marca Buehler (1 barra)

Termoplástico marca Lakeside L70C (1 barra)

3.1.4 Vidriería.

Cajas de petri

Cubreobjetos

Portaobjetos convencionales

Portaobjetos petrográficos

3.1.5 Otros.

Calibrador pie de rey (1)

Cámara fotográfica (1)

Cincel y martillo pequeño

Cinta métrica (1)

Filtro con poro de 0.22µm (50)

Guantes de nitrilo (2 cajas)

Material de bioseguridad (Bata de laboratorio, Gafas de seguridad, Tapabocas)

Portafiltros con membrana intercambiable (20)

Puntas para micropipeta de 10-100µl

Recipientes de plástico

Tubos Falcon (12)

3.2 PROCEDIMIENTOS

3.2.1 Selección de material fósil.

El material fósil utilizado en el presente estudio fue donado por el Centro de Investigaciones Paleontológicas de Villa de Leyva (CIP) (Figura 12). Los ejemplares reposan en la colección paleontológica del centro; los criterios de selección se basaron en la buena conservación externa y en que las muestras no hayan sido sometidas a ningún proceso de curaduría con agentes químicos.



Figura 12. Fotografía del CIP, tomada por Andrea Caballero.

Los tres fósiles se encuentran registrados bajo los códigos de colección: FCG-CBP-91, FCG-CDP-60 y FCG-CBP-75. Cabe resaltar que no se tuvo en cuenta identificación taxonómica ni partes anatómicas de los individuos para la selección, razón por la que no se realizaron inferencias de tipo filogenético, paleoecológico o fisiológico. No obstante, para la caracterización del material fósil se tuvo en cuenta los criterios definidos desde la paleontología sistemática, tales como material referido, localización, horizonte y edad (Cadena & Schweitzer, 2014).

Adicionalmente en el presente trabajo se asigna un código provisional para cada muestra (CIP1, CIP2 y CIP3) con el fin de facilitar su comprensión. A continuación, se da una descripción básica de cada una de las muestras.

CIP1:

- *Material referido*: **FCG-CBP-91.** Fundación Colombiana de Geología - Carlos Bernardo Padilla. En el presente estudio se codificó como CIP1 (Figura 13). Corresponde al cráneo y algunos huesos de la región anterior. Fósil de tortuga clasificada en el orden Testudines por Mary Luz Parra, fue encontrada en el año 2012 por el señor Alirio González y donada por el mismo al CIP. De este fósil se seleccionó un hueso largo en aparente estado de conservación, el cual fue retirado posterior a la realización del molde hecha por investigadores del CIP (Figura 14).
- *Localización*, No se pudo determinar su procedencia geográfica exacta dado que ingreso a la colección por proceso de donación; sin embargo, la información brindada por los investigadores del CIP, señala que proviene de Loma La Cabrera.
- *Horizonte y Edad*. Formación Paja, Cretácico Inferior. Etayo-Serna (1979) indica un rango de edad que va desde Hauteriviense hasta el Atípense (~132,9 a ~113,0) (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017).



Figura 13. Fotografía del fósil CIP1, tomada por Fredi Bolivar.



Figura 14: A) Fotografía de fósil CIP1, B) Hueso largo (clavicula) extraido. Elaboración propia.

CIP2:

- *Material referido:* **FCG-CBP-60** (Fundación Colombiana de Geología - Carlos Bernardo Padilla), con parte de la columna vertebral (1,87 cm de cuello a cola). Tortuga encontrada por Juan Parra, Mary Luz Parra y Arcadio Parra. Para mayor facilidad en el presente trabajo se denominó como CIP2. Para tomar la muestra de este espécimen se tuvo en cuenta la buena conservación morfológica de la columna del individuo, y se tomó una de las secciones que menos comprometía al registro (Figura 15).
- *Localización:* Loma La Catalina, Sector Monsalve, Villa de Leyva, Colombia.
- *Horizonte y Edad:* Formación Paja, Cretácico Inferior. Etayo-Serna (1979) indica un rango de edad que va desde Hauteriviense hasta el Atípense (~132,9 a ~113,0) (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017).



Figura 15: Fotografía de fragmento y ubicación en el fósil de CIP2. Elaboración propia.

CIP3:

- *Material referido:* **FCG-CBP-75** (Fundación Colombiana de Geología - Carlos Bernardo Padilla), tortuga encontrada por Juan Parra. Para mayor facilidad en el presente trabajo se denominó como CIP3 (Figura 16). De este espécimen se tomó un fragmento que no pudo ser ubicado en el plano general, pero que claramente hacia parte del caparazón de este individuo (Figura 17), el cual está casi completo, huevos y aleta proximal (76 cm de parte más anterior a parte más posterior y 61 desde aleta hasta parte medial).
- *Localización:* Loma La Catalina, Sector Monsalve, Villa de Leyva, Colombia.
- *Horizonte y Edad:* Formación Paja, Cretácico Inferior. Etayo-Serna (1979) indica un rango de edad que va desde Hauteriviense hasta el Atípense (~132,9 a ~113,0) (Finney, Cohem, & Gibbard, 2017).



Figura 16: Fotografia de fosil CIP3. A) Parte de caparazón encontrado. B) Aleta proximal. Elaboracion propia.

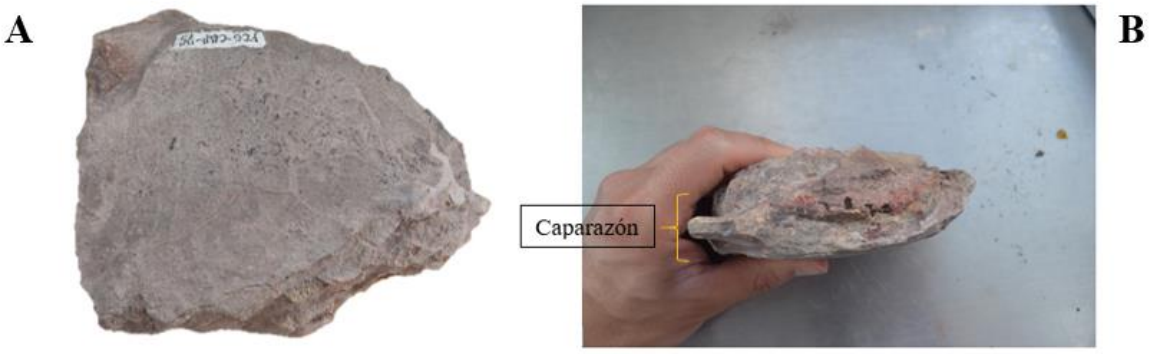


Figura 17: Fotografía de, A) Fragmento seleccionado de CIP3, B) Observacion de caparazón en vista transversal. Elaboración propia.

3.2.2 Realización de técnicas específicas para análisis histológico.

Los procedimientos específicos para análisis histológico se realizaron de acuerdo con las técnicas *In situ* y *Ex situ*, donde se selecionaros 3 protocolos partir de la tabla 1; de los cuales se han obtenido resultados satisfactorios en las diferentes investigaciones palehistológicas: 1) **Sección delgada en Microscopio petrográfico;** 2) **Sección delgada en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB);** 3) **Desmineralización de fragmentos óseos.** A

continuación (Figuras 18, 19 y 20) se muestran los esquemas de cada fragmento usado, así como los procedimientos que fueron llevados a cabo con cada fracción obtenida.

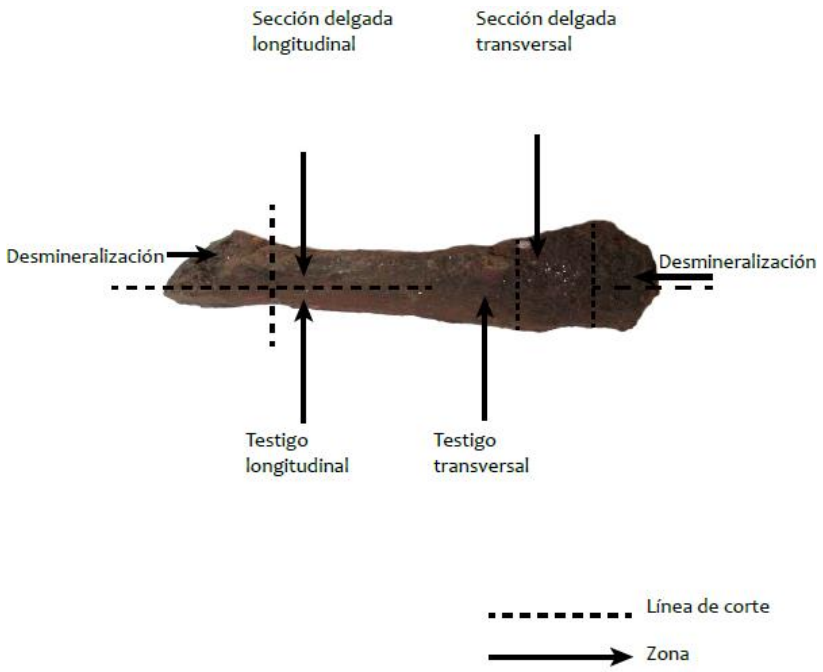


Figura 18: Planos de corte de CIP1 para los distintos protocolos. Elaboración propia.

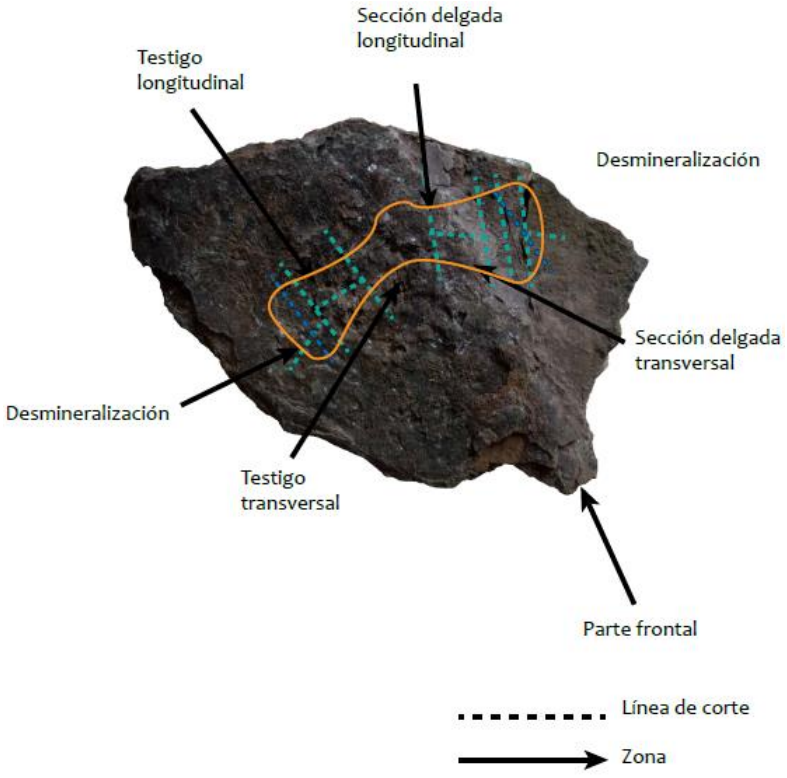


Figura 19: Planos de corte de CIP2 para los distintos protocolos. Elaboración propia.

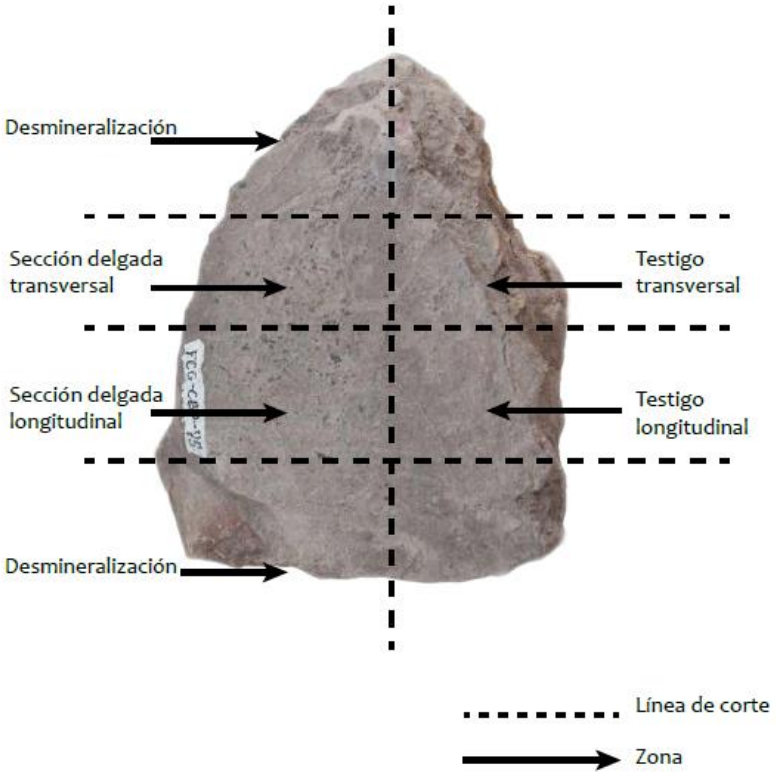


Figura 20: Planos de corte de CIP3 para los distintos protocolos. Elaboración propia.

3.2.2.1 Técnica 1. *In situ.*

El termino *In situ* es ampliamente utilizado en distintos campos científicos, en este caso hace referencia a la identificación de tejido óseo dentro de una muestra original de cada uno de los individuos.

De acuerdo con lo señalado por Chinsamy y Raath (1992), antes de realizar cualquier modificación en las muestras, se tomaron registros de datos que contienen forma, tipo de hueso, tamaño y diagrama de cortes. Posteriormente se realizó una toma fotográfica de cada uno de los huesos, antes y después de cada proceso, debido a que los protocolos llevados a cabo generan la perdida inevitable de cierta cantidad de material.

3.2.2.1.1 Elaboración de secciones delgadas para la observación en microscopio petrográfico.

Para la realización de secciones delgadas se tuvo en cuenta el protocolo de elaboración de secciones petrográficas estándar propuesto por Chinsamy y Raath (1992). El cual fue realizado en el Departamento de Geociencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

1. Medición y registro de datos.
2. Inmersión en resina de la muestra a examinar.
3. Las muestras fueron cortadas, con una cortadora punta de diamante marca Ingram, modelo 135 y marca Minosercar.
4. Cada uno de los cortes se fijó con termoplástico temporalmente a un portaobjetos.
5. Se desbastó (Devastadora marca Ingram, modelo 400) una de las superficies hasta lograr una superficie homogénea que ira contra el portaobjetos definitivo.
6. Se colocó el portaobjetos definitivo a la superficie lijada, y se retiró el portaobjetos temporal.
7. Se homogenizó la superficie a la cual se le retiro el portaobjetos para posteriormente lijar manualmente.
8. Se lijó la muestra con carbono 1000, carbono 600 y carbono 400, hasta la observación deseada (40µm aproximadamente).
9. Se observó en microscopio óptico de luz trasmitida marca Leica, con el fin de identificar estructuras y posteriormente en microscopio petrográfico, marca Motic referencia, BA310 Pol Binocular con el uso y sin el uso de polarizador (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016).

9.1.Las muestras se observarón de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

9.2. Posteriormente se realizó el registro fotográfico.

(Chinsamy & Raath, 1992)

Al momento de realizar cada uno de los cortes se debe tener precaución para evitar accidentes, adicionalmente quien realice el procedimiento deberá usar gafas de seguridad y bata de laboratorio.

3.2.2.1.2 Elaboración de testigos para observación en SEM (Scanning Electron Microscope) y análisis EDS (Espectroscopía de Energía Dispersiva)

Los testigos (secciones) fueron realizados en el Departamento de Geociencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; la observación en SEM y el análisis EDS en el laboratorio de microscopia de la Universidad de los Andes.

1. Medición y registro de datos.
2. Inmersión en resina de la muestra a examinar.
3. Cortar pequeñas muestras de $1cm^2$ por 5mm de espesor (Chávez Aponte, y otros, 2008), con una cortadora punta de diamante.
4. Las muestras serán llevadas al laboratorio de microscopia, donde deberán estar secas y además serán recubiertas o metalizadas con un material conductor (Universidad Politécnica de Valéncia, 2012), para este caso se usó la técnica *Spputtering* con un recubrimiento de cátodo de oro, marca Quorum 150r, modelo 2015; para obtener mejor calidad en la imagen. (López, y otros, 2012)

5. Se observaron de las muestras en el SEM a diferentes escalas de aumento y tomaron fotografías.
6. Se realizo análisis EDS con el fin de identificar los elementos presentes en las muestras (López, y otros, 2012).

3.2.2.1.3 Criofractura de testigos para observación en SEM (Scanning Electron Microscope).

De las muestras de $1cm^2$ por 5mm de espesor, realizadas en el procedimiento anterior (2.2.3.1.2.), se realizaron criofracturas con nitrógeno líquido, en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Distrital (BIOMOL); la observación se realizó en SEM y el análisis EDS en el laboratorio de microscopia de la Universidad de los Andes.

1. Con un Dremel se realizó una muesca en cada una de las muestras, por donde se desea realizar el corte.
2. Se coloco cada muestra en un recipiente de plástico y se agregó nitrógeno líquido hasta que quedaron totalmente cubiertas.
3. Cuando el nivel de burbujeo disminuyo de manera notable, se agregó de nuevo nitrógeno, se repitió una vez más.
4. Se sacaron las muestras de los recipientes, con un martillo y un cincel pequeño se dieron golpes secos por la muesca, para lograr fragmentarla.
5. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de microscopia de la Universidad de los Andes, donde se metalizaron con un material conductor (Universidad Politécnica de Valéncia, 2012), para este caso se usó la técnica *Spputtering* con un recubrimiento de cátodo de oro, marca Quorum 150r, modelo 2015; para obtener mejor calidad en la imagen. (López, y otros, 2012)

6. Observación de las muestras en el SEM a diferentes escalas de aumento y toma de fotografías.

3.2.2.2 Técnica 2. *Ex situ*.

En este caso, el termino se refiere al aislamiento de células fósiles, para lo cual es necesaria la modificación estructural de las muestras, lo que genera perdida de la composición y modificación de sus propiedades (Cadena & Schweitzer, 2014).

3.2.2.2.1 Desmineralización con EDTA para el aislamiento de tejido óseo y observación en microscopio óptico.

1. Se tomaron 4 muestras pequeñas de cada fragmento fósil, para un total de 8 muestras de $1cm^2$ x 0.5 cm de espesor, las cuales se obtuvieron mediante el uso de las cortadoras, de disco con borde continuo, marca Minosecar y marca Ingram, modelo 135.
2. Se colocaron los pequeños trozos de muestra en cajas de petri, separados y marcados.
3. Se agrego ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 0.5M pH 8.0, previamente filtrado con membrana de poro 0.22µm) hasta cubrir toda la muestra.
4. Se realizaron cambios de EDTA cada 5 días, hasta lograr observar material óseo.
5. Se coloco 100µl en un portaobjetos con su cubreobjetos y se observó en microscopio biológico (óptico). (Cadena & Schweitzer, 2014) (Cadena & Schweitzer, 2012)
6. Las muestras se observaron de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, a manera de zig-zag.
7. Se realizó registro fotográfico.

4 RESULTADOS

4.1 Técnicas específicas para análisis histológico.

4.1.1 Técnica *In situ.*

4.1.1.1 Secciones delgadas

A partir de las secciones delgadas obtenidas tanto en sección transversal como en sección longitudinal se efectuó la observación en microscopio petrográfico y en Microscopia óptica de luz trasmitida.

4.1.1.1.1 CIP1 en Microscopia óptica de luz trasmitida

- **Sección transversal**

En las fotografías 21 y 22 se pueden observar las láminas delgadas realizadas a la muestra CIP1 (21-A, 21-B). Se observa un alineamiento paralelo con tipica forma de hueso esponjoso (21-C), en este caso la flecha señala la linea de tejido vista a un aumento de 40x. En la fotografía 21-D, la flecha señala la linea de tejido esponjoso así como también es posible observar que dicha linea separa el corte en dos composiciones una arriba y otra abajo, vistos a un aumento de 10x.

La fotografía 21-E corresponde a la ampliación de un fragmento de las estructuras de la muestra CIP1 observadas en la fotografía 21-C y 21-D. En esta caso a un aumento de 40x no es posible distinguir la presencia de células fósiles ni otros remanentes óseos. La fotografía 21-F muestra la parte mas central del corte a un aumento de 10x, donde se ve con claridad la organización de huesos esponjoso con trabéculas, las cuales conservan una minima cantidad de remanentes orgánicos. La flecha indica el espacio que antes era ocupado por la médula y ahora esta lleno de algun tipo de mineral.

En la fotografía 21-G, se observa un corte con aumento de 40x, el cual corresponde a un acercamiento del corte histológico observado en la fotografía 21- F. En este corte es posible observar la trabecula con pocos remanentes lo cuales no poseen formaciones de tipo celular, la flecha indica un mineral que ocupa el espacio de la médula.

En la fotografía 22-A, a un aumento 10x se observa preservacion de hueso esponjoso en algunas partes de la seccion, el resto del área muestra micro-fracturaciones. La fotografía 22-B corresponde al área indicada en el recuadro azul de la fotografía 22-A. A un a aumento de 40x es posible identificar crecimiento concentrico, pero con un notorio proceso de mineralización. La flecha indica una serie de laminas óseas superpuestas.

La fotografía 22-C corresponde a una ampliacion de 40x del recuadro rojo de la fotografía 22-A. En esta caso, la flecha señala remanentes relativemente alterados y con evidencia de crecimiento concentrico. En la fotografía 22-D, se observa la zona ampliada (40x) del recuadro rojo de la fotografía 22-A, con aparente presencia de células fósiles (osteocitos), señalados con la fecha, los cuales tiene una morfologia plana y pequeños canaliculos.

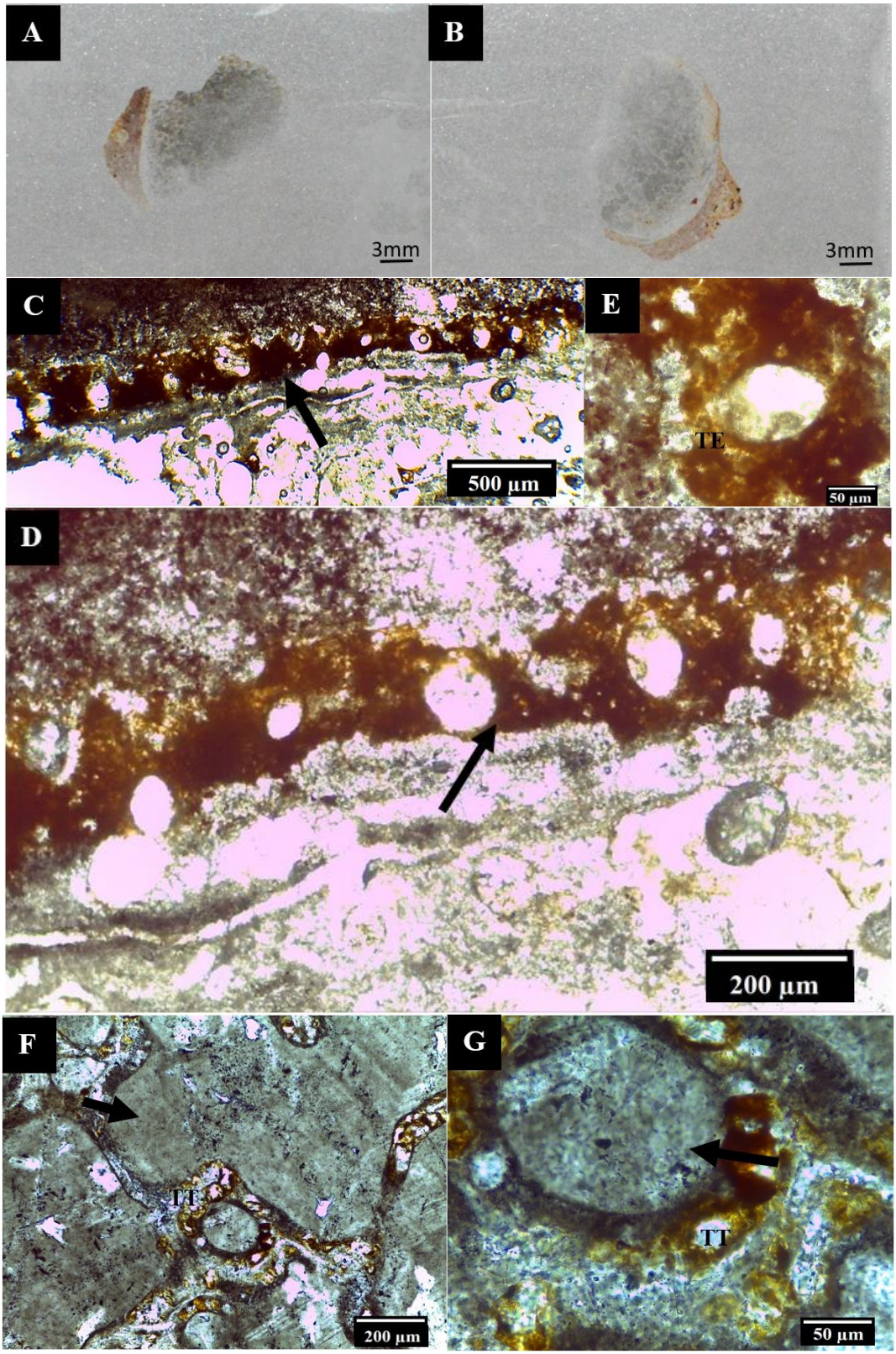


Figura 21: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida.

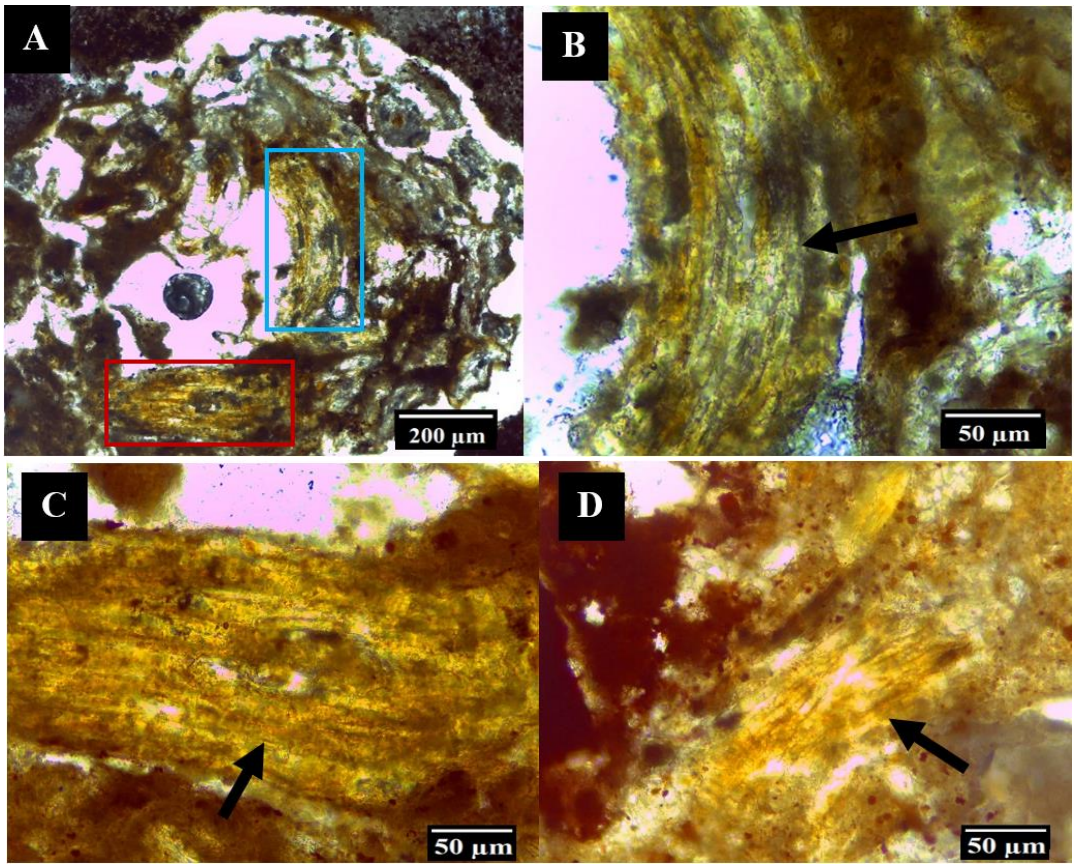


Figura 22: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida.

- **Sección longitudinal**

La fotografía 23-A corresponde a la vista general de la seccion 23-B. El análisis histológico a un aumento de 4x permitió identificar la presencia de tejido trabecular y de minerales en espacios medulares indicados por la flecha. En la fotografía 23-C, se observa una ampliación a un aumento de 40x de una seccion de la fotografía 23-B, que no permitió identificar células ni otros remanentes.

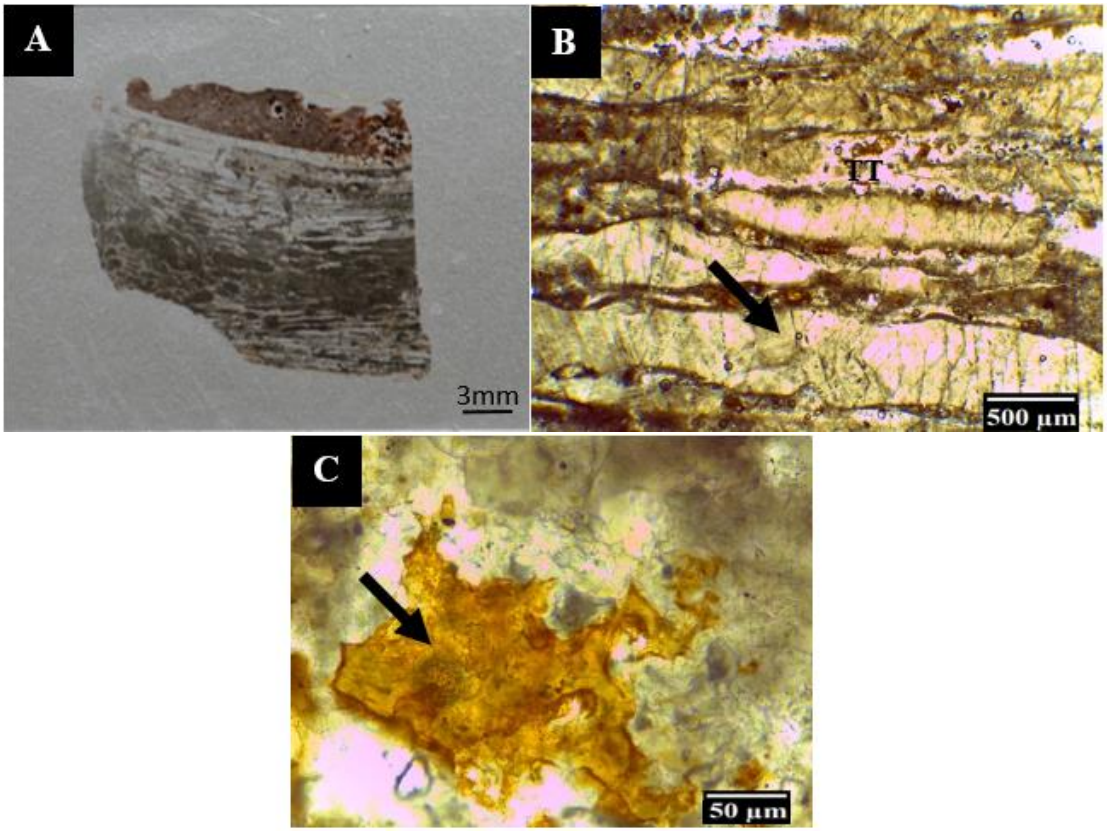


Figura 23: Vista de secciones longitudinales de CIP1 en microscopio óptico de luz trasmitida.

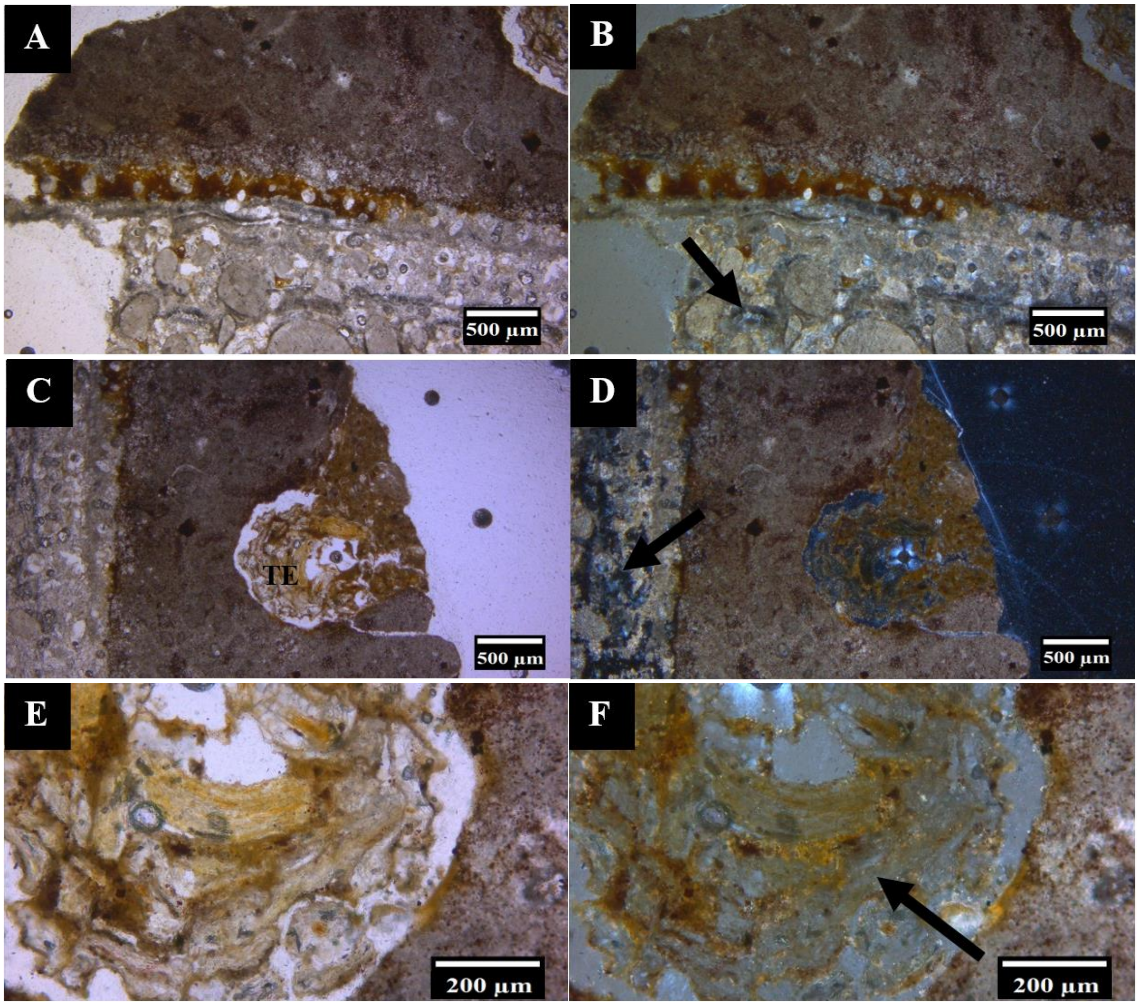
4.1.1.1.2 CIP1 en Microscopia Petrográfica con luz trasmitida y con luz polarizada.

- **Sección transversal**

En las fotografías 24-A, y 24-B, es posible observar presencia de tejido esponjoso en la muestra CIP1. En la fotografía 24-B a un aumento de 2.5x, la flecha señala cumulos de silice, mientras que los tonos amarillos corresponden a tejido óseo. En las fotografías 24-C y 24-D, se muestra la parte más externa del hueso esponjoso, donde se aprecia un proceso de cambio de material, que para el presente trabajo no se logra identificar su origen.

En la fotografía 24-D a un aumento de 2.5x, la flecha indica la presencia de silice, sin embargo no se distingue presencia de hueso compacto. En las fotografías 24-E y 24-F a un aumento de 10x, que corresponde a un aumento de los cortes histológicos vistos en las fotografías 24-C y 24-D, la flecha señala la presencia de silice.

Mediante microscopia petrografica se identificó la presencia de tejido trabecular con cumulos óseos (fotografías 24-G y 24-H). Asi mismo, se observó (flecha en fotografía 24-G) presencia de carbonato de calcio además de silice (flecha en fotografía 24-H a un aumento de aumento de 2.5x) que reemplazo paulatinamente al tejido óseo. Las fotografías 24-I y 24-J, a un aumento de 10x, se observa otra seccion de hueso esponjoso, donde se notan cumulos de tejido óseo en tonalidades amarillas (fotografía 24-I), cristales de calcita o carbonato de calcio.



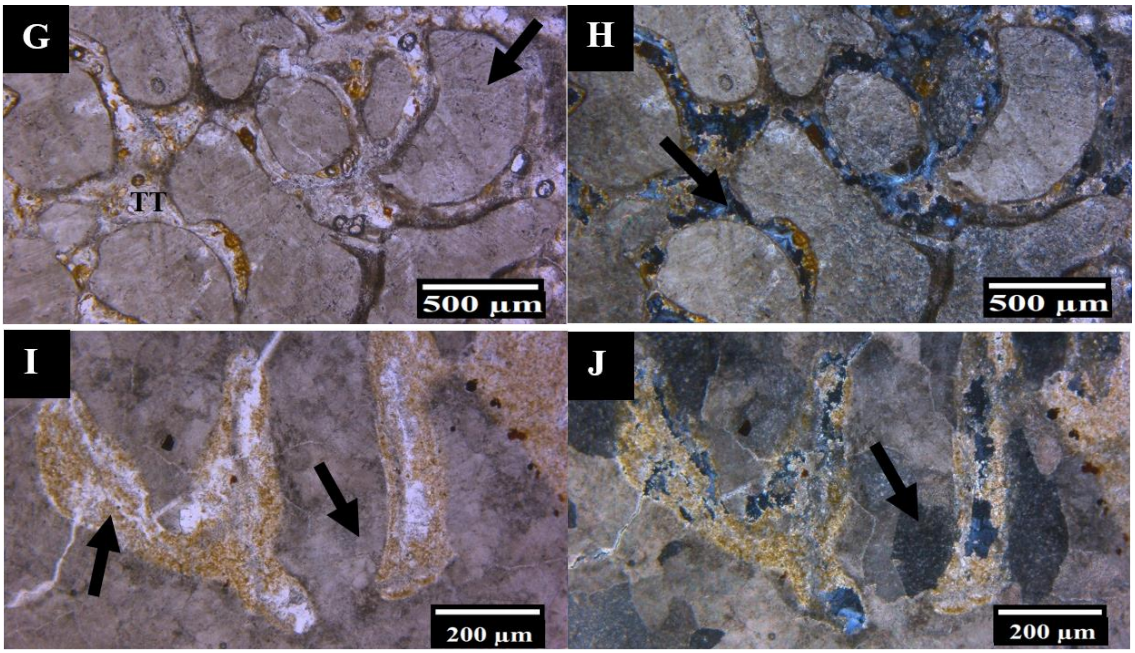
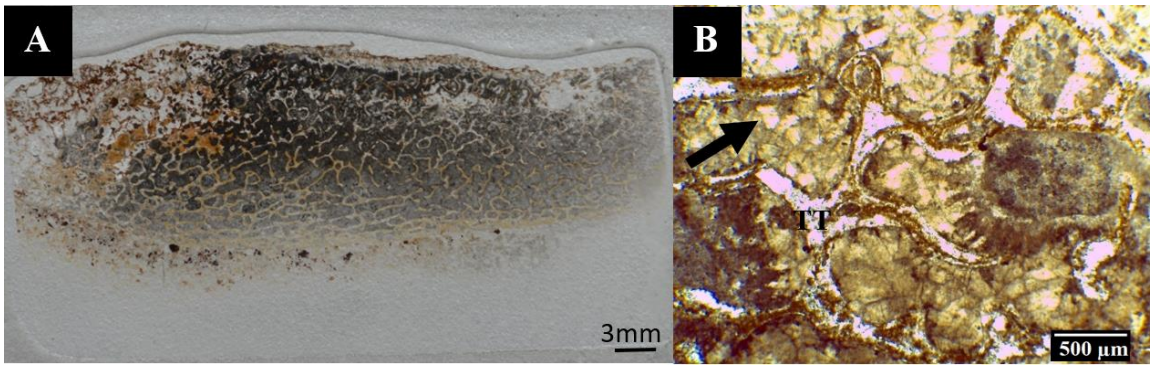


Figura 24: Vista de secciones trasversales de CIP1 en microscopio petrografico.

4.1.1.1.3 CIP2 en Microscopia óptica de luz trasmitida.

- **Sección transversal**

En cuanto al análisis del especimen CIP2, a partir de la sección transversal (fotografía 25-A) observada a un aumento de 4x, fue posible identificar la presencia de tejido trabecular con remanentes óseos, espacios medulares llenos de minerales (fotografía 25-B) y tejido óseo, con presencia de granulos pequeños no poseen células fósiles (fotografía 25-C, aumento 40x).



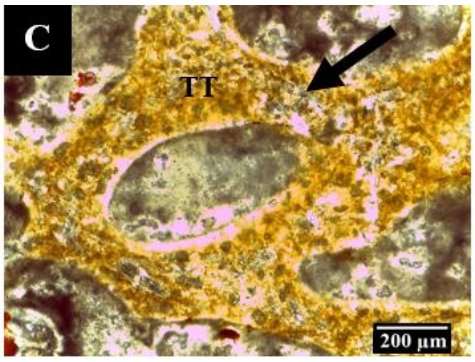


Figura 25: Vista de secciones trasversales de CIP2 en microscopio óptico de luz trasmitida.

- **Sección longitudinal**

En corte longitudinal la muestra CIP2 (fotografía 26-A) se caracterizó por la presencia de una aparente distribucion longitudinal de tejido óseo y celulas fósiles (fotografía 26-B, aumento de de 40x). La observación de la lámina a un aumento de 100x, parecia indicar la presencia de posibles células óseas con canalículos, no obstante, un análisis detallado comprobó que no es mas que una alteracion de la resina durante el proceso de pulido (fotografía 26-C).

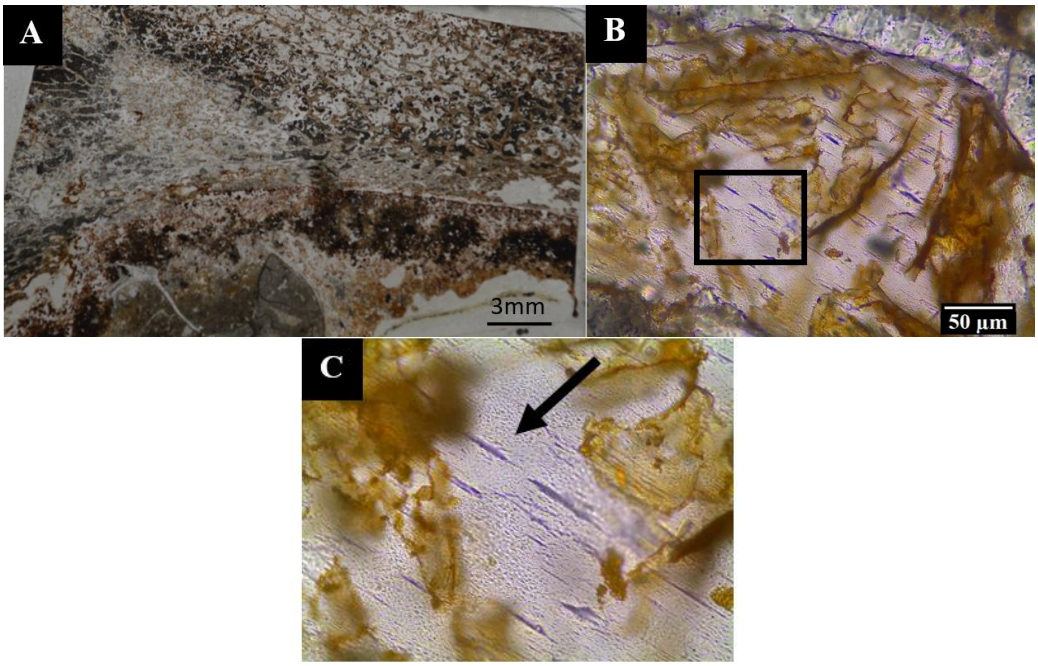


Figura 26: Vista de secciones longitudinales de CIP2 en microscopio óptico de luz trasmitida.

4.1.1.1.4 CIP2 en Microscopia Petrográfica con luz trasmitida y con luz polarizada.

- **Sección transversal**

El análisis histológico de las láminas de cortes transversal de la muestra CIP2 bajo microscopia petrográfica con luz trasmitida y con luz polarizada, permitio identificar tejido trabecular con distinta forma y organización (fotografía 27-A y 27-B). Las flechas indican grandes cristales de carbonatos de calcio, y los tonos amarillos indican presencia de remanentes óseos y procesos de mayor recristalizacion (fotografías 27-C y 27-D).

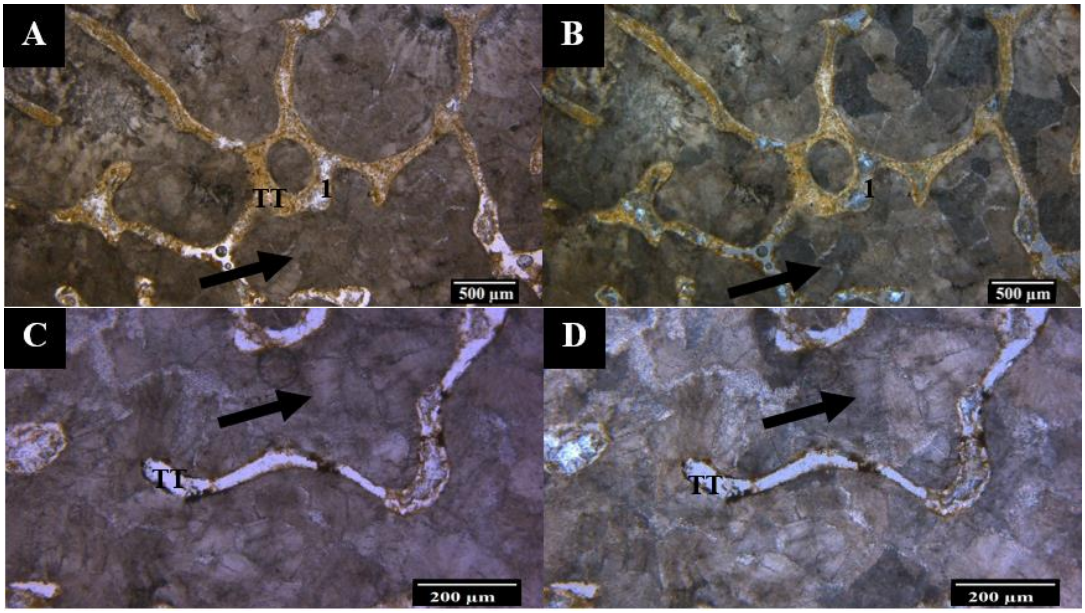


Figura 27: Vista de secciones transversales de CIP2 en microscopio petrografico.

- **Sección longitudinal**

La observacion de las laminas longitudiales permitio determinar caracteristicas semejantes a las observadas en el corte trasnversal, con baja o poca evidencia preservación de estructuras fósiles (fotografías 28A, 28B, 28C y 28D).

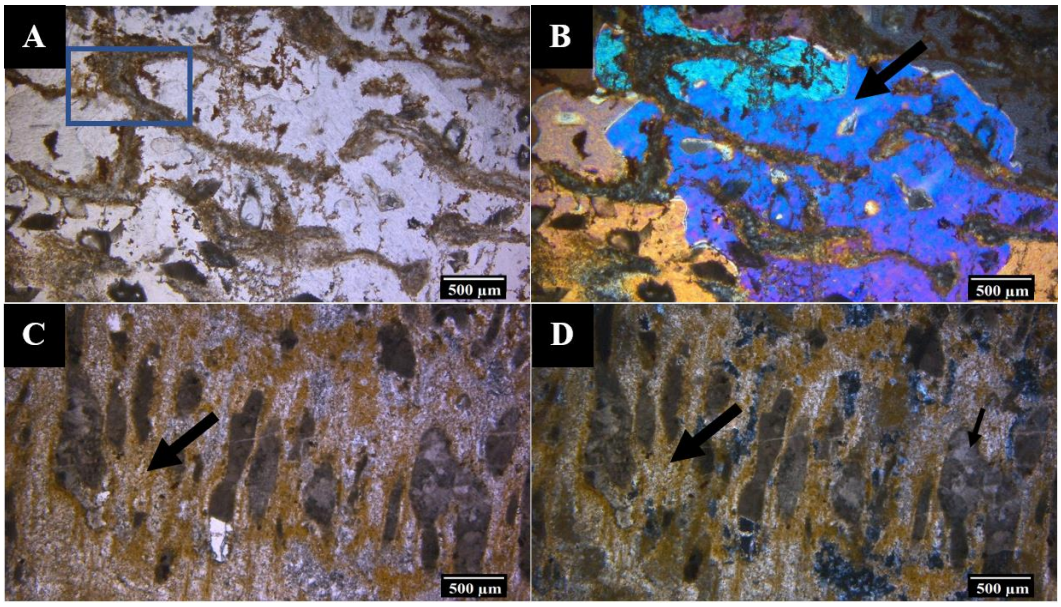


Figura 28: Vista de secciones longitudinales de CIP2 en microscopio petrografico.

4.1.1.1.5 CIP3 en Microscopia óptica de luz trasmitida.

- **Sección transversal**

En la observación de los cortes transversales mediante microscopia óptica de luz transmitida (Fotografía 29-A), se identificaron áreas con mayor preservación ósea dentro del caparazón. Se observa además formación de hueso compacto con presencia de sistemas haversianos y láminas hacia el exterior de la muestra (fotografía 29-B). A través de una ampliación del área donde se identificó hueso compacto de caparazón (fotografía 29-C), se pudieron identificar osteonas secundarias que aparentemente se encuentran deformadas y comprimidas, con laminillas intersticiales. En otra sección fue posible identificar una línea de cementación (fotografía 29-D), una osteona secundaria (fotografía 29-E) y un osteocito con algunos canaliculos visibles (fotografía 29-F).

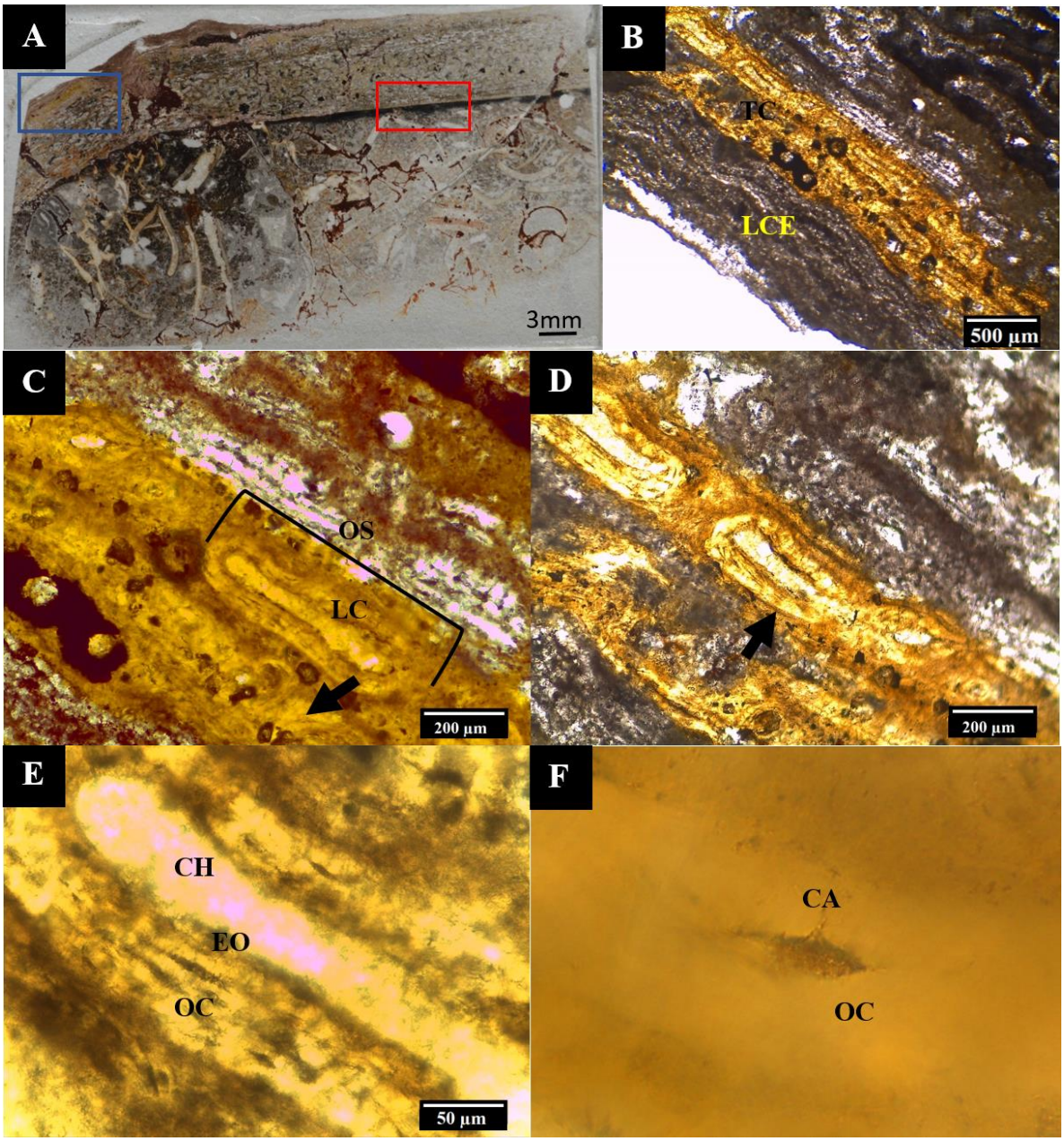


Figura 29: Vista de secciones transversales de CIP3 en microscopio óptico de luz trasmitida.

- **Sección longitudinal**

A diferencia de los resultados obtenidos con las secciones transversales, para el caso de las longitudinales no fue posible identificar caracteristicas propias de tejido o remanentes óseos (fotografías 30-A, 30-B y 30-C).

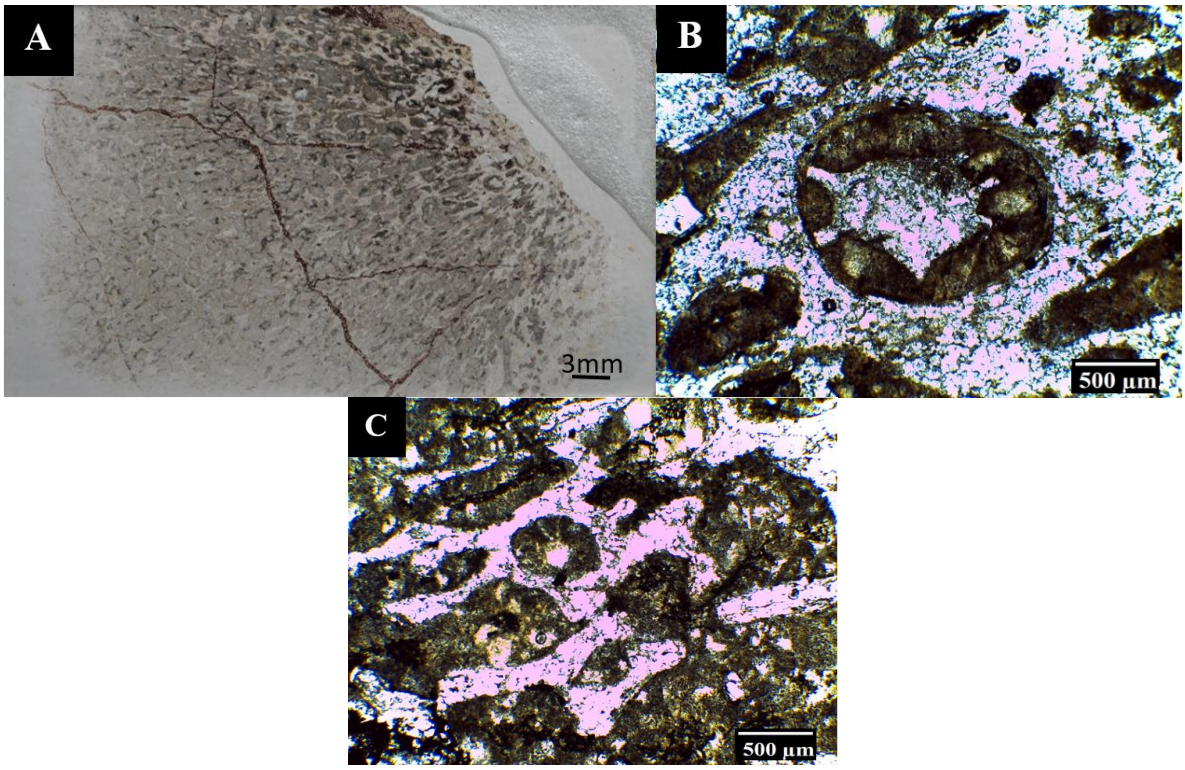


Figura 30: Vista de secciones longitudinales de CIP3 en microscopio óptico de luz trasmitida.

4.1.1.1.6 CIP3 en Microscopia Petrográfica con luz trasmitida y con luz polarizada.

- **Sección transversal**

El analisis petrográfico de las secciones transversales de CIP3, confirma la presencia de tejido compacto (fotografía 31-A y 31-B). En la fotografía 31-B se observa la presencia de minerales asociados al tejido óseo que constituyen un elemento diferencial en la muestra. En el corte se ven dos osteonas secundarias completas (fotografía 31-C), así como la presencia de fosfatos y silice, y la mezcla de estos dos (fotografía 31-D).

La sección central del caparazón se observa poco preservada, aun cuando es posible identificar tejido esponjoso y rellenos de carbonatos.

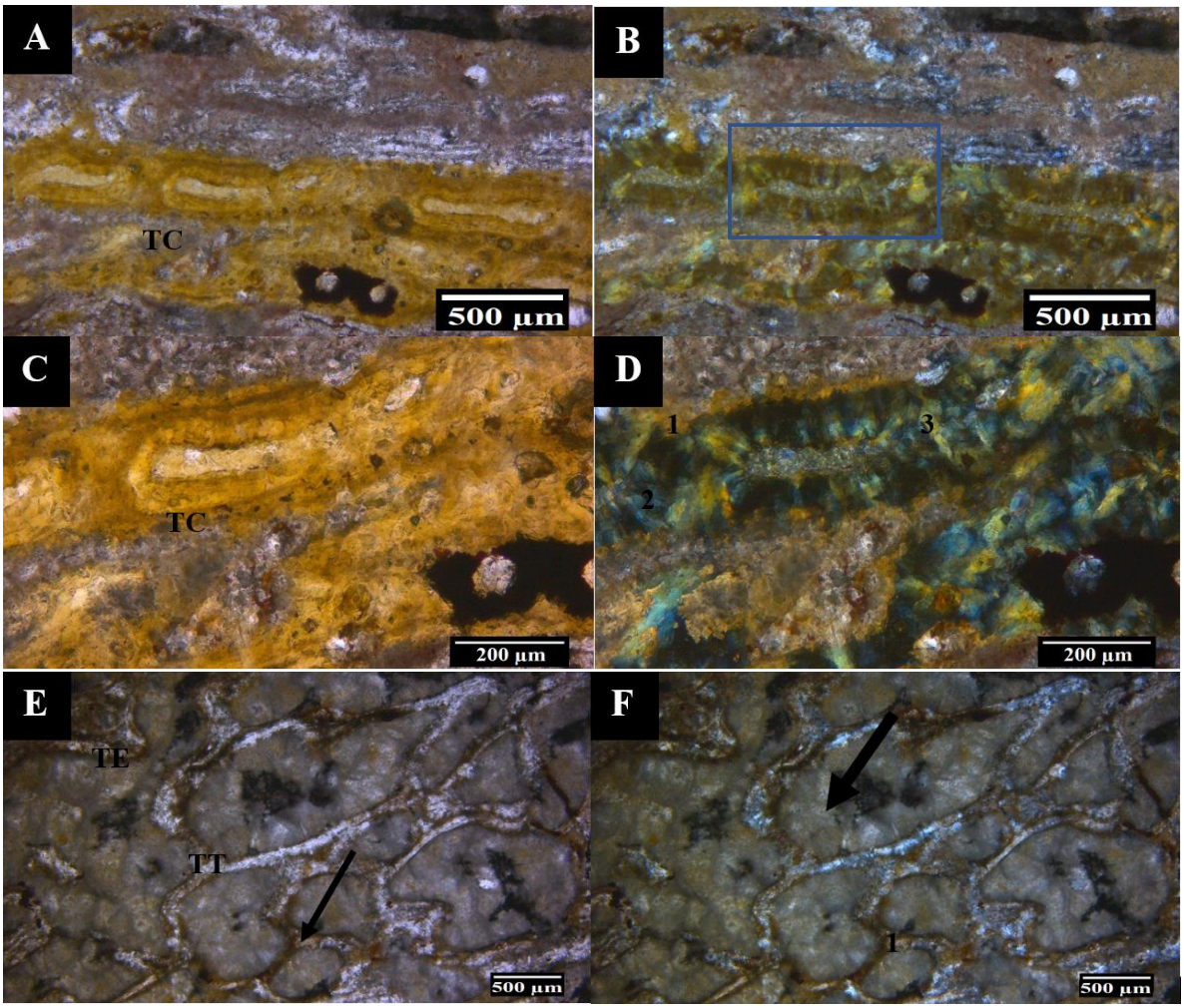


Figura 31: Vista de secciones transversales de CIP3 en microscopio petrografico.

- **Sección longitudinal**

Para el caso de las secciones longitudinales, a pesar de que se esperaba la observación de una preservación microestructural similar a las transversales, no se logra identificar tejido compacto, solamente en la figura 32-A y 32-B se identifica la presencia de hueso esponjoso altamente recristalizado y microfracturado.

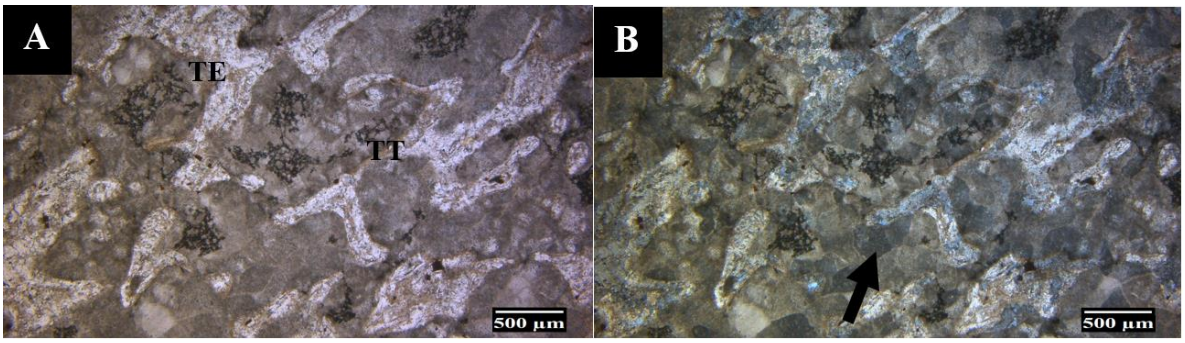


Figura 32: Vista de secciones longitudinales de CIP3 en microscopio petrografico.

4.1.1.2 Testigos, observación en SEM (Scanning Electron Microscope) y análisis EDS (Espectroscopía de Energía Dispersiva).

En la siguiente figura se encuentran los fragmentos a los que se les realizó la microscopia electrónica de barrido, sin y con criofractura con nitrógeno líquido:

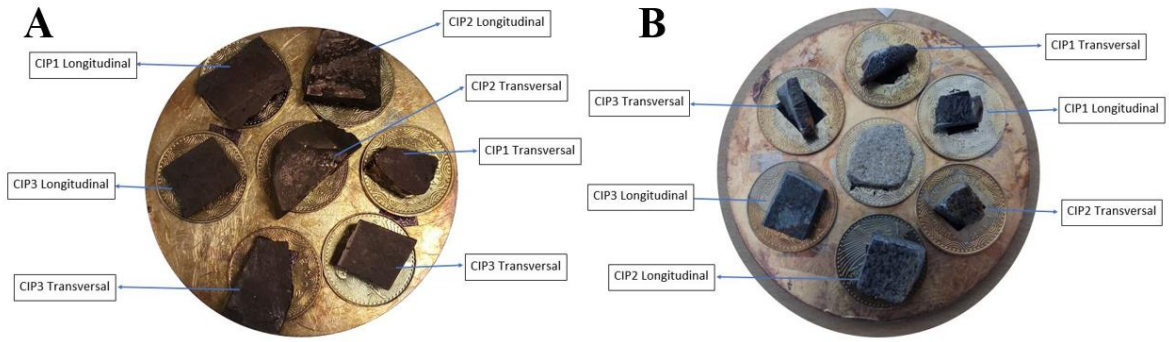


Figura 33: Muestras para microscopia electronica de barrido. A. Secciones elaboradas con cortadora marca Minosecar con disco diamantado y metalizadas con oro. B. Fragmentos despues de la criofractura y antes del metalizado con oro.

4.1.1.2.1 <u>CIP1 en microscopia electrónica sin y con criofractura.</u>

- **Sección transversal**

Muestras en corte transversal de CIP1, en la fotografia 34-A y B (sin criofractura), para A se observa a un lado de la muestra una aparente disposicion longitudinal y una seria de espacios al ampliar la zona demarcada con un circulo azul (fotografia 34-B) se distingue con mayor claridad dichas formaciones; sin embargo no se puede observar mayores caracteristicas, ya

que el plano de observacion se encuentra de lado. En las fotografias 34-C, D y (con criofractura) se observan a distintos aumentos unas formaciones en las muestras, sin embargo dichas formaciones no corresponden con caracteristicas microestructurales de tejido óseo.

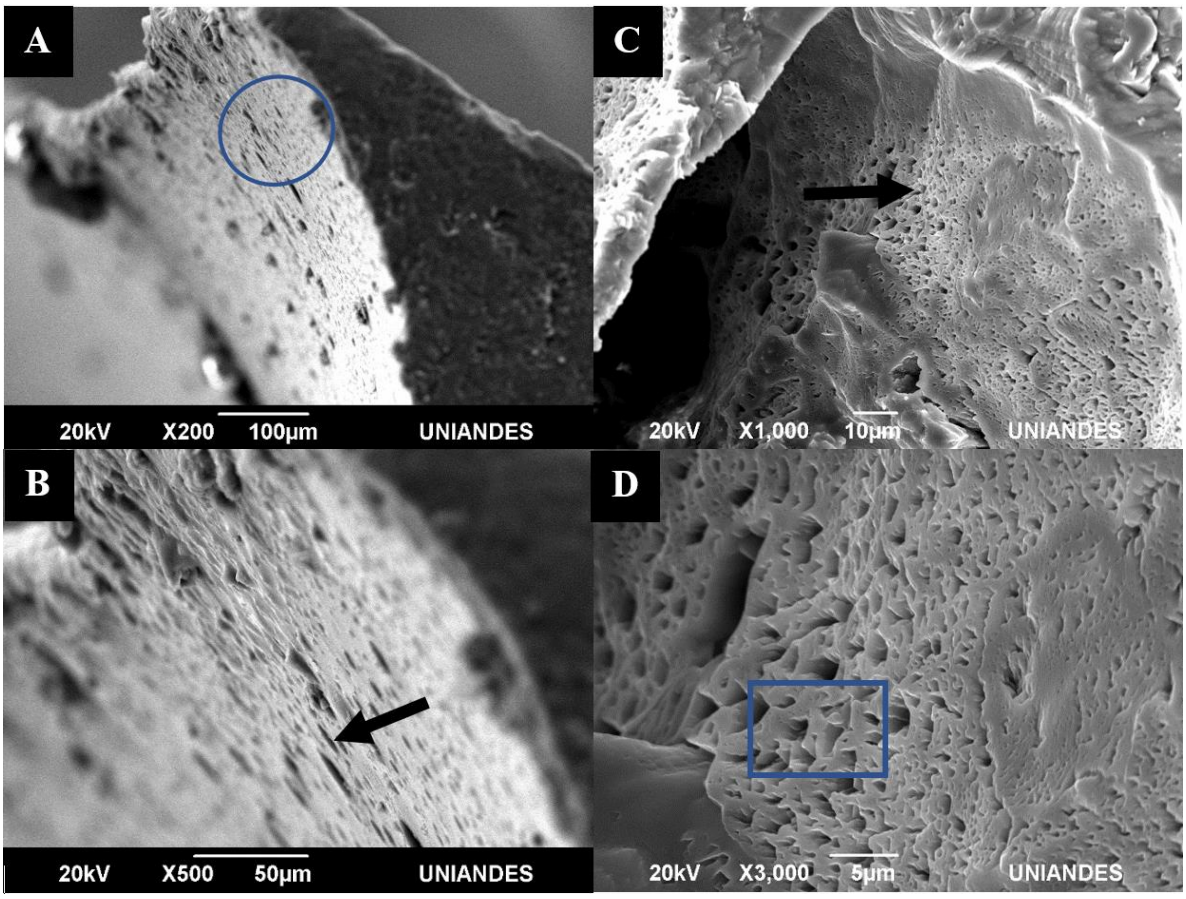


Figura 34: Vista de muestras de CIP1 en corte trasnversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

- **Sección longitudinal**

En corte longitudinal (fotografías 35-A y B), tomadas sin criofractura permite la observación de una serie de líneas paralelas que a su vez contiene una seria de espacios, la flecha en A indica lo que podría ser un conducto de Volkmann con alta cristalización, en el recuadro azul y ampliación en 35-B de una formación similar a un conducto haversiano, sin embargo, no es la estructura que se esperaría ver en un corte longitudinal. En la fotografía 35-C (con

criofractura) se observa una serie de filas longitudinales, pero ninguna con características de tejido óseo

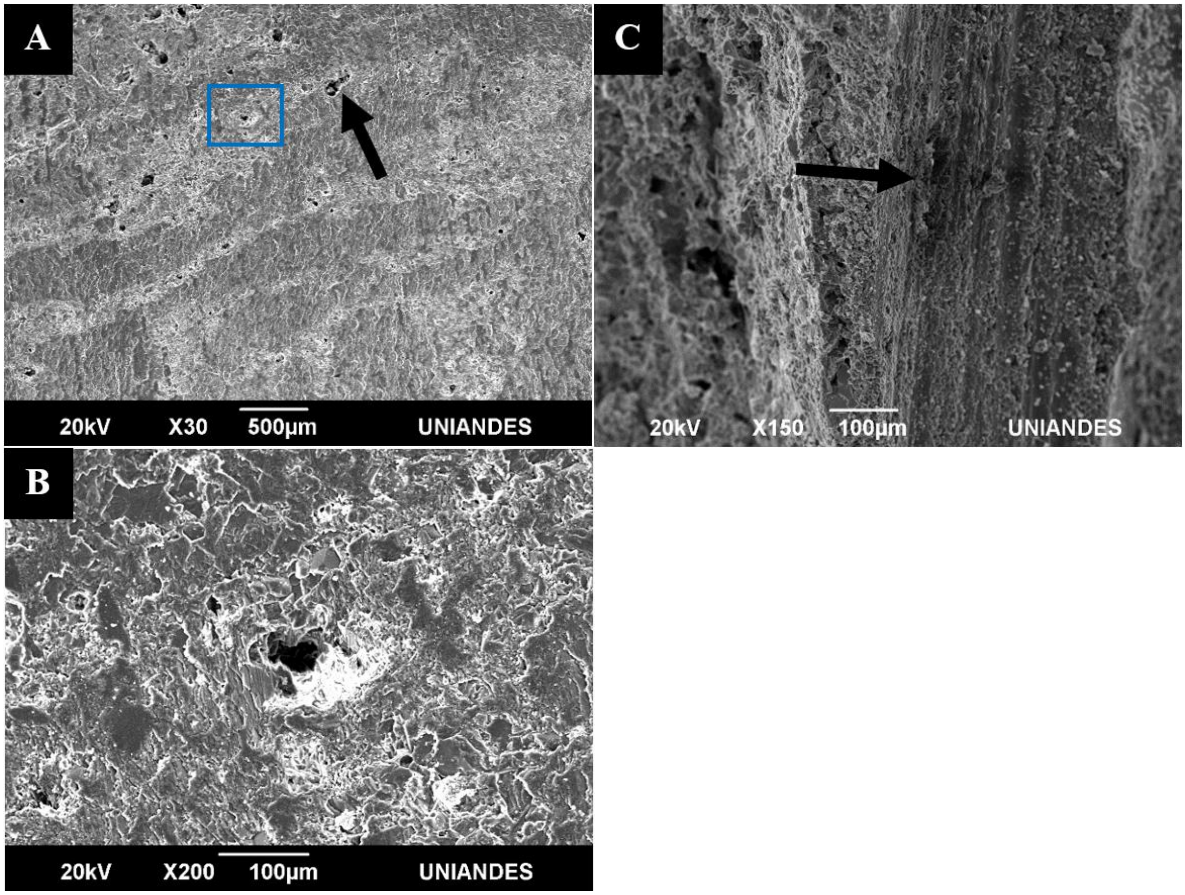


Figura 35: Vista de muestras de CIP1 en corte longotudinal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

4.1.1.2.2 CIP2 en microscopia electrónica sin y con criofractura.

- **Sección transversal**

En las muestras sin criofractura (fotografias 36-A y B) se observa una superficie bastante fracturada, con ausencia de remanentes óseos; mientras que las muestras criofracturadas 36-C la flecha señala tejido esponjoso en forma paralela, recuadro blanco indica una fila paralela mas pequeña y en la fotgrafia 36-D se observa mineralización y microfracturación en el plano.

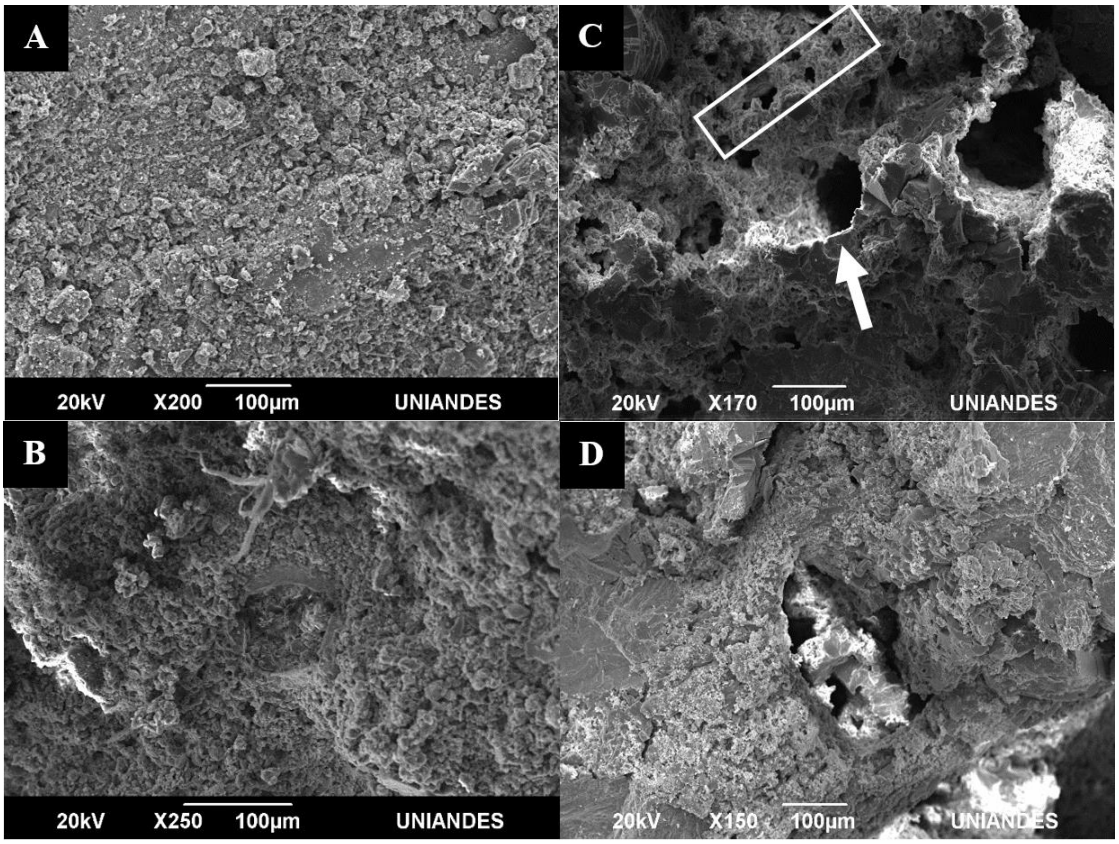


Figura 36: Vista de muestras de CIP2 en corte transversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

- **Sección longitudinal**

En vista longitudinal sin criofractura (fotografías 37-A y B) en A se observa en el recuadro blanco una organización de espacios con tamaños similares (tejido esponjoso), sin embargo, dichos espacios están pobremente preservados, en B se muestra otra zona de la sección con nula presencia de remanentes óseos. En la fotografía 37-C (criofracturada) se observan una serie de líneas longitudinales, que podrían indicar áreas de fractura, pero ningún remanente óseo visible. A un menos aumento con Criofractura (fotografía 37-D) es posible la observación de grandes cristales de minerales.

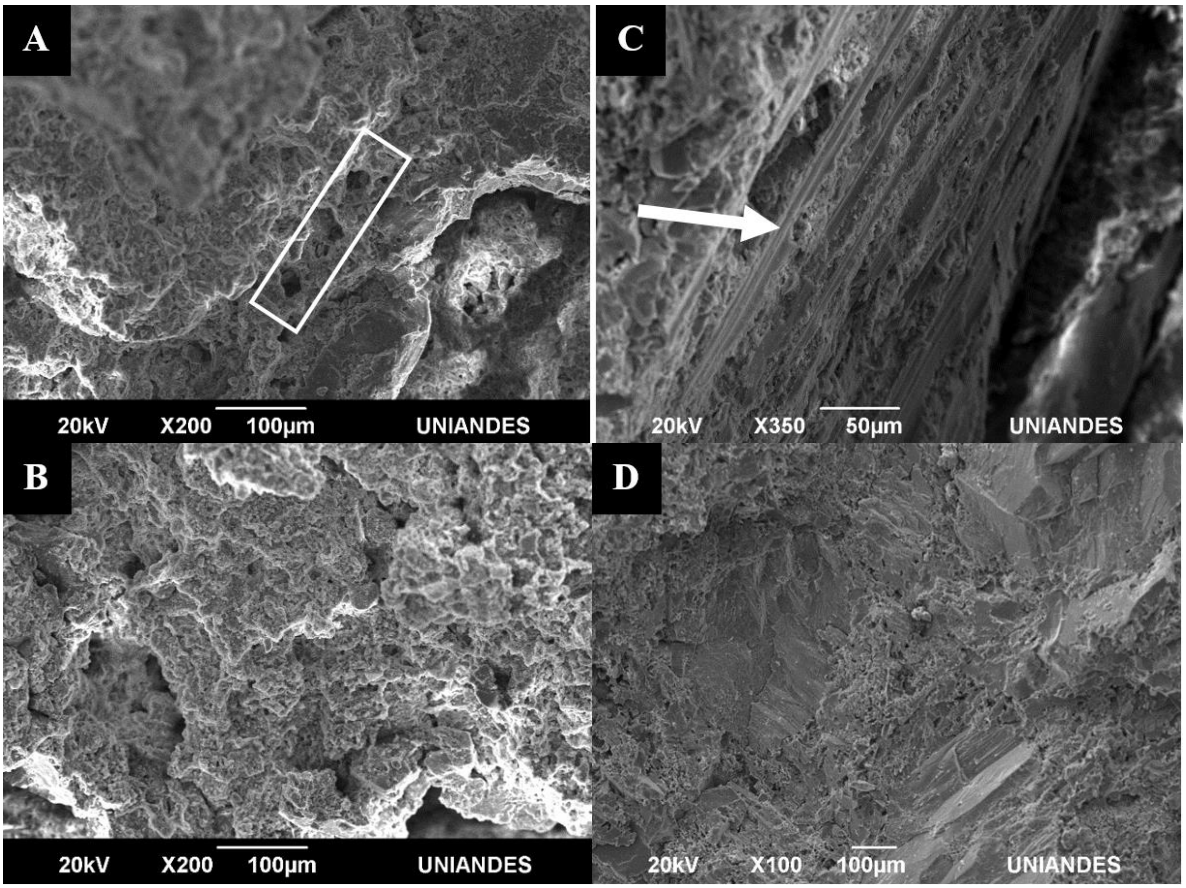


Figura 37: Vista de muestras de CIP2 en corte longitudinall observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

4.1.1.2.3 CIP3 en microscopia electrónica sin y con criofractura.

- **Sección transversal**

Para las muestras observadas del especimen CIP3 , en la figura 38-A y B sin criofractura, en A se observa la presencia de lo que podria ser una Osteona secundaria (OS) con aparente deformación, es posible identificar el canal haversiano (CH), Endostio osteónico (EO). En la figura 38-B la flecha indica la presencia de dos capas con diferente composición, las lineas punteadas señalan la direccion de dicha lamina. Con criofractura en la figura 38-C se observan una serie de espacios totalmente circulares no caracteristicos de formaciones de tejido óseo y en 38-D en recuadro azul indica una alta recristalizacion y microfracturas, con nula presencia de tejido óseo.

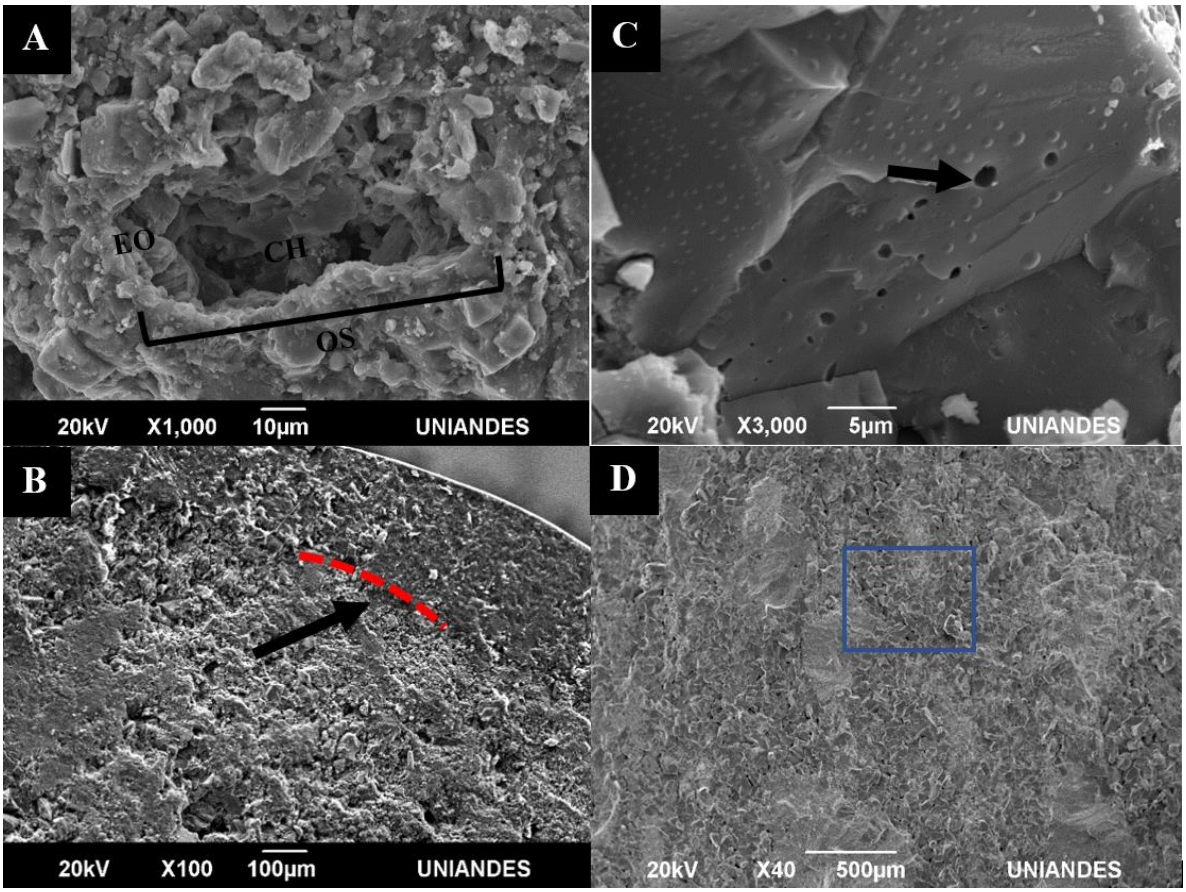


Figura 38: Vista de muestras de CIP3 en corte transversal observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

- **Sección longitudinal**

En la figura 39-A y B (sin criofractura). En A el recuadro azul señala un cambio en el tipo de material, sin embargo no se observa preservacion microestructural, en B se observaron diversas estructuras relacionadas con microalgas u hongos; para las figura 39-C, con criofractura, se distingue una disposicion de lineas longitudinales sin observacion de tejido óseo.

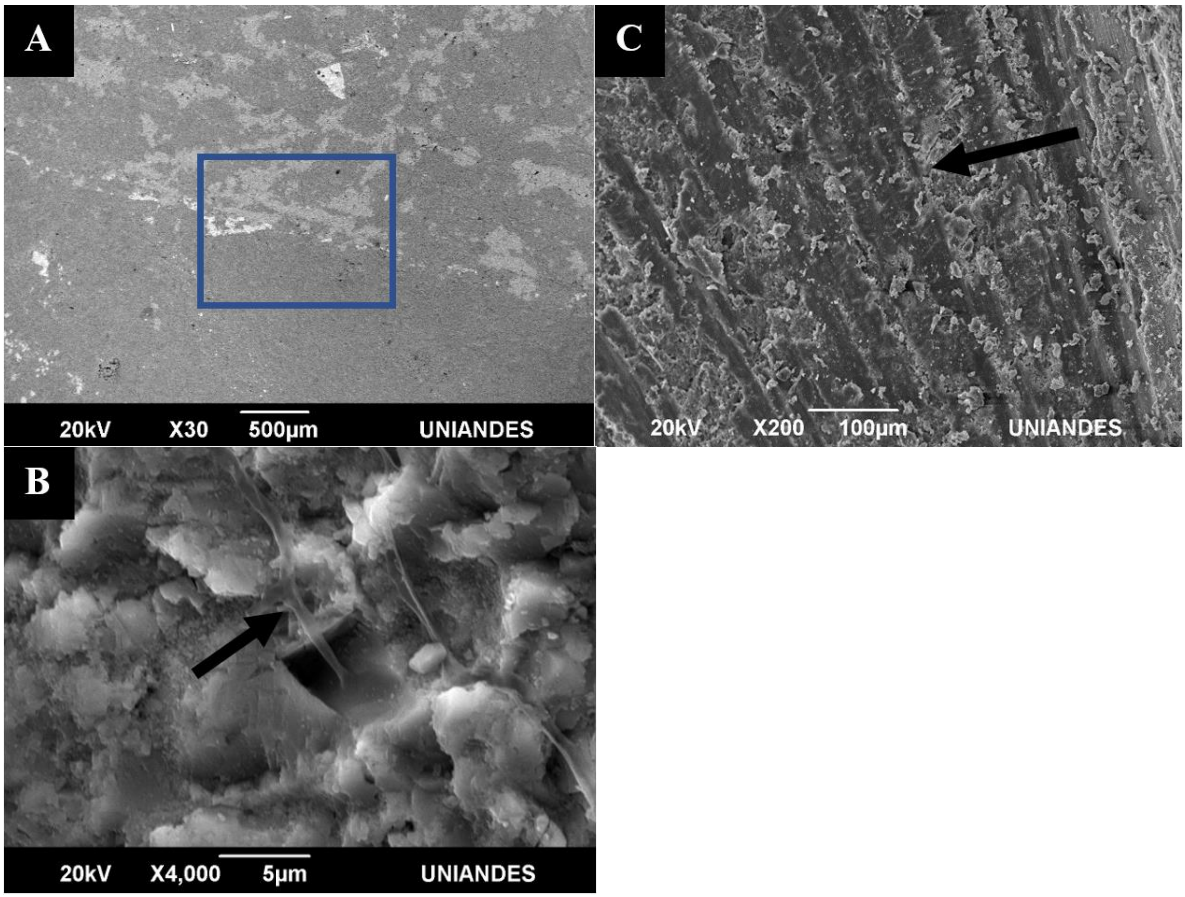
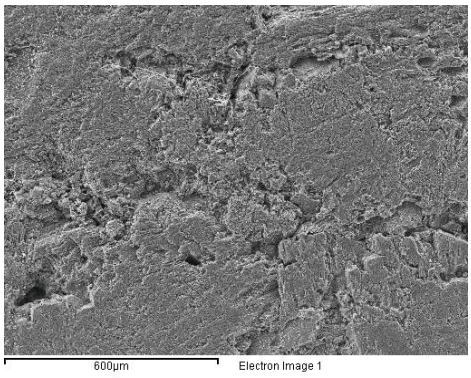
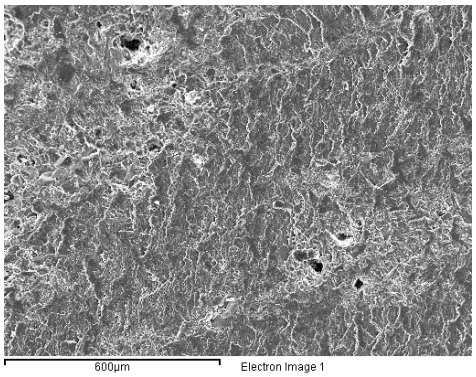
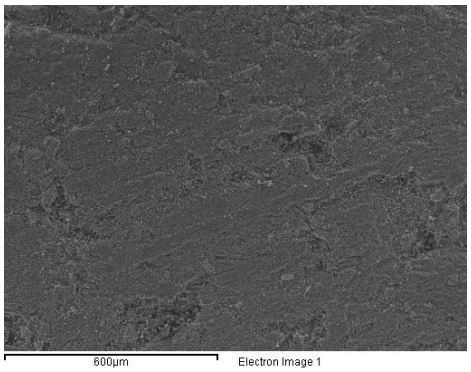
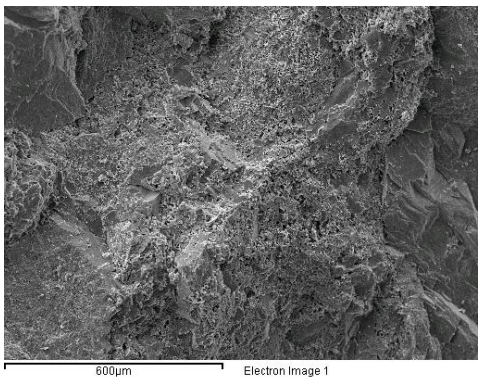
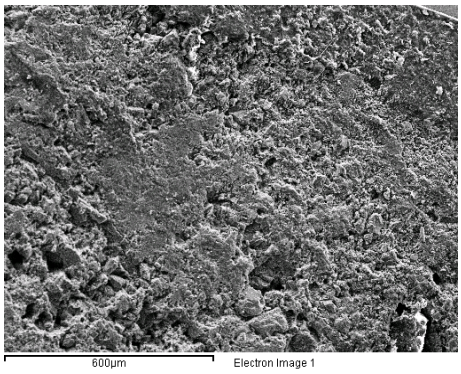
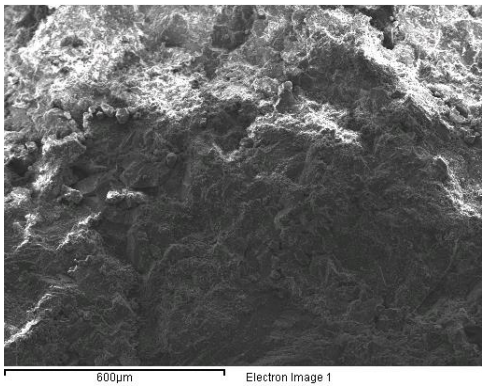


Figura 39: Vista de muestras de CIP3 en corte longitudinall observadas en microscopio electronico de barrido y metalizadas con oro.

4.1.1.2.4 Análisis EDS

El analsis EDS fue realizado en las muestras antes de la criofractura, ya que deben ser lo mas planas posibles, se realizo un analisis por cada muestra, transversal y longitudinal, con el fin de determinar los componentes de cada una, la tabla 2 muestra las areas en donde se realizo el analisis.

Tabla 2: Fotografias de las áreas donde se realizo el analisis EDS

	TRANSVERSAL	LONGITUDINAL
CIP1		
CIP2		
CIP3		

Adicionalmente mediante el análisis EDS (Espectroscopía de Energía Dispersiva), tras determinar los elementos presentes en las muestras (tabla 3), se comparan y promedian los valores obtenidos para la concentración de dichos elementos.

Tabla 3: Concentración de cada uno de los elementos presentes en todas las muestras analizadas y promedios de entre la direccion (longitudinal y transversal) de los cortes de cada muestra con cada elemento.

Muestra	Dirección	Concentración								
		C	O	Al	Si	P	Ca	Fe	S	K
CIP1	Transversal	3,53	26,83	0	0,93	7,47	37,04	0,98	21,8	0
	Longitudinal	13,53	39,58	0,94	2,63	14,7	59,34	1,21	0	0
	Promedio	8,53	33,205	0,47	1,78	11,085	48,19	1,095	10,9	0
CIP2	Transversal	2,45	14,49	0,62	1,56	7,05	36,63	3,26	14,94	0
	Longitudinal	4,2	8,75	0	0	5,77	43,76	0	0	0
	Promedio	3,325	11,62	0,31	0,78	6,41	40,195	1,63	7,47	0
CIP3	Transversal	28,32	16,03	3,09	12,07	12,46	35,53	2,61	0	0,86
	Longitudinal	13,53	39,58	0,94	2,63	14,7	59,34	1,21	0	0
	Promedio	20,925	27,805	2,015	7,35	13,58	47,435	1,91	0	0,43

4.1.2 Técnica *Ex situ*

4.1.2.1 Desmineralización y observación en microscopio óptico.

4.1.2.1.1 CIP1 en Microscopia óptica de luz trasmitida.

La figura 40-A presente matriz ósea, la flecha indica celulas fosiles en su interior (osteocitos) de distinta forma y tamaño a un aumento de 40x. En 40-B se identifica la presencia de un osteocito (OC) señalado con un circulo azul, dentro de matriz ósea. En la figura 40-C se amplia lo visto en B a 100x, lo que permite mayor claridad en la observacion de osteocito (OC) y donde ademas de observan sus porolongaciones o canaliculos (CA), la flecha señala uno.

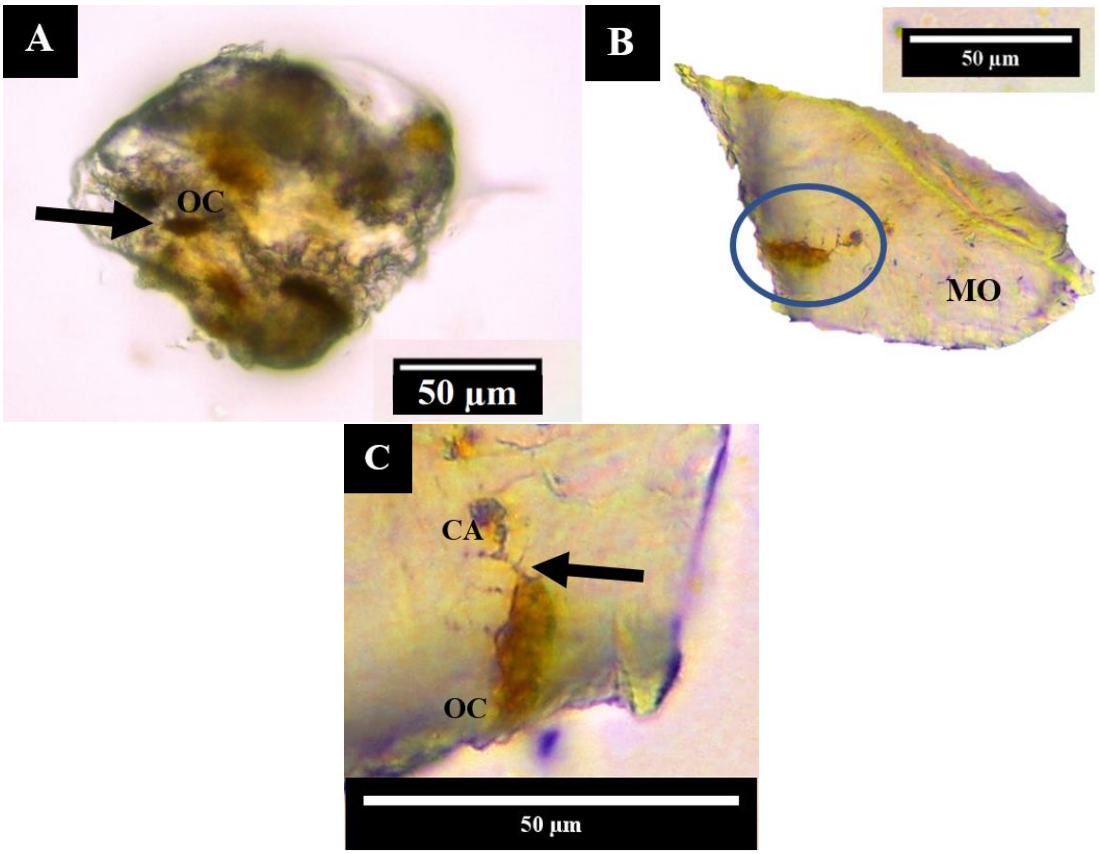


Figura 40: Vista de muestras de CIP1 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida.

4.1.2.1.2 CIP2 en Microscopia óptica de luz trasmitida.

En las muestras de CIP2 desmineralizadas en EDTA, en la figura 41-A la flecha indica matriz ósea con presencia de células fósiles, aumento de 10x. En aumento de 40x (figura 41-B) se observa una clara presencia de osteocitos (OC) con sus canalículos (CA); para la observación a mayor detalle en 100x se amplía el recuadro azul de la figura 41-B en 41-C, donde se observa con más detalle un osteocito (OC) y sus prolongaciones o canalículos (CA) encriptados en matriz ósea.

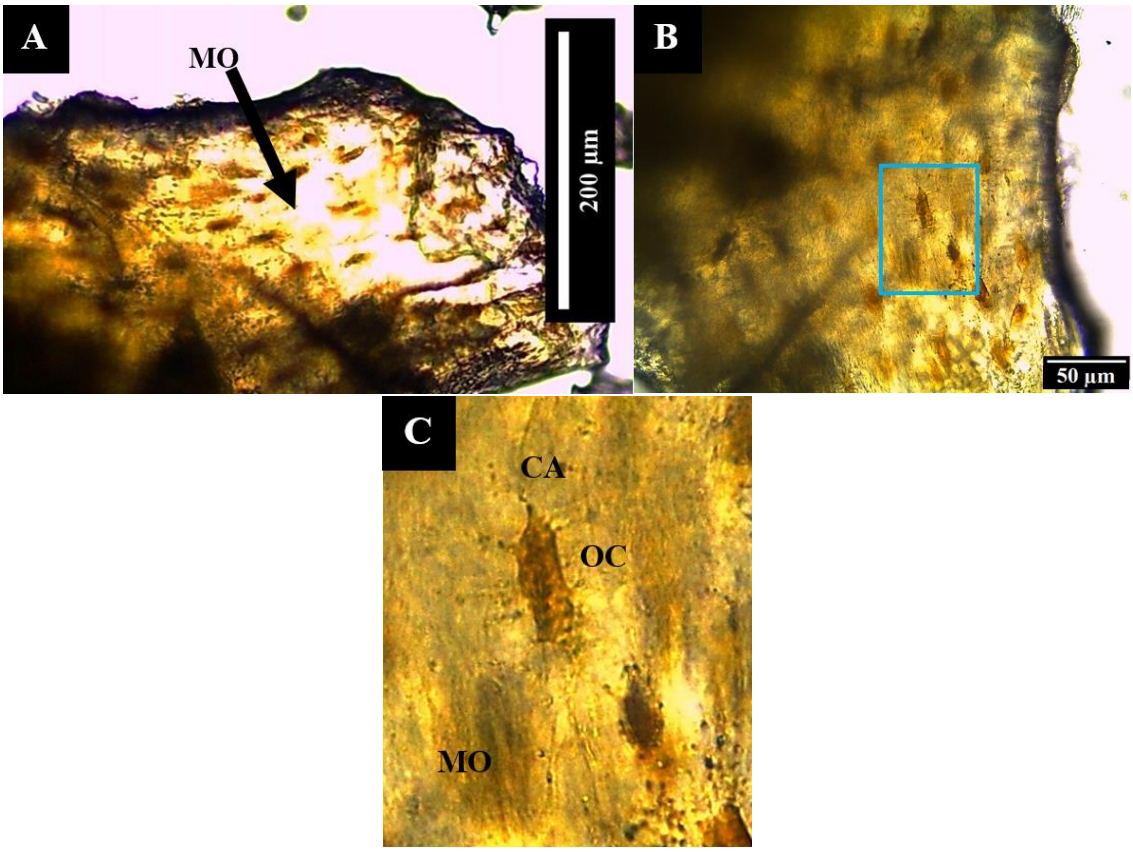


Figura 41: Vista de muestras de CIP2 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida.

4.1.2.1.3 CIP3 en Microscopia óptica de luz trasmitida.

En la figura 42-A se observa la presencia de matriz ósea; sin embargo, no se identificaron células fósiles ni vasos sanguíneos, aumento de 40x.

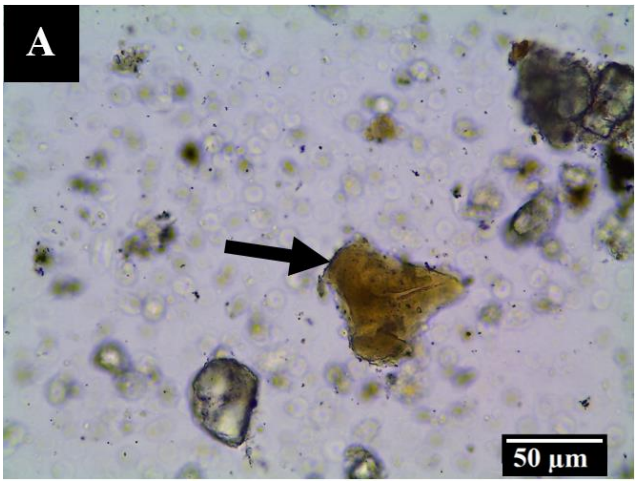


Figura 42: Vista de muestras de CIP3 desmineralzadas y observadas en microscopio óptico de luz trasmitida.

5 ANALISIS DE RESULTADOS

Para determinar el nivel de preservación microestructural en fósiles es necesaria una comparación cualitativa con otras investigaciones realizadas, para el caso del presente análisis, es de tener en cuenta que se desconoce dicho nivel en los registros del área de Villa de Leyva y sus alrededores, por tal razón en la tabla 4 se realiza una comparación entre nuestros resultados para el protocolo de secciones delgadas (Técnica *In Situ*) y los de otros autores en fósiles de Testudines. En la tabla 5 se realiza la misma comparación con el protocolo de desmineralización (Técnica *Ex Situ*). Para el caso del análisis de testigos en Microscopio Electrónico de Barrido no se realizan comparaciones debido a la escasa información sobre dicho protocolo en fósiles de este orden.

En la tabla 4 se muestran las principales estructuras óseas identificadas en distintos testudines, pertenecientes a diferentes cronoestratigrafias, mediante la técnica *In situ.*

Tabla 4: Diferentes investigaciones realizadas con las estrcuturas determinadas en las mismas, mediante la tecnica In Situ, con elaboracion de secciones delgadas. X, Presencia. /, Ausencia. A. Investigación realizada por (Scheyer T. , 2007). B. Investigación realizada por (Scheyer & Sander, Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles, 2007). C. Investigación realizada por (Scheyer & Sánchez, 2007). D. Investigación realizada por (Scheyer & Anquetin, 2008). E. Investigación realizada por (Talevi, 2012). F. Investigación realizada por (Janello, Cerda, & de la Fuente, 2016). I. Presente investigación.

Técnica *In situ*							
ESTRUCTURAS ÓSEAS IDENTIFICADAS	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**I**
Fibras de sharpey	X	X	X	X	X	X	/
Osteona primaria	X	X	X	X	X	X	/
Osteona secundaria	X	X	X	X	X	X	X
Hueso laminar	X	X	X	X	X	X	X
Hueso esponjoso	X	X	X	X	X	X	X
Haces de fibras colagenas	X	X	X	X	/	/	/
Conductos de volkmann	X	/	X	X	X	/	/
Lagunas de celulas óseas	X	/	X	X	X	/	X
Tejido conectivo	/	/	X	/	/	/	/
Hueso compacto	X	X	X	X	X	X	X

En la tabla 5, se muestran las estructuras identificadas en las diferentes investigaciones mediante la técnica *Ex situ*.

Tabla 5: Diferentes investigaciones realizadas con las estrcuturas determinadas en las mismas, mediante la tecnica Ex Situ, con desminaralización con EDTA. X, Presencia. /, Ausencia. G. Investigación realizada por (Cadena & Schweitzer, 2012). H. Investigación realizada por (Cadena & Schweitzer, 2014). I. Presente investigacion.

Técnica *Ex situ*			
ESTRUCTURAS ÓSEAS IDENTIFICADAS	**G**	**H**	**I**
Osteocitos	X	X	X
Vasos sanguineos	/	X	/
Canaliculos	X	X	X

A partir de las tablas 4 y 5 se determina cierto grado de preservacion microestructural, ya que los resultados obtenidos permitieron la obervacion de tejido óseo fosil, en las tres muestras analizadas, ademas es de precisar que en algunas de las investigaciones mostradas en las tablas se tomaron varios especimenes lo que aumenta la cantidad de caracteristicas óseas encontradas (Talevi, 2012) (Scheyer T. , 2007), sin embargo no precisamente indica que un solo especimen muestre todas las estructuras indicadas, por tal razon a pesar de ser aparentemente baja la preservacion esta presente lo que corrobora lo señalado por (Cadena & Schweitzer, 2012) donde indican que la preservacion celular es independiente de los ambientes sedimentarios (depositos marinos, dulceacuicolas y terrestres). A partir de lo anterior la discusión se relaciona con la calidad de dicha preservación que para el caso de los 3 especimenes seleccionados fue baja, lo que podria estar influeciado por la encapsulación tridimensional del material óseo dentro de la fase mineral, lo que lo protegeria de factores externos que provocan su degradación (Cadena & Schweitzer, 2012).

Para el caso de las estructuras óseas encontradas en cada uno de los especimenes, se especifica que para:

CIP1: Se determina la presencia de tejido óseo de tipo esponjoso, con pocos monticulos o acumulaciones de tejido laminar o trabecular, todos los espacios medulares han sido reemplazados por minerales de distintos tipos de carbanatos, ademas no se identifica

tejido óseo de tipo compacto lo que puede deberse a procesos de recristalización, ademas de que la cantidad de hueso compacto a encontrar debia ser menor, de acuerdo con lo señalado por (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016), donde plantean la disminucion de las capas de tejido compacto debido a los habitos acuaticos; lo que concuerda con el hallazgo de esta tortuga en sedimientos marinos.

Se observo en el tejido laminar la presencia de lagunas o de osteocitos aplanados y dispuestos en una organización circunferencial.

En el protocolo de desmineralizacion, los osteocitos presentaron una forma alargada y semi-aplanada con un tamaño aproximado de 50µm acorde con lo observado en la revision bibliografica de Cadena (2012), Cadena & Schweiter (2012) y, Cadena & Schweiter (2014). Estos osteocitos se encontraron encriptados en matriz ósea, por lo que no se determina si son celulas óseas o por el contrario si corresponden a sus lagunas, ya que, para determinar si son o no osteocitos es necesario aislarlos de su matriz (Cadena & Schweitzer, 2014) (Cadena & Schweitzer, 2012), ademas se debe corroborar mediante la observacion de Microscopía Electronica de Barrido la presencia de organelos celulares.

CIP2: Presencia de gran cantidad de espacios medulares rellenos de calcitas o carbonatos, las trabeculas oseas en su gran mayoria se encuentran con una presencia importate de material óseo que esta dispuesto hacia los bordes, sin embargo no presenta remanentes de células óseas, de igual manera que lo señalado para CIP1, la nula presencia de tejido óseo de tipo compacto concuerda con habitos de tipo acuatico (Cerda, Sterli, & Scheyer, 2016).

Al igual que en CIP1, el procedimiento de desmineralización, permitio identificar osteocitos que presentarón tamaños aproximados de 50µm y fuerón encontrados en su matríz, razón por la cual no es posible determinar si son celulas óseas o son sus respectivas lagunas.

CIP3: Se observa la mejor preservación de tejido óseo y la única presencia de hueso compacto para las tres muestras analizadas, lo que puede ser resultado de que esta muestra correspondia a caparazón el cual se encuentra caracterizado por una capa externa y una interna de hueso compacto -tejido diploe- (Scheyer T. , 2007). Se encuentran osteocitos de forma semi-aplanada en las osteonas secundarias, en concordancia con la descripción realizada por Cadena & Schweiter (2012) donde describen tres tipos distintos de osteocitos para las capas del caparazón (figura 43):

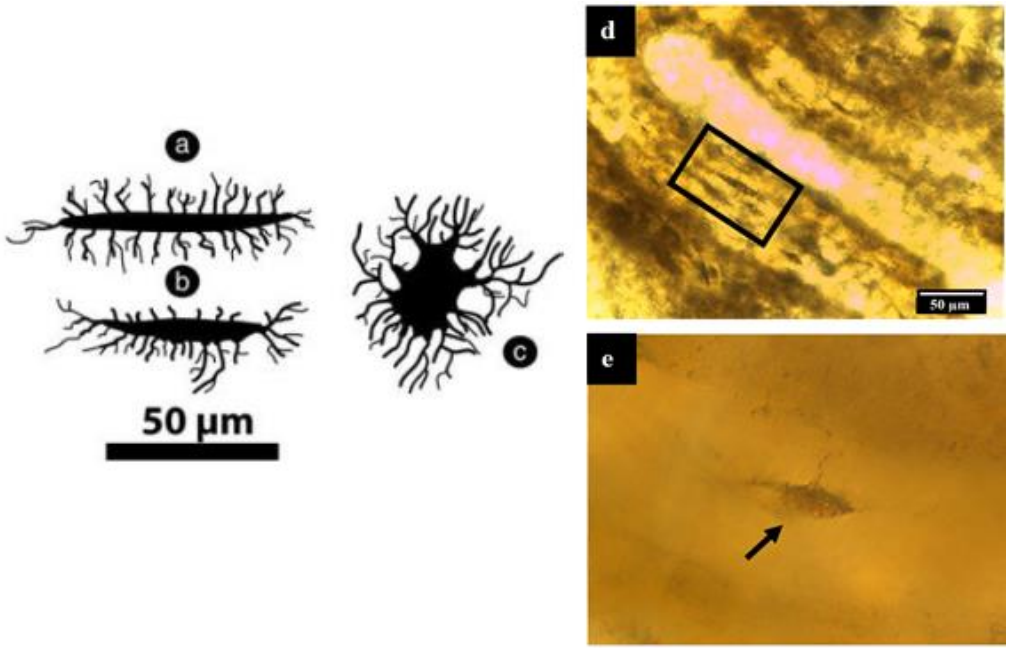


Figura 43. a. Osteocito aplanado: morfotipo dominante de la corteza interna. b. Osteocito semi-aplanado: abundantes en laminilla de osteona primaria y secundaria. c. osteocito radiado: morfotipo dominante de cortezas externas. Tomada de Cadena & Schweitzer (2012). d. Fotografia de seccion trasnversal de CIP3, donde se observa la forma del osteocito en el recuadro negro, en 40x. e. Vista en 100x de un osteocito.

A partir de la figura 43, y con las observaciones realizadas podríamos posiblemente clasificar las estructuras encontradas como osteocitos de tipo B que predominan en la capa interna del caparazón (Cadena & Schweitzer, 2012), lo cual es concordante ya que arriba de dicha lamina de hueso compacto se encontraron acumulaciones de tejido esponjoso; sin

embargo las osteonas parecen estar deformadas, aunque es difícil de determinar debido a que no se encontraron más patrones de referencia.

Al realizar los 3 protocolos seleccionados inicialmente (ver tabla 1), se puede decir que las secciones delgadas funcionan de manera exitosa para la determinación de preservación microestructural de tejido óseo en muestras que muchas veces pueden estar altamente degradadas (Scheyer & Anquetin, 2008), por otra parte los resultados obtenidos a partir de este protocolo pueden ser mas profundos usando técnicas de desmineralizadación con el fin de aislar los remanentes óseos observados y así determinar si estos son orgánicos (celulas fosiles) o si por el contrario son moldes generados por procesos de cristalización y de precipitación de minerales en los distintos procesos fosildiageneticos (Tütken & Vennemann, 2011) (Barrientos, Sarmiento, & Galligani, 2016) (Collins, Nielsen-Marsh, Hiller, & Smith, 2002)

Para el protocolo de testigos en Microscopia Electronica de Barrido, las observaciones en su mayoria no arrojaron resultados satisfactorios, lo que puede deberse a la degradacion de las muestras, ademas se identifican otras estructuras que pueden generar confusión, debido a que no se tienen caracteres de comparacion claros como son el color, la trasparencia y la birrefrigencia, sin embargo los analisis EDS permitieron el establecimiento de los elementos y la concentracion de los mismos en las diferentes muestras, donde se evidencio gran cantidad de calcio y de fosforo (Tabla 3), por lo cual se asume que las muestras tienen un origen orgánico (Ross & Pawlina, 2015), ya que estos dos elementos son los dos componenetes principales de la hidroxiapatita, la cual a su vez es parte fundamental de la composicion nanoestructural de hueso. El analisis de testigos en MEB podria ser mejor empleado para la observaion de posibles celulas fosiles o de muestras que presenten una calidad mejor en la

preservación, por ejemplo muestras que contengan fibras colagenas como resultado de una buena preservacion ya que dichas estructuras son las primeras en degradarse en los procesos de fosilización (Bell, Skinner, & Jones, 1996).

6 CONCLUSIONES

Se determinó la preservación microestructural de fósiles de Villa de Leyva, adicionalmente se confirma que dicha preservación no está relacionada con los ambientes sedimentarios, por lo que es muy probable que el resto de los tres especímenes contengan áreas con mayor preservación.

La conservación externa de los fosiles no esta directamente relacionada con su preservacion interna, ademas la calidad de la preservacion microestructural si puede estar definida por procesos fosidiageneticos especificos para cada muestra.

La técnica mas efectiva para la observación de estructuras preservadas en el fósil fue la de secciones delgadas para microscopía petrográfica y óptica de luz transmitida, dado que en cada una de las muestras se pudo observar de manera clara la capa de hueso esponjoso, los remanentes de las trabeculas y algunos osteocitos en ellas, conservando en la mayoria de los casos su organización original.

La tecnica de observacion de testigos en el MEB fue la menos efectiva en cuanto a la observacion de estructuras o remanentes organicos, debido a que las estructuras identificadas presentaban una alta deformación como producto de los procesos de mineralización. A diferencia del protocolo de secciones delgadas la observacion en el MEB genera imágenes tridimensionales, lo que nos dio como resultado la observacion de altas cantidades de microcristales que deformaron las estructuras óseas.

En cuanto a la técnica de desmineralizacion, fue posible observar la matriz ósea de los tres especimenes, pero en solo dos se divisó lo que posiblemente son osteocitos con sus respectivas prolongaciones. Aunque no fue posible aislarlos totalmente de la matriz

Adicionalmente, la preservación microestrutural no esta distribuida uniformemente en todas las muestras, lo que puede estar relacionado con la ubicación del tejido hacia el exterior del fósil ó, a procesos de recristalizacion sectorizados.

A pesar de que en las tres tortugas se logro identificar remanentes oseós, el especimen CIP3 presenta la mejor preservación, permitiendo una caracterización de formas y estructuras, lo que podria ser el resultado de que la muestra tomada de dicho especimen pertenece a una parte del caparazón, el cual esta compuesto por una estructura diploe de hueso compacto y una lamina central de hueso esponjoso lo que puedo haber permitido la mayor preservación

Finalmente se determina la relación entre las microestructuras óseas encontradas en los individuos y su ambiente deposicional con una paleoecologia de tipo marino.

7 RECOMENDACIONES

Se debe enfocar el estudio de los fósiles en el ámbito paleohistológico a manera de complemento a los demás estudios realizados, para que de esta manera se puedan hacer inferencias más acertadas acerca de la paleoecología de los individuos, sus hábitos, su alimentación y las relaciones con individuos pertenecientes al mismo lugar y periodo de tiempo.

Uno de los ideales de este trabajo es aportar al desarrollo e implementación de un banco de datos nacional, que aportaría a futuros investigadores y podría dar las bases para la realización de modelos geobiológicos más precisos de nuestro territorio.

Las secciones delgadas paleohistológicas deben tener un grosor mínimo de 50µm aproximadamente, ya que al ser menor el grosor se pierden estructuras importantes en la observación.

Se debe tener en cuenta la capacidad de expansión-contracción de las rocas en las que se encuentran encapsulados los fósiles, ya que la elaboración de las secciones delgadas se puede ver afectada por ruptura del vidrio petrográfico debido a estos movimientos.

Uno de los factores importantes en la observación de secciones delgadas y material desmineralizado es el no tratamiento del fósil con ácidos, debido a que este procedimiento puede afectar el material preservado ya que el ácido no solo actúa en la superficie del fósil, si no que entra en las porosidades de este y sigue actuando durante un tiempo, disminuyendo así las posibilidades de encontrar microestructuras preservadas.

Cada uno de los protocolos empleados en este trabajo arrojaron resultados positivos, pero estos se enfocan de manera distinta en cuanto a la observación del tejido óseo, lo ideal es relacionarlos para obtener resultados y análisis más robustos.

8 AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Daniel Pomar por contagiarnos de su gusto por la paleontología. Al Centro de Investigaciones Paleontológicas, a su Gerente Mary Luz Parra y todo el equipo de trabajo por abrirnos las puertas y brindarnos toda la información, material y orientación requerida.

Al PhD Edwin Cadena por su confianza, apoyo y dedicación en todo el desarrollo de esta investigación; a nuestra directora de trabajo de grado MSc Carmen Helena Moreno Durán por su apoyo incondicional, sus consejos y su gran disposición para esta investigación.

Al PhD Freddy Rodríguez Saza por sus aportes, orientación académica y apoyo emocional en todo momento.

Al Departamento de Geociencias de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá) por sus aportes académicos y técnicos en la elaboración de algunos de los protocolos, especialmente al Técnico Carlos Armando Sanchez, por sus asesorías en la elaboración de protocolos y al Profesor Carlos Alberto Sánchez.

Al grupo de Biología Molecular de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas "BIOMOL" y al Profesor Luis Francisco Becerra por su colaboración en varios aspectos del presente trabajo.

A nuestra alma máter Universidad Distrital Francisco José de Caldas y al Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico por proporcionar los fondos sin los cuales no habría sido posible la realización de este estudio.

9 OTROS APORTES

El presente trabajo de grado, ha tenido participacion en modalidad de ponencia en un evento nacional y una internacional, A continuacion se menciona el evento, organizadores, fecha y titulo de la ponencia.

1. Evento: Conversatorio Bioarqueologia Molecular y Palehistología en Colombia.

   Organizado por: ARGE de Colombia, Facultad de Ciencias Sociales de laUniversidad de los Andes y BrainLine.

   Fecha: Viernes 25 de noviembre de 2016.

   Titulo de la Ponencia: Comparación de técnicas paleohistológicas para la identificación de tejido óseo en muestras paleontológicas.

2. Evento: XV CONGRESO NACIONAL DE PALEONTOLOGÍA.

   Organizado por: La Sociedad Mexicana de Paleontología y la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

   Fecha: Del 26 al 30 de junio del 2017.

   Titulo de la Ponencia: Descripción de tejido óseo, en tres ejemplares del orden Testudines del periodo Cretácico, hallados en Villa de Leyva, Colombia.

10 BIBLIOGRAFIA

Alcaldia de Villa de Leyva. (23 de Junio de 2015). *Sitio oficial de Villa de Leyva en Boyacá, Colombia*. Obtenido de Sitio oficial de Villa de Leyva en Boyacá, Colombia: http://villadeleyva-boyaca.gov.co

Barrientos, G., Sarmiento, P., & Galligani, P. (2016). EVALUACIÓN DE LA DIAGÉNESIS ÓSEA MEDIANTE EL USO DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB): APROXIMACIONES ANALÍTICAS APLICABLES A MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS. *REVISTA ARGENTINA DE ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA*, 1-13.

Bell, L. S., Skinner, M. F., & Jones, S. J. (1996). The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance . *Forensic Science International*, 129-140.

Bromage, T., Juwayeyi, Y., Katris, J., Gomez, S., Ovsiy, O., Goldstein, J., . . . Schrenk, F. (2016). The scaling of human osteocyte lacuna density with body size and metabolism. *ELSEVIER*, 33-40.

Cadena, E. A. (2007). The First Late Pleistocene Record Of Kinosternon (Cryptodira: Kinosternidae) Turtles For Northern South America, Pubenza Locality, Colombia. *South American Journal of Herpetology*, 201-205.

Cadena, E. (2015). The first South American sandownid turtle from the Lower Cretaceous of Colombia. *PeerJ*.

Cadena, E. (2016). *PaLeoT*. Obtenido de PaLeoT: http://paleot.weebly.com/about-turtles.html

Cadena, E. A. (2014). *The Record of Turtles in Colombia; A Review of the Discoveries, Research and Future Challenges.* Bogotá: Acta Biológica Colombiana.

Cadena, E. A., & Parham, J. F. (7 de Septiembre de 2015). Oldest known marine turtle? A new protostegid from the Lower Cretaceous of Colombia. *PaleoBios, 1*(32), 1-42. Obtenido de http://paleot.weebly.com/uploads/1/5/0/7/15071262/cadena_parhamdesmato2015.pdf

Cadena, E. A., & Schweitzer, M. H. (11 de Mayo de 2012). Variation in osteocytes morphology vs bone type in turtle shell and their exceptional. *Elsevier, 51*, 614-620.

Cadena, E. A., & Schweitzer, M. H. (15 de Octubre de 2014). A Pelomedusoid Turtle from the Paleocene–Eocene of Colombia Exhibiting Preservation of Blood Vessels and Osteocytes. *Journal of Herpetology, 48*(4), 461–465.

Cadena, E., Ksepka, D., & Norell, M. (2012). New material of Mongolemys elegans Khosatzky and Mlynarski, 1971 (Testudines: Lindholmemydidae) from the Late

Cretaceous of Mongolia with comments on bone histology and phylogeny. *American Museum Novitates*.

Cerda, I., Sterli, J., & Scheyer, T. (2016). Bone shell microstructure of Condorchelys antiqua Sterli, 2008, a stem turtle from the Jurassic of Patagonia. *ELSEVIER*, 133–146.

Chávez Aponte, E. O., Alfonzo Hernandez, I., Finol, H. J., Barrios N., C., Boada Sucre, A., & Carrillo Briceño, J. (2008). Histologia y ultraestructura de los osteodermos fósiles de Glyptodon clavipes Y Holmesina sp. (XENARTHRA: CINGULATA). *SciELO*, 618.

Chinsamy, A., & Raath, M. (1992). PREPARATION OF FOSSIL BONE FOR HISTOLOGICAL EXAMINATION. *Palaeontologica Africana*, 39-44.

Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., & Smith, C. I. (2002). The Survival of Organic Matter in Bone. *Archaeometry*, 383–394.

Crawford, N., Parham, J., Sellas, A., Faircloth, B., Glenn, T., Papenfuss, T., . . . Simison, W. (2015). A phylogenomic analysis of turtles. *ELSEVIER*, 250-257.

D' Agostino, P. (2007). Los Dinosaurios de la A a la Z. En P. D' Agostino, *Los Dinosaurios de la A a la Z* (pág. 15). Marenostrum.

Dal Sasso, G., Maritan, L., Usai, D., Angelini, I., & Artioli, G. (2014). Bone diagenesis at the micro-scale: Bone alteration patterns during multiple burial phases at Al Khiday (Khartoum, Sudan) between the Early Holocene and the II century AD. *ELSEVIER*, 30-42.

Dixon, R., Dawson, L., & Taylor, D. (2008). *The experimental degradation of archaecological human bone by anaerobic bacteria and the implications for recovery of ancient DNA.* Lincoln.

Etayo Serna , F. (1967). *bdigital.* Obtenido de bdigital: http://revistas.unal.edu.co/index.php/geocol/article/view/30374

Etayo-Serna, F. (1979). Zonation of the Cretaceous of Central Colombia by Ammonites. *Publicaciones Geologicas Especiales del Ingeominas*, 1-186.

Fernandez, S. R. (1998). Tafonomía y Fosilización. En B. Meléndez, *Trratado de Paleontología, Tomo I* (págs. 51-107). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.

Fernandez, S. R. (2000). *Temas de Tafonomía.* Madrid: Universidad complutense de Madrid, Departamento de Paleontología.

Finney, S., Cohem, K., & Gibbard, P. (Febrero de 2017). *Tabla Cronoestratigráfica Internacional.* (International Commission on Stratigraphy, Intérprete) Estados Unidos.

Fortoul, T., & Castell, A. (2010). *Histología y Biología Celular* (2da edición ed.). Mexico D.F.: Mc Graw Hill.

Geneser, F., Brüel, A., Ilso Christensen, E., Qvortrup, K., & Tranum Jensen, J. (2012). *Geneser Histologia* (4a Edición ed., Vol. IV). (K. Mikkelsen, Ed.) Kobenhavn: Editorial Medica Panamericana. Recuperado el 16 de Abril de 2016

Gutierrez, M., Martínez, G., & Nielsen-Marsh, C. (2001). Alteración Diagenética y Preservación Diferencial de los Conjuntos Óseos de la Localidad Arqueológica Paso Otero (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Estudios Geológicos*, 291-299.

Hirayama, R. (16 de Abril de 1998). Oldest known sea turtle. *Nature, 392*, 705-708. doi:10.1038/33669

Huertas, G. (2003). Flora Fosil de Villa de Leyva y sus Alrededores. En G. Huertas Gonzales, *Flora Fosil de Villa de Leyva y sus Alrededores* (pág. 15). Linotipia Bolivar.

IDEAM. (23 de Mayo de 2017). *IDEAM*. Obtenido de IDEAM: http://www.ideam.gov.co/web/siac/biodiversidad

Janello, J. M., Cerda, I. A., & de la Fuente, M. S. (2016). Shell bone histology of the long-necked chelid Yaminuechelys (Testudines: Pleurodira) from the late Cretaceous—early Palaeocene of Patagonia with comments on the histogenesis of bone ornamentation. *The Science of Nature*.

Jordana, X., Marín Moratalla, N., Moncunill Solè, B., Nacarino Menesesa, C., & Köhler, M. (2016). Ontogenetic changes in the histological features of zonal bone tissue of ruminants: A quantitative approach. *ELSEVIER*, 265-276.

Koon, H., O'Connor, T., & Collins, M. J. (2010). Sorting the butchered from the boiled. *Journal of Archaeological Science*, 62-69.

Kuratani, S., Kuraku, S., & Nagashima, H. (Enero- Febrero de 2011). *National Center for Biotechnology Information.* Obtenido de National Center for Biotechnology Information: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210938

López, P., Cartajena, I., Olivares, G., López, Ó., Carabias, D., & Morales, C. (2012). *Temas de Arqueología: Estudios Tafonómicos y Zooarqueológicos (II).* Buenos Aires, Argentina.

Lyson, T. R., Bever, G. S., Scheyer, T. M., Hsiang, A. Y., & Gauthier, J. A. (2013). *Evolutionary Origin of the Turtle Shell.* Elsevier.

Malam, J., & Parker, S. (2008). Dinosaurios y otras criaturas prehistoricas. En J. Malam, & S. Parker, *Dinosaurios y otras criaturas prehistoricas* (págs. 228-229). Barcelona: Parragon.

Müller , A. H. (1992). *Lehrbuch der Paläozoologie, Allgemeine Grundlagen.* Jena: Gustav Fischer Verlag.

Nacarino Meneses, C. (Junio de 2011). *Universidad Autónoma de Madrid.* Obtenido de Universidad Autónoma de Madrid: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/7748/42993_Carmen_Nacarino.pdf?sequence=1

Nagashima, H., Kuraku, S., Uchida, K., Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y., & Kuratani, S. (2013). *Morphology and Evolution of Turtles, Chapter 4.* Dordrecht, Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media. doi:10.1007/978-94-007-4309-0_4

Orlandi, G., Jordana, X., Moncunill Solé, B., & Köhler, M. (2016). Bone histology of the giant fossil dormouse Hypnomys onicensis (Gliridae, Rodentia) from Balearic Islands. *ELSEVIER*, 247-253.

Padian, K. (2013). Bone Histology of Fossil Tetrapods: Advancing Methods, Analysis, and Interpretation. En K. Padian, & E.-T. Lamm, *Bone Histology of Fossil Tetrapods: Advancing Methods, Analysis, and Interpretation* (págs. 1-11). Los Angeles: University of California Press.

Palombo, M., & Zedda, M. (2016). Surviving in a predator-free environment: Hints from a bone remodelling process in a dwarf Pleistocene deer from Crete. *ELSEVIER*, 255-264.

Páramo, M. (2015). Estado actual del conocimiento de los reptiles. *Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina*, *15*(1), 40–57. Obtenido de http://dx.doi.org/10.5710/PEAPA.12.06.2015.98

Patarroyo Gama, P. (2005). *Principios de Paleontología.* Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos.

Plotkin, P. (2007). *Biology and conservation of ridley sea turtles.* Baltimore: JHU Press.

Rogel, M., Hongjin, Q., & Ameer, G. (2008). The role of nanocomposites in bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, 4221–4352.

Ross, M., & Pawlina, W. (2012). *Histología: Texto y atlas color con biologia celular y molecular* (6ta edicion ed.). Bogota: Editorial medica panamericana.

Ross, M., & Pawlina, W. (2015). *Histología.* Madrid: Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.

Scheyer, T. (2007). *Comparative bone histology of the turtle shell (carapace and plastron): implications for turtle systematics, functional morphology and turtle origins.* Bonn.

Scheyer, T., & Anquetin, J. (2008). Bone histology of the Middle Jurassic turtle shell remains from Kirtlington, Oxfordshire, England. *Lethaia*, 85–96.

Scheyer, T., & Sánchez, M. (2007). Carapace bone histology in the giant pleurodiran turtle Stupendemys geographicus: Phylogeny and function. *Acta Paleontológica Polonica*, 137-154.

Scheyer, T., & Sander, P. (22 de Mayo de 2007). Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles. *THE ROYAL SOCIETY B, 274*, 1885–1893.

SiB Colombia. (8 de Mayo de 2017). *Sistema de Informacion sobre Biodiversidad de Colombia*. Obtenido de Sistema de Informacion sobre Biodiversidad de Colombia: http://www.sibcolombia.net/

Talevi, M. (2012). *Estudio paleohistológico de reptiles marinos de Patagonia (Plesiosauria, Mosauria, Ictiosauria, Chelonia): aspectos fisiológicos y paleoecológicos implicados.* Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata.

Tomassini, R., Miño Boilini, Á., Zurita, A., Montalvo, C., & Cesaretti, N. (2015). Modificaciones fosildiagenéticas en Toxodon platensis Owen, 1837 (Notoungulata, Toxodontidae) del Pleistoceno Tardío de la provincia de Corrientes, Argentina. *REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS GEOLÓGICAS*, 283-292.

Trueman, C. N., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N., & Weiner, S. (2004). Mineralogical and Compositional Changes in Bones Exposed on Soil Surfaces in Amboseli National Park, Kenya: Diagenetic Mechanisms and the Role of Sediment Pore Fluids. *Journal of Archaeological Science*, 721-739.

Tütken, T., & Vennemann, T. W. (2011). Fossil bones and teeth: Preservation or alteration of biogenic compositions? *Palaeo*, 1-8.

Universidad Complutense. (18 de Febrero de 2014). *https://www.ucm.es/*. Obtenido de https://www.ucm.es/: https://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-02-18-01%20fisiopatologia%20osea.pdf

Universidad Nacional de Rio Negro. (2014). *Sede alto valle y valle medio*. Obtenido de Sede alto valle y valle medio: http://sedealtovalle.unrn.edu.ar/index.php/todas-las-noticias/208-curso-de-postgrado-introduccion-a-la-paleohistologia-de-vertebrados

Universidad Politécnica de Valéncia. (2012). *Universitat Politécnica de Valéncia*. Obtenido de Universitat Politécnica de Valéncia: http://www.upv.es/entidades/SME/info/753330normalc.html