



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Ontogenetic study of the mechanical properties and architecture of the radius (appendicular bone) of two species of odontocetes *Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei*

Estudio ontogénético de las propiedades mecánicas y la arquitectura en el radio (hueso apendicular) de dos especies de odontocetos *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*

Carmiña Alba Fernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Facultat de Biologia
Departament de Biologia Animal
Programa de doctorat en Biodiversitat

Ontogenetic study of the mechanical properties and architecture of the radius (appendicular bone) of two species of odontocetes *Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei*

Estudio ontogénético de las propiedades mecánicas y la arquitectura en el radio (hueso apendicular) de dos especies de odontocetos *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*

Memoria presentada por
Carmiña I. Alba Fernández
Para optar al título de
Doctora
por la Universidad de Barcelona.

Barcelona, 2015

Director/Tutor:
Dr. Adrià Casinos Pardos,
Catedrático de Biología Animal
Departamento de Biología Animal

Codirector:
Dr. Alejandro Aguilar Vila,
Catedrático de Biología Animal
Departamento de Biología Animal

Dedicada amb tot el meu amor
a Àngel, Gaia i Marina i amb tot
l'afecte a l'àvia Palmira, que
sense ells això seria impossible

Agradecimientos

Querría comenzar agradeciendo a las personas que han hecho posible esta tesis; primero a Adrià que me dio la oportunidad de hacer esta tesis. Han sido muchos años juntos, por su esfuerzo supervisando y revisando los adelantos de este trabajo y su comprensión, muchas gracias.

También quisiera agradecer a Alex por cederme las muestras para realizar este trabajo, dándome apoyo y supervisión en momentos críticos. A Xon por toda la ayuda recibida para poder realiza la parte de análisis químicos.

A Peter Zioupos de Cranfiel University con el que aprendí una visión diferente de la investigación. Sin su ayuda y comprensión no sería posible el capítulo de micro y nano arquitectura del hueso. También agradecer a su equipo, incluyendo a Keith y en particular a Viv, con la que compartí muchas horas de laboratorio, que al igual que Richard me dieron cobijo en sus casa. Espero romper estereotipos que digan que los ingleses son fríos y poco amigables.

También agradezco a la Universidad de Barcelona y en especial a la Oficina de Gestió de la Recerca formada en su momento por Luis Escribano, Àngels Altes, Carlos Viladiu, Carlos Pérez, Antonio Casabosh y al resto del equipo, por compartir su tiempo durante la beca de colaboración sin la cual no habría podido desarrollar aunque fuera a medio tiempo la tesis. A la gente de los Servicios Científico Técnicos con los que aprendí muchas técnicas y pude procesar las muestras.

A lo largo de estos años tuve la oportunidad de disfrutar de una beca de movilidad BE por lo que agradezco al AGAUR por la estancia en la Universidad de Cranfield (Reino Unido) sin la cual no sería posible haber realizado una buena parte de la tesis y de ver como se realiza investigación en otro país.

No puedo olvidarme de toda la gente del departamento que sin su soporte y las horas compartidas la vida sería dura y poco divertida. En especial a Pin y Pon (Mari y Alex) que además de compartir muchas horas de laboratorio, las penas y alegrías que da realizar una tesis, son unos excelentes amigos. A los de biomecánica (Jorge, Elías, Eloy y Débora), a los de micromamíferos (Pepa, Francesc, Vera, entre otros), a los de herpetología (Gustavo, Miguel Ángel, Albert, Xavi, Núria, Marc, Alex R., Juan Carlos), a compañeros de "viaje" como fueron, Santi, María José, Giovanna, Toni, Pep, Víctor, Elena, Jordi, Yolanda, Marc, Victoria, Mónica y otros que no pongo el nombre por no hacer la lista interminable, agradecerles el tiempo y espacio compartidos con muchas anécdotas para contar.

Debo agradecer de un modo especial a la persona que más tuvo que sufrir esta tesis aparte de mí misma. Àngel, este trabajo también es tuyo. Sin ti no hubiese terminado nunca, y nunca te agradeceré lo suficiente tu apoyo durante todos estos años. Gracias por estar ahí y apoyarme en todos los planes y por tener juntos a Marina y a Gaia.

A la familia, no solo de México (mi madre, hermano, tíos y primos) si no también a los de aquí (tíos y primos), los cuales de una manera u otra han sido partícipes de esta aventura. A Andreia, Virginia, Mireya y Gloria por su ayuda y cariño.

Dejo para el final a una de las personas a la que va dedicada la tesis, mi abuela, una de las personas más importantes de mi vida. Sin ti no sería yo y se que soy una gran parte de ti. Gracias por tu alegría y tu fuerza, por ser un ejemplo a seguir y por todos los recuerdos de los cuales ahora careces y que ahora me llevo conmigo. Siento que ya no estés para ver que la terminé.

Índice:

Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	7
1 Introducción.....	11
1.1 Marco General.....	11
1.2 Hueso.....	12
1.2.1 Generalidades.....	12
1.2.2 Componentes del hueso.....	12
1.2.3 Desarrollo del hueso: osificación, modelado y remodelado óseo.....	15
1.2.4 Clasificación.....	18
1.2.5 Estructura de los huesos largos.....	20
1.2.6 Osteoporosis.....	21
1.3 Morfometría y biomecánica.....	24
1.3.1 Morfometría.....	24
1.3.1.1 Definición.....	24
1.3.1.2 Historia.....	24
1.3.1.3 Alometría.....	25
1.3.2 Biomecánica.....	25
1.3.2.1 Definición.....	25
1.3.2.2 Métodos de análisis.....	26
1.3.2.3 Generalidades de mecánica de hueso.....	27
1.4 Anatomía esquelética de los Cetáceos.....	29
2 Objetivos.....	35
3 Material y Métodos.....	37
3.1 Descripción de las especies.....	37
3.1.1 <i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen, 1833).....	37
3.1.2 <i>Pontoporia blainvillei</i> (Gervais & d'Orbigny, 1844).....	40
3.2 Muestras biológicas.....	42
3.3 Análisis biométricos.....	43
3.4 Análisis mecánicos.....	44
3.4.1 Ensayo de flexión.....	44
3.4.2 Análisis de dureza superficial (Microdurezas y Nanodurezas).....	46
3.4.2.1 Preparación de muestras.....	46
3.4.2.1.1 Corte de muestras.....	46
3.4.2.1.2 Limpieza de muestras.....	47
3.4.2.1.3 Inclusión en acrílico.....	47
3.4.2.1.4 Acabado de las muestras.....	47
3.4.2.2 Microdureza.....	47
3.4.2.3 Nanodureza.....	48
3.5 Análisis químicos.....	50
3.5.1 Análisis de elementos principales.....	50
3.5.2 Análisis de otros elementos.....	51
3.5.3 Análisis de aminoácidos.....	51
3.6 Determinación de la densidad y la porosidad de los huesos.....	52
3.7 Análisis estadísticos.....	53
4 Resultados.....	55

4.1	<i>Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species</i>	56
4.1.1	Introduction.....	56
4.1.2	Material and Methods.....	60
4.1.3	Results.....	61
4.1.4	Discussion.....	74
4.1.4.1	Allometric relationship in direct measured parameters.....	74
4.1.4.2	Allometric relationship in parameters indirectly measured.....	75
4.1.4.3	Theoretical allometry.....	76
4.1.4.4	Interspecific allometric models.....	79
4.1.4.5	Sex differences.....	79
4.2	<i>Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfines</i>	81
4.2.1	Introducción.....	81
4.2.2	Material y métodos.....	83
4.2.3	Resultados.....	85
4.2.3.1	Patrones de crecimiento.....	85
4.2.3.2	Análisis químicos.....	91
4.2.3.2.1	Análisis descriptivos.....	91
4.2.3.2.2	Análisis de varianza.....	92
4.2.3.2.3	Relación de la edad/talla con los elementos químicos.....	94
4.2.3.2.4	Relación de parámetros mecánicos con los elementos químicos.....	98
4.2.3.2.5	Relación de la proporción de fósforo-nitrógeno en el hueso.....	105
4.2.3.2.6	Relación de la proporción de carbono-nitrógeno en el hueso.....	106
4.2.3.2.7	Relación de la proporción de calcio fósforo en el hueso.....	107
4.2.4	Discusiones.....	107
4.2.4.1	Patrones de crecimiento.....	107
4.2.4.2	Análisis químicos.....	110
4.3	<i>Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone</i>	113
4.3.1	Introduction.....	113
4.3.2	Materials and methods.....	116
4.3.3	Results.....	121
4.3.3.1	General results:.....	121
4.3.3.1.1	Microhardness ANOVA.....	122
4.3.3.1.2	Nanohardness ANOVA.....	123
4.3.3.2	<i>Stenella coeruleoalba</i>	125
4.3.3.2.1	Microhardness.....	125
4.3.3.2.2	Nanohardness.....	130
4.3.3.3	<i>Pontoporia blainvillei</i>	134
4.3.3.3.1	Microhardness.....	134
4.3.3.3.2	Nanohardness.....	139
4.3.3.4	Physicochemical characteristics of bone.....	143
4.3.3.4.1	Statistical analyses.....	143
4.3.3.4.2	Allometric relationships.....	143
4.3.3.4.3	Age relationships.....	145
4.3.3.4.4	Percentage porosity relationships.....	149
4.3.4	Discussions.....	152
4.3.4.1	General results.....	152
4.3.4.2	Results per species.....	155
4.3.4.3	<i>Stenella coeruleoalba</i>	155
4.3.4.4	<i>Pontoporia blainvillei</i>	156
4.3.4.4.1	Nanohardness.....	157
4.3.4.5	Physicochemical characteristics of bone.....	157
5	Discusión general	159
6	Conclusiones	165
7	References	167

8	Resumen	179
8.1	<i>Capítulo 1: Introducción</i>	179
8.2	<i>Capítulo 2 : Materia y Métodos</i>	182
8.3	<i>Capítulo 4: Resultados</i>	185
8.3.1	4.1 Alometría estructural de los parámetros de la sección transversal de radio en dos especies de delfines.....	185
8.3.2	4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfines.	188
8.3.3	4.3 Caracterización de micro y nanodureza en radio del delfín.....	191
9	Anexos	197
9.1	<i>Anexo 1. Datos de los parámetros utilizados en el estudio.</i>	197
9.2	<i>Anexo 2 Medidas Externas</i>	197
9.3	<i>Anexo 3 Principio de similitud</i>	198
9.4	<i>Anexo 4 Equivalencia de las ecuaciones del Modelo de Gompertz</i>	200
9.5	<i>Annex 5 Other tables and graphs of Subchapter 4.3</i>	201

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de los componentes del hueso	12
Figura 2. Representación de las fibras de colágeno a tres escalas diferentes.....	14
Figura 3. Representación de las células que componen al hueso trabecular	15
Figura 4. Estructura microscópica del hueso. Copyright ©.The McGraw-Hill Companies, Inc.....	18
Figura 5. Tipos de hueso por su forma y su estructura.....	20
Figura 6. Esquema de las partes que forman el hueso largo de mamíferos. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.	21
Figura 7. Curva de esfuerzo/deformación unitaria de la región transversal de un material, donde σ_u es el último punto antes de la fractura, σ_y marca el punto de inflexión entre la región elástica de la plástica. El área bajo la curva refleja la energía que requiere el material antes de llegar a fractura. La pendiente de la gráfica en la región elástica es conocida como el módulo de Young y refleja la rigidez del material.	28
Figura 8. Anatomía básica de un odontoceto.....	29
Figura 9. Esquema del esqueleto de un odontoceto.....	30
Figura 10. <i>Stenella coeruleoalba</i>	38
Figura 11. Mapa de distribución de <i>Stenella coeruleoalba</i>	39
Figura 12. <i>Pontoporia blainvillei</i>	40
Figura 13. Mapa de distribución de <i>Pontoporia blainvillei</i>	42
Figura 14 a y b Parámetros biométricos medidos del radio de delfín listado	44
Figura 15 Esquema de la disposición para el ensayo de flexión en 3 puntos	45
Figura 16. Foto de la sección trasversal mostrando la superficie de fractura en el radio de <i>Stenella coeruleoalba</i>	46
Figura 17 Esquema representativo de las microindentaciones en color rojo y las nanoindentaciones de color azul.....	48
Figura 18. Gráfica de la secuencia estándar utilizada para hacer las nanoindentaciones.	49
Figura 19. Gráfica de la secuencia multicíclica utilizada para hacer las nanoindentaciones.	50
Figura 20. Metodología de la descomposición ácida de una muestra orgánica	51
Figure 21. Cetacean evolution and phylogenetic tree. These figures show many of the anatomical adaptation exhibited by cetaceans, mainly skeletal changes. Drawings are not to scale.	57
Figure 22. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse diameter and sagittal diameter) to Log body length in <i>Stenella coeruleoalba</i>	65
Figure 23. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body length in <i>Stenella coeruleoalba</i>	66
Figure 24. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse diameter and sagittal diameter) to body mass in <i>Stenella coeruleoalba</i>	67
Figure 25. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body mass in <i>Stenella coeruleoalba</i>	68
Figure 26. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse and diameter, sagittal diameter) to body length in <i>Pontoporia blainvillei</i>	69
Figure 27. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body length in <i>Pontoporia blainvillei</i>	70
Figure 28. Allometric logarithmic plots for direct measurements parameters (body length, radius length, transverse parameter and sagittal diameter) to body mass in <i>Pontoporia blainvillei</i>	71
Figure 29. Allometric logarithmic plots for indirect measurements parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body mass in <i>Pontoporia blainvillei</i>	72
Figura 30. Representación grafica del modelo de crecimiento de Gompertz	84
Figura 31. Representación grafica de la variación ontogenética en <i>Stenella coeruleoalba</i> . Los diagramas de dispersión que representan los diferentes parámetros vs. Edad, están basadas en el modelo de crecimiento de Gompertz.....	87
Figura 32. Representación grafica de la variación ontogenética en <i>Pontoporia blainvillei</i> . Los diagramas de dispersión que representan los diferentes parámetros vs. edad están basadas en el modelo de crecimiento de Gompertz.	89
Figura 33. Porcentajes de algunos compuestos químicos en <i>Stenella coeruleoalba</i> por edad y por categoría de edad.....	95
Figura 34. Porcentajes de algunos compuestos químicos en <i>Pontoporia blainvillei</i> por sexo, edad y categoría de edad.....	96
Figura 35. Regresiones entre porcentaje de hidroxiprolina y talla para ambas especies.	97
Figura 36. Regresiones entre porcentaje de colágeno y talla para ambas especies.	97

Figura 37. Regresiones entre porcentaje de calcio y la resistencia para <i>Stenella coeruleoalba</i> , entre sexos y entre categoría de edad.	99
Figura 38. Regresiones entre porcentaje de calcio y la resistencia para, <i>Pontoporia blainvillei</i> entre sexos y entre categoría de edad.	103
Figure 39. Bone classification according to cross section texture in dolphin's bone.....	113
Figure 40. Microscopic bone structures were (a) is a compact bone (b) is a Haversian system and (c) is a trabeculae bone	114
Figure 41. Position of the radii in the pectoral fin (in red) and cross section of the radii along the sagittal diameter.	116
Figure 42. Schematic representation of cross section points where did measured hardness in bone plate.	118
Figure 43a. Graphic of standard test where the x-axis represents indentation time (s), blue line a penetration deep (μm), and brown line a normal force. And 43b. Loading displace curves in <i>Stenella coeruleoalba</i> sample.....	119
Figure 44.a. Graphic of multicycling test where the x-axis represents indentation time (s), blue line a penetration deep (μm), and brown line a normal force and 44b. shows a typical set of load-displacement curves in indentation data for <i>Stenella coeruleoalba</i> sample.....	120
Figure 45. T-test box plot of microhardness for both species. A central circle to indicate the mean, a box to indicate the mean plus/minus the standard deviation and whiskers around the box to indicate the mean plus/minus 1.96*standard deviation (hence if your data follows the normal distribution 95% of data should fall within the whiskers.....	122
Figure 46. T-test box plot of nanohardness for both species	122
Figure 47. Cross-sectional representation of colors of microhardness average for position, where the dark area has more harshly than the light.	126
Figure 48. Box plots of microhardness between sexes for <i>Stenella coeruleoalba</i>	127
Figure 49. Box plots of microhardness between types of bone for <i>Stenella coeruleoalba</i>	127
Figure 50. Box plots of microhardness between age categories for <i>Stenella coeruleoalba</i>	128
Figure 51. Microhardness in trabecular bone (EC position) against age in <i>Stenella coeruleoalba</i> . Regression lines fitted to the data for sex.	129
Figure 52. Microhardness in cortical bone (EE position) against age in <i>Stenella coeruleoalba</i> . Regression lines fitted to the data for sex.	130
Figure 53. Boxplots of age category in nanohardness can also reveal the independence of samples for <i>Stenella coeruleoalba</i>	132
Figure 54. Box plots of type of test in nanohardness can also reveal the independence of samples for <i>Stenella coeruleoalba</i>	132
Figure 55. Standard nanohardness in trabecular bone (E position) against age in <i>Stenella coeruleoalba</i> . Regression lines were fitted to data for sex.....	133
Figure 56. Cyclic nanohardness in trabecular bone (W position) against age in <i>Stenella coeruleoalba</i> . Regression lines were fitted to data for sex.....	134
Figure 57. Microhardness cross-sectional representation as a function of position. The transversal diameter presents a larger microhardness than sagittal one.	135
Figure 58. T-test box plot for sex in <i>Pontoporia blainvillei</i>	136
Figure 59. T-test box plots for types of bone in <i>Pontoporia blainvillei</i> . Significant difference between are found.	136
Figure 60. T-test box plot for age category did not show significant differences in <i>Pontoporia blainvillei</i>	137
Figure 61. Factorial ANOVA analyses of microhardness for different bone types in <i>Pontoporia blainvillei</i> . ANOVA factors between age category and type of bone were $F=4.59$ $p=0.03$ (mean square MS = 0.8 and degrees of freedom = 1). The vertical bars denote 0.95 confidence intervals.....	138
Figure 62. Regression of the microhardness to age for females and males for <i>Pontoporia blainvillei</i> in cancellous bone.	138
Figure 63. Regression of the microhardness to age for females and males for <i>Pontoporia blainvillei</i> in cortical bone.....	139
Figure 64. Nanohardness t-test box plots for types of bone in <i>Pontoporia blainvillei</i> . Samples present significant differences.	140
Figure 65. Nanohardness t-test box plots for type of test in <i>Pontoporia blainvillei</i> . Significant differences come out.	141
Figure 66. Regression of the nanohardness to age for females and males for <i>Pontoporia blainvillei</i> in cancellous bone.	142

Figure 67. Regression of the nanohardness to age for females and males for <i>Pontoporia blainvillei</i> in cortical bone.....	142
Figure 68. Relationships between real density and age for sex in <i>Stenella coeruleoalba</i> , which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)	146
Figure 69. Relationships between percentage of real density and age for <i>Pontoporia blainvillei</i> , which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2).....	146
Figure 70. Relationships between percentage of porosity and age for <i>Stenella coeruleoalba</i> in whole samples and for sexes. The linear equation and coefficient of determination (r^2) is included. ..	147
Figure 71. Relationships between percentage of porosity and age for <i>Pontoporia blainvillei</i> . The linear equation and coefficient of determination (r^2) is included.....	147
Figure 72. Relationships between percentage of mineral content and age for <i>Stenella coeruleoalba</i> , which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)	148
Figure 73. Relationships between percentage of mineral content and age for <i>Pontoporia blainvillei</i> , which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)	148
Figure 74. Relationships between real density and percentage of porosity for <i>Stenella coeruleoalba</i> between sex.....	149
Figure 75. Relationships between real density and percentage of porosity for <i>Pontoporia blainvillei</i> , for females and males.....	150
Figure 76. Relationships between mineral content and percentage of porosity for <i>Stenella coeruleoalba</i> , for females and males.....	150
Figure 77. Relationships between mineral content and percentage of porosity for <i>Pontoporia blainvillei</i> , for females and males.	151
Figure 78. Relationships between strength and percentage of porosity for <i>Stenella coeruleoalba</i> , for females and males.....	151
Figure 79. Relationships between strength and percentage of porosity for <i>Pontoporia blainvillei</i> , for females and males.....	152
Figure 80. Plot for two species to show microhardness means for positions, shows three groups: the first is down, the second in the middle and third in the top.....	154
Figure 81. Plot for two species to show nanohardness means for positions.	154
Figure A5.82. Anova for two factors between sex and type of bone of <i>Stenella coeruleoalba</i>	202
Figure A5.83. Anova for two factors between type of bone and age category of <i>Stenella coeruleoalba</i>	202
Figure A5.84. Anova for two factors between sex and age category of <i>Stenella coeruleoalba</i>	203
Figure A5.85. Box plots of sex in nanohardness for <i>Stenella coeruleoalba</i>	203
Figure A5.86. Box plots of types of bone in nanohardness for <i>Stenella coeruleoalba</i>	204
Figure A5.87. Box plots of sex in nanohardness for <i>Pontoporia blainvillei</i>	204
Figure A5.88. Boxplots of age category in nanohardness for <i>Pontoporia blainvillei</i>	205

Índice de Tablas

Table 1. Allometric relationships of radius bone calculated for the length (l), transverse diameter (td), sagittal diameter (sd), second moment of area (I), cortical surface (A), polar moment (J), strength (σ) related to body length (L). 95% confidence intervals for a the y-intercept and b the slope are given. Other abbreviations: Sc <i>Stenella coeruleoalba</i> , Pb <i>Pontoporia blainvillei</i> , ω whole, f females, m males, n sample size, r correlation coefficient. Significant correlation are marked with an asterisk (*). C.I. b of red colour present a negative allometric value.	63
Table 2. Allometric relationships of radius bone calculated for the follow parameters (L), and (l), and (td), and (sd), and (I), and (sc), and (σ) related to body mass (M_b). The abbreviations and marks are the same that table 1.	64
Table 3. Comparison between sex for the both species. Significant differences are marked with an asterisk (*). Where sp is species, n is the size of the sample, F is Fisher's statistics and p provability levels.	73
Table 4. Comparison between to allometric coefficients at two difference levels: Phylogenetic (43) and ontogenetic (the present study). Where b (slope) in allometric equation, r correlation coefficient. Without correlation are marked with a symbol (ζ) and in red colour.	74
Table 5. A comparison of the theoretical allometric exponents secondary to geometric similarity with those collected in this studied.	78
Table 6. Interspecific comparison for allometric models, showing species (sp), equations (eq.), slope confidence intervals (C.I.b)	79
Tabla 7. Ecuación y parámetros estadísticos del modelo de crecimiento Gompertz en <i>Stenella coeruleoalba</i> . Los parámetros son talla (L), peso (M_b), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ), divididos en el total de muestra (ω), en hembras (f) y en machos (m). La (n) es el número total de muestras y (r^2) es el coeficiente de determinación. Los intervalos de confianza (C.I.) de las variables del modelo que presentan diferencias significativas están marcados con *	88
Tabla 8. Ecuación y parámetros estadísticos del modelo de crecimiento Gompertz en <i>Pontoporia blainvillei</i> . Los parámetros son talla (L), peso (M_b), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ), divididos en el total de muestra (ω), en hembras (f) y en machos (m). La (n) es el número total de muestras y (r^2) es el coeficiente de determinación. Los intervalos de confianza (C.I.) de las variables del modelo que presentan diferencias significativas están marcados con *	91
Tabla 9. Análisis descriptivos de la variación en el porcentaje de los elementos químicos de los huesos analizados en <i>Stenella coeruleoalba</i>	92
Tabla 10. Análisis descriptivos de la variación en el porcentaje de los elementos químicos de los huesos analizados en <i>Pontoporia blainvillei</i>	92
Tabla 11. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre sexos en <i>Stenella coeruleoalba</i> ..	93
Tabla 12. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre sexos en <i>Pontoporia blainvillei</i> ...	93
Tabla 13. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre categorías de edad (sexualmente inmaduros y maduros) en <i>Stenella coeruleoalba</i>	93
Tabla 14. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre categorías de edad (sexualmente inmaduros y maduros) en <i>Pontoporia blainvillei</i>	94
Tabla 15. Análisis de regresión entre la resistencia y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo, en categorías de edad, para el radio de <i>Stenella coeruleoalba</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson, y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	98
Tabla 16. Análisis de regresión entre la superficie cortical y los porcentajes de diferentes elementos químicos, para cada sexo según categorías de edad, para el radio de <i>Stenella coeruleoalba</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	100
Tabla 17. Análisis de regresión entre el segundo momento del área y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad para <i>Stenella coeruleoalba</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar). Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	101

Tabla 18. Análisis de regresión entre la resistencia y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo, según categorías de edad, para el radio de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson, y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	102
Tabla 19. Análisis de regresión entre la superficie cortical y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad, para el radio de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	104
Tabla 20. Análisis de regresión entre el segundo momento del área y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad para <i>Pontoporia blainvillei</i> . Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.	105
Tabla 21. Análisis descriptivo de la proporción del fósforo y el nitrógeno en las dos especies estudiadas.....	105
Tabla 22. ANOVA de la proporción del fósforo y el nitrógeno en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.	106
Tabla 23. Análisis descriptivo de la proporción del carbono y el nitrógeno en las dos especies estudiadas.....	106
Tabla 24. ANOVA de la proporción del carbono y el nitrógeno en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.	106
Tabla 25. Análisis descriptivo de la proporción del calcio y el fósforo en las dos especies estudiadas.	107
Tabla 26. ANOVA de la proporción del calcio y el fósforo en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.....	107
Tabla 27. Means, maximum and minimum values and standard deviation of total hardness measurements at both micro and nano scale are displayed. Abbreviation: n=sample size and Std. Dev.=standard deviation.	122
Tabla 28 ANOVA test of microhardness measurements for data obtained in different variables in both species with 0.95 confidence intervals. * stands for significant differences.	123
Tabla 29 ANOVA between species in microhardness in any position with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1.	123
Tabla 30 ANOVA in nanohardness for all parameters with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.....	124
Tabla 31. Factorial ANOVA examining the effect of species between means of different variables in nanohardness with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.	124
Tabla 32 ANOVA between species in nanohardness for any position, where C is trabecular bone, E and W are cortical bone, with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.	125
Tabla 33 ANOVA between age categories and species in nanohardness for any position with 0.95 confidence and degree of freedom=1. * stands for significant differences.....	125
Tabla 34. Descriptive statistics analysis in microhardness of sex of bone for <i>Stenella coeruleoalba</i> .	126
Tabla 35. Descriptive statistics analysis in microhardness of different positions for <i>Stenella coeruleoalba</i>	126
Tabla 36 Analysis of varianza (ANOVA) of parameters in microhardness for <i>Stenella coeruleoalba</i> . * stands for significant differences.	129
Tabla 37 Factorial Anova of microhardness for <i>Stenella coeruleoalba</i>	129
Tabla 38. Descriptive statistics analysis in nanohardness of sex, type of bone and age category for <i>Stenella coeruleoalba</i>	131
Tabla 39. Descriptive statistics analysis in nanohardness for standard indentation of all positions of bone for <i>Stenella coeruleoalba</i> . Cs: centre standard indentation, Es: east standard indentation. Ws: west standard indentation.....	131
Tabla 40. Descriptive statistics analysis in nanohardness for cyclic indentation for all positions of bone for <i>Stenella coeruleoalba</i> . Cm: centre cycling indentation, Em: east cycling indentation. Wm: west cycling indentation.	131

Table 41 Anova nanohardness for <i>Stenella coeruleoalba</i> . * stands for significant differences.	133
Table 42 Factorial Anova of nanohardness for <i>Stenella coeruleoalba</i> . * stands for significant differences.	133
Table 43. Microhardness descriptive statistics analyses for sex, type of bone and age category in <i>Pontoporia blainvillei</i>	134
Table 44. Descriptive statistics analysis in microhardness of different positions for <i>Pontoporia blainvillei</i>	135
Table 45 Analysis of varianza (ANOVA) of parameters in microhardness for <i>Pontoporia blainvillei</i> . * stands for significant differences.	137
Table 46 Factorial ANOVA for microhardness between all parameters in <i>Pontoporia blainvillei</i> . * stands for significant differences.	137
Table 47. Descriptive statistics analyses in nanohardness for sex, type of bone and age category in <i>Pontoporia blainvillei</i>	139
Table 48. Nanohardness descriptive statistics analysis for standard indentation at all positions of bone for <i>Pontoporia blainvillei</i>	140
Table 49. Nanohardness descriptive statistics analysis for cyclic indentation at all positions of bone for <i>Pontoporia blainvillei</i>	140
Table 50 Nanohardness ANOVA for <i>Pontoporia blainvillei</i>	141
Table 51 Nanohardness factorial ANOVA for <i>Pontoporia blainvillei</i>	141
Table 52. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterise the bone for all samples.	143
Table 53. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterize the bone for <i>Stenella coeruleoalba</i>	143
Table 54. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterize the bone for <i>Pontoporia blainvillei</i>	143
Table 55. Allometric relationships of radius bone calculated for the porosity (ρ_p) related to strength (σ). 95% confidence intervals for a the y-intercept and b the slope are given. Other abbreviations: Sc <i>Stenella coeruleoalba</i> , Pb <i>Pontoporia blainvillei</i> , ω whole, f females, m males, n sample size, r correlation coefficient, Degrees of Freedom=2. Significant correlation are marked with an asterisk (*). C.I. b of red colour present a negative allometric value.	144
Table 56. Allometric relationships of radius bone calculated for the real density (ρ_r) related to strength (σ). 95% confidence intervals for a the y-intercept and b the slope are given. Other abbreviations: Sc <i>Stenella coeruleoalba</i> , Pb <i>Pontoporia blainvillei</i> , ω whole, f females, m males, n sample size, r correlation coefficient, Degrees of Freedom=2.	145

1 Introducción

1.1 Marco General

Esta memoria es el resultado de una amplia investigación sobre la variación sexual y ontogénica de parámetros con significado mecánico en un hueso apendicular (radio) en dos especies de odontocetos: *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Mammalia). Se parte de la hipótesis de que las proporciones de las estructuras óseas no están sólo limitadas por los condicionantes de naturaleza mecánica, sino también por factores de tipo adaptativo, entre ellos los derivados de la posible presión selectiva de los tipos de locomoción.

Para ello se consideró también necesario analizar si los cambios que se producen en las series ontogenéticas repiten los patrones hallados previamente en series filogenéticas, comparando sexos y edades entre las especies estudiadas.

El propósito de este trabajo es comprobar hasta qué punto animales como los odontocetos, como consecuencia de su adaptación secundaria extrema al medio acuático, son capaces de neutralizar (contrarrestar) la atracción de la gravedad inherente al medio terrestre. Esta adaptación se podría presentar como un proceso espontáneo de osteoporosis (disminución de la densidad de los huesos debida a la pérdida de sus componentes minerales), que ya ha sido descrito en una especie de odontoceto (*Delphinus delphis*), y así generalizarlo a otras especies, observando si las posibles alteraciones estructurales que conlleva dicha osteoporosis tienen un significado mecánico parecido a los descritos en osteoporosis patológicas, o de las llamadas de desuso en el hombre. Más concretamente se trata de comprobar la existencia de una osteoporosis por desuso en las dos especies de delfines: *Stenella coeruleoalba* (marina) y *Pontoporia blainvillei* (marino-estuarina), además de conocer la variación de la densidad, la porosidad y la composición química (contenido mineral) de los huesos en ambas especie de odontocetos.

1.2 Hueso

1.2.1 Generalidades

El esqueleto de los vertebrados es el almacén del cuerpo del animal. Está formado de hueso y cartílago. Sirve de soporte para la inserción de los músculos y como protección de algunos órganos. Además mantiene la configuración general del animal y sus articulaciones posibilita el movimiento (1, 2).

El hueso se puede considerar un tejido o una estructura. Su origen es mesodérmico y se desarrolla a partir del mesénquima (3).

El cartílago es otro tipo de tejido que forma parte importante del esqueleto de los vertebrados, aunque en estado adulto está muy reducido, ya que en su mayoría ha sido sustituido por hueso. Sin embargo la mayor parte del esqueleto de un embrión está formado por cartílago. En los vertebrados superiores, en los que el cartílago es sustituido luego por hueso, se le denomina *cartílago transitorio*, mientras que cuando persiste durante toda la vida se le llama *cartílago permanente* (3, 4).

1.2.2 Componentes del hueso

El hueso está compuesto por células, colágeno, matriz ósea y minerales, tal como se muestra en el esquema (Figura 1).

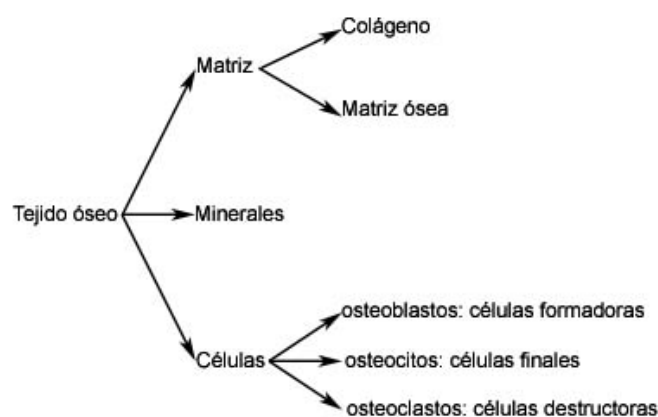


Figura 1. Esquema de los componentes del hueso

El hueso es un tejido compuesto, que presenta tres componentes fundamentales: la matriz orgánica, que constituye el 30%, minerales, en un 70%, y células óseas; estos porcentajes varían según los diversos tipos de hueso. El material orgánico da al hueso su flexibilidad mientras que el material inorgánico da al hueso su resistencia. La mayor parte de la matriz orgánica la constituyen fibras de colágeno (94%), siendo el resto sustancia fundamental, la cual es un gel semisólido altamente hidratado y bioquímicamente complejo (macromoléculas de proteoglicanos). La estructura dura del hueso se obtiene del componente mineral que está principalmente compuesto por los cationes calcio y magnesio y por el anión fosfato, en forma de hidroxiapatita. Este último es el más abundante y forma cristales entrelazados con fibras de colágeno; y está compuesto en menor cantidad por carbonato, citrato, cloro y flúor (5).

El peso específico es aproximadamente de $2,0 \text{ g/cm}^3$, pero varía dependiendo del hueso. Los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) constituyen uno de los principales reservorios de Ca y P, entre otros minerales. El Ca y el P aportan del 65 al 70% del peso seco del hueso. Las fibras de colágeno son del 25 a 30% del peso seco del hueso (4, 5).

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), como se mencionó anteriormente, es un compuesto cristalino integrado por tres moléculas de fosfato de calcio y una molécula de hidróxido de calcio. El concentrado de la hidroxiapatita es la matriz de calcio encontrada en el hueso. Esta sustancia natural contiene aproximadamente 14% de la proteína del colágeno y 4% de otras proteínas y aminoácidos menores (sobre todo hidroxiprolina, glicina y ácido glutámico). El calcio abarca entre el 24 y el 30% de la matriz de la hidroxiapatita y junto con varios elementos (cinc, potasio, silicio, manganeso, hierro) forma un conjunto biodisponible activo de calcio (6).

La matriz orgánica está formada principalmente por fibras colágenas. El colágeno es una proteína que está constituido por cadenas de polipéptidos, cada uno de las cuales es un polímero de aminoácidos. Las tres cadenas de polipéptidos que forman el colágeno aparecen entrelazadas formando una triple hélice, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno (Figura 2). Estas macromoléculas de tropocolágeno son muy pequeñas, con un peso por hélice en torno a las 300 kilodaltons (kDa) y se agrupan entre sí constituyendo estructuras llamadas fibrillas de colágeno. Cada fibrilla de colágeno está constituida por miles de

moléculas de tropocolágeno. Centenares de estas fibrillas se unen lado a lado formando fibras colágenas mucho más voluminosas (7).

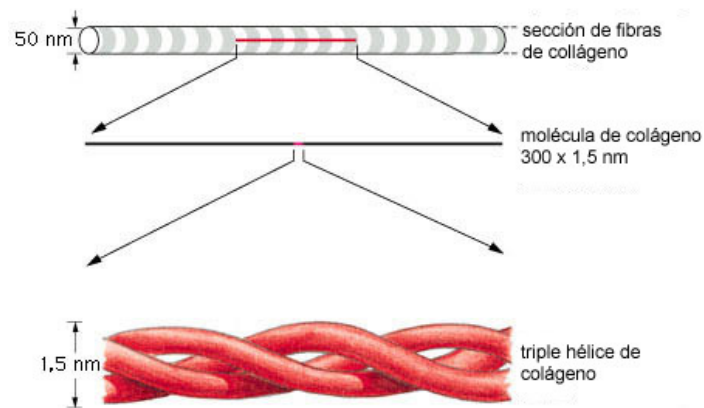


Figura 2. Representación de las fibras de colágeno a tres escalas diferentes.

Existen tres tipos de células óseas propiamente dichas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Sin embargo también podemos distinguir las células osteoprogenitoras que son células de origen mesodérmico a partir de la que se generan los osteoblastos y los osteocitos (Figura 3).

Los osteoblastos son las células que forman el hueso y que han perdido la capacidad de dividirse por mitosis. Segregan colágeno y otros materiales (proteoglucanos y glucoproteínas) utilizados para la construcción del hueso, siendo precursoras de otras células óseas, ya que sintetizan la parte orgánica de la matriz. Se disponen siempre en la superficie ósea, lado a lado, en una disposición que recuerda al epitelio simple y a medida que segregan los materiales de la matriz ósea, ésta los va envolviendo convirtiéndolos en osteocitos (8).

Los osteocitos son las células maduras que mantienen el hueso. Se originan a partir de los osteoblastos, que se encuentran en la superficie interior de la matriz ósea ocupando las lagunas de las que parten canalículos. Cada laguna contiene un osteocito. En el interior de los canalículos, las prolongaciones de los osteocitos próximos establecen contactos mediante uniones comunicantes que permiten el flujo intercelular de iones y pequeñas moléculas, como las hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo de los huesos (3, 8).

Los osteoclastos son células móviles, gigantes, ampliamente ramificadas, con partes dilatadas que contienen entre 6-50 núcleos o más. Los osteoclastos derivan de los monocitos de la sangre circulante, reabsorben el tejido óseo y participan en los procesos de remodelación de los huesos (8).

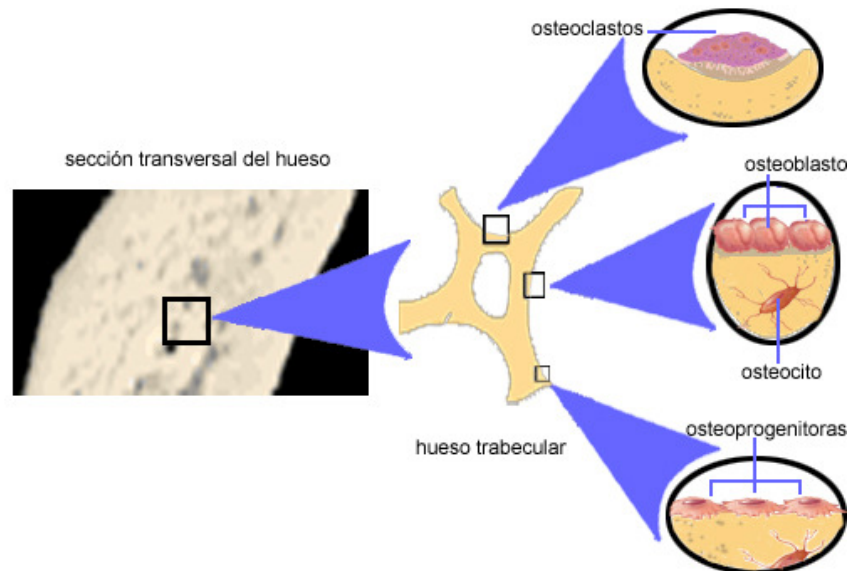


Figura 3. Representación de las células que componen al hueso trabecular

1.2.3 Desarrollo del hueso: osificación, modelado y remodelado óseo

La relación entre las actividades de los osteoblastos (formación del hueso) y los osteoclastos (reabsorción del hueso) varía a lo largo de la vida del organismo, lo que nos permite diferenciar tres procesos durante el desarrollo del esqueleto: osificación, modelado óseo y remodelado óseo.

Osificación:

La mayor parte del esqueleto se origina tempranamente en el embrión, a partir de células de la capa mesodérmica. A medida que el embrión se desarrolla, las células del mesodermo migran y se agrupan en los lugares donde se formarán las estructuras óseas(4). La osificación es el proceso por el cual se forma hueso nuevo. Se puede formar de dos maneras:

- Por osificación intramembranosa que es directa de tejido conjuntivo sin pasar por el estado de cartílago. Se produce por la condensación de las células mesenquimáticas en áreas específicas del mesénquima o tejido conectivo

embrionario donde se formará el hueso. Cuando aumenta la vascularización y las células mesenquimáticas se transforman en osteoblastos. Los huesos así formados se denominan huesos de membrana o dérmicos (algunos huesos craneales y faciales).

- Por osificación endocondral, que también se inicia con la condensación de las células mesenquimáticas en el sitio donde se desarrollará el futuro hueso. Sin embargo, estas células se diferencian en condroblastos que producen una matriz cartilaginosa que adquiere la forma general del futuro hueso. El modelo cartilaginoso, aumenta su tamaño por crecimiento intersticial y por aposición, y posteriormente aparece un centro de osificación primaria en la mitad de la diáfisis que hace que el hueso crezca por aposición aumentando su diámetro. Al mismo tiempo el hueso crece en longitud por sus extremos que presentan placas cartilaginosas en la que hay sustitución de cartílago preexistente (hueso de cartílago). En tal caso se habla de osificación endocondral o perióstica (huesos largos).

Ambos procesos requieren de una base sólida y un aporte vascular para la elaboración y la mineralización de la matriz extracelular (1, 3, 9).

Modelado y remodelado óseo:

Después de la osificación, el hueso crece cambiando su forma y tamaño durante el desarrollo del organismo. Sin embargo, el hueso no crece por deposición ósea en la superficie externa y reabsorción en la superficie interna. El aumento del tamaño del hueso ocurre por medio de un mecanismo que implica la actividad coordinada de los osteoblastos y osteoclastos en diferentes puntos del hueso y donde la deposición del hueso necesariamente excede a la reabsorción del hueso (4, 8).

- Modelado óseo: Este mecanismo implica las actividades coordinadas de los osteoblastos y osteoclastos pero desacopladas, resultando en el cambio del tamaño y la forma del hueso. Como consecuencia del proceso de modelado óseo, la superficie del hueso externa e interna (periostio y endostio, respectivamente) presenta una serie de microcaracterísticas que están relacionadas con las actividades de formación y reabsorción ósea. Las áreas relacionadas con la formación ósea se caracterizan por la presencia de las fibras de colágeno mineralizadas mientras que las áreas de reabsorción presentan lagunas de Howship. Asimismo, conforme el hueso crece, las

distintas partes que lo constituyen deben reubicarse para mantener el equilibrio funcional del hueso.

- Remodelación ósea: A diferencia del modelado, es una actividad que coordinada y acoplada los dos tipos de células y tiene lugar a lo largo de la vida del organismo para mantener y reparar los huesos formados. Una vez que se alcanza la madurez del esqueleto el proceso de modelado óseo se reduce considerablemente. Durante el periodo adulto se requiere un mantenimiento del esqueleto que implica una reorganización interna del hueso mediante el proceso denominado remodelación. El mantenimiento del esqueleto adulto implica la reparación de fracturas, prevención de la acumulación excesiva de hueso viejo que es frágil, mantenimiento la homeostasis de calcio y fósforo, y adaptación de la arquitectura interna del hueso a la variación de carga en biomecánica (9). La remodelación ósea se puede describir en 4 fases:

- Fase de reabsorción: los osteoclastos multinucleados activados, derivados de la médula ósea, reabsorben un área de la matriz ósea mineralizada.
- Fase de reversión celular: las células osteoprogenitoras (precursores osteoblásticos), los cuales pueden proliferar y diferenciarse en osteoblastos, migran a la laguna de reabsorción y detienen la actividad osteoclástica.
- Fase de formación: los osteoblastos depositan nueva matriz ósea y rellenan la laguna de reabsorción.
- Fase de reposo: durante la formación del hueso los osteoblastos quedan incluidos en el osteoide-matriz ósea y se diferencian en osteocitos. Los osteoblastos que se encuentran en la superficie del hueso permanecen inactivos y se denominan células quiescentes.

Se distinguen dos tipos de tejido óseo: a) el inmaduro o primario y b) el maduro, secundario o laminar. Los dos tipos poseen las mismas células y los mismos componentes de la matriz, pero mientras que en el tejido óseo primario las fibras colágenas se disponen irregularmente, sin orientación definida, en el tejido óseo secundario o laminar se organizan en láminas que pueden formar sistemas de Havers. Cada sistema de Havers u ostión está formado por un cilindro largo, a veces bifurcado y formado por 4 a 20 laminillas óseas concéntricas. En el centro del cilindro óseo hay un conducto revestido de endostio o conducto de Havers, que contienen vasos y nervios. Los conductos de Havers se comunican entre sí, con la cavidad medular y con la superficie externa del hueso por medio de conductos transversales u oblicuos,

llamados conductos de Volkmann (Figura 4). El sistema de Havers es producto del remodelado del hueso cortical. Estos se distinguen de los de Havers por no presentar laminillas óseas concéntricas (1, 3, 8). Un hecho interesante es que los sistemas de Havers de los diferentes mamíferos, aunque esencialmente similares, presentan peculiaridades en cuanto a su distribución, y en algunos casos es posible determinar una especie, basándose sólo en este carácter (2).

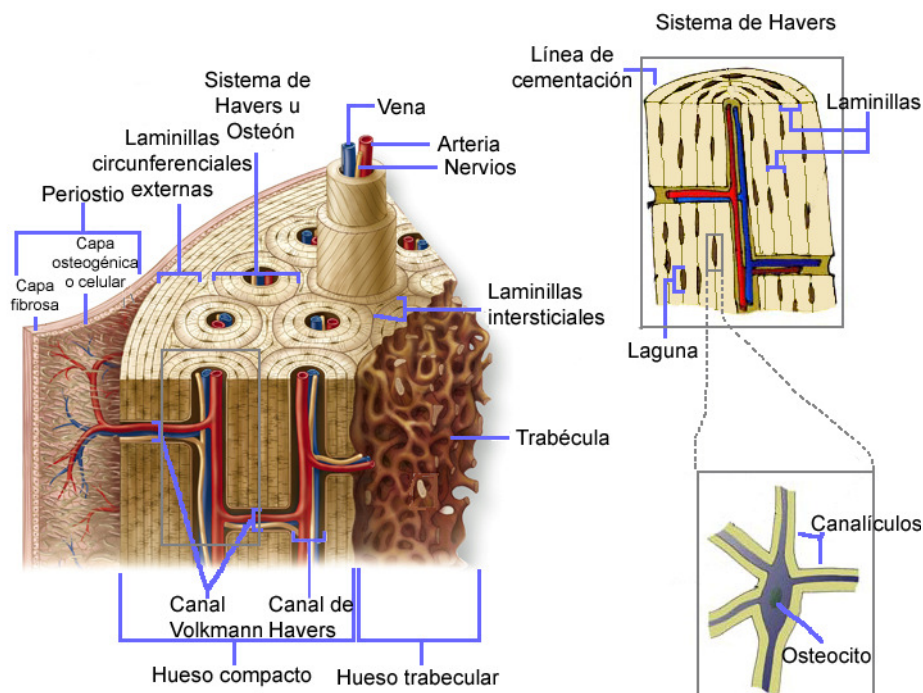


Figura 4. Estructura microscópica del hueso. Copyright ©. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Los huesos llevan fuertemente adherida una densa envoltura de tejido conjuntivo, el periostio, comparable al pericondrio que rodea al cartílago, al que se unen músculos, tendones y ligamentos. El crecimiento en espesor de los huesos es el resultado de la actividad de células formadoras de hueso, localizadas en la superficie interna del periostio (8).

1.2.4 Clasificación

Existen diferentes formas de clasificar el hueso:

a) Por su forma y su función. Generalmente se divide en cuatro clases, aunque esta clasificación no es totalmente satisfactoria (Figura 5).

- Huesos largos: son estructuras típicamente elongadas, de forma cilíndrica y con extremidades ensanchadas, y su función suele ser de soporte y de palanca (p.e. húmero).
- Huesos planos: son huesos delgados y con frecuencia curvos, en los que predominan dos dimensiones (presentan dos caras). Su función consiste en proteger los órganos que recubren (p.e. los huesos parietales).
- Huesos cortos: presentan unas dimensiones similares en longitud, anchura y grosor y su principal función es amortiguar los choques (p.e. los huesos carpianos).
- Huesos irregulares: son huesos de forma irregular, normalmente impares. Presentan funciones muy variadas, y no están claramente especializados (p.e. el sacro).

b) Por su estructura. La arquitectura del hueso vista en sección longitudinal o transversal presenta diferencias macroscópicamente y microscópicamente en los siguientes dos tipos (Figura 5):

- Hueso cortical o compacto: Representa el 80% del total del hueso, su superficie externa esta recubierta por el periostio. Se encuentra en la periferia y aparece como una masa sólida y continúa. Está compuesto por una sustancia intersticial calcificada, la matriz ósea, depositada en capas llamadas lamelas. Se caracteriza por espacios abiertos parcialmente rellenos ubicados en la cavidad medular recubierta por el endóstio. En su interior existe una red de finos canales longitudinales (canales de Havers) y transversales (canales de Volkmann) que transportan los vasos que posibilitan su nutrición y los nervios que transmiten sensibilidad.
- Hueso trabecular o esponjoso: se encuentra en una parte más interna que el hueso cortical, forma el 20 % del total del hueso y presenta una disposición tridimensional de laminillas o placas delgadas (trabéculas) y espículas, con médula ósea en su interior que se entrecruzan en diferentes direcciones. Los espacios existentes entre las laminillas se encuentran ocupados por la médula, y se denominan espacios medulares.

La diferencia principal entre ambos tejidos óseos viene dada por la porosidad que en el hueso cortical varía entre el 5 % y el 30 %, mientras que en el hueso trabecular varía entre el 30 % y el 90 %.

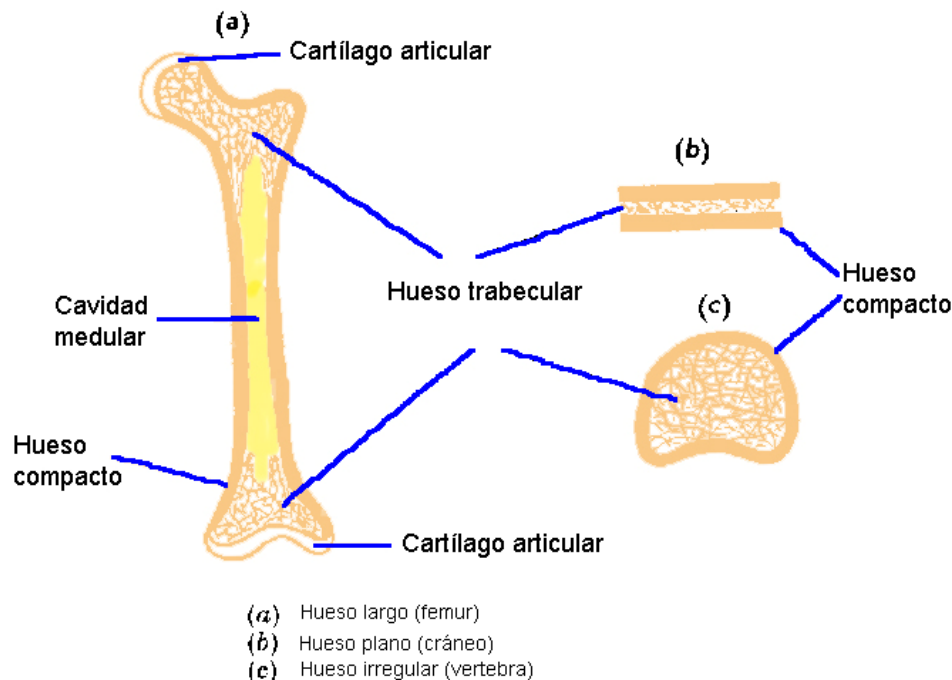


Figura 5. Tipos de hueso por su forma y su estructura

c) Por su disposición en la matriz. Se pueden clasificar en:

- Hueso laminar o tejido óseo secundario: el hueso laminar es hueso maduro con fibras de colágeno dispuestas en lamelas. En el hueso trabecular, las láminas están ordenadas paralelamente una detrás de otra, mientras que en el hueso compacto están organizadas concéntricamente alrededor del canal vascular, terminando en un conducto de Havers.
- Hueso inmaduro o tejido óseo primario: Es un hueso inmaduro con fibras de colágeno dispuestas irregularmente. Contiene pequeñas cantidades de sustancia mineral y una proporción alta de osteocitos en comparación con el hueso laminar. El tejido óseo primario es temporal y eventualmente se convierte en laminar(1-3, 8).

Debido a que este trabajo trata sobre uno de los huesos largos, solamente se explicara la estructura de este tipo de hueso.

1.2.5 Estructura de los huesos largos

Se distinguen anatómicamente tres regiones: una parte media o diáfisis, dos extremos habitualmente abultados, epífisis, y las zonas de unión epifisodiafisarias o metáfisis (Figura 6). Las epífisis pueden ser totalmente cartilaginosas o, si ha comenzado la osificación, estar separadas de la diáfisis por medio de *discos epifisarios cartilaginosos*. Esta parte contiene la zona de crecimiento del hueso. En el adulto, la metáfisis y la epífisis son continuas. La diáfisis es un cilindro de hueso compacto, con una cavidad o *conducto medular central* que contiene médula ósea roja, amarilla o ambas. La epífisis y la metáfisis están formadas por *hueso esponjoso* cubierto por una delgada capa de hueso compacto, que en la zona articular se recubre con *cartílago hialino*. La diáfisis está formada por *hueso compacto*, rodeado por una delgada vaina de *periostio*. Este último está formado por una *capa externa* fibrosa y resistente; y por una *capa interna*, llamada *capa osteógena*. La superficie interna del hueso está cubierta por una delgada capa de *endostio* (3, 8, 10).

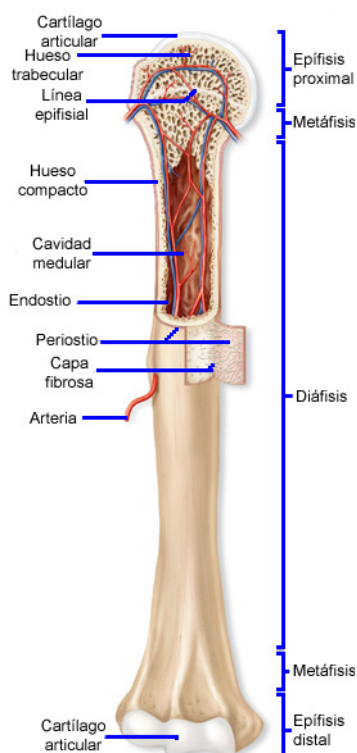


Figura 6. Esquema de las partes que forman el hueso largo de mamíferos. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

1.2.6 Osteoporosis

Se define como enfermedad esquelética sistémica con disminución de la masa o densidad ósea, deterioro microarquitectónico del tejido óseo cortical y, sobre

todo, trabecular, que aumenta la fragilidad del hueso y, consecuentemente, el riesgo de fracturas (11).

La densidad ósea es la cantidad de materia por centímetro cúbico. En algunas ocasiones se denomina también densidad mineral del hueso.

El hueso sufre una continua remodelación, por lo que la masa ósea aumenta o disminuye. Hay un aumento progresivo de la masa ósea desde el nacimiento hasta la edad adulta y es diferente según la estructura y tipo del hueso. El *pico de masa ósea*, que es la máxima densidad ósea se alcanza al llegar a la edad adulta.

A partir de este momento la masa ósea empieza a disminuir, por lo que es importante alcanza un pico de masa ósea alto para así hallarse cuando comienza el descenso con una densidad ósea más alta, por lo que la edad se considera un factor muy importante. Otro factor a tener en cuenta en la pérdida de masa ósea en mamíferos es el sexo, observándose en hembras una acelerada pérdida de la masa ósea causada por la movilización de calcio para la reproducción, mientras que en machos la pérdida no es tan grande.

La osteoporosis se clasifica en primaria y secundaria dependiendo de la causa que la provoque:

a) Primaria: no tiene factores causales

- Idiopática: Se da en jóvenes (mujeres amenoreicas) y hombres adultos (caída de la testosterona).
- Posmenopáusica o tipo I: Aparece tras la menopausia como consecuencia de la carencia de estrógenos.
- Senil o tipo II: Aparece a partir de los 70 años, como consecuencia de la pérdida de masa ósea que se ha producido con la edad.

b) Secundaria: es la osteoporosis que se da como consecuencia de otra enfermedad y hay diferentes causas (12):

- Enfermedades endocrinológicas como son los estados hipogonadales o las patologías endocrinas en sí.
- Enfermedades gastrointestinales y nutricionales.
- Enfermedades del tejido conectivo (Osteogénesis imperfecta, síndrome de Ehlers-Danlos y síndrome de Marfan).
- Enfermedades hematopoyéticas (Mieloma múltiple, leucemias y linfomas entre otras).

- Enfermedades renales (Insuficiencia renal crónica y acidosis tubular renal).
- Enfermedades gastrointestinales y nutricionales.
- Enfermedades inducidas por drogas (Glucocorticoides, heparina, anticonvulsivantes, entre otros).
- Inmovilización prolongada (Transplante de órganos, enfermedades reumáticas, rotura de huesos entre otras).

La osteoporosis de desuso, conocida también como de inmovilización, se define, al igual que la osteoporosis común (primaria tipo I), como una pérdida de mineral, principalmente de calcio, en los huesos. Se diferencia esencialmente por el mecanismo por el que dicha pérdida se da. La osteoporosis también puede definirse como la pérdida de densidad asociada con el deterioro de la microarquitectura del hueso. Por esta razón las propiedades mecánicas se consideran buenos estimadores del proceso de osteoporosis (13).

En las últimas décadas se están realizando muchos estudios sobre la osteoporosis de desuso. Este tipo de osteoporosis es considerado como el mayor problema de salud de los astronautas como resultado de los vuelos espaciales (14). También se presenta usualmente en personas que tienen una actividad física restringida y por consiguiente un reducido efecto anabólico del ejercicio, y de la acción gravitatoria en el esqueleto (15, 16). Este tipo de osteoporosis incrementa el riesgo de fracturas en los huesos al igual que el resto de tipos.

La dificultad de realizar estudios en el sistema esquelético humano por cambios gravitatorios, ha llevado a los científicos a utilizar modelos de osteoporosis en animales, siendo estos parte esencial del desarrollo de nuevas aproximaciones y tratamientos para la osteoporosis (17-19).

1.3 Morfometría y biomecánica

El tejido óseo está influido por procesos químicos y físicos, siendo relevante el crecimiento ya que es una característica biológica de los seres vivos. Un incremento en tamaño lleva implícitos muchos cambios, ya que significa no sólo un aumento en la talla sino también un cambio en la forma que generalmente conlleva una sucesión de adaptaciones fisiológicas. Las propiedades geométricas del hueso se ven afectadas por distintos factores que no solo incluyen la edad, sino también el sexo, especie, origen, ejercicio y contenido de minerales. Estas propiedades influyen en la biomecánica de los organismos.

1.3.1 *Morfometría*

1.3.1.1 *Definición*

Se define la morfometría como la rama de la biometría que agrupa un conjunto de métodos para la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma biológica y su variación (20). Es una técnica muy utilizada en estudios de comparación entre formas, taxones, poblaciones, o procesos de desarrollo. F. Galton (1901) definía la morfometría como el estudio estadístico de observaciones y fenómenos biológicos (21).

1.3.1.2 *Historia*

La diversidad de formas y tamaños contenidos en la naturaleza es apreciable a simple vista. Desde el punto de vista anatómico se presentan unas normas generales que determinan un patrón básico de organización, por lo que se han tratado de relacionar con una modelización matemática desde por lo menos la época clásica. Pitágoras (580-500 a. C.) propuso la idea de que toda forma, toda estructura y por lo tanto todo objeto natural, tenía que tener su propio número característico. Fue Arquímedes (287-212 a. C.) quien argumentó sobre la proporcionalidad existente entre la superficie y el volumen de figuras geométricas sólidas de distintos tamaños (21). Galileo (1564-1642) reconocería que la naturaleza está escrita en caracteres

geométricos enunciando el principio general de similitud, y D'Arcy Wentworth Thompson (1917) propuso una transformación cartesiana para relacionar las formas, es decir, analogías entre entidades matemáticas y estructuras biológicas (22).

El principio general de similitud da los valores teóricos para los exponentes alométricos en escalado isométrico basados en diferentes restricciones biomecánicas y la ley cuadrado-cubo; tiene dos hipótesis que predicen el comportamiento alométrico de los caracteres óseos, tanto biométricos como biomecánicos basándose en asunciones diferentes(23):

- Hipótesis de similitud geométrica: se basa en la geometría Euclidiana y la ley cuadrada-cúbica.
- Hipótesis de similitud elástica: asume que los organismos han evolucionado de manera similar para soportar los efectos de la gravedad. Estas proporciones isométricas se muestran en el anexo 3.

1.3.1.3 *Alometría*

J.S. Huxley (1932) estudió las proporciones animales desde un punto de vista estadístico, proponiendo una ecuación que permite describir el crecimiento de una región con respecto a otras o respecto al organismo en su conjunto. Este análisis consiste básicamente en el ajuste de las variables a estudiar a la función potencial $y = a * x^b$, conocida como ecuación de crecimiento alométrico, donde y es la variable dependiente, x la independiente, b es el coeficiente de alometría y a representa la intersección con el eje y . Entre magnitudes equivalentes el coeficiente b puede ser mayor que 1 (alometría positiva), menor que 1 (alometría negativa), o igual a 1 (isometría). Si bien no se otorga una significación biológica o general al coeficiente a , Gould (1971) sugirió que se trataba de un factor que expresa diferencias en tamaño entre organismos similares en forma, y propuso que la conservación de una similitud geométrica —que según este autor poseería una base genética simple— es relevante en macroevolución. (21, 24, 25).

1.3.2 *Biomecánica*

1.3.2.1 *Definición*

Se define como la ciencia que analiza el movimiento y otras características mecánicas de los seres vivos.

1.3.2.2 *Métodos de análisis*

El comportamiento mecánico del hueso puede estudiarse desde una doble perspectiva. Por un lado, por las características materiales del tejido, a través de pruebas mecánicas de secciones del hueso, y por otro, por las propiedades estructurales, tomando el hueso como una unidad anatómica entera y considerando su forma y arquitectura, que configuran su geometría. Ambos métodos, con el objetivo de registrar las resistencias óseas y las deformaciones óseas que acontecen en las situaciones de carga, permiten crear curvas y modelos para el estudio de la resistencia, energía de absorción, plasticidad, elasticidad y modelos arquitectónicos y de la microarquitectura estructural (26).

En el análisis biomecánico del aparato locomotor hay que tener en cuenta los siguientes factores:

1) Las fuerzas externas que se ejercen sobre los huesos y articulaciones: fuerzas musculares, peso (W) y fuerzas externas producidas por los cambios bruscos de velocidad del organismo.

2) La respuesta interna de los huesos: esfuerzo, deformación, momento, consecuencia de las fuerzas externas. En equilibrio estático, los momentos producidos por las fuerzas externas se equilibran con los momentos producidos por las fuerzas internas.

3) La resistencia máxima de los huesos, que es la tensión más alta desarrollada por el hueso antes de su ruptura, en general sigue esta serie: 1) resistencia a la compresión 2) resistencia a la tracción 3) resistencia a la flexión y 4) resistencia a la torsión.

Por esto, el sistema osteoarticular está construido de tal forma que optimiza estas propiedades de los distintos tipos de esfuerzo. Esto lo hace de varias maneras: combinando en distintas cantidades los componente moleculares de forma que el material adquiera distintas propiedades y combinando los diferentes elementos macroscópicos de forma que se maximice la respuesta funcional impidiendo el colapso del conjunto y/o la fractura de los componentes individuales (27).

1.3.2.3 *Generalidades de mecánica de hueso*

El hueso es el único tejido capaz de adaptarse mecánicamente y modificar su calidad y geometría en respuesta a cargas impuestas sobre el mismo (27). Las propiedades mecánicas del hueso son modeladas por fuerzas intrínsecas y extrínsecas. Las primeras pueden ser consideradas fisiológicas, mientras que las fuerzas extrínsecas no tienen límite en su magnitud y dirección. Ambos tipos de fuerzas causan alteraciones en: la geometría del hueso, las características microscópicas, la densidad, el grado de mineralización, y la orientación y disposición de las fibras colágenas (27, 28).

La respuesta del tejido óseo frente a las fuerzas que se aplican sobre su superficie depende tanto del tipo de fuerza como del tipo de hueso, de su densidad, arquitectura y composición. Las fuerzas que pueden actuar sobre el tejido óseo son de cuatro tipos: tensión, compresión, flexión y torsión. Las dos primeras son deformaciones simples y las dos últimas son combinaciones de tensión y compresión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea (fuerza normal) o de forma oblicua (fuerza de cizallamiento) (26).

Como se mencionó anteriormente, el hueso posibilita la acción mecánica de la musculatura y, a pesar de la dureza y resistencia del tejido óseo, éste posee cierta elasticidad. Los huesos responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico. La primera fase de deformación es elástica y depende de la rigidez del hueso. En esta fase, la deformación es temporal y se mantiene solo durante el tiempo de aplicación de la fuerza, tras lo cual el hueso recupera su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica, y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido, se produce la fractura (Figura 7).

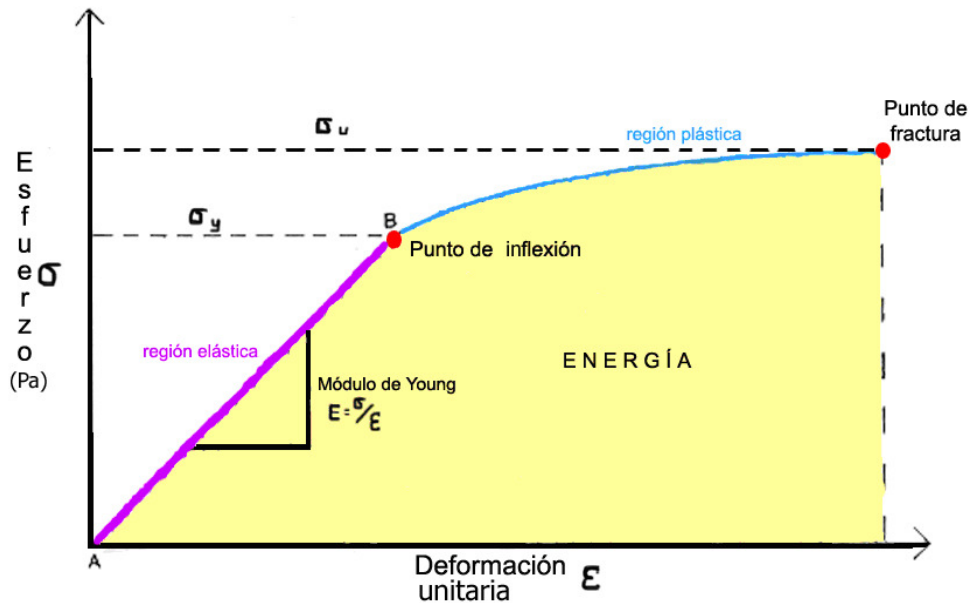


Figura 7. Curva de esfuerzo/deformación unitaria de la región transversal de un material, donde σ_u es el último punto antes de la fractura, σ_y marca el punto de inflexión entre la región elástica de la plástica. El área bajo la curva refleja la energía que requiere el material antes de llegar a fractura. La pendiente de la gráfica en la región elástica es conocida como el módulo de Young y refleja la rigidez del material.

Los huesos largos de humanos están formados fundamentalmente por tejido óseo compacto o cortical, son elásticos y poco plásticos. En estos huesos, la resistencia será mayor cuando la fuerza se aplique de forma vertical al sentido de la carga. Cuando la fuerza se aplica de forma oblicua, la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con más rapidez (29).

En los huesos integrados por tejido óseo esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo del eje vertical de las trabéculas vertebrales, y también cuando es paralela a los sistemas trabeculares del cuello femoral. Estos huesos, al ser menos densos que los formados por tejido óseo cortical, son menos elásticos y más plásticos, por lo que pueden presentar deformaciones mayores. Así, mientras que en los huesos integrados por tejido esponjoso las fracturas se producen cuando existen variaciones del 7% de su longitud, en los integrados por tejido compacto las fracturas se producen con variaciones del 2%(29).

1.4 Anatomía esquelética de los Cetáceos

La mayoría de los cambios adaptativos que han sufrido los cetáceos al pasar del medio terrestre al marino conllevan grandes modificaciones morfológicas, tanto en estructura como en función (Felts & Spurrell, 1966). Los cetáceos presentan una morfología claramente pisciforme, sin cuello visible y con vértebras cervicales cortas y a menudo soldadas. La fuerza locomotora está confiada a la aleta caudal, extendida en el plano horizontal, fibrosa y sin esqueleto. Faltan totalmente los miembros posteriores y la cintura pélvica (es estremadamente reducida y sin relación con la columna vertebral en misticetos) y los miembros anteriores tienen lo equivalente al brazo y al antebrazo de longitud notablemente reducida; los dedos presentan hiperfalangismo y externamente se han transformado en aletas natatorias. No tienen pelo y presentan una capa de grasa aislante debajo de la piel (30-32) (Figura 8).

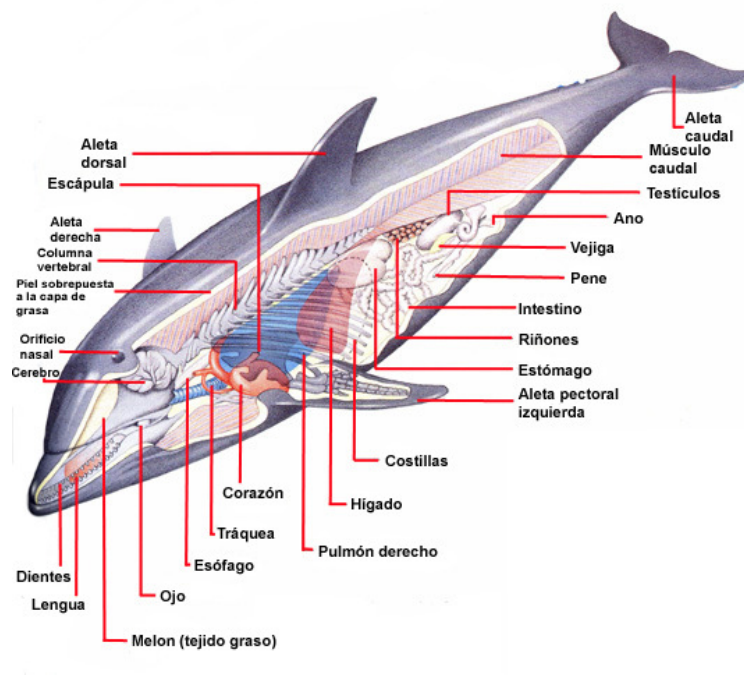


Figura 8. Anatomía básica de un odontoceto

La vida marina ha modificado también la anatomía interna de estos animales. Por lo que respecta al cráneo, éste difiere del resto de los mamíferos por los cambios en las relaciones topográficas de sus elementos y en las proporciones de éstos. El cráneo resultante en los cetáceos actuales es alto, ancho y corto; los huesos de la parte anterior han retrocedido deslizándose hacia atrás, cabalgando sobre los

elementos de posición originariamente posterior; a su vez los huesos posteriores avanzan; además hay un alargamiento antero-posterior de los huesos de la región facial, ya que los orificios nasales se han trasladado a la parte superior del cráneo para facilitar la respiración dentro del agua (33) (Figura 8). El proceso de cabalgamiento se designa con el nombre de telescopización, ya que los huesos encajan unos dentro de otros (Figura 9). Estas modificaciones aparecen claramente en los cetáceos modernos (ballenas y delfines), pero no en los cetáceos fósiles más antiguos (arqueocetos) que tienen el cráneo más parecido a la disposición usual del resto de mamíferos. Los embriones de los cetáceos actuales, muestran un cráneo muy parecido al de los mamíferos terrestres (34).

La dentición de estos mamíferos ha sido profundamente transformada y es el carácter que motiva la clasificación a nivel de suborden, separándolos en odontocetos y misticetos. Los primeros presentan homodontia (un gran número de dientes muy parecidos) y los segundos presentan barbas en vez de dientes, las cuales son de queratina y tienen un origen ectodérmico (35).

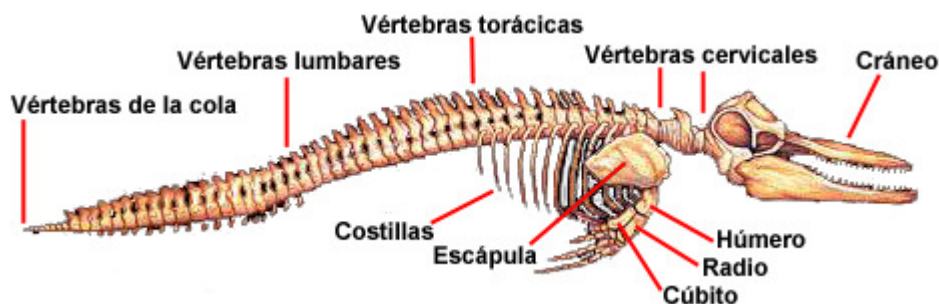


Figura 9. Esquema del esqueleto de un odontoceto

Por lo que respecta al resto de las características, y aparte de la uniformidad más o menos marcada de la morfología interna, los cetáceos difieren tanto en peso como en tamaño, medidas y proporciones del cuerpo; miden desde los dos metros de longitud y pocas decenas de kilos de algunos delfines hasta los treinta metros y más de cien toneladas de peso de algunas ballenas.

El desarrollo y la estructura de los huesos es muy interesante en la anatomía de las extremidades de los cetáceos, ya que revela las presentes adaptaciones al medio físico como parte de la evolución de las aletas (36). Una de las características que indicó que los basilosaurios (antepasados de los cetáceos modernos) tenía una vida totalmente acuática fueron las extremidades anteriores, ya que presentaban una

escápula larga y en forma de abanico que no presentan los mamíferos terrestres, y que el radio y el cúbito eran deprimidos según el plano de la aleta, y finalmente la movilidad restringida que presentaba la extremidad (37).

En los cetáceos las aletas pectorales tienen una importancia fundamental en su movilidad, ya que son las encargadas de dar dirección al movimiento, y de controlar la posición del cuerpo, además de contribuir a su forma hidrodinámica (38).

Las características distintivas que presenta el esqueleto de las aletas son las siguientes:

- En los cetáceos, las proporciones de las extremidades anteriores se han diferenciado tanto de las de mamíferos terrestres que el codo se encuentra aproximadamente en el contorno corporal y la extremidad visible es casi enteramente en el antebrazo y la mano (33).
- Presentan hiperfalangismo, así que el número de falanges por dígito junto con la forma del radio de la aleta son características a nivel específico.
- Tienen una osificación retardada y no presentan reabsorción, con lo que se consigue una muy lenta madurez ósea, y la creación de hueso esponjoso, y sin cavidad medular.

En un análisis somero del hueso de cetáceos se observa que existe una estructura porosa-esponjosa, con una densidad que en conjunto es de moderada a baja respecto a la de un mamífero terrestre. La densidad de los huesos de las aletas presenta una distribución relacionada no sólo con la orientación estructural del hueso, sino que las estructuras compacto-esponjosas se relacionan espacialmente (39). La densidad reducida de las aletas de cetáceos (40) va acompañada de un gran desarrollo de la matriz densa del tejido óseo, la cual podría ayudar a mantener la resistencia de la aleta (33).

Según Zangerl (1935), los datos paleontológicos, señalan que uno de los primeros estados en la adaptación marina secundaria, tanto en reptiles como en mamíferos, estuvo marcada por un incremento en la densidad de los huesos (paquistosis), mientras que después las formas de las mismas líneas desarrollaban huesos menos densos (38). Esto está en desacuerdo con los primeros investigadores, que decían que la densidad del hueso podría presentarse para vencer la capacidad de flotar en una adaptación incompleta de reptiles y mamíferos (39). En los mamíferos marinos actualmente se sabe que hubo un cambio de las formas típicamente

terrestres a osteopetrosis (huesos hiperdensos) y paquiosteosclerosis (combinación de paquiostosis y osteoesclerosis que se define como la sustitución del hueso trabecular por hueso compacto y la paquiostosis que es el incremento en la densidad del hueso y aumenta con el tamaño y la edad) y a continuación a osteoporosis en el primer cuarto de la historia evolutiva de los cetáceos, mostrando las divergencias de este grupo según sus nichos ecológicos y hábitos alimentarios (36, 41, 42).

La secuencia de aparición y fusión de los centros de osificación primaria y secundaria en las extremidades de los cetáceos sigue generalmente el patrón clásico en mamíferos (38, 43). La anatomía interna de las aletas es una mezcla interesante de retención, supresión y modificación de los elementos del tejido duro y blando de las extremidades anteriores de los mamíferos.

Las características morfológicas y funcionales se pueden explicar de la siguiente forma. La musculatura del hombro en todos los cetáceos es muy compleja y es la única que permite el movimiento de la articulación en la extremidad. El cociente de la longitud del radio-cúbito al del húmero varía levemente entre odontocetos; el esqueleto del antebrazo es generalmente más largo. El “codo”, plano y ancho, el cual articula al radio y al cúbito con el húmero, es una sincondrosis fuertemente reforzada por un ligamento grueso. En la “muñeca”, los carpianos y metacarpianos están completamente relacionados cerca de la superficie plana de la articulación. Los movimientos también están limitados por ligamentos derivados de los tendones, reduciendo o suprimiendo los músculos flexor y extensor (dependiendo de la familia de cetáceos a la que pertenezca (44). Un tejido conectivo muy denso y enmarañado rodea a los huesos y a los ligamentos en la parte sin músculo de la extremidad y llena los espacios interdigitales y completa la forma hidrodinámica. Sobre muchas de las extremidades, el tejido subcutáneo es delgado y firmemente adherido al fondo subcutáneo del tejido conectivo denso. La parte anterior de la aleta pectoral llega a ser continua con la gruesa capa de grasa del cuerpo (38, 43).

Particularizando en las características estructurales del radio de los odontocetos, encontramos que el radio es corto y plano, y que carece de cavidad medular abierta al igual que el resto de los huesos largos en cetáceos. Su sección transversal tiene esencialmente forma de cuña semi-lineal. Su articulación perpendicular al “codo” es una sincondrosis. En la forma linear del antebrazo sin

músculo el radio recibe predominantemente las cargas en el plano transversal medio lateral como los movimientos de la aleta (en el hombro), oponiéndose a la inercia del cuerpo y la resistencia del agua controlando la postura del cuerpo. El crecimiento del cartílago es circularmente anómalo, es decir, mínimo en la parte anterior, moderado en la parte lateral y media, y máximo en la parte posterior, mientras que el crecimiento proximal presenta una inclinación posterior igual que la elongación de los huesos. Por lo anterior podemos decir que el radio es único no solo en relación a su forma y articulación, sino también por su particular patrón de crecimiento diferencial (38, 39).

Como antecedente al presente trabajo, cabe citar el estudio de algunos aspectos de alometrías en huesos largos de cetáceos, dirigido a conocer su relación a nivel filogenético, hallándose que los delfines pequeños presentan una mayor robustez que la que necesitan las grandes ballenas (45), así como el trabajo en el que se plantea como hipótesis la posible descompactación ontogenética del hueso de la aleta pectoral de *Delphinus delphis* (46). El presente trabajo tendrá como uno de los objetivos el comprobar si esta hipótesis es generalizable a otros odontocetos.

2 Objetivos

La hipótesis de este trabajo tal como se ha introducido anteriormente en el marco general, se sintetiza en *que las proporciones de las estructuras óseas no están sólo limitadas por los condicionantes de naturaleza mecánica, sino también por factores de tipo adaptativo, entre ellos los derivados de la posible presión selectiva de los tipos de locomoción*. Para validar esta premisa se estudiarán dos especies de odontocetos, *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*, en las cuales se abordarán los siguientes objetivos:

1. Conocer el significado biomecánico de la geometría de la sección transversal del radio:
 - 1.1. Investigar la relación alométrica entre la longitud total del delfín con los parámetros geométricos de la sección transversal del radio.
 - 1.2. Investigar la relación alométrica entre la masa corporal del delfín con los parámetros geométricos de la sección transversal del radio (hueso largo).
 - 1.3. Determinar la dependencia de los parámetros geométricos del radio en función del sexo y de la especie.

2. Estudiar el crecimiento ontogénico de la estructura del hueso para cada especie estudiada por medio de las propiedades mecánicas y la composición química.
 - 2.1. Describir la curva de crecimiento para el total de individuos y para ambos sexos en relación con los parámetros geométricos y mecánicos de la sección transversal.
 - 2.2. Relacionar la edad con los principales elementos químicos del hueso tanto por sexo como por categoría de edad.
 - 2.3. Dar pautas que ayuden a comprender los procesos de maduración ósea y la variación en contenido mineral de los huesos de la aleta de los delfines.

3. Estudiar la micro y nano arquitectura de la sección transversal del radio de las especies estudiadas.

- 3.1. Describir la dureza de la sección transversal del hueso y comparar el hueso cortical y el trabecular a nivel micro y nano.
- 3.2. Conocer la variación de la densidad, porosidad y la composición química (contenido mineral) de los huesos en cada una de las especies para ambos sexos.
- 3.3. Establecer las posibles relaciones entre las variaciones de porosidad y las probables variaciones en contenido químico, por un lado y la resistencia, por el otro.

Los resultados obtenidos al desarrollar el objetivo 1 se presentan en la sección 4.1. Los del objetivo 2 en la sección 4.2 y los del objetivo 3 se encuentran en la sección 4.3.

3 Material y Métodos

En esta investigación se utilizaron huesos de aletas pectorales de dos especies, *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*, de las que se disponía de sendas series ontogenéticas que abarcaban desde neonatos hasta individuos plenamente adultos. Se eligió el radio por ser uno de los huesos largos generalmente más estudiados en biomecánica. Las mencionadas especies no sólo fueron escogidas por la disponibilidad del material, sino también porque se trataba de animales distanciados tanto desde el punto de vista filogenético como ambiental.

3.1 Descripción de las especies

Clasificación taxonómica de las especies:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Mammalia

Orden: Cetacea

Suborden: Odontoceti

Familia: Delphinidae

Especie: *Stenella coeruleoalba*

Familia: Pontoporiidae

Especie: *Pontoporia blainvillei*

3.1.1 *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833)

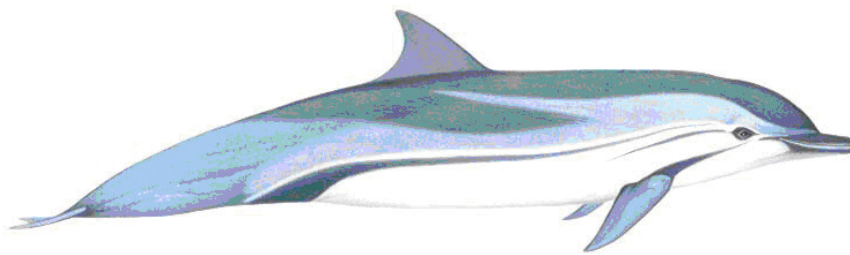
Nombres comunes: delfín listado (castellano), Dofí llistat (catalán), striped dolphin (inglés), blue-white dolphin (inglés), Meyen's dolphin (inglés), dauphin bleu et blanc (francés).

Descripción: Este delfín presenta cuerpo alargado, robusto y fusiforme; el morro es prominente. La aleta dorsal es falciforme y alta, la aleta caudal es pequeña y delgada con extremos en punta (Figura 10).

Las medidas corporales son las siguientes:

- hembras longitud promedio 2,4 m y el peso 110 a 153 kg
- machos longitud promedio 2,6 m y el peso 116 a 165 kg.

Color: En la parte dorsal, las primeras dos terceras partes del cuerpo son de color negro a gris oscuro, mientras que la tercera parte dorsal (posterior) es de color gris claro. Los flancos presentan dos bandas lanceoladas que salen del ojo, la primera gris claro y la segunda más oscura. La parte ventral es blanca hasta la región anal. El rostro es gris oscuro, al igual que las aletas pectorales.



Copyright: Martin Camm

Figura 10. *Stenella coeruleoalba*.

Reproducción: La edad de madurez sexual es variable según los sexos. Los machos llegan a la madurez sexual entre los 7 y los 15 años, mientras las hembras lo hacen entre los 5 y los 13 años. La época reproductiva es en invierno y a principios de verano en el Pacífico noroccidental, mientras que en el Mediterráneo ocurre al final del verano (47). El periodo de gestación dura de 12 a 13 meses. Los fetos crecen aproximadamente 0,29 cm/día. Al nacer miden de 90 a 100 cm de longitud, con ligeras diferencias entre rangos de talla y pesan aproximadamente 11 Kg (48). Los jóvenes son cuidados cerca de 16 meses por la madre (47, 48). Las hembras tienen típicamente un intervalo de alumbramiento de cuatro años, existiendo un periodo de descanso de entre 2 y 6 meses entre el fin de la lactancia y la siguiente reproducción (48).

Alimentación: Se alimentan de camarones, calamares y pequeños peces.

Comportamiento: Son animales gregarios que van en manadas de 100 a 500 individuos, pero se han registrado grupos de más de 2000 ejemplares. Dentro de la manada hay segregación por grupos (juveniles, adultos y adultos en apareamiento).

Longevidad: Se han encontrado individuos hasta de 47 años, aunque la estimación para esta especie es entre los 55 y 60 años de vida.

Distribución: Delfín marino, costero. Especie ampliamente distribuida en aguas templadas y tropicales, de los grandes océanos. Es especialmente abundante en el Mar Mediterráneo, las aguas templadas y cálidas del Pacífico norte, el Atlántico norte, Sudáfrica y algunas regiones del Océano Índico (49-52) (Figura 11).



Figura 11. Mapa de distribución de *Stenella coeruleoalba*.

En España el delfín listado es el cetáceo más abundante en las aguas ibéricas, tanto atlánticas como mediterráneas. En el Atlántico norte su distribución se extiende desde el sur de las Islas Británicas hasta las aguas norteafricanas, con un máximo de densidad situado probablemente frente a las costas ibéricas. Esta especie es muy habitual en todo el Mediterráneo occidental, especialmente en el noreste ibérico y mar de Liguria, zonas en las que representa más del 60% de los cetáceos varados o avistados. El delfín listado se halla también presente en el Mediterráneo oriental, pero su abundancia es probablemente menor. Las poblaciones que habitan las vertientes atlántica y mediterránea de la Península Ibérica parecen mantener una gran independencia. Así, los ejemplares del Mediterráneo son de tamaño ligeramente menor que los del Atlántico, y es probable

que existan también otras ligeras diferencias en coloración y morfología entre las dos poblaciones (53).

Hábitat: El delfín listado habita preferentemente aguas de una temperatura superficial comprendida entre los 18 y 25 grados centígrados. En general se trata de un animal de costumbres eminentemente pelágicas, aunque en el Mediterráneo es abundante en la plataforma continental a partir de una profundidad de unos 100 m a 200 m o de una distancia de la costa de unas 10 millas náuticas (49, 51).

3.1.2 *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844)

Nombre común: Franciscana (castellano), La Plata river dolphin (inglés), Toninha (portugués), Cachimbo (portugués), Dauphin de la Plata (francés).

Descripción: Delfín pequeño, que se caracteriza por presentar un hocico largo y angosto que crece en relación con la longitud del cuerpo. Cabeza abovedada. Ojos pequeños. Aleta dorsal pequeña y triangular, no muy prominente, y situada en el centro del dorso. Las aletas pectorales son anchas y de forma casi triangular (54) (Figura 12).

Las medidas corporales son las siguientes:

- hembras longitud: 137 - 177 cm (1,6 m promedio) y el peso 45 kg
- machos longitud: 121 - 158 cm (1,5 m promedio) y el peso 36 kg

Color: Ocre amarillento, aclarándose hasta un color mostaza pálido en el vientre (55, 56).



Figura 12. *Pontoporia blainvillei*

Reproducción: Se reproducen durante la primavera y el verano. Las hembras alcanzan la madurez a los 2 años de vida. Tienen una cría solamente, después de un período de gestación de once meses. Las crías miden unos 70 cm al nacer y son amamantadas alrededor de 4 meses. La madurez de los machos se produce entorno a los 3 años de edad (57).

Alimentación: Come peces, calamares, crustáceos y pulpos.

Comportamiento: Se conoce poco sobre su comportamiento. Viaja en grupos de entre 1 y 5 individuos

Longevidad: Aproximadamente entre 18 y 20 años.

Distribución: Es un delfín marino costero que habita aguas someras y estuarinas (Estuario del Río de la Plata) de las regiones templado tropicales del oeste del océano del Atlántico sur. Su distribución se extiende desde Itaúnas (18°25'S), estado de Espírito Santo en el sudeste de Brasil (58), a Golfo Nuevo (42°35'S), en la provincia del Chubut, Argentina (59). Sin embargo, la especie no se distribuye continuamente a través de esa franja. Algunos estudios indican que las franciscanas son extremadamente raras o están ausentes en dos áreas de la parte norteña de la franja entre Macaé (sur del Río de Janeiro) y Ubatuba (norte de São Paulo) y en el sur del estado de Espírito Santo (60-64). Las razones de que no estén presentes en estos no están claras, pero podría ser que entre los factores responsables se encuentre el hecho que la especie prefiere aguas de poca profundidad y turbias (61, 65, 66) (Figura 13).



Figura 13. Mapa de distribución de *Pontoporia blainvillei*

Hábitat: Aguas turbias próximas a las desembocaduras de ríos.

Antecesoros fósiles: Incluyen los generos de *Pliopontos* y *Parapontoporia*; especies subtropicales marinas encontrados en el Pacífico este, y generos como *Pontistes* y *Pontoporia* pertenecientes al Mioceno tardío encontrados en sedimentos marinos en Argentina (33).

3.2 Muestras biológicas

Los especímenes de *Stenella coeruleoalba* usados en el presente estudio provienen de animales que murieron durante la epidemia de morbillivirus epizoótico en el Mediterráneo occidental en 1990. La muestra se compone de 99 especímenes (47 hembras, 38 machos y 12 animales de sexo desconocido). El rango de edad va de 0 a 34 años, con longitudes que varían entre 94 centímetros, en los fetos, y 211 centímetros en los adultos.

Estos especímenes ya han sido utilizados en los trabajos sobre el estudio de las variaciones geográficas de la longitud máxima del cuerpo en delfín listado del Mediterráneo occidental (67); sobre la biología reproductiva de las hembras, donde se estudiaron la edad, madurez sexual, el periodo de gestación, el periodo de lactancia, la ovulación y el embarazo (48); y sobre la madurez, crecimiento y desarrollo de los huesos en las aletas pectorales, donde las características osteológicas y métricas fueron medidas por medio de radiografías (68).

Las muestras de *Pontoporia blainvillei* se obtuvieron de animales que fueron atrapados en redes de pesca en la localidad de Necochea (Argentina) entre 1988 y 1992 (69). La muestra consta de 37 especímenes (26 hembras y 11 machos). El rango de edad varía entre 6 meses y los 7 años, con longitudes que van desde los 101 a 157 centímetros.

Las aletas pectorales de ambas especies se preservaron congeladas a -23°C hasta que se utilizaron para este estudio.

Debido al origen del material, las medidas externas (talla y masa corporal) se tomaron en algunas ocasiones sobre el terreno y otras en el laboratorio. En el anexo 1 se muestra qué parámetros biométricos ya se tenían y cuáles se midieron para este trabajo.

3.3 Análisis biométricos

La longitud total o talla (L) de los delfines se midió usando el método Norris (70), el cual implica medir al ejemplar desde la punta de mandíbula inferior hasta la escotadura de la aleta caudal (anexo 2).

Para la masa corporal (M_b) se utilizó una balanza estándar. La edad (a) de los organismos se calculó a través del recuento de las bandas de crecimiento de los dientes, realizando en secciones longitudinales descalcificadas y teñidas (69, 71).

Los radios de las aletas fueron extraídos en ambas especies, se limpiaron separando todo el músculo de alrededor, y se midieron varios parámetros geométricos: la longitud (l), tomando la mayor distancia desde la parte proximal a la distal, el diámetro sagital (sd) y el diámetro transversal (td) para cada radio. Los diámetros fueron medidos en la mitad de la diáfisis (Figuras 14 a y b). Estas medidas se tomaron con un pie de rey MITUTOYO (± 0.1 milímetros de grado de precisión).

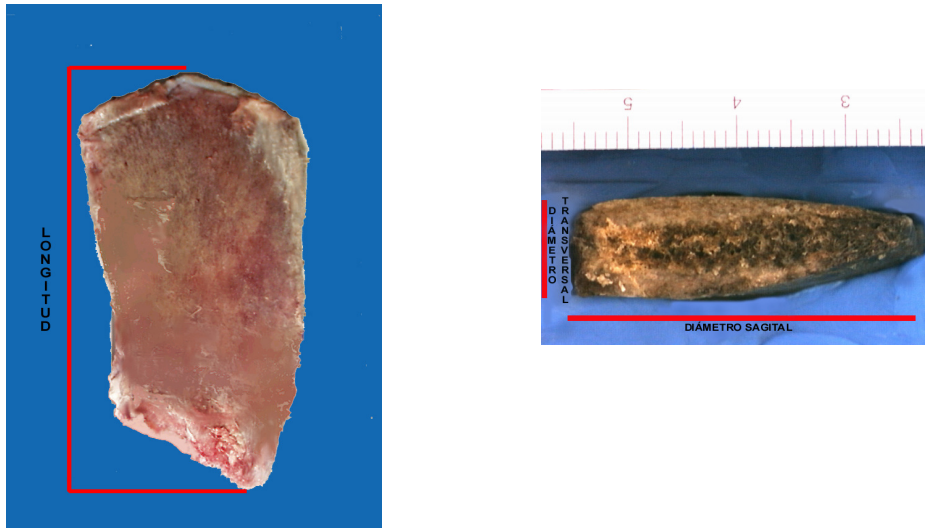


Figura 14 a y b Parámetros biométricos medidos del radio de delfín listado

Para relacionar las medidas de los diferentes parámetros en cada una de las especies estudiadas, se utilizó la ecuación potencial alométrica normal:

$$y = a x^b \quad \text{Ecuación 1}$$

Su transformación logarítmica, para pasar la relación curvilínea de las variables a lineal es:

$$\log y = b \log x + \log a \quad \text{Ecuación 2}$$

dónde b es el coeficiente alométrico y a representa la intersección en el eje y como se mencionó en la introducción.

3.4 Análisis mecánicos

3.4.1 Ensayo de flexión

Los ensayos de flexión se realizaron en una máquina hidráulica universal INSTRON 8511 (Universitat de Barcelona) para los huesos de *Stenella coeruleoalba* y una máquina Dartec Series HC10 (Cranfield University) para los huesos de *Pontoporia blainvillei*, con la finalidad de calcular la carga de fractura. Para ambas especies se utilizó el método en flexión por tres puntos (Figura 15), que actúa sobre el hueso durante su función. Los huesos se cargaron en dirección del plano sagital, en el punto medio de la longitud del radio y se llevaron a fractura. La velocidad del actuador fue de 0,5 mm/min. Se empleó una fuerza estática de 10

kN, y de 5 kN de fuerza dinámica en la célula de carga. La envergadura (distancia entre dos soportes) dependió de la longitud del hueso. Se utilizaron cinco distancias diferentes entre los soportes, tres para *Stenella coeruleoalba* (2,5, 3,5 y 5 cm) y dos para *Pontoporia blainvillei* (2 y 2,8 cm). Esta metodología es análoga a la utilizada en un estudio de huesos de aves (72-74).

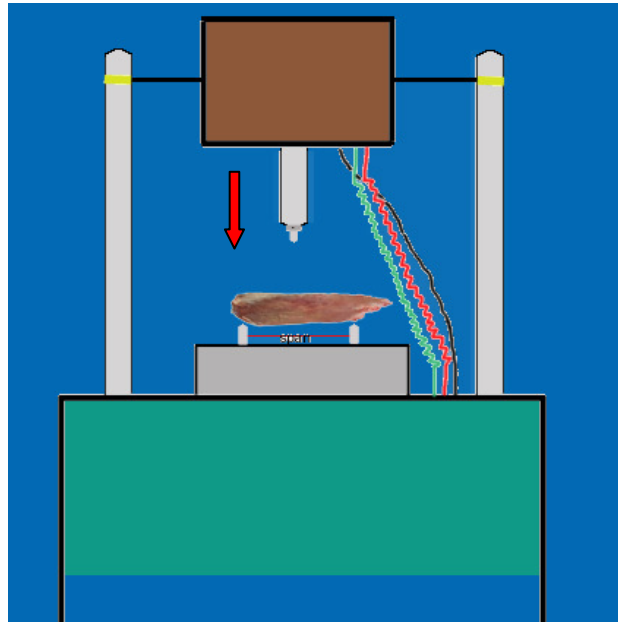


Figura 15 Esquema de la disposición para el ensayo de flexión en 3 puntos

La resistencia (σ) fue calculada de acuerdo con las siguiente fórmula (75):

$$\sigma = \frac{3 \times P_{\max} \times S}{2 \times sc \times sd} \quad \text{Ecuación 3}$$

dónde: P_{\max} es la carga máxima, S la envergadura, sc la superficie cortical (o área transversal) y sd el diámetro sagital.

De cada sección transversal de los huesos se hicieron fotografías con una cámara Canon Powershot G-3, mostrando la superficie de ruptura (Figura 16). Con las fotos se estimaron la superficie cortical o el área de la sección transversal (sc) y el segundo momento del área (I) mediante el programa IMAT, desarrollado por los “Serveis Científico Tècnics de la Universitat de Barcelona”. Para ello se utilizó la siguiente fórmula estándar:

$$I = \pi sd^3 \frac{td}{4} \quad \text{Ecuación 4}$$

dónde sd es el diámetro sagital y td es el diámetro transversal del hueso radio (76).

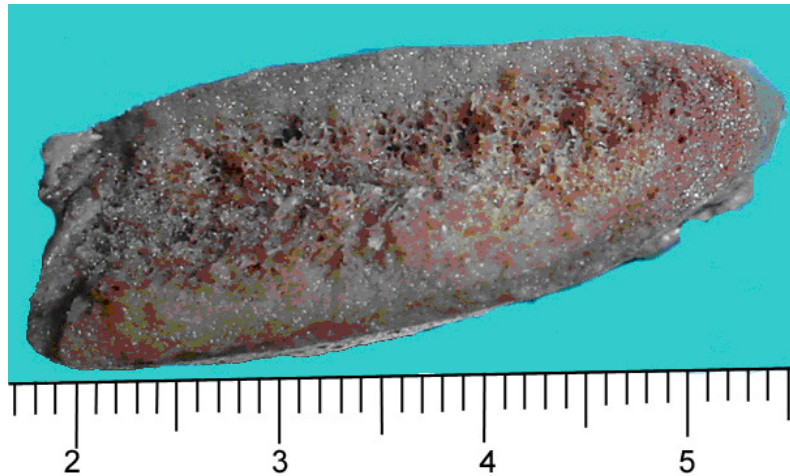


Figura 16. Foto de la sección trasversal mostrando la superficie de fractura en el radio de *Stenella coeruleoalba*.

3.4.2 Análisis de dureza superficial (Microdurezas y Nanodurezas)

La dureza superficial representa la resistencia que ofrece un cuerpo para ser penetrado o indentado en su superficie. Las técnicas cuantitativas de dureza se realizan utilizando un pequeño indentador que es forzado contra la superficie del material. La profundidad o tamaño de la indentación resultante es medida y relacionada a un valor de dureza. Los durómetros o durímetros forzarán al indentador contra el material con una carga determinada y por un tiempo preestablecido por el investigador. Para la medición de las huellas en las pruebas de microdureza se usa el microscopio incorporado al aparato.

3.4.2.1 Preparación de muestras

3.4.2.1.1 Corte de muestras

Se cortaron placas de la sección transversal de cada hueso, después de haber hecho los ensayos de flexión. De cada muestra se cortaron dos placas transversales en segmentos semicirculares de 2 a 3,5 mm, usando una sierra metalúrgica, modelo Struers, Accutom-2, a una velocidad de 4/12 rpm*100.

3.4.2.1.2 *Limpieza de muestras*

Con el fin de poder quitar la sangre y la grasa que tenían los huesos, se les hizo el siguiente tratamiento de limpieza. Se pusieron en una solución de metanol-cloroformo al 50 % por 48 horas. Después se pusieron en metanol al 100% por 2 horas más. Finalmente se cambiaron a una solución de 250 ml de agua destilada, con 3 gotas de hipoclorato de sodio. Mientras las muestras estaban en las soluciones se movían constantemente mediante una rotadora modelo Stuart Scientific Roller SRT1. Posteriormente cada placa fue limpiada con agua caliente a presión, para finalmente ponerlas a secar en una estufa (modelo Gallenkamp) a 36° C por 24 horas.

3.4.2.1.3 *Inclusión en acrílico*

A continuación, se cortaron anillos de PVC. Éstos, previamente etiquetados, se colocaron en un papel adhesivo dentro de los cuales se colocaba la placa de hueso referenciada. Se colocaron en un compartimiento de vacío (“lento de Buehler”) y se les agregó una solución hecha de 10 ml de resina (Polyester casting resin) y 6 gotas de endurecedor (hardener), y finalmente se activó la bomba de vacío. El tratamiento de impregnación se realizó en la máquina Bauhler Vacuum, durante 12 horas. Una vez listas las muestras se dejaron secar en la estufa por 48 horas a 36°C.

3.4.2.1.4 *Acabado de las muestras*

Posteriormente las muestras se lijaron y pulieron cuidadosamente en una pulidora modelo *Metaserv Rotary Pregrinder* hasta exponer la red trabecular del hueso. Para lijar se utilizaron lijas de agua con grano abrasivo de SiC, de grados progresivos, para dejar una superficie lo más lisa posible. Primero se utilizó la lija de 600, luego de 800, continuando con la de 1200, puliendo bajo continua irrigación de agua. Finalmente se pulió utilizando un algodón y una solución de micropulidor de aluminio.

3.4.2.2 *Microdureza*

Una vez prepararan las muestras se pusieron a secar en la estufa para posteriormente y a temperatura ambiente, hacer las indentaciones. Para ello se utilizó una máquina Indentec - modelo HWDM7-. Este modelo de máquina utiliza el sistema de Vickers, que consiste en un método de ensayo por indentación por el cual, con una máquina calibrada, se fuerza un indentador piramidal de base cuadrada que tiene un ángulo entre caras específico, bajo una carga predeterminada, contra la superficie del material a ser ensayado. A continuación se mide la diagonal resultante de la impresión luego de retirar la carga (77). Este método es el más común, ya que permite realizar mediciones en áreas muy reducidas, como por ejemplo en trabéculas. Emplea un diamante de forma piramidal con ángulo de 136° que al aplicarle una carga variable, deja una huella de forma cuadrangular, en la que se miden las diagonales y se promedian. Con estos valores el número de dureza superficial se obtiene a partir de un cuadro que los transforma automáticamente a los datos obtenidos. En cada muestra se hicieron 9 indentaciones (Figura 17) con cargas de 10 g.

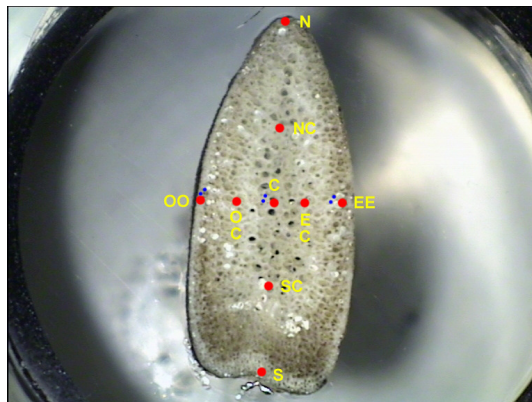


Figura 17 Esquema representativo de las microindentaciones en color rojo y las nanoindentaciones de color azul.

3.4.2.3 Nanodureza

Para llevar a cabo el microanálisis electrónico se midieron las nanodurezas de las muestras con la máquina modelo CSM Instruments – Nano Hardness Tester – y el software Indentation (versiones 3.0 y 3.59).

Como se muestra en la figura 17, sobre cada muestra se le realizaron 6 indentaciones. Se utilizaron dos tipos de secuencia: la secuencia “estándar” y la multicíclica. La primera aplica una carga de 10 mN con 30 s de carga, 30 s

estacionado y 30 s de descarga del indentador y con él se hicieron 3 de las indentaciones (Figura 18). El segundo protocolo, basado en una secuencia llamada “constante multicíclica”, aplica una carga y descarga tres veces, con dos periodos de descanso. Las cargas también fueron de 10 mN, y los tiempos fueron de 30 s carga, 10 s estacionado, 30 s descarga, 1 s descanso, 30 s carga, 10 s estacionado, 30 s descarga, 1 s descanso, 30 s carga, 30 s estacionado, 30 s descarga (Figura 19). Se utilizaron estas técnicas para poder ser comparadas entre ambas secuencias y también para compararlas con los resultados de un artículo ya publicado (78).

Las nanoindentaciones se llevaron a cabo paralelamente a las indentaciones de las microdurezas, en las posiciones CC, EE y OO (Figura 17) de las placas. En cada posición se hicieron los dos tipos diferentes de secuencias. Las nanoindentaciones se diferencian de las microindentaciones no sólo por su tamaño, sino también por la forma triangular del diamante que las hace. Esta técnica es muy utilizada en biomateriales, principalmente en animales domésticos (ovejas, caballos y vacas) y en el hombre.

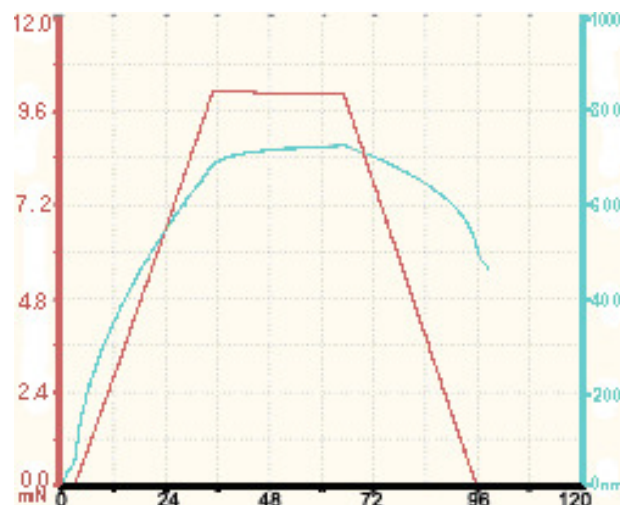


Figura 18. Gráfica de la secuencia estándar utilizada para hacer las nanoindentaciones.

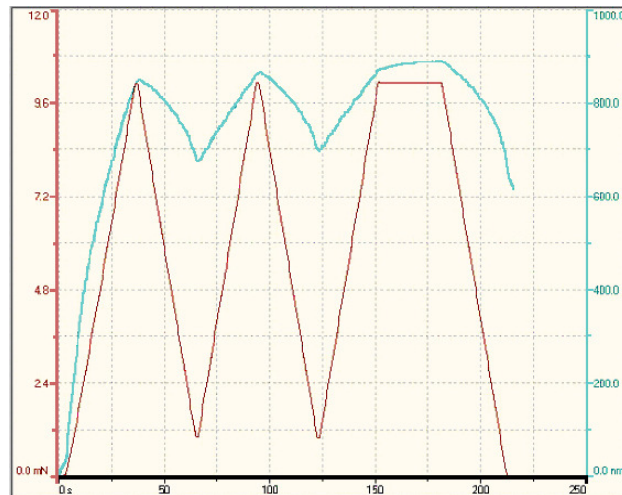


Figura 19. Gráfica de la secuencia multicíclica utilizada para hacer las nanoindentaciones.

3.5 Análisis químicos

Una vez hechos los análisis geométricos y mecánicos, se cortó una placa del hueso restante de cada una de las muestras. Cada placa de la muestra fue triturada para homogeneizarla en un mortero de ágata, y después puesta a secar en una estufa a 105 ° C por 24 h para poder realizar los siguientes análisis químicos.

3.5.1 Análisis de elementos principales

Se cuantificó el Ca, Mg, Na y P por ser los elementos principales. Para ello se hizo una descomposición ácida de las muestras tal y como lo describe la Figura 20 (79). Se pesaron 0,75 mg de muestra seca homogeneizada para Franciscana y 0,40 mg para el delfín listado y se sometió a una digestión (proceso mediante el cual se elimina la materia orgánica) en Selecta Bloc-digest con ácido nítrico concentrado y ácido perclórico.

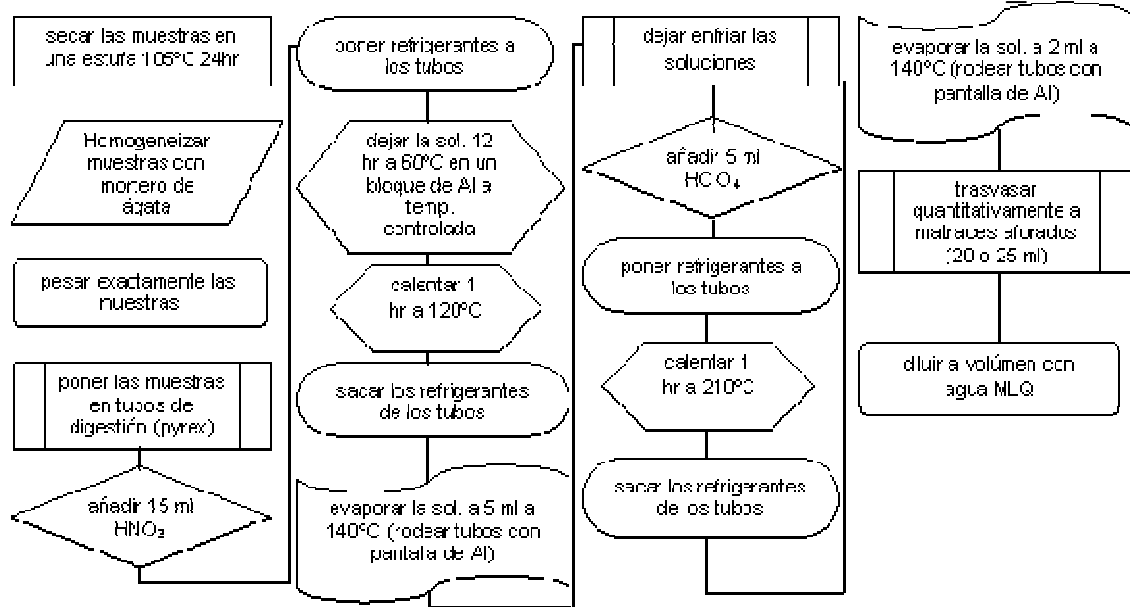


Figura 20. Metodología de la descomposición ácida de una muestra orgánica

El resultado de la solución se analizó en el espectrómetro óptico de emisión de plasma acoplado por inducción simultánea (ICP-OES) modelo PerkinElmer Optima 3200 RL.

3.5.2 Análisis de otros elementos

En las mismas muestras homogeneizadas y secadas se analizó el contenido de C y N. Para ello se pesaron 100 mg del triturado de cada muestra y, utilizando un analizador elemental NA 1500 (C.E. Instruments), se cuantificaron ambos elementos.

3.5.3 Análisis de aminoácidos

El resto de la muestra homogeneizada y secada se utilizó para cuantificar los aminoácidos, en particular la prolina y la hidroxiprolina, con la finalidad de estimar la cantidad de colágeno presente en los huesos (7). Para ello se utilizó la cromatografía de intercambio iónico.

3.6 Determinación de la densidad y la porosidad de los huesos

Después del proceso de limpieza y con la finalidad de determinar la densidad, porosidad y el contenido mineral de las muestras, la segunda placa se cortó y pulió hasta darle la forma geométrica de paralelepípedo. Se pesaron las muestras para obtener la masa. Para calcular la densidad y porosidad, primero fue necesario determinar el volumen (V) (Ec. 5), la masa seca (W_d), la masa húmeda (W_w), la masa sumergida (W_s).

$$V = h * t * d \quad \text{Ecuación 5}$$

donde h = largo, t = alto y d = ancho

Para calcular W_d se pusieron las muestras en la estufa a 36° por 12 horas, y después se pesaron todas las muestras utilizando una balanza modelo Metter Toledo ®. Para calcular W_w se pusieron las muestras en agua destilada por 12 horas. Después se centrifugaron en agua a 3000 r.p.m. por 2 minutos y se pesaron. Para calcular W_s se utilizó el método de imbibición que consiste en poner las muestras en agua destilada por 12 horas, después a centrifugar a 1000 r.p.m. por 5 minutos, para que el agua destilada penetre en todos los poros, y finalmente se pesaron sumergiéndolas en una vaso con agua destilada y tarada previamente, mediante una báscula digital.

Para calcular la densidad real (d_r) (Ec. 8) primero tuvo que calcularse la densidad aparente (d_a) (Ec.6)

$$d_a = \frac{W_w}{V} \quad \text{Ecuación 6}$$

Asumiendo que los poros del hueso están rellenos de agua y ésta se elimina al centrifugar, como la densidad del agua es $d_{wt} = 1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, el volumen trabecular o de la matriz (V_m) es igual al peso de agua eliminado,

$$V_m = \frac{(W_w - W_s)}{d_{wt}} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$d_r = \frac{W_w}{V_m} \quad \text{Ecuación 8}$$

Tenemos entonces que la porosidad (p) del hueso calculada es:

$$p = V_m / V \quad \text{Ecuación 9}$$

Para calcular el contenido mineral (C_m) (Ec.10) de las muestras y después de haber calculado los parámetros anteriores, se pusieron las muestras en una solución EDTA durante 14 días cambiándose cada 2 días. Al terminar este proceso las muestras se enjuagaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 36° C durante 12 horas y se pesaron (W_m). Con este proceso de desmineralización calculamos mediante la siguiente fórmula el contenido mineral de cada muestra:

$$C_m = \frac{(W_w - (W_d - W_m))}{W_w} \quad \text{Ecuación 10}$$

Finalmente, se cuantificó no solamente en los diferentes ejemplares, sino por zonas del área cortical.

3.7 Análisis estadísticos

Para analizar las relaciones alométricas (Ec. 1) se utilizaron dos modelos estadísticos de regresión: el modelo I cuadrático, comúnmente llamado de mínimos cuadrados, y el modelo II, conocido como el método de la mediana geométrica. Estos cálculos fueron hechos con el programa estadístico Alometra.

El modelo I, pese a ser la técnica más utilizada debido a su sencillez en los análisis alométricos, sólo se utilizó cuando la variable dependiente se calculaba indirectamente a partir de otro parámetro. El modelo II es un método más exacto de determinar la pendiente de la regresión cuando la variable dependiente es medida directamente (80-82). Para ambos modelos se hizo una transformación logarítmica en base 10 de los datos.

Se estudiaron las alometrías de los siguientes parámetros l , sd , td , l , sc y σ respecto a la L y a M_b y L con respecto a M_b ; paralelamente se calcularon los coeficientes de correlación en cada análisis estadístico. Para los parámetros l , sd ,

td , y sc se utilizó el modelo II de regresión y para los parámetros l y σ el modelo I (83). Las regresiones se calcularon para el total de la muestra y para cada sexo, por separado y para cada una de las especies (*Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*).

Para comparar las correlaciones de los parámetros L y M_b se utilizó una prueba de hipótesis conocida como el análisis Z-test para la igualdad de dos correlaciones utilizando el paquete estadístico SYSTAT v.9.

Para comparar las diferencias entre sexos en cada especie se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA).

Para relacionar diferentes parámetros con la edad se utilizó el modelo de crecimiento de Gompertz.

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos básicos y pruebas de comparación múltiple por medio del ajuste de Tukey. También se hicieron ANOVAs de un factor y de varios factores utilizando el paquete estadístico STATISTICA v.6 (1984-2002 StatSoft Inc.)

4 Resultados

Los resultados se presentan en tres subcapítulos. Esto es debido a la diferente naturaleza de las técnicas utilizadas. Se ha incluido una pequeña descripción de cada técnica más detallada en los subcapítulos. El primero de ellos, *Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species* aborda la investigación de los huesos como estructura relacionando la alometría con las propiedades mecánicas del hueso. El segundo titulado *Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfines* evalúa el crecimiento ontogénico del hueso. Finalmente, *Micro- and nano-hardness characterization of dolphin radius bone* analiza la dureza en dicho hueso, en las dos especies de delfines, a dos escalas diferentes de su arquitectura.

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species

4.1.1 Introduction

In 1638, Galileo suggested that the skeletons of aquatic vertebrates were proportionally lighter (relative to the body mass) and grew slower than those of terrestrial vertebrates. This fact was understood as a consequence that bones in water do not have to support the weight of the body (84). De Buffrénil *et al.* (1985) showed that the skeletal mass of common dolphins (*Delphinus delphis*) was proportionally lower than that of terrestrial mammals. This was consistent with Galileo's predictions regarding aquatic vertebrates.

Cetaceans – whales, dolphins and porpoises – are highly specialized mammals. They possess morphological and physiological adaptations to a fully aquatic lifestyle, acquired through selective pressures, and manifested on a wide range of traits. A streamlined body, lack of fur, backward shift of the nostrils, transformation of forelimbs into flippers, evolution of flukes for swimming, and loss of the hind limbs, are all examples of adaptation, towards enhancing swimming and optimizing energy utilization (85, 86), as show in Figure 21. In particular, the pectoral fin, or flipper, of the cetaceans represents a very advanced adaptation of the plesiomorphic mammalian forelimb to the aquatic environment, and bones have undergone drastic modifications of proportions and articulations in comparison to terrestrial mammals (38).

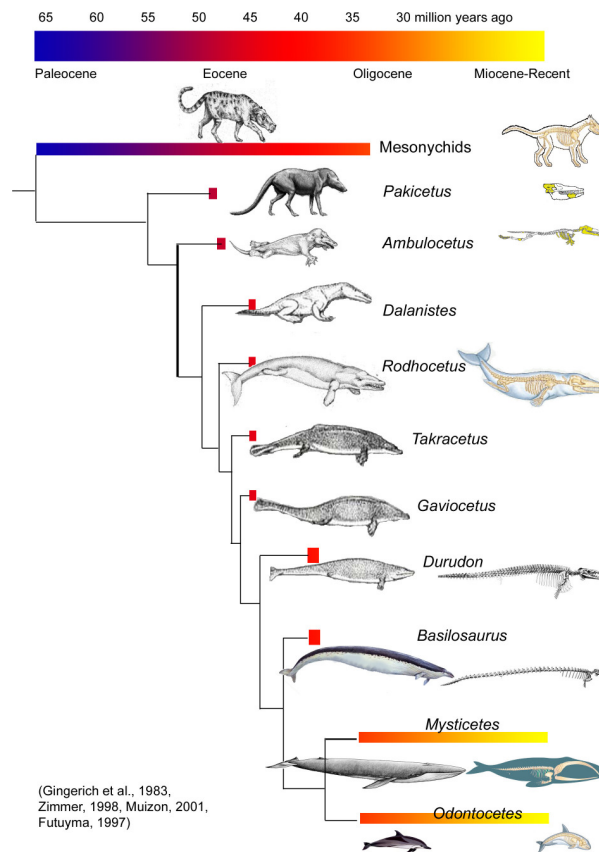


Figure 21. Cetacean evolution and phylogenetic tree. These figures show many of the anatomical adaptation exhibited by cetaceans, mainly skeletal changes. Drawings are not to scale.

The shape analysis of biological structures provides an important empirical approach to identify and interpret mechanical constraints underlying the form and function of skeletal support systems. The changes of proportions with size in a series of identically shaped structures can be predicted on geometrical bases (87), as it was referenced in the introduction by the principle of similarity. This predictability is inferred from power laws called allometric equations (88), which are well established in biology. The allometric studies describe the adaptive forms differences between organisms that yield to functional equivalence at different sizes. Several allometric studies on marine and terrestrial mammals demonstrated this (89-92). The relationship between body size, bone length and cross-sectional dimensions has mechanical functional equivalence that can help to understand the adaptive differences of the organisms (92). The degree of functional adaptability varies with both the structures and the functions concerned (93). Moreover, cetaceans have undergone an evolutionary

selection that has altered the internal and external architecture, proportion, number and spatial relationship of bones.

External and skeleton measurements of cetaceans have been studied since 19th century. Cetaceans allometric growth, at interspecific level, has been described using a sample of estimated body mass and length taken from literature (94). The geometric similarity in mammals suggested that the deviation of mammalian design from the elastic similarity model is much more drastic than previously suspected (89). Furthermore, few studies describe growth in body parameters using the ontogenetic allometric approach for cetaceans.

In a previous paper (45), the scaling of flipper bones skeleton against body mass was examined in 18 genera of cetaceans; forelimbs were compared and it was found that whereas large cetacean limb structure of the bones is less robust than expected. Limb bones are more robust in small cetaceans. A negative allometry was found in limb bones for small cetaceans. This could be explained for the greater relative swimming speed and the greater stresses incurred by high-speed swimming.

Most of allometric studies in cetaceans have been devoted to harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). Read and Tolley in 1997 described allometric growth of external body features and suggested that the evolutionary reduction in body size in female is due to rapid growth, in order to attain adult size as quickly as possible and facilitate early reproduction in a cold environment (95). Aspects of biology and growth on harbour porpoise were examined using an allometric formula to calculate body mass from body length and concluded that those measurements were strongly correlated (96). Allometric analyses were used to gain insights into the function and energetic requirements of specific organ systems during growth in both sexes of *Phocoena phocoena*. Growth rates for many body components were found larger than expected, which seemed to contribute to their early maturation for these species (97). A recent study compared two growth models: allometry of the skeleton and skeletal proportions in growing. It was found that fully growth harbour porpoises showed paedomorphosis in grown males relative to females (98).

For another specie, *Delphinus delphis*, ontogenetic development has been described, showing that skeletal mass of common dolphins is proportionally more reduced than that of terrestrial mammals (99).

With respect to the genus *Stenella*, Miyazaqui et al. (1981) described and analyzed the organs growth in two species of this genus and compared its pattern with other cetaceans. Results suggested that organs growth coefficient (relationship between organ weight and body weight) cannot always be a significant parameter to characterize these species, and in some cases the difference of the coefficients between populations of the same species is larger than their difference with respect to other species (100). The use of allometric analyses to compare the main body organs of *Stenella graffmani* and *Stenella longirostris* showed that their values of Huxley's growth coefficient b (see material and methods section) was smaller than one, whereas for another species of the same genus (*Stenella coeruleoalba*) and two other species of odontocetes (*Delphinus delphis* and *Phocoena phocoena*) it was higher than 1 (101). Calzada et al. (1997) (102) reported the growth patterns, maximum body length, age and length at attainment of physical maturity in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) and they concluded that both age and length are related parameters associated with body growth or ossification of the skeleton, which is liable to be affected by density dependent forces. Ramos et al. 2000 (103) studied age and growth in La Plata dolphins from Rio de Janeiro state and found asymptotic body lengths smaller than those from Uruguay.

In odontoceti, cross-sectional geometrical parameters have not been commonly considered as an expression of bone morphology (45, 46, 68), even though they seem to be a good approach to understand adaptation in relation to ontogenetic and phylogenetic scaling (104). Second moment of area or moment of inertia reflects ability to support bending loads. Since primary measurements of cross-sectional geometrical structures have not been previously reported in dolphins ontogeny, the present work studies the variation of the cross-sectional geometrical parameters in radii of striped dolphin and the La Plata dolphin. Yet, as sex could also lead to different scaling, allometric relationships of the geometrical parameters to total body length and body mass, are also investigated as a function of sex.

4.1.2 *Material and Methods*

Measurements were performed on the radii of both species, *Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei*. Cross-sectional geometrical parameters were measured using the procedure described 2.4.1. The measured parameters were length (l), transverse (td) and sagittal diameters (sd) (width and thickness respectively), second moment of area (I), cortical surface (A), polar moment (J) and strength (σ). Measurements were taken on strict morphological transverse and sagittal plans (Fig. 14b). Data on body length and body mass of the specimens studied were already published (48, 67, 68, 71, 102).

Mechanical tests were carried out with an Instron testing machine. Whole bones were tested by loading them along the sagittal plane at the mid point of the length, in a three point bending rig, using a span in accordance with the length of the bones. Bones were loaded until break. The actuator speed was 0.5 mm/min. A 10 kN static and 5 kN dynamic load cell were employed. This methodology had already been proposed for similar studies on bird bones (72, 74).

In order to understand the structure of the bone limb we also evaluated the strength (σ), that is, the ability to apply a force and overcome a resistance. It was estimated using equation 3 in chapter 2.

For most biological structures, cross-sectional shapes are typically irregular and their geometric properties often cannot be calculated using formulae for standard geometries. For this reason, the broken surfaces of the bones were ground to obtain smooth cross-sectional images. Cross-sectional area, second moment of area and polar moment were calculated with the IMAT programme based on standard formulae (equation 4 in chapter 2).

When a differential growth rate exists, such that the size of one part (or more) of the body changes in proportion to another part, or to the whole body, this pattern is called scaling. Typically, the power model represents a scaling equation as follows: $y =$

$a * x^b$ and its log-log transformation $\log y = b \log x + \log a$ (equations 1 and 2 respectively in chapter 2).

Two different statistical techniques for regression analyses were used. The commonly used technique is the quadratic regression (least-squares or Model I). The second technique that was used is the reduced major axis regression (Model II). The correlation coefficient r was used to assess strength of relationship between the variables. The parameters l , A , J and σ were regressed versus L and M_b (independent variables) by Model I. The l , and td , and sd , and sc were regressed versus body length and body mass by Model II.

The same kind of analysis was used for the whole set of sample (females+males+unknown) and the two sex subsamples (females and males) for each species (*Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei*). Sex differences for both species were compared using a covariance analysis (ANCOVA). To find out the most significant parameter (body length or body mass) for regression analyses, we used the test for equality of correlation coefficients (for more details, refer to chapter 2).

4.1.3 Results

Fifteen scaling relationships were examined for the radius: seven parameters vs. body length and eight parameters vs. body mass; each regression was calculated for the whole sample, and for the female and male subsamples.

The results of allometric equations developed for radius bone are show in tables 1 and 2. We found 77 correlations, 45 for striped dolphins and 32 for La Plata dolphins. In the La Plata dolphin, more correlations for males (11) than for females (7) were found and the dependent variables were more correlated to body length (17) than to body mass. All this is directly inferred from correlation factor (r) in Table 1 and Table 2.

Typically body mass is the independent variable used in allometric equations (88). However, because striped dolphins samples died of disease, we used both body length and body mass alternatively as independent variables. To know which parameters were best for the relations, we used Z-test analyses for equality of two correlations. When we carried out this test we found that most of the correlations did

not show significant differences between the use of body length or body mass. When differences existed, better correlations were found with body mass (for *Stenella coeruleoalba*, A were $Z=2.547$ $p=0.011$ and I were $Z=2.591$ $p=0.010$), which contradicts that previously reported with the other model.

The relationships between the bone length and the parameters investigated for *Stenella coeruleoalba* shows that only for the half of the variables the confidence intervals calculated for the corresponding slopes contained a theoretical isometric growth. However, the confidence intervals contained the theoretical value of isometry for all variables in *Pontoporia blainvillei* (see Table 1). Table 2 show the relationships between body mass with the investigated parameters. In the case of *Stenella coeruleoalba*, except for the length of the radius, the confidence intervals calculated contain the values corresponding to the predictions for all the other parameters (see Table 5).

The allometric results for body length in *Stenella coeruleoalba* are depicted in figures 22 and 23. In figures 24 and 25 can be seen the relationships with \log body mass.

Scatter diagrams on \log body length vs. the different parameters for *Pontoporia blainvillei* shows the allometric relations in Figures 26 and 27 and on \log body mass in figures 28 and 29.

Table 1. Allometric relationships of radius bone calculated for the length (*l*), transverse diameter (*td*), sagittal diameter (*sd*), second moment of area (*I*), cortical surface (*A*), polar moment (*J*), strength (σ) related to body length (*L*). 95% confidence intervals for *a* the *y*-intercept and *b* the slope are given. Other abbreviations: *Sc* *Stenella coeruleoalba*, *Pb* *Pontoporia blainvillei*, ω whole, *f* females, *m* males, *n* sample size, *r* correlation coefficient. Significant correlation are marked with an asterisk (*). C.I. *b* of red colour present a negative allometric value.

	sp	n	r	equation	C.I. <i>a</i>	C.I. <i>b</i>
<i>l</i>	<i>Sc</i>	ω 90	0.806*	$y=0.14 L^{0.74}$	0.23-0.09	0.84-0.65
		<i>f</i> 47	0.799*	$y=0.12 L^{0.78}$	0.25-0.06	0.91-0.64
		<i>m</i> 37	0.844*	$y=0.16 L^{0.72}$	0.31-0.08	0.85-0.59
	<i>Pb</i>	ω 35	0.601*	$y=0.03 L^{1.01}$	0.11-0.007	1.30-0.73
		<i>f</i> 27	0.667*	$y=0.02 L^{1.05}$	0.11-0.005	1.38-0.73
		<i>m</i> 12	0.729*	$y=0.09 L^{0.76}$	0.54-0.01	1.13-0.40
<i>td</i>	<i>Sc</i>	ω 91	0.727*	$y=0.01 L^{0.84}$	0.02-0.007	0.97-0.72
		<i>f</i> 48	0.579*	$y=0.02 L^{0.78}$	0.05-0.007	0.97-0.59
		<i>m</i> 37	0.886*	$y=0.009 L^{0.90}$	0.02-0.004	1.05-0.76
	<i>Pb</i>	ω 39	0.811*	$y=0.008 L^{1.02}$	0.02-0.002	1.21-0.82
		<i>f</i> 27	0.773*	$y=0.009 L^{0.99}$	0.03-0.002	1.25-0.73
		<i>m</i> 11	0.887*	$y=0.007 L^{1.01}$	0.04-0.001	1.37-0.66
<i>sd</i>	<i>Sc</i>	ω 92	0.799*	$y=0.04 L^{0.79}$	0.08-0.03	0.90-0.70
		<i>f</i> 48	0.744*	$y=0.03 L^{0.88}$	0.07-0.01	1.05-0.70
		<i>m</i> 37	0.947*	$y=0.03 L^{0.86}$	0.05-0.02	0.96-0.77
	<i>Pb</i>	ω 39	0.705*	$y=0.01 L^{1.06}$	0.03-0.003	1.32-0.82
		<i>f</i> 27	0.630*	$y=0.04 L^{0.76}$	0.15-0.01	1.00-0.52
		<i>m</i> 12	0.758*	$y=0.003 L^{1.35}$	0.05-0.0001	1.98-0.73
<i>I</i>	<i>Sc</i>	ω 66	0.809*	$y=5E-08 L^{3.50}$	1E-06-1E-09	4.13-2.87
		<i>f</i> 34	0.861*	$y=3E-07 L^{3.12}$	1E-05-1E-08	3.78-2.47
		<i>m</i> 26	0.895*	$y=5E-09 L^{3.90}$	4E-07-7E-11	4.72-3.08
	<i>Pb</i>	ω 37	0.473*	$y=4E-11 L^{4.75}$	3E-08-4E-14	6.14-3.36
		<i>f</i> 26	0.142	$y=2E-10 L^{4.33}$	1E-06-6E-14	6.10-2.57
		<i>m</i> 11	0.731*	$y=4E-11 L^{4.74}$	3E-06-7E-16	7.02-2.46
<i>A</i>	<i>Sc</i>	ω 66	0.815*	$y=1E-04 L^{2.03}$	5E-04-2E-05	2.32-1.74
		<i>f</i> 34	0.854*	$y=7E-04 L^{1.67}$	3E-03-1E-04	1.99-1.37
		<i>m</i> 26	0.906*	$y=5E-05 L^{2.16}$	3E-04-6E-06	2.55-1.78
	<i>Pb</i>	ω 39	0.539*	$y=2E-05 L^{2.26}$	5E-04-1E-06	2.89-1.63
		<i>f</i> 27	0.249	$y=5E-05 L^{2.12}$	0.003-9E-07	2.97-1.27
		<i>m</i> 9	0.828*	$y=6E-05 L^{2.11}$	0.01-3E-07	3.17-1.05
<i>J</i>	<i>Sc</i>	ω 66	0.810*	$y=1E-09 L^{4.25}$	2E-08-4E-11	4.87-3.64
		<i>f</i> 34	0.859*	$y=4E-08 L^{3.54}$	1E-06-1E-09	4.19-2.90
		<i>m</i> 26	0.898*	$y=6E-10 L^{4.35}$	4E-08-8E-12	5.15-3.54
	<i>Pb</i>	ω 39	0.508*	$y=8E-11 L^{4.64}$	5E-08-1E-13	5.97-3.31
		<i>f</i> 27	0.201	$y=4E-10 L^{4.27}$	1E-06-1E-13	6.00-2.55
		<i>m</i> 12	0.751*	$y=7E-11 L^{4.68}$	2E-06-1E-15	6.86-2.51
σ	<i>Sc</i>	ω 60	0.412*	$y=0.62 L^{0.69}$	4.95-0.08	1.08-0.29
		<i>f</i> 30	0.393*	$y=1.72 L^{0.48}$	16.55-0.18	0.92-0.05
		<i>m</i> 25	0.519*	$y=0.12 L^{1.00}$	5.29-0.002	1.73-0.29
	<i>Pb</i>	ω 34	0.590*	$y=0.0005 L^{1.84}$	0.04-7E-06	2.74-0.94
		<i>f</i> 25	0.610*	$y=0.0002 L^{1.99}$	0.06-1E-06	3.10-0.87
		<i>m</i> 7	0.669	$y=0.001 L^{1.70}$	1.16-9E-07	3.14-0.25

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

Table 2. Allometric relationships of radius bone calculated for the follow parameters (L), and (l), and (td), and (sd), and (l), and (sc), and (σ) related to body mass (M_b). The abbreviations and marks are the same that table 1.

sp		n	r	equation	C.I. a	C.I. b
L	Sc	ω 76	0.917*	$y=43.9 M_b^{0.34}$	50.13-38.46	0.38-0.32
		f 41	0.847*	$y=40.3 M_b^{0.36}$	52.45-31.09	0.43-0.31
		m 35	0.968*	$y=46.5 M_b^{0.33}$	52.60-41.04	0.36-0.31
	Pb	ω 24	0.901*	$y=44.9 M_b^{0.32}$	54.71-36.82	0.38-0.26
		f 15	0.845*	$y=37.1 M_b^{0.38}$	54.22-25.40	0.50-0.26
		m 9	0.397	$y=57.1 M_b^{0.25}$	70.69-46.16	0.31-0.19
l	Sc	ω 74	0.772*	$y=2.46 M_b^{0.25}$	2.87-2.12	0.28-0.21
		f 40	0.736*	$y=2.36 M_b^{0.26}$	3.00-1.87	0.32-0.20
		m 34	0.823*	$y=2.52 M_b^{0.23}$	3.08-2.06	0.28-0.19
	Pb	ω 24	0.466	$y=1.54 M_b^{0.27}$	2.19-1.09	0.38-0.17
		f 15	0.545	$y=1.01 M_b^{0.42}$	1.95-0.52	0.63-0.21
		m 9	0.397	$y=2.22 M_b^{0.16}$	3.48-1.42	0.29-0.03
td	Sc	ω 75	0.764*	$y=0.31 M_b^{0.30}$	0.37-0.26	0.35-0.26
		f 41	0.593*	$y=0.31 M_b^{0.30}$	0.43-0.22	0.38-0.22
		m 34	0.880*	$y=0.30 M_b^{0.30}$	0.38-0.25	0.35-0.25
	Pb	ω 24	0.803*	$y=0.33 M_b^{0.35}$	0.44-0.24	0.44-0.26
		f 15	0.634*	$y=0.29 M_b^{0.39}$	0.52-0.17	0.57-0.21
		m 9	0.912*	$y=0.32 M_b^{0.35}$	0.50-0.21	0.48-0.22
sd	Sc	ω 75	0.839*	$y=0.83 M_b^{0.30}$	0.98-0.71	0.34-0.26
		f 41	0.719*	$y=0.78 M_b^{0.32}$	1.05-0.58	0.39-0.25
		m 34	0.924*	$y=0.87 M_b^{0.29}$	1.03-0.74	0.33-0.25
	Pb	ω 24	0.766*	$y=0.49 M_b^{0.40}$	0.71-0.34	0.52-0.29
		f 15	0.547	$y=0.68 M_b^{0.30}$	1.08-0.42	0.45-0.15
		m 9	0.820*	$y=0.40 M_b^{0.45}$	0.91-0.18	0.69-0.22
l	Sc	ω 54	0.872*	$y=0.02 M_b^{1.21}$	0.06-0.01	1.41-1.03
		f 29	0.867*	$y=0.03 M_b^{1.18}$	0.10-0.01	1.45-0.91
		m 25	0.890*	$y=0.02 M_b^{1.27}$	0.07-0.006	1.56-0.99
	Pb	ω 24	0.574*	$y=0.002 M_b^{1.65}$	0.01-0.0002	2.25-1.05
		f 15	0.029	$y=0.002 M_b^{1.57}$	0.04-0.0001	2.52-0.63
		m 9	0.794*	$y=0.002 M_b^{1.59}$	0.04-0.0001	2.46-0.73
A	Sc	ω 54	0.867*	$y=0.26 M_b^{0.67}$	0.39-0.18	0.77-0.58
		f 27	0.848*	$y=0.32 M_b^{0.64}$	0.56-0.19	0.77-0.51
		m 25	0.904*	$y=0.22 M_b^{0.71}$	0.38-0.13	0.84-0.58
	Pb	ω 24	0.604*	$y=0.12 M_b^{0.77}$	0.30-0.05	1.04-0.50
		f 15	0.075	$y=0.12 M_b^{0.75}$	0.53-0.03	1.21-0.30
		m 9	0.843*	$y=0.13 M_b^{0.76}$	0.45-0.04	1.13-0.40
J	Sc	ω 54	0.872*	$y=0.01 M_b^{1.38}$	0.04-0.007	1.57-1.19
		f 29	0.863*	$y=0.02 M_b^{1.34}$	0.06-0.007	1.60-1.07
		m 25	0.894*	$y=0.01 M_b^{1.43}$	0.04-0.003	1.70-1.15
	Pb	ω 24	0.590*	$y=0.002 M_b^{1.6}$	0.02-0.0003	2.17-1.03
		f 14	0.288	$y=0.001 M_b^{1.8}$	0.04-4E-05	2.87-0.71
		m 9	0.814*	$y=0.003 M_b^{1.6}$	0.05-2E-04	2.38-0.75
σ	Sc	ω 47	0.624*	$y=6.14 M_b^{0.31}$	10.05-3.76	0.44-0.20
		f 26	0.406*	$y=9.19 M_b^{0.20}$	20.29-4.16	0.39-0.01
		m 23	0.515*	$y=6.06 M_b^{0.33}$	16.81-2.18	0.57-0.09
	Pb	ω 18	0.735*	$y=0.29 M_b^{0.87}$	1.09-0.08	1.30-0.44
		f 13	0.835*	$y=0.17 M_b^{1.04}$	0.71-0.04	1.50-0.59
		m 7	0.559	$y=1.83 M_b^{0.24}$	7.09-0.48	0.65-0.17

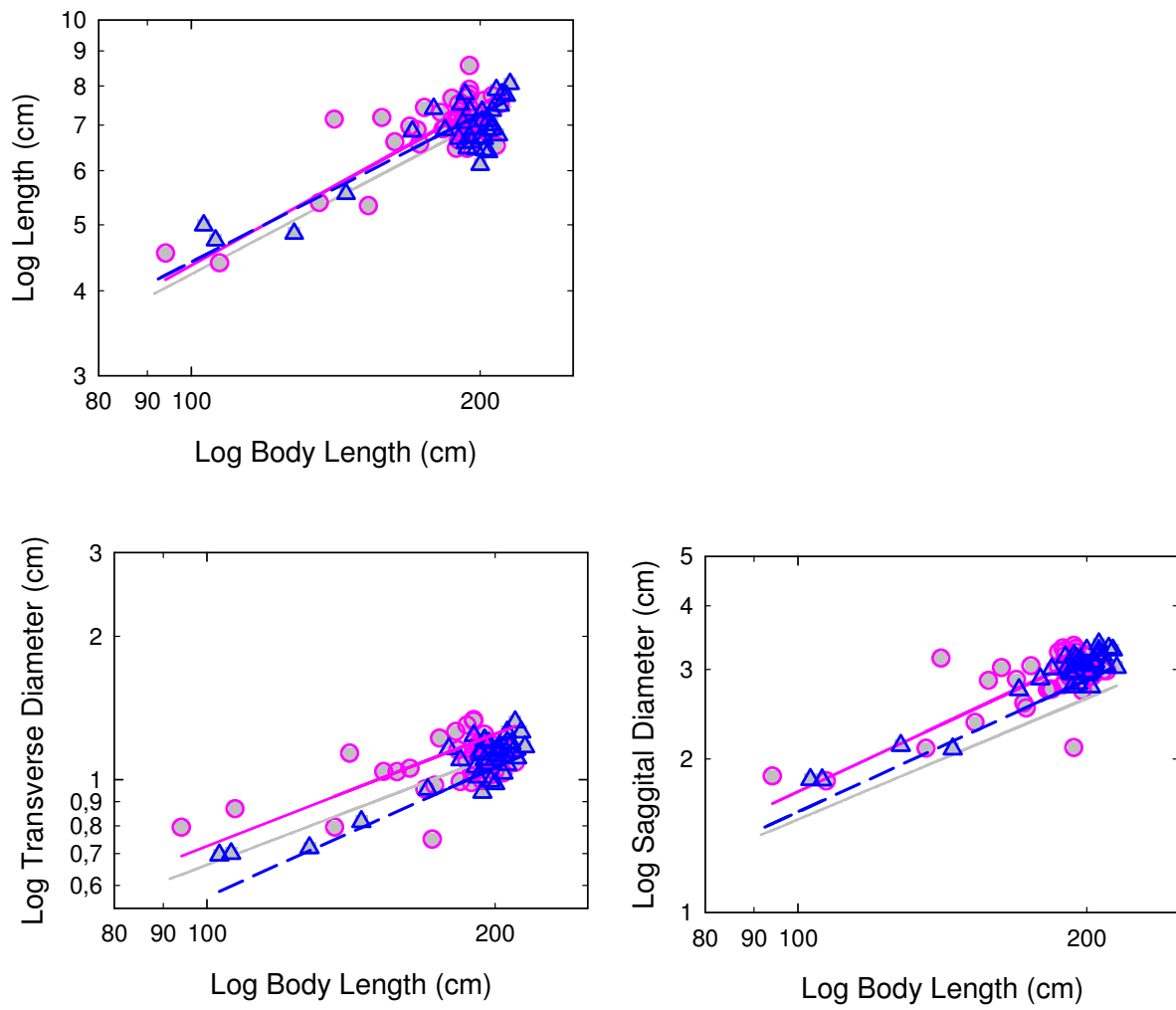


Figure 22. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse diameter and saggital diameter) to Log body length in *Stenella coeruleoalba*

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

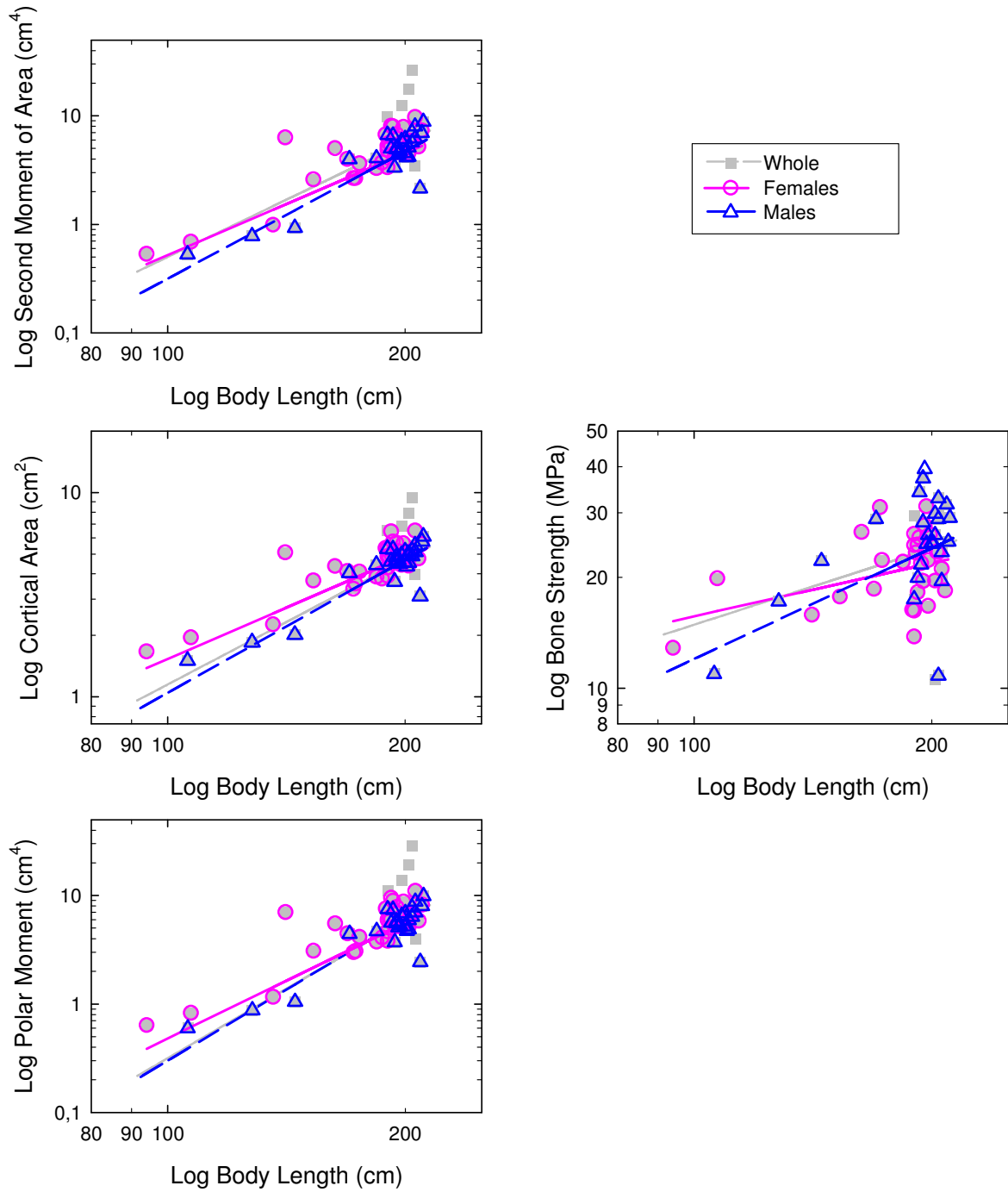


Figure 23. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body length in *Stenella coeruleoalba*

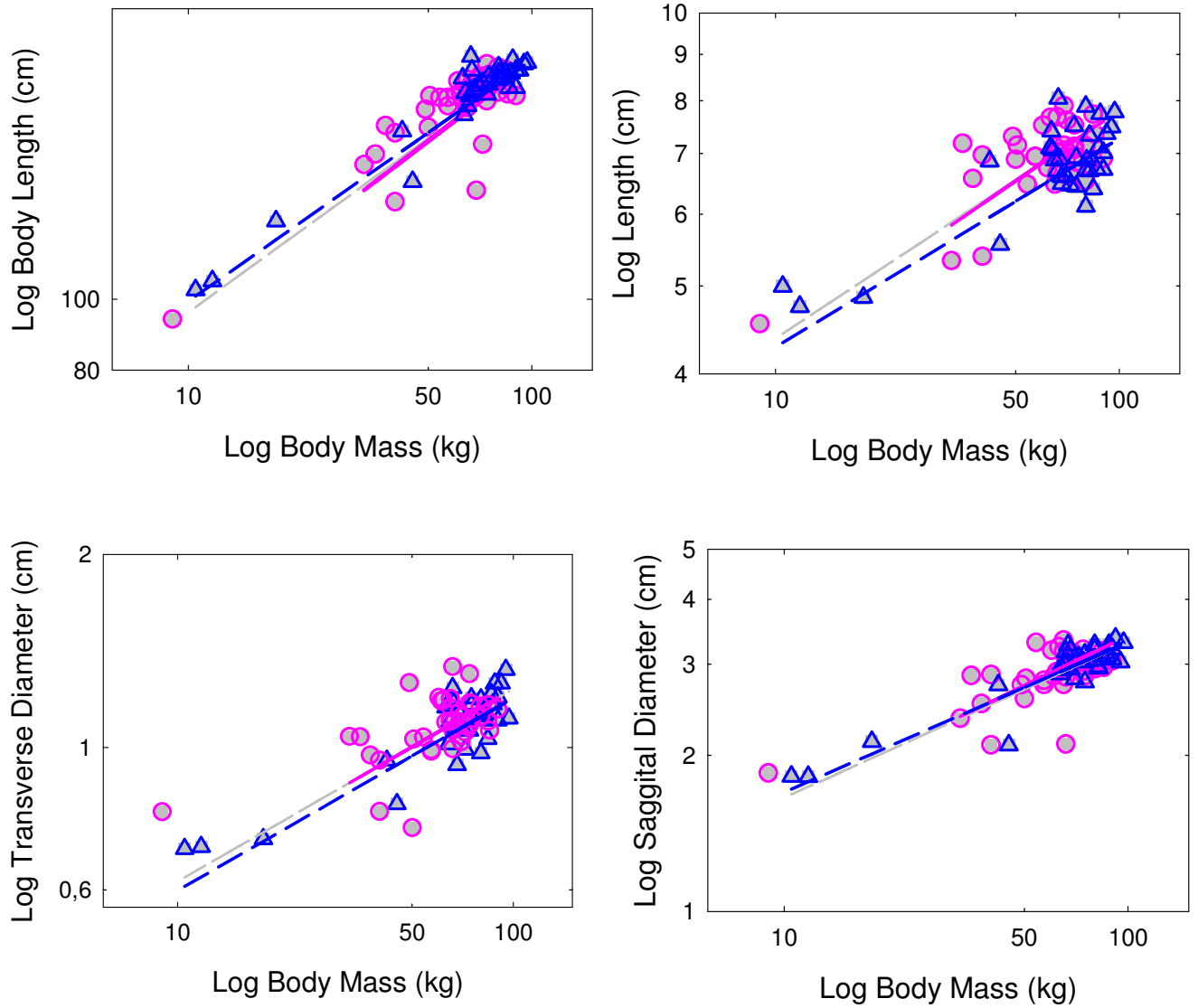


Figure 24. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse diameter and saggital diameter) to body mass in *Stenella coeruleoalba*

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

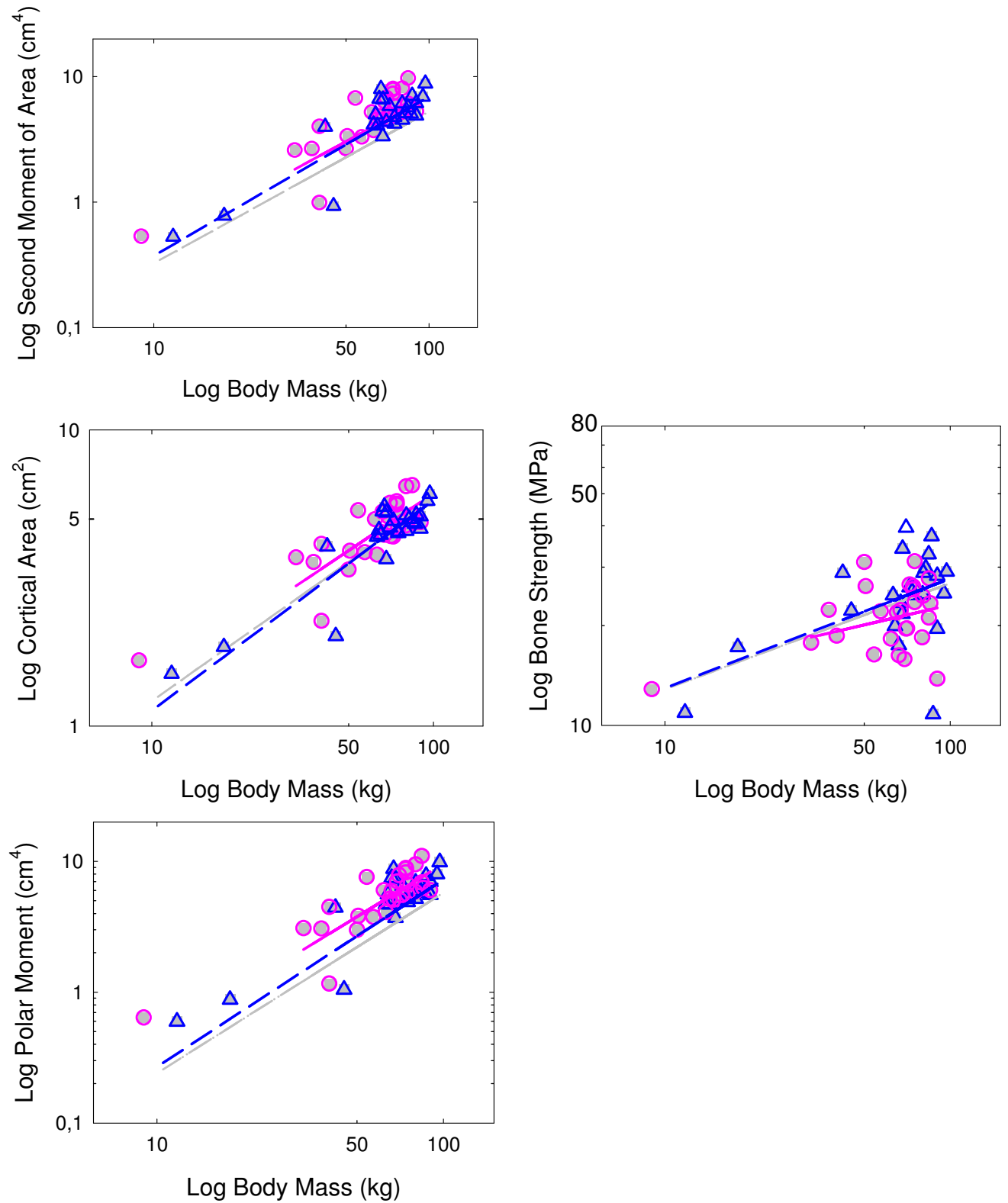


Figure 25. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body mass in *Stenella coeruleoalba*

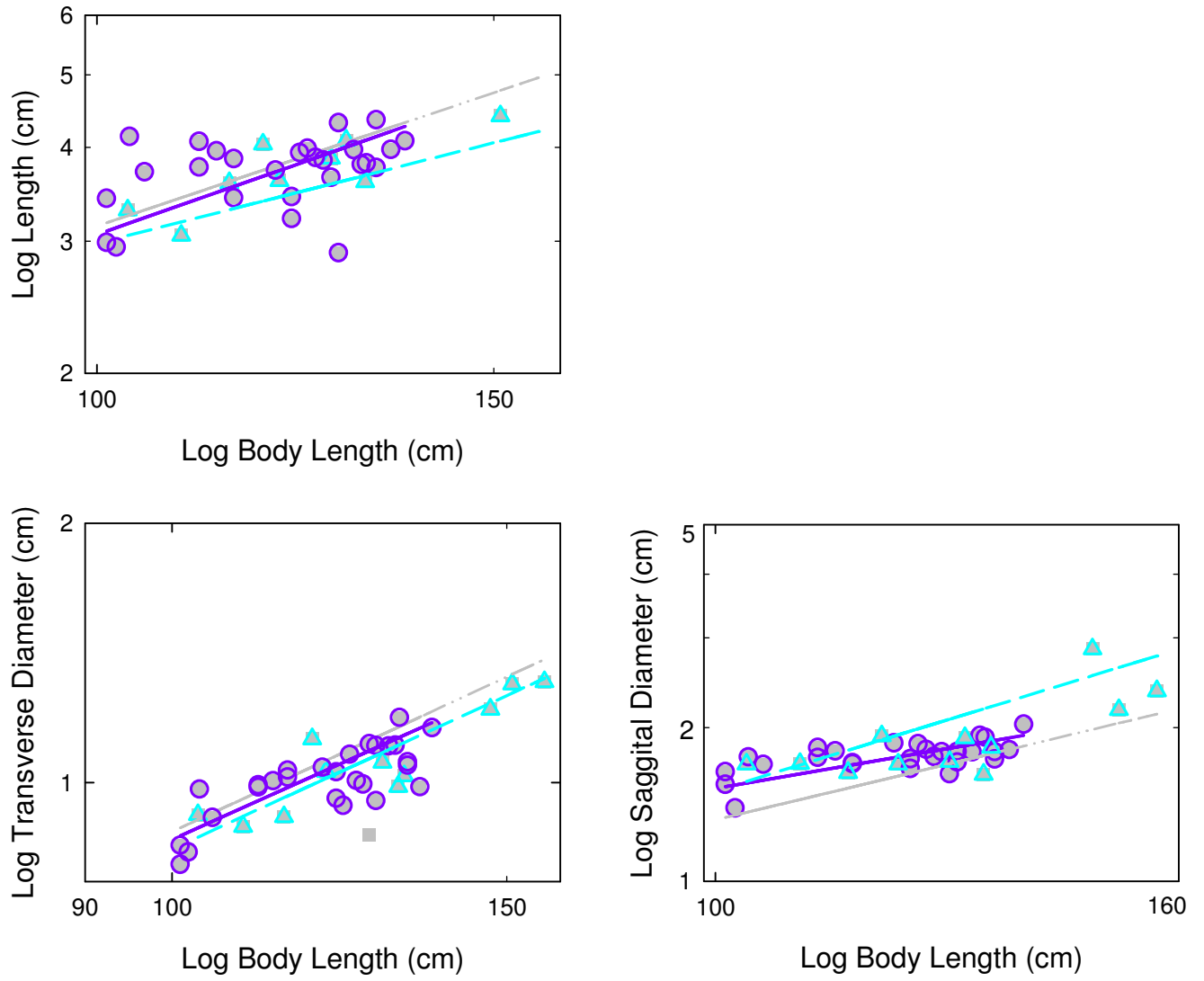


Figure 26. Allometric logarithmic plots for direct measurement parameters (radius length, transverse and diameter, saggital diameter) to body length in *Pontoporia blainvillei*.

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

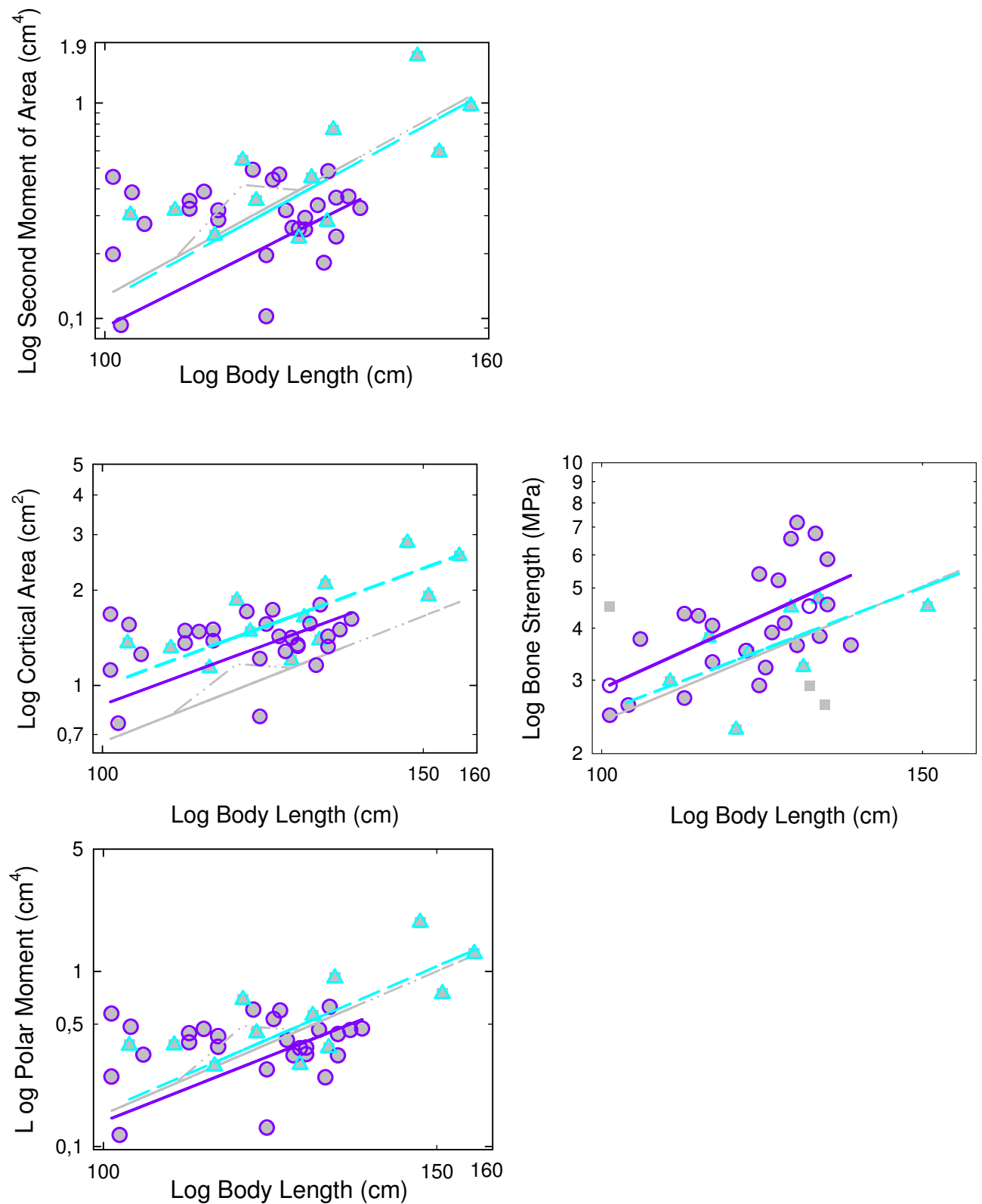


Figure 27. Allometric logarithmic plots for indirect measurement parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body length in *Pontoporia blainvillei*.

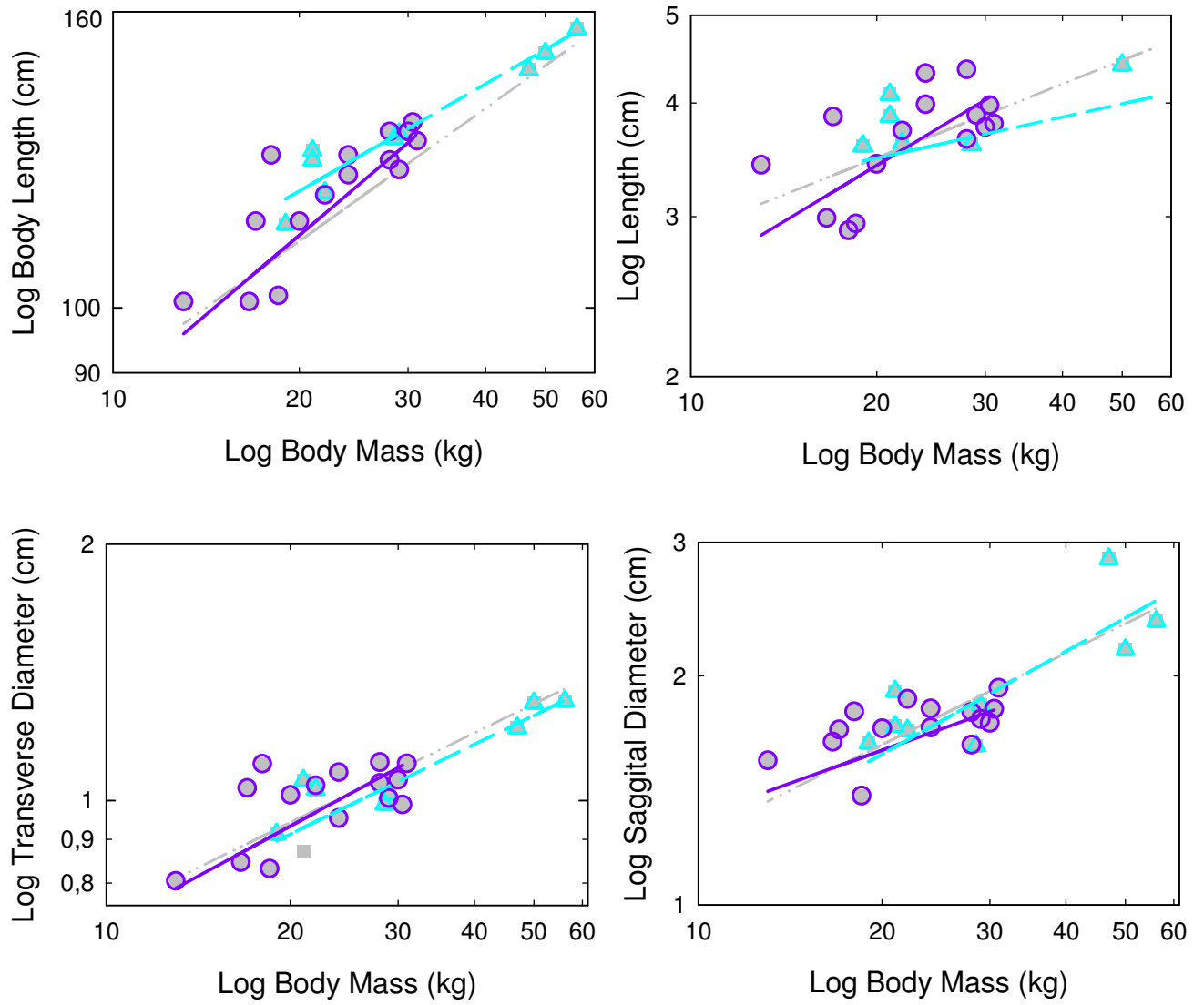


Figure 28. Allometric logarithmic plots for direct measurements parameters (body length, radius length, transverse parameter and saggital diameter) to body mass in *Pontoporia blainvillei*

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

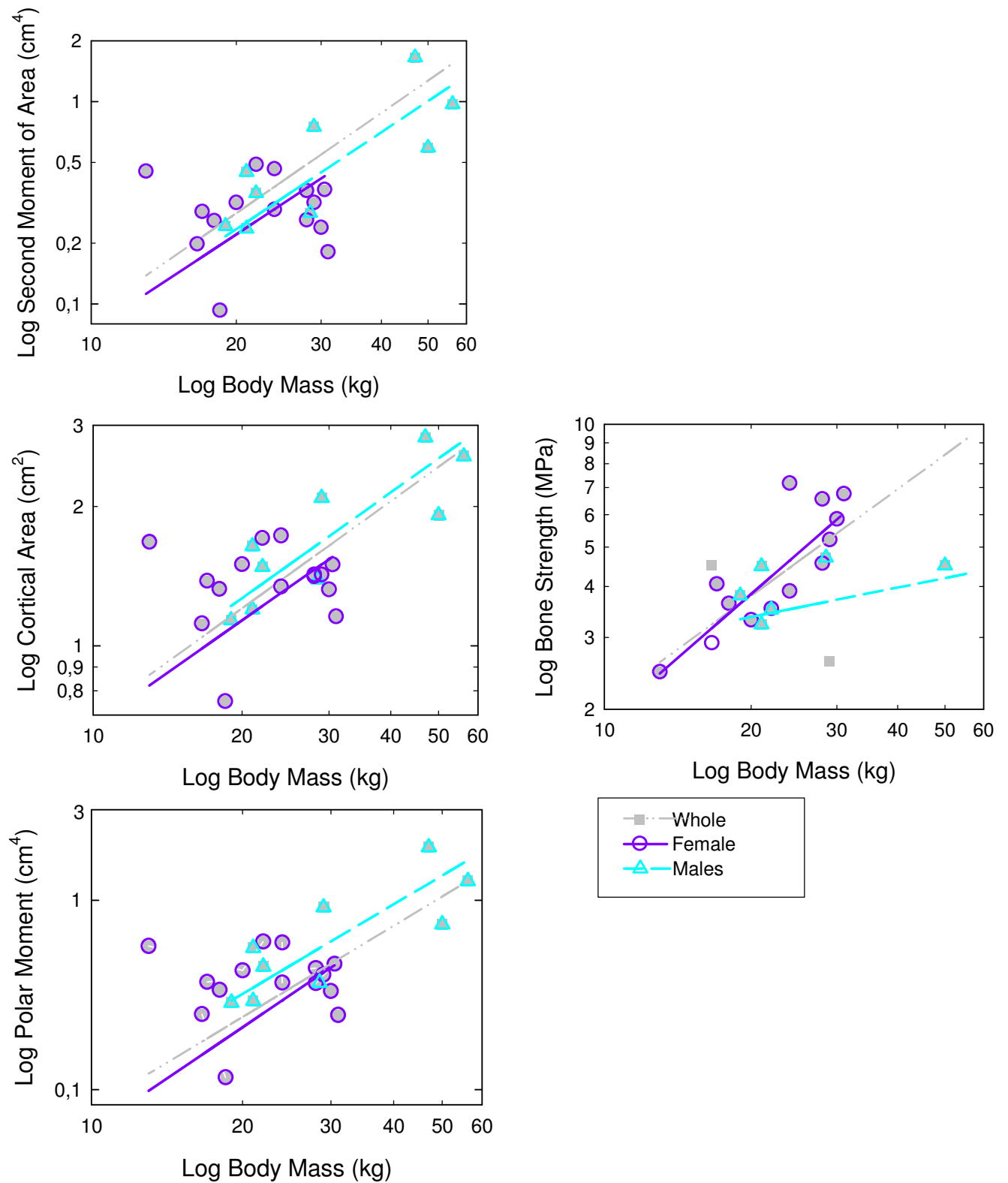


Figure 29. Allometric logarithmic plots for indirect measurements parameters (second moment of area, cortical area, polar moment and strength) to body mass in *Pontoporia blainvillei*

For striped dolphins, Table 1 and shows that, between sexes, and for each of the parameters, while females present a yield curve that slopes loward, males present a yield curve that slopes upward, except for length, where both present slope lower, and polar moment where both present slope upper. This patter is only found for La Plata dolphins, for the directly measured parameters (length, transverse diameter and sagittal diameter).

In the comparison between sexes for each species, we found significant differences in striped dolphins for the parameters length (l) and cortical surface area (A) vs. body length and second moment of area (I) and cortical surface area (A) vs. body mass. However, for La Plata dolphin the only difference between sexes are in second moment of area (I). The results are presented in Table 3.

Table 3. Comparison between sex for the both species. Significant differences are marked with an asterisk (*). Where **sp** is species, **n** is the size of the sample, **F** is Fisher's statistics and **p** provability levels.

	sp	n	F	p
l/L	Sc	82	6.51*	0.01
	Pb	37	3.52	0.07
td/L	Sc	82	0.42	0.52
	Pb	37	0.73	0.40
sd/L	Sc	83	0.002	0.96
	Pb	37	1.19	0.28
I/L	Sc	58	1.77	0.19
	Pb	37	4.66*	0.04
A/L	Sc	58	4.21*	0.04
	Pb	37	3.24	0.08
σ/L	Sc	54	2.28	0.14
	Pb	33	2.75	0.11
Mb/L	Sc	74	2.53	0.12
	Pb	22	0.04	0.85
l/Mb	Sc	72	6.90*	0.01
	Pb	22	0.46	0.50
td/ Mb	Sc	73	2.99	0.09
	Pb	22	0.31	0.58
sd/ Mb	Sc	73	0.90	0.34
	Pb	22	0.54	0.47
I/ Mb	Sc	52	2.41	0.13
	Pb	22	1.68	0.21
A/ Mb	Sc	52	4.91*	0.03
	Pb	22	1.28	0.27
σ/ Mb	Sc	49	1.43	0.24
	Pb	18	4.17	0.05
L/ Mb	Sc	74	0.73	0.39
	Pb	22	0.83	0.37

4.1.4 Discussion

Allometric relationships between body mass/body length and other body parts of odontocetes have been studied by several researchers (see introduction to this chapter). However, such studies have only focused on simple linear measurements of external bone breadths, which have limited mechanical significance.

4.1.4.1 Allometric relationship in direct measured parameters

The results from the allometric patterns (see Figure 22 and Table 1) in striped dolphin exhibited negative allometry for many parameters (l , td and sd) and in many of these cases the confidence intervals calculated include the theoretical exponents. Similar results were found in a interspecific/phylogenetic study; in 1994 Dawson showed that in cetaceans, the radius diameters exhibit negative allometry when scaled against bone length and body mass (see Table 4) (45). In fact, allometric analysis in *Phocoena phocoena* from external body measurements (95) and from different skeletal measurements (98) also showed negative allometry.

Table 4. Comparison between to allometric coefficients at two difference levels: Phylogenetic (45) and ontogenetic (the present study). Where b (slope) in allometric equation, r correlation coefficient. Without correlation are marked with a symbol (ζ) and in red colour.

Bone proportions	Scales	sp	b	R
L vs. sd	Phylogenetic		0.74	0.93
	Ontogenetic	Sc	0.79	0.79
Pb		1.06	0.70	
L vs. td	Phylogenetic		0.84	0.96
	Ontogenetic	Sc	0.76	0.66
Pb		1.02	0.81	
M_b vs. l	Phylogenetic		0.34	0.91
	Ontogenetic	Sc	0.25	0.77
Pb		0.27	0.46 [∘]	
M_b vs. sd	Phylogenetic		0.24	0.80
	Ontogenetic	Sc	0.30	0.83
Pb		0.40	0.76	
M_b vs. td	Phylogenetic		0.28	0.89
	Ontogenetic	Sc	0.30	0.76
Pb		0.35	0.80	

Table 1, Table 2 and Table 5 show that La Plata dolphin display positive allometry for almost all parameters. This is consistent with findings in the work of Del Castillo et al. (2014) which found that the only bone of the pectoral fin which presented positive allometry is the radius (105). In the parameters that do not present it, confidence intervals contain the theoretical exponents. This could be attributed to the evolutionary origin of this species. The Pontoporidae family is older (from Middle Miocene) than the family Delphinidae (around late Miocene) (106). That is, older genus, like Pontoporia, shows a positive allometry while more evolved species present negative allometry, as porpoises and delphinid species. It has been proposed that in modern cetaceans, limbs have acquired a new stabilizing and steering function; they do not generate any propulsive force (39). Various morphological changes facilitated these functional adaptations and the limb is subjected to varying transverse forces due to water resistance. It could be inferred that the evolution from a positive to a negative allometry would be a consequence of the development of new functions like the increase of swimming speed (104).

4.1.4.2 *Allometric relationship in parameters indirectly measured*

Material parameters in cross-sectional long bones, as second moment of area (I), cortical surface area (A), polar moment (J) and strength (σ) have been studied at evolutionary level for different taxa (with reference to phylogeny) (107). Special emphasis have been devoted to locomotor habits, which have been investigated in several order of mammals (22, 108-112), and avian long bones (72). Nevertheless, some studies on these parameters deal with ontogenetic changes are in humans, jack rabbits and gulls but not in dolphins (113-115).

Biewener (108) carried out a phylogenetic study with respect to body mass, which includes eleven species of small mammals and bipedal birds and which uses six different appendicular bones. The values of I and J for mammals+birds are $I = 1.219 M_b^{1.426}$, $J = 1.057 M_b^{0.716}$, and σ for small mammals is $\sigma = 214 M_b^{-0.011}$ while for large mammals is $\sigma = 35 M_b^{0.28}$. If these phylogenetic results are compared with ontogenetic values described in tables 2, the slope of both dolphin species lay in the confidence intervals given by Biewener.

Pontoporia blainvillei presents positive allometry, even higher than terrestrial mammals. This is striking if it is taken into account that marine mammals are not exposed to the forces of gravity as land mammals. Contrarily, *Stenella coeruleoalba* shows negative allometry for almost all parameters, as it would be expected for a marine mammal. Thus, the biomechanical differences of radius bone between both species of dolphins are considerable. Pinedo showed that *Pontoporia blainvillei* is well adapted to the coastal environment, where turbid waters do not require fast-swimming but instead efficient and rapid movement shifts, coordinated by a skilfull rudder (65). On the other hand, *Stenella coeruleoalba* is an open ocean cetacean, being one of the most agile and faster cetaceans. It travels at a speed around 15 Km/h, and is able to reach 40 Km/h. A unique behavioural characteristic is that they perform "high arcing jumps while violently and rapidly making several rotations with the tail before re-entering the water" (50, 51). This particular movement is called "roto-tailing". Yet, they often swim in the bow wave of boats. These athletic characteristics along with the need of a fast rudder would fit the structure (39) of the radius bone and would justify the negative allometry, characteristic of many marine mammal of pectoral fin (116).

Traditionally, limb proportions or total limb lengths have been scarcely ever regarded as indicative of velocity, but animals probably do not optimize their anatomy for the purpose of speed, which occurs only on rare occasions, but for reducing costs of locomotion (117).

Pontoporia blainvillei resists greater bending loads than *Stenella coeruleoalba*. The greater strength could be due to, as mentioned above, they make quick and sudden movements in the coastal environment.

4.1.4.3 *Theoretical allometry*

According to Valverde et al. (113) it is not clear at all in allometry whether differences between slopes calculated in interspecific allometrical situations, that is, scaling changes between adults of different species, and those calculated in intraspecific or ontogenetic allometry, must be or not similar. The two hypotheses currently accepted for predicting scaling changes among adults, the geometrical similarity and the elastic similarity (91) are based either in the assumption that shape is

similar or, inversely, that the body mass increases must generate a differentiated growth in diameters and lengths, originating consequently a change in proportions and shapes (118). In interspecific allometry the predictions are made assuming a constant shape (geometrical similarity) as we see in annex 3.

The comparison between the theoretical allometric exponents for geometric similarity (annex 3) with the studied parameters is shown in Table 5. Isometry is only found in the relationships between body length with strength, body mass with body length and body mass with strength for striped dolphin males. In these cases, as explained above this seems to be a coincidence. The research that has been carried out on ontogenetic scaling has been fully inductive (113), in the sense that the only general hypotheses taken into account are those formulated for interspecific allometry, and in intraspecific studies most of the effort has been devoted to the study of particular cases, and as signalled by Ford & Corruccini (1985)(119), intraspecific scaling varies greatly among different species.

4.1 Structural allometry of the radius cross-sectional parameters in two dolphin species.

Table 5. A comparison of the theoretical allometric exponents secondary to geometric similarity with those collected in this studied.

sp	Geometric predicted for L	Observed Isometry		Geometric predicted for Mb	Observed Isometry		
I	1	ω	0.74	< 1	0.33	0.25	< 0.33
		Sc f	0.78	≤ 1		0.26	< 0.33
		m	0.72	< 1		0.23	< 0.33
		ω	1.01	≥ 1		0.27	≤ 0.33
		Pb f	1.05	≥ 1		0.42	≥ 0.33
		m	0.76	≤ 1		0.16	< 0.33
td	1	ω	0.84	≤ 1	0.33	0.30	≤ 0.33
		Sc f	0.78	≤ 1		0.30	≤ 0.33
		m	0.90	≤ 1		0.30	≤ 0.33
		ω	1.02	≥ 1		0.35	≥ 0.33
		Pb f	0.99	≤ 1		0.39	≥ 0.33
		m	1.01	≥ 1		0.35	≥ 0.33
sd	1	ω	0.79	≤ 1	0.33	0.30	≤ 0.33
		Sc f	0.88	≤ 1		0.32	≤ 0.33
		m	0.86	≤ 1		0.29	≤ 0.33
		ω	1.06	≥ 1		0.40	≥ 0.33
		Pb f	0.76	≤ 1		0.30	≤ 0.33
		m	1.35	≥ 1		0.45	≥ 0.33
I	3.99	ω	3.50	≤ 3.99	1.33	1.21	≤ 1.33
		Sc f	3.12	≤ 3.99		1.18	≤ 1.33
		m	3.90	≤ 3.99		1.27	≤ 1.33
		ω	4.75	≥ 3.99		1.65	≥ 1.33
		Pb f	4.33	≥ 3.99		1.57	≥ 1.33
		m	4.74	≥ 3.99		1.59	≥ 1.33
A	2	ω	2.03	≥ 2	0.66	0.67	≥ 0.66
		Sc f	1.67	≤ 2		0.64	≤ 0.66
		m	2.16	≥ 2		0.71	≥ 0.66
		ω	2.26	≥ 2		0.77	≥ 0.66
		Pb f	2.12	≥ 2		0.75	≥ 0.66
		m	2.30	≥ 2		0.76	≥ 0.66
J	3.99	ω	4.25	≥ 3.99	1.33	1.38	≥ 1.33
		Sc f	3.54	≤ 3.99		1.34	≥ 1.33
		m	4.35	≥ 3.99		1.43	≥ 1.33
		ω	4.64	≥ 3.99		1.60	≥ 1.33
		Pb f	4.27	≥ 3.99		1.80	≥ 1.33
		m	4.68	≥ 3.99		1.60	≥ 1.33
σ	1	ω	0.69	≤ 1	0.33	0.31	≤ 0.33
		Sc f	0.48	≤ 1		0.20	≤ 0.33
		m	1	= 1		0.33	= 0.33
		ω	1.84	≥ 1		0.87	≥ 0.33
		Pb f	1.99	≥ 1		1.04	≥ 0.33
		m	1.70	≥ 1		0.24	≤ 0.33
L	-	ω			0.33	0.34	≥ 0.33
		Sc f				0.36	≥ 0.33
		m				0.33	= 0.33
		ω				0.32	≤ 0.33
		Pb f				0.38	≥ 0.33
		m				0.25	< 0.33

4.1.4.4 *Interspecific allometric models*

We have compared our results with other studies on different odontocetes species, attempting to do an interspecific comparison between allometric equations. Table 6 shows body mass related to total body length for some different species and populations. Whereas the theoretical relationship between mass and volume is $M_b \propto L^3$ (if constant density is considered), we find exponents slightly smaller as it has been reported in other species (99). Nevertheless, they fall within the range of variation found between *S. coeruleoalba* Atlantic population and *S. attenuata*; the allometric coefficient difference of the body mass-length is really insignificant. Moreover, in *S. coeruleoalba* Mediterranean population, the difference is slightly larger but completely lies in the confidence interval of *Stenellae*. It is also noted that between *P. phocoena* and *D. delphis*, which are small species, the range of variation between the allometric coefficients are lower than in the rest of the species.

Table 6. Interspecific comparison for allometric models, showing species (sp), equations (eq.), slope confidence intervals (C.I.b)

sp	eq.	C.I. b	References
<i>Stenella coeruleoalba</i> Atlantic population	$M_b=0.176L^{2.927}$		Miyazaqui et al. 1981
<i>Stenella attenuate</i>	$M_b=-0.190L^{2.928}$		Miyazaqui et al. 1981
<i>Phocoena phocoena</i>	$M_b=0.000083L^{2.632}$	2.574 – 2.690	Lockyer 1995
<i>Delphinus delphis</i>	$M_b=0.1142L^{2.545}$	1.967 – 3.124	De Buffrénil et al. 1985.
<i>Stenella coeruleoalba</i> Mediterranean population	$M_b=0.00001L^{2.86}$	2.424 – 3.286	Present study
<i>Pontoporia blainvillei</i>	$M_b=0.00002L^{2.88}$	2.226 -- 3.429	Present study

4.1.4.5 *Sex differences*

In striped dolphins' females, all allometries with body length (L) are negative (see Table 1 and Table 5) except sagittal diameter (sd) and polar moment (J). Striped dolphins males show positive allometry in almost all parameters, with the exception of radius length (I) and sagittal diameter (sd). These results are consistent with Van Utrecht results for flippers (98).

For La Plata dolphins, size over the radius length increases more in females than in males, as can be inferred from Figure 26. However, the sagittal diameter increases faster in males than in females.

In striped dolphins, significant differences between sexes for relations I/L , A/L and A/M_b are found (see Table 3). These differences between sexes for radius length and cortical surface could be attributed to different physical effort undertaken by males and females according to their complex social structure. Moreover, three types of schools have been identified: juvenile, adult and mixed. Adult and mixed schools are divided into breeding and non-breeding schools (50, 51). If we suppose that females spend more time than males in breeding schools by looking after the calves, they would keep a more constant average speed, without leaving the calves to make acrobatic jumps. In consequence, the geometry proportion in female radius could show a slower growth rate in comparison to males.

La Plata dolphins only present significant differences between sexes in the second moment of area (I) with respect to body length (see Table 3 and Table 6). Second moment of area is a geometric property of the cross section related to bending. We could point out the difference between efficient and rapid shift of movements of females and males. However, in this study no significant differences for other parameters were found.

Pinedo found that females are larger than males, and that showed great variation in the total adult body length (65). The differences found between the two studies could be due to the existence of several different populations (62, 120, 121). Pinedos' study samples present a mix of these stocks, while we studied specimens only from a small zone in the province of Buenos Aires.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfines

4.2.1 *Introducción*

Haeckel (1866) definió la ontogenia como el desarrollo de un órgano u organismo desde su origen hasta su formación definitiva, es decir, el desarrollo individual (122). El crecimiento es un fenómeno biológico complejo a través del cual los seres vivos, al mismo tiempo que incrementan su masa, maduran morfológicamente y adquieren progresivamente su plena capacidad funcional (123). Por esto, para hacer estudios ontogénicos es esencial determinar la edad de los animales.

Durante la ontogenia, el desarrollo de la estructura del esqueleto es una combinación compleja inherente al crecimiento relativo de la edad y a la adaptación mecánica a las cargas aplicadas (124). La edad afecta todas las propiedades del hueso en animales durante la vida del individuo (78), a la vez que el hueso se ve afectado por procesos externos e internos. Los externos (Ej. actividad física) producen cambios en la medida y forma de los huesos que, consecuentemente, terminan en una remodelación estructural. Estos cambios afectan las propiedades mecánicas del tejido óseo, durante toda la vida. Los procesos internos (Ej. cambios químicos) remodelan su arquitectura interna. Las propiedades mecánicas se ven afectadas por otros factores que incluyen, además de la edad, el sexo, la especie, el origen del hueso, el ejercicio y el contenido mineral (27, 125, 126).

En los huesos largos de mamíferos, los niveles de tensión a lo largo de la diáfisis parece que se mantienen constantes a través de la ontogenia (127). El aumento de la masa corporal, con la edad conlleva un aumento de las cargas mecánicas sobre los huesos largos. Se cree que éstos compensan estas fuerzas con mecanismos internos tales como el aumento y redistribución de la masa ósea (128). Pero esto, para los cetáceos no tendría que ser así, ya que se ve una reducción de tejido óseo, incluso en los huesos largos, reflejo de una optimización del esqueleto a las condiciones gravitatorias en las que viven (99).

Los cambios relativos a la edad en las propiedades materiales son debidos principalmente al resultado en el incremento de la mineralización del hueso (128). La

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

concentración del contenido mineral del hueso varía con la especie, la edad, la función mecánica del hueso y la condición fisiopatológica del individuo. Todos estos factores son interdependientes y cada uno hace del hueso lo que es (78). Los constituyentes inorgánicos de la matriz ósea son principalmente sales minerales en forma cristalizada (fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita, carbonato cálcico y en cantidades menores sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio). Estas sales se encuentran depositadas en un retículo formado por las fibras de colágeno. El proceso por el cual estas sales se depositan y cristalizan en el retículo se denomina calcificación. Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, un exceso de ellos implica una mayor fragilidad del hueso (ej. rostro de *Mesoplodon densirostris*) (129). Es precisamente el retículo de colágeno y otras proteínas presentes en la matriz lo que le aporta al hueso su flexibilidad y resistencia a la tensión (130).

El crecimiento en mamíferos es una función no lineal de la edad y está condicionada a la energía disponible, al gasto energético de mantenimiento de los individuos y al crecimiento potencial de los tejidos (131). Existen varios métodos para describir el crecimiento; principalmente para el estudio de mamíferos se han utilizado dos modelos de crecimiento, el de von Bertalanffy (132, 133) y el de Gompertz. El primero se usó en odontocetos en un par de trabajos (121, 134) mientras que el segundo ha sido más utilizado para este suborden debido a que presenta un punto de inflexión (102, 131, 135, 136), siendo en consecuencia más apropiado (95, 98, 102, 136-138) en comparación con el modelo de crecimiento de von Bertalanffy, ya que en algunos trabajos mencionados se han hecho comparaciones entre ambos modelos (95, 96, 135, 137).

En general, el modelo de crecimiento de Gompertz relaciona la edad con la talla o longitud total (102, 137, 139). En el presente trabajo estudiaremos por primera vez el crecimiento en algunos parámetros biométricos del radio de dos especies de odontocetos, describiendo la curva de crecimiento para cada especie (total de individuos) y para ambos sexos, además de relacionar la edad con los principales elementos químicos del hueso.

Los procesos de maduración ósea y la variación en contenido mineral de los huesos de la aleta de los delfines han sido poco estudiados, por lo que en este trabajo daremos algunas pautas que ayuden a comprender estos procesos, tanto entre sexos de una misma especie, como por categorías de edad, y entre las dos especies estudiadas, además de relacionarlos con parámetros biométricos. También se verá la

relación de la proporción fósforo/nitrógeno (P/N) que puede dar una mejor comprensión de los cambios metabólicos del hueso, ya que estos dos elementos son los que juegan el papel más importante en el depósito óseo de animales de rápido crecimiento, y su concentración varía mucho dependiendo de los alimentos que consumen (140).

4.2.2 Material y métodos

Como se explicó en el capítulo 2 las dos especies de odontocetos que se estudiaron son *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*. Estas muestras ya fueron utilizadas en otros trabajos de investigación, por lo que algunas variables morfológicas como talla y peso (67, 68). junto con la edad fueron calculadas por otros investigadores (69, 71). El resto de las variables fueron medidas o calculadas como se especifica en el citado capítulo.

En mamíferos, el crecimiento del cuerpo se describe con modelos no lineales que sigue usualmente patrones de forma sigmoidea, con tendencia asintótica, pues son los que presentan un mejor ajuste entre los valores observados y los esperados (141). La curva de crecimiento de Gompertz (Figura 30) se calculó usando el programa *online* de internet *Zunzun* (142), que utiliza la ecuación sigmoidea 2D de Gompertz (Ecuación 12), realizándose una cantidad máxima de 1000 iteraciones con una tolerancia (margen para error absoluto) de 1^{-15} para cada variable, tanto en lo referente al total de muestras como a cada sexo en ambas especies. Este modelo se basa en que la tasa de crecimiento relativo decrece de forma exponencial; la curva es asimétrica respecto de su punto de inflexión, siendo el ritmo de desarrollo más lento después de alcanzado este punto.

$$y = Ze^{-be^{-kt}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde y es la variable calculada, Z es el valor de la asíntota máxima de y , e es la base de los logaritmos naturales, k es el descenso exponencial del crecimiento, t es la edad y el parámetro b describe el crecimiento inicial.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

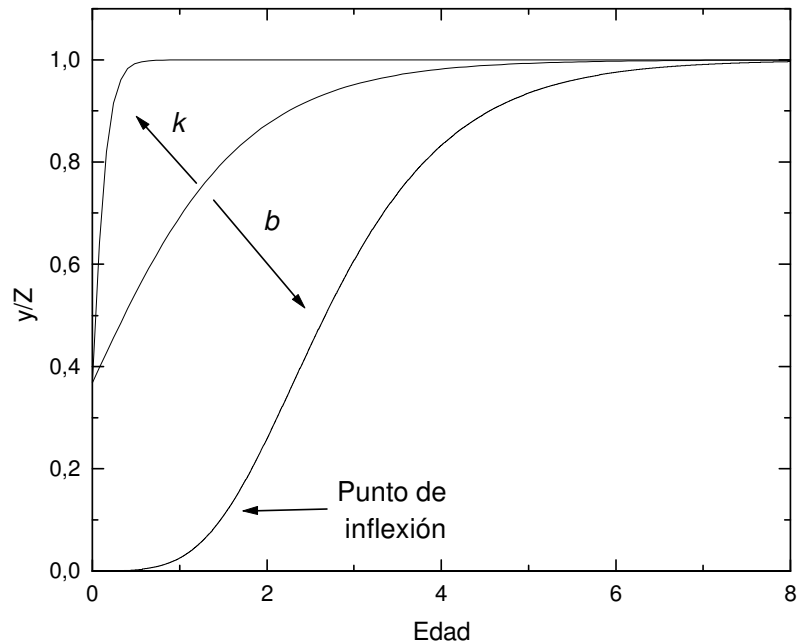


Figura 30. Representación gráfica del modelo de crecimiento de Gompertz

Estas variables se pueden interpretar en términos biológicos y utilizarse para caracterizar el crecimiento de la siguiente manera: el aumento del valor de Z indica un mayor tamaño final de adultos. Biológicamente, k representa la desaceleración del crecimiento; al aumentar k , la tasa de crecimiento disminuye con mayor rapidez, y la asíntota se alcanza antes en el tiempo. El aumento de b tiene dos efectos: retrasar el inicio del aumento del crecimiento de la curva sigmoidea, y retrasar el momento en que la curva alcanza su asíntota. Se establecen con el aumento inicial las condiciones del parámetro b , donde $b * k$ es la tasa de crecimiento en $t = 0$, el inicio del crecimiento (132, 133).

Las variables que se relacionaron con la edad fueron talla (L), peso (Mb), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ).

Las ecuaciones de crecimiento fueron calculadas por separado para el total de individuos y para cada sexo.

Para la representación gráfica se utilizó el programa SIGMAPLOT v9.0, basado en la siguiente expresión (Ec. 12), que tiene una significación algebraico-equivalente a la ecuación 11.

$$y = Ze^{\left(-e^{-\frac{t-x_0}{b}}\right)} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde y es la variable calculada, Z es el valor asintótico de la ecuación, el parámetro b es la constante de integración, t es la edad, e es la base de los logaritmos naturales y x_0 es la edad inicial (para la equivalencia de las ecuaciones véase anexo 4).

Se utilizaron regresiones lineales (Modelo I) para analizar los cambios a través del tiempo, del porcentaje de la composición química (Ca, Mg, Na, P, C y N), por lo que se dividieron los individuos sexados de cada especie en individuos maduros e inmaduros.

Para analizar la proporción de hidroxiprolina (ver capítulo 2) y calcular así indirectamente el colágeno, se utilizaron cuatro muestras de cada sexo por especie, que representaban diferentes categorías de edad. Las categorías de edad se consideraron a partir de los trabajos de Calzada et al. (1994) y Corcuera et al. (1994), tal y como se explica en la metodología en el apartado de reproducción de cada especie.

Se hicieron análisis estadísticos descriptivos básicos para conocer la media, desviación estándar, e intervalos de confianza para los porcentajes de los elementos químicos de ambas especies. Se realizaron análisis univariados para las diferencias entre sexos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (sexo); también se utilizaron análisis univariados de covarianza para ver las diferencias por categorías de edad. Finalmente las pruebas de comparaciones múltiples entre categorías de edad se llevaron a cabo mediante el ajuste de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA (1984-2002 StatSoft Inc.)

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Patrones de crecimiento

La ecuación de Gompertz describe adecuadamente el crecimiento en el delfín listado tanto para el total de individuos como entre sexos (Figura 31). Se encontraron coeficientes de correlación (r^2) mayores de 0,92. La media de los valores de r^2 para todas las variables medidas dio para el total de muestra (w) 0,967, en hembras (f) 0,963 y en machos (m) 0,971, lo que nos indica que hay una pequeña variación entre hembras y machos, siendo las hembras las que presentan r^2 menores (Tabla 7).

Aparentemente en todas las gráficas de la Figura 31 el crecimiento entre hembras, machos y muestras totales es diferente; sin embargo de las variables

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

analizadas en *Stenella coeruleoalba* solamente encontramos diferencia significativa, en el parámetro de crecimiento llamado tasa inicial de crecimiento (x_0), para el diámetro sagital (sd), encontrando que es mayor en las hembras (f) (0,52) que en las muestras totales (-2,96) y en los machos (-3,60). Esto, descrito biológicamente, muestra que los diámetros sagitales empiezan a crecer antes en los machos que en las hembras, siendo éste más lento y llegando a su crecimiento máximo a una edad mayor que en las hembras, es decir, en hembras el diámetro sagital empieza a crecer después y su crecimiento es más rápido. Un patrón similar se observa en la grafica del diámetro transversal; sin embargo, éste no presenta una diferencia significativa (Tabla 7).

Las variables Z y b no presentan diferencias significativas en ninguna de los parámetros. Biológicamente esto nos dice que tanto hembras como machos son muy similares en el resultado final de los parámetros estudiados en su edad adulta, y también que comienzan a crecer casi al mismo tiempo en todos los parámetros medidos, a excepción de los diámetros en ambos sexos.

En la Figura 31 se observa que en algunos parámetros (segundo momento del área (I), momento polar (J), superficie cortical (A), resistencia (σ)) la tasa inicial de crecimiento (x_0) comienza antes del nacimiento tanto en machos como en hembras, siendo estas ultimas mayores en I , J y A siguiendo un patrón muy similar, mientras que σ es más grande en los machos, alcanzando en ellos la asíntota con mayor rapidez que en las hembras.

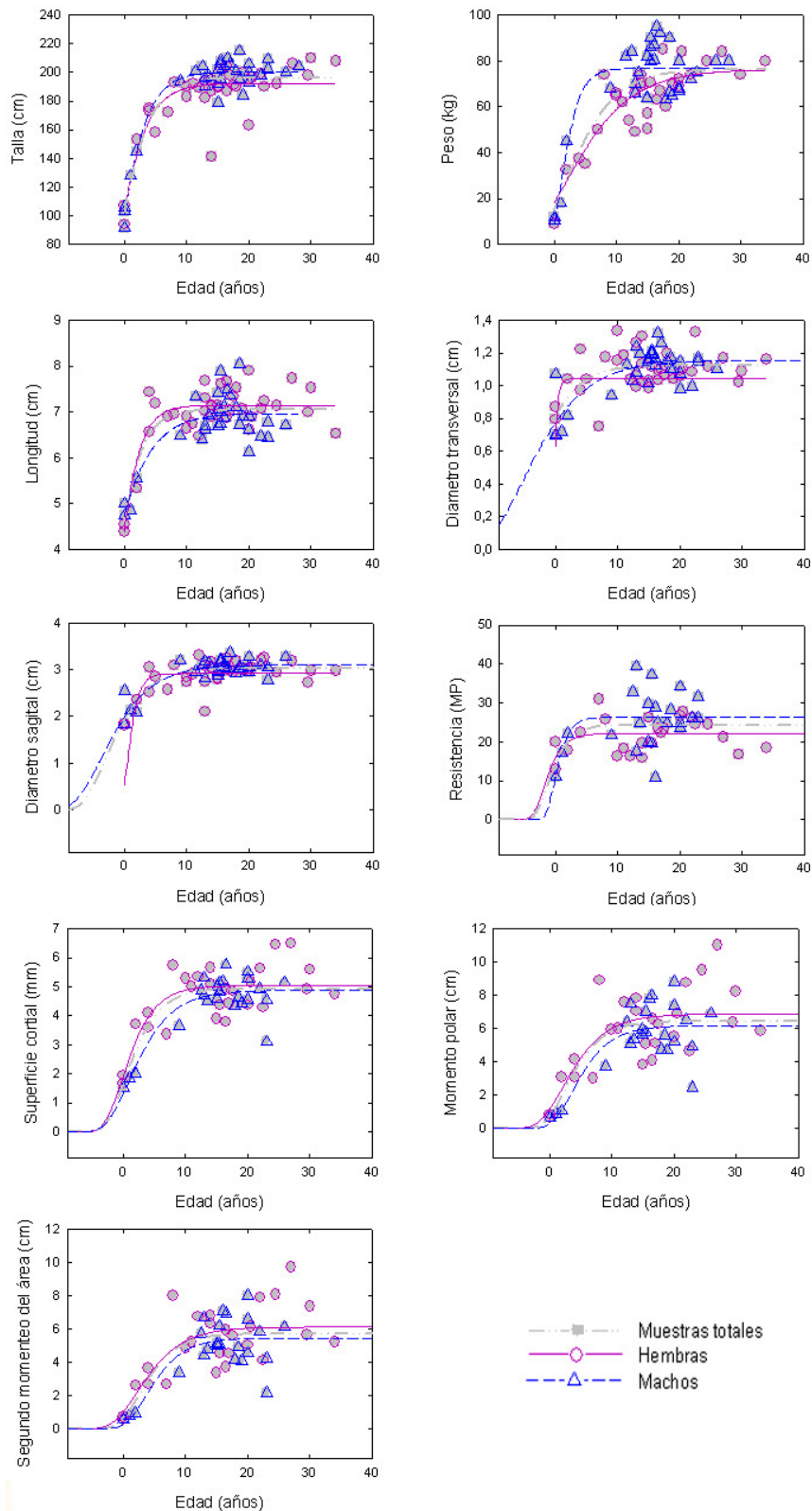


Figura 31. Representación gráfica de la variación ontogenética en *Stenella coeruleoalba*. Los diagramas de dispersión que representan los diferentes parámetros vs. Edad, están basadas en el modelo de crecimiento de Gompertz

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 7. Ecuación y parámetros estadísticos del modelo de crecimiento Gompertz en *Stenella coeruleoalba*. Los parámetros son talla (L), peso (Mb), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ), divididos en el total de muestra (ω), en hembras (f) y en machos (m). La (n) es el número total de muestras y (r^2) es el coeficiente de determinación. Los intervalos de confianza (C.I.) de las variables del modelo que presentan diferencias significativas están marcados con *

	n	r^2	equation	C.I.Z	C.I.b	C.I.k
L	ω 70	0,996	$y=196,5 * e^{-(e^{(a-1,303)/2,98})}$	199,85-193,17	3,86-2,10	-0,64--1,96
	f 36	0,998	$y=200,6 * e^{-(e^{(a-1,007)/2,67})}$	203,54-197,27	3,73-1,61	-0,39--1,61
	m 37	0,995	$y=192 * e^{-(e^{(a-1,337)/2,75})}$	197,34-187,00	3,95-1,55	-0,21--2,46
Mb	ω 63	0,980	$y=76,34 * e^{-(e^{(a-2,11)/4,32})}$	81,16-71,53	5,96-2,68	3,27-0,95
	f 32	0,983	$y=76,33 * e^{-(e^{(a-2,11)/5,85})}$	84,31-68,34	8,67-3,03	4,01-0,20
	m 31	0,984	$y=76,8 * e^{-(e^{(a-1,23)/1,66})}$	80,45-73,11	3,05--0,28	1,96-0,51
l	ω 68	0,996	$y=7,04 * e^{-(e^{(a-1,97)/2,38})}$	7,16-6,93	3,46-2,38	-0,81--3,14
	f 37	0,997	$y=7,14 * e^{-(e^{(a-1,50)/2,08})}$	7,28-6,99	3,05-1,10	-0,50--2,50
	m 31	0,996	$y=6,96 * e^{-(e^{(a-3,58)/3,76})}$	7,21-6,71	7,63--0,10	0,53--7,71
td	ω 69	0,990	$y=1,12 * e^{-(e^{(a-4,00)/3,64})}$	1,16-1,09	6,68-0,60	-0,17--7,83
	f 36	0,980	$y=1,04 * e^{-(e^{(a-0,24)/0,35})}$	1,09-0,60	10,34--9,62	6,51--7,00
	m 32	0,992	$y=1,15 * e^{-(e^{(a-5,06)/5,53})}$	1,25-1,06	12,20--1,13	1,00--11,14
sd	ω 69	0,995	$y=3,04 * e^{-(e^{(a-2,96)/3,63})}$	3,11-2,97	5,34-1,93	-1,22--4,70
	f 39	0,963	$y=2,91 * e^{-(e^{(a-0,52)/1,02})}$	3,11-2,71	1,87-0,17	0,98-0,06*
	m 32	0,996	$y=3,09 * e^{-(e^{(a-3,60)/4,36})}$	3,22-2,97	7,90-0,82	-0,48--6,72
I	ω 51	0,925	$y=5,71 * e^{-(e^{(a-2,62)/3,28})}$	6,30-5,13	5,86-0,70	4,50-0,73
	f 27	0,926	$y=6,11 * e^{-(e^{(a-2,34)/4,02})}$	7,09-5,13	7,99--0,05	5,12--0,43
	m 24	0,941	$y=5,45 * e^{-(e^{(a-3,71)/3,30})}$	6,34-4,57	7,25--0,61	7,62--0,18
A	ω 51	0,980	$y=4,93 * e^{-(e^{(a-0,28)/3,03})}$	5,17-4,69	4,78-1,27	1,31--0,75
	f 27	0,978	$y=5,03 * e^{-(e^{(a-0,14)/2,92})}$	5,40-4,67	5,20-0,64	1,48--1,77
	m 24	0,986	$y=4,87 * e^{-(e^{(a-1,03)/3,82})}$	5,27-4,47	6,96-0,68	2,48--0,41
J	ω 51	0,930	$y=6,44 * e^{-(e^{(a-2,54)/3,23})}$	7,09-5,79	5,78-0,68	4,39-0,70
	f 27	0,928	$y=6,86 * e^{-(e^{(a-2,21)/3,84})}$	7,93-5,78	7,73--0,03	4,95--0,51
	m 24	0,945	$y=6,16 * e^{-(e^{(a-3,75)/3,33})}$	7,13-5,19	7,12--0,44	7,54--0,03
σ	ω 47	0,945	$y=24,2 * e^{-(e^{(a-1,26)/1,94})}$	26,13-22,37	5,66--1,77	2,22--4,75
	f 24	0,965	$y=22,1 * e^{-(e^{(a-1,95)/1,71})}$	24,14-20,14	7,40--3,98	5,23--9,13
	m 23	0,943	$y=26,3 * e^{-(e^{(a-0,15)/1,28})}$	29,31-23,35	3,89--1,31	1,77--2,08

También en franciscana el modelo de Gompertz da una buena descripción del crecimiento, ya que en general se encontraron valores de r^2 mayores que 0,84 y observamos que la media de los r^2 de todas las variables son para el total de muestra 0,946, en hembras 0,953 y en machos 0,963. Esta especie presentan un mayor r^2 los machos que las hembras; además hay una disminución entre los r^2 si lo comparamos con la otra especie (Figura 32).

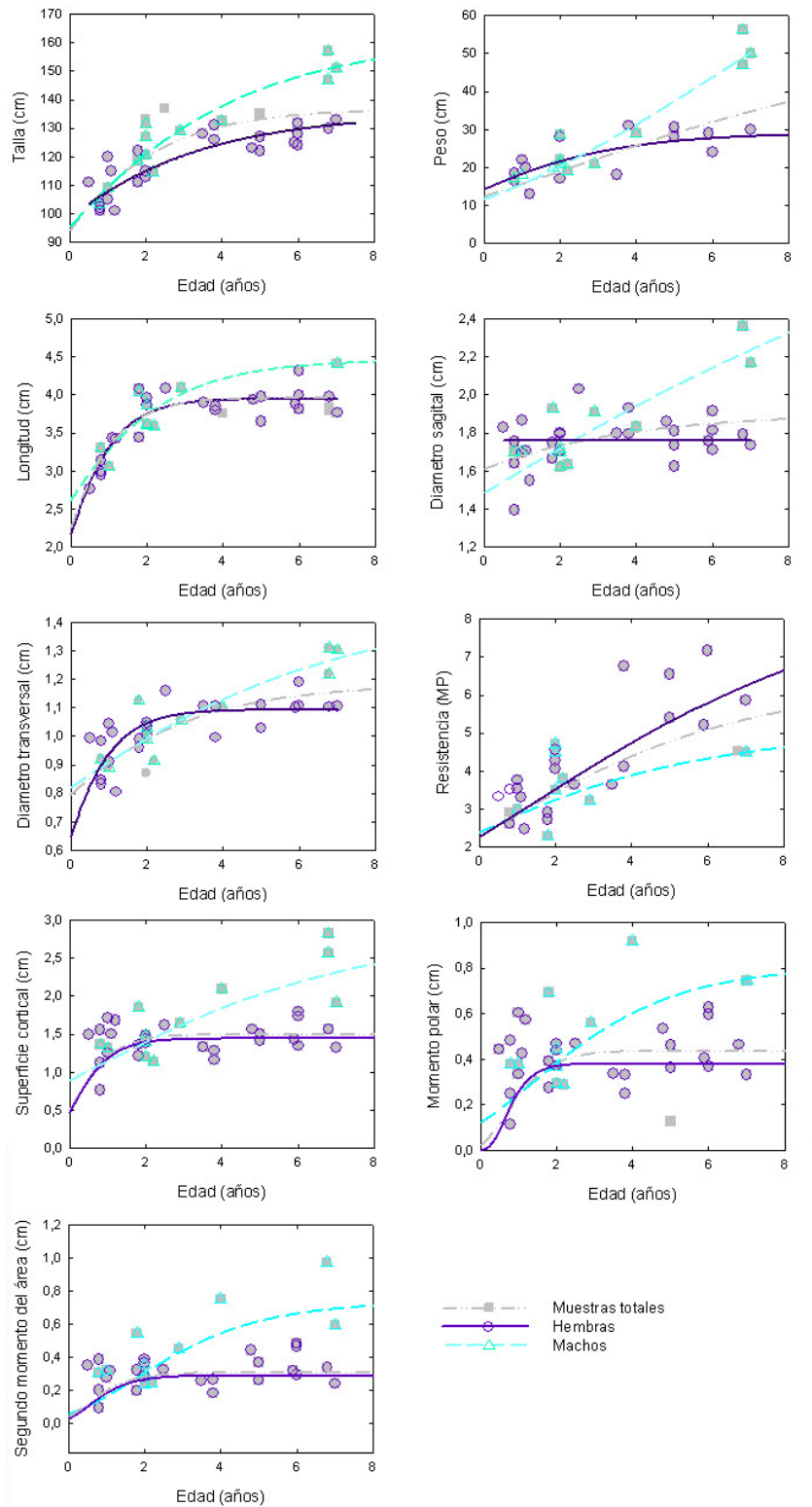


Figura 32. Representación grafica de la variación ontogenética en *Pontoporia blainvillei*. Los diagramas de dispersión que representan los diferentes parámetros vs. edad están basadas en el modelo de crecimiento de Gompertz.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

En las gráficas de franciscana (Figura 32), al igual que en las de delfín listado, (Figura 31) aparentemente se observan diferencias entre las muestras totales, hembras y machos. Sin embargo de los tres parámetros de crecimiento, sólo encontramos diferencias significativas en la tasa de crecimiento, al igual que en el delfín listado, para el diámetro sagital (sd), con la diferencia que para franciscana es menor en hembras (-54,57) que para las muestras totales (-6,21) y los machos (-2). También encontramos diferencias significativas en las variables longitud del radio (l) y diámetro transversal (td), encontrando en la primera diferencias tanto en el total de la muestra, como para ambos sexos, mientras que para el td , al igual que sd , la tasa de crecimiento en hembras (-7,44) es mucho menor que en el total de la muestra (-2,30) y que en machos (-2,69) (Tabla 8).

Llama la atención en *Pontoporia blainvillei* que presente un crecimiento más lento, con asíntotas poco pronunciadas en comparación con *Stenella coeruleoalba*, observándose diferencias entre sexos mucho más marcadas, siendo generalmente los machos mayores en casi todos los parámetros.

Tabla 8. Ecuación y parámetros estadísticos del modelo de crecimiento Gompertz en *Pontoporia blainvillei*. Los parámetros son talla (L), peso (Mb), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ), divididos en el total de muestra (ω), en hembras (f) y en machos (m). La (n) es el número total de muestras y (r^2) es el coeficiente de determinación. Los intervalos de confianza (C.I.) de las variables del modelo que presentan diferencias significativas están marcados con *.

	n	r^2	equation	C.I. Z	C.I. b	C.I. k
L	ω 39	0,995	$y=136,80 \cdot e^{-(e^{-(a-1,88)/1,91})}$	145,17-128,43	3,41-0,41	0,10--3,86
	f 26	0,998	$y=135,14 \cdot e^{-(e^{-(a-3,44)/2,98})}$	149,39-120,90	6,15--0,19	0,08--6,97
	m 12	0,998	$y=161,61 \cdot e^{-(e^{-(a-2,14)/3,34})}$	188,08-135,14	6,67-0,02	0,13--4,42
Mb	ω 28	0,950	$y=54,96 \cdot e^{-(e^{-(a-2,35)/5,96})}$	134,64--24,70	16,19--4,27	11,61--6,89
	f 15	0,972	$y=29,15 \cdot e^{-(e^{-(a-0,77)/2,30})}$	40,92-17,39	7,98--3,37	2,36--3,91
	m 13	0,982	$y=133,76 \cdot e^{-(e^{-(a-6,84)/7,65})}$	405,42--137,90	17,66--2,36	21,64--7,94
l	ω 35	0,987	$y=3,62 \cdot e^{-(e^{-(a-7,07)/0,22})}$	3,92-3,31	0,23-0,20	-7,08--7,06*
	f 23	0,985	$y=3,59 \cdot e^{-(e^{-(a-9,48)/0,30})}$	3,88-3,29	0,31-0,29	-9,49--9,47*
	m 9	0,997	$y=4,46 \cdot e^{-(e^{-(a-1,12)/1,79})}$	5,05-3,86	3,53-0,06	0,74--2,98*
td	ω 38	0,994	$y=1,18 \cdot e^{-(e^{-(a-2,30)/2,49})}$	1,30-1,06	4,39-0,59	-0,55--4,05
	f 26	0,983	$y=0,97 \cdot e^{-(e^{-(a-7,44)/0,02})}$	1,59-0,34	0,03-0,01	-7,43--7,45*
	m 13	0,997	$y=1,48 \cdot e^{-(e^{-(a-2,69)/5,12})}$	2,02-0,93	11,16--0,91	-1,39--4,00
sd	ω 38	0,994	$y=1,90 \cdot e^{-(e^{-(a-6,21)/3,48})}$	2,30-1,50	14,80--7,82	12,15--24,58
	f 27	0,994	$y=1,73 \cdot e^{-(e^{-(a-54,57)/0,23})}$	2,00-1,46	0,24-0,22	-54,56--54,58*
	m 13	0,996	$y=3,36 \cdot e^{-(e^{-(a-2,00)/10,08})}$	8,89--2,16	38,26--18,09	12,00--16,00
I	ω 36	0,847	$y=0,30 \cdot e^{-(e^{-(a-0,46)/0,66})}$	0,37-0,23	1,81--0,48	1,14--0,20
	f 24	0,881	$y=0,28 \cdot e^{-(e^{-(a-0,51)/0,60})}$	0,35-0,22	1,77--0,57	1,15--0,12
	m 13	0,905	$y=-0,73 \cdot e^{-(e^{-(a-1,76)/1,87})}$	1,19-0,28	3,04-0,70	3,17-0,36
A	ω 40	0,957	$y=1,49 \cdot e^{-(e^{-(a-0,06)/0,61})}$	1,63-1,35	0,94-0,27	0,27-0,14
	f 28	0,966	$y=1,43 \cdot e^{-(e^{-(a-0,06)/0,57})}$	1,58-1,29	0,89-0,25	0,25--0,12
	m 14	0,974	$y=2,85 \cdot e^{-(e^{-(a-0,61)/4,10})}$	4,85-0,85	9,26--1,06	3,47--2,24
J	ω 39	0,879	$y=0,43 \cdot e^{-(e^{-(a-0,68)/0,64})}$	0,51-0,35	1,22-0,06	0,92-0,44
	f 26	0,875	$y=0,38 \cdot e^{-(e^{-(a-0,64)/0,38})}$	0,45-0,35	1,11--0,35	1,00-0,27
	m 12	0,912	$y=0,81 \cdot e^{-(e^{-(a-0,12)/3,93})}$	1,51-0,10	4,34--0,01	3,56--0,82
σ	ω 29	0,960	$y=6,37 \cdot e^{-(e^{-(a-0,21)/3,33})}$	11,36-1,38	11,19--3,32	2,33--2,08
	f 23	0,968	$y=8,88 \cdot e^{-(e^{-(a-1,59)/5,17})}$	19,81--2,05	13,42--3,07	8,27--5,08
	m 8	0,955	$y=5,07 \cdot e^{-(e^{-(a-1,10)/3,87})}$	15,15--4,99	30,65--22,90	6,40--8,60

En ambas especies las variables que presentaron coeficientes de correlación menor fueron las el segundo momento del área (I) y el momento polar (J) (Tabla 7 y Tabla 8).

4.2.3.2 Análisis químicos

4.2.3.2.1 Análisis descriptivos

En los análisis descriptivos de los elementos químicos se halló que para el delfín listado los coeficiente de variación son muy pequeños (Tabla 9), observándose las mayores variaciones en Na y C; mientras que para franciscana (Tabla 10) la

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

variación es mucho mayor en todos los elementos menos en el C, que junto con el N, presenta los coeficientes de variación menores de la tabla y son similares a los mayores que presenta el delfín listado.

Tabla 9. Análisis descriptivos de la variación en el porcentaje de los elementos químicos de los huesos analizados en *Stenella coeruleoalba*

elemento	n	Desviación estándar	Media	C.I.	C.V.
Ca	59	1,43	22,14	21,77-22,51	0,06
Mg	58	0,02	0,25	0,25-0,26	0,08
Na	65	0,12	0,79	0,76-0,82	0,15
P	57	0,57	10,23	10,08-10,38	0,05
C	64	3,12	18,17	17,39-18,95	0,17
N	62	0,37	4,62	4,52-4,71	0,08

Tabla 10. Análisis descriptivos de la variación en el porcentaje de los elementos químicos de los huesos analizados en *Pontoporia blainvillei*

elemento	n	Desviación estándar	Media	C.I.	C.V.
Ca	39	7,57	15,98	13,53-18,44	0,47
Mg	39	0,07	0,16	0,13-0,18	0,43
Na	39	0,25	0,63	0,55-0,72	0,40
P	39	3,68	7,53	6,34-8,72	0,49
C	39	5,41	42,79	41,04-44,55	0,13
N	39	0,52	3,20	3,03-3,37	0,16

Para la hidroxiprolina (OH-PRO) y el colágeno, para ambas especies se tiene un total de 8 muestras (2 machos y 2 hembras para cada especie) con una media, intervalos de confianza y desviación estándar para la primera de M=1,40, C.I.= 0.94-1,93 y DS=0,28 y del colágeno de M=9,93, C.I.= 6.66-13,68 y DS=1,97.

4.2.3.2.2 Análisis de varianza

En el análisis de varianza no encontramos diferencias significativas entre sexos en los elementos químicos en franciscana (Tabla 12), mientras que para delfín listado solo encontramos diferencias significativas en el nitrógeno (Tabla 11)

Tabla 11. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre sexos en *Stenella coeruleoalba*

elemento		n	F	p	MS
Ca	f	30	0,79	0,378	1,62
	m	29			
Mg	f	28	0,003	0,950	0,001
	m	30			
Na	f	33	0,08	0,776	0,001
	m	32			
P	f	30	1,59	0,213	0,51
	m	27			
C	f	32	0,11	0,744	1,06
	m	32			
N	f	32	8,62*	0,004	1,03
	m	30			

Tabla 12. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre sexos en *Pontoporia blainvillei*

elemento		n	F	p	MS
Ca	f	27	1,09	0,301	62,86
	m	12			
Mg	f	27	1,29	0,262	0,008
	m	12			
Na	f	27	0,99	0,325	0,063
	m	12			
P	f	27	0,68	0,414	9,32
	m	12			
C	f	27	2,19	0,147	62,45
	m	12			
N	f	27	0,86	0,358	0,234
	m	12			

En el análisis de varianza por categoría de edad en ambas especies, encontramos diferencias significativas en Ca y P, y para franciscana también en Mg (Tabla 13 y Tabla 14).

Tabla 13. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre categorías de edad (sexualmente inmaduros y maduros) en *Stenella coeruleoalba*

elemento	n	F	p	MS
Ca	59	5,10*	0,003	8,77
Mg	58	1,057	0,37	0,0003
Na	65	1,310	0,28	0,02
P	57	5,72*	0,001	1,53
C	62	3,561	0,02	30,76
N	64	3,090	0,03	0,39

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 14. ANOVA del porcentaje de los elementos químicos entre categorías de edad (sexualmente inmaduros y maduros) en *Pontoporia blainvillei*

elemento	n	F	p	MS
Ca	59	3,61*	0,022	47,55
Mg	58	4,20*	0,012	0,004
Na	65	1,88	0,149	0,059
P	57	2,83*	0,052	11,83
C	62	0,79	0,506	29,84
N	64	2,29	0,094	0,24

Se hizo una comparación Post-hoc (ya que envuelve variables categóricas) con el análisis de comparación multiple Tukey HSD, encontrándose para el delfín listado, tanto para Ca como para P, que las diferencias significativas se dan entre hembras inmaduras y maduras (para Ca el cuadrado de la media (MS)=1,72 con una probabilidad (p)=0,004 y para P MS=0,27 p=0,002) y entre hembras inmaduras y machos maduros (para Ca MS=1,72 p=0,004 y para P MS=0,27 p=0,001).

En franciscana las categorías de edad que presentan diferencias significativas en el Ca son: los machos maduros con las hembras inmaduras (MS=47,55 p=0,02), con las hembras maduras (MS=47,55 p=0,04), y con los machos inmaduros (p=0,02); para el P se encontraron diferencias significativas solo entre machos inmaduros y maduros (MS=11,83 p=0,04); y para el Mg se encontraron diferencias significativas entre machos maduros y hembras inmaduras (MS=0,04 p=0,01), maduras (MS=0,04 p=0,02), y machos inmaduros (p=0,01).

4.2.3.2.3 Relación de la edad/talla con los elementos químicos

La evolución del porcentaje de los elementos químicos con la edad se representa en las figuras 33 y 34. El análisis que se sigue para estudiar las variaciones del porcentaje se basa en un modelo lineal, ya que estos no siguen un modelo de crecimiento sigmoideal como es el modelo general de crecimiento de Gompertz, ya que presentan una disminución en la edad adulta.

En las regresiones de los porcentajes de los elementos químicos con la edad, encontramos que no siguen ningún patrón concreto. Tanto los porcentajes de los cuatro elementos principales (Ca, Mg, Na, P) del hueso como el porcentaje de composición del Carbono (C) y el Nitrógeno (N) (usados para medir el contenido de proteínas) (Figura 33 y Figura34). Aunque se observa una tendencia a aumentar los compuestos químicos en los individuos inmaduros con la edad, tanto en hembras

como en macho, mientras que en los individuos maduros disminuye o se mantiene; esta tendencia es más clara en hembras que en machos, con excepción de N en *Stenella coeruleoalba* y el P en *Pontoporia blainvillei*.

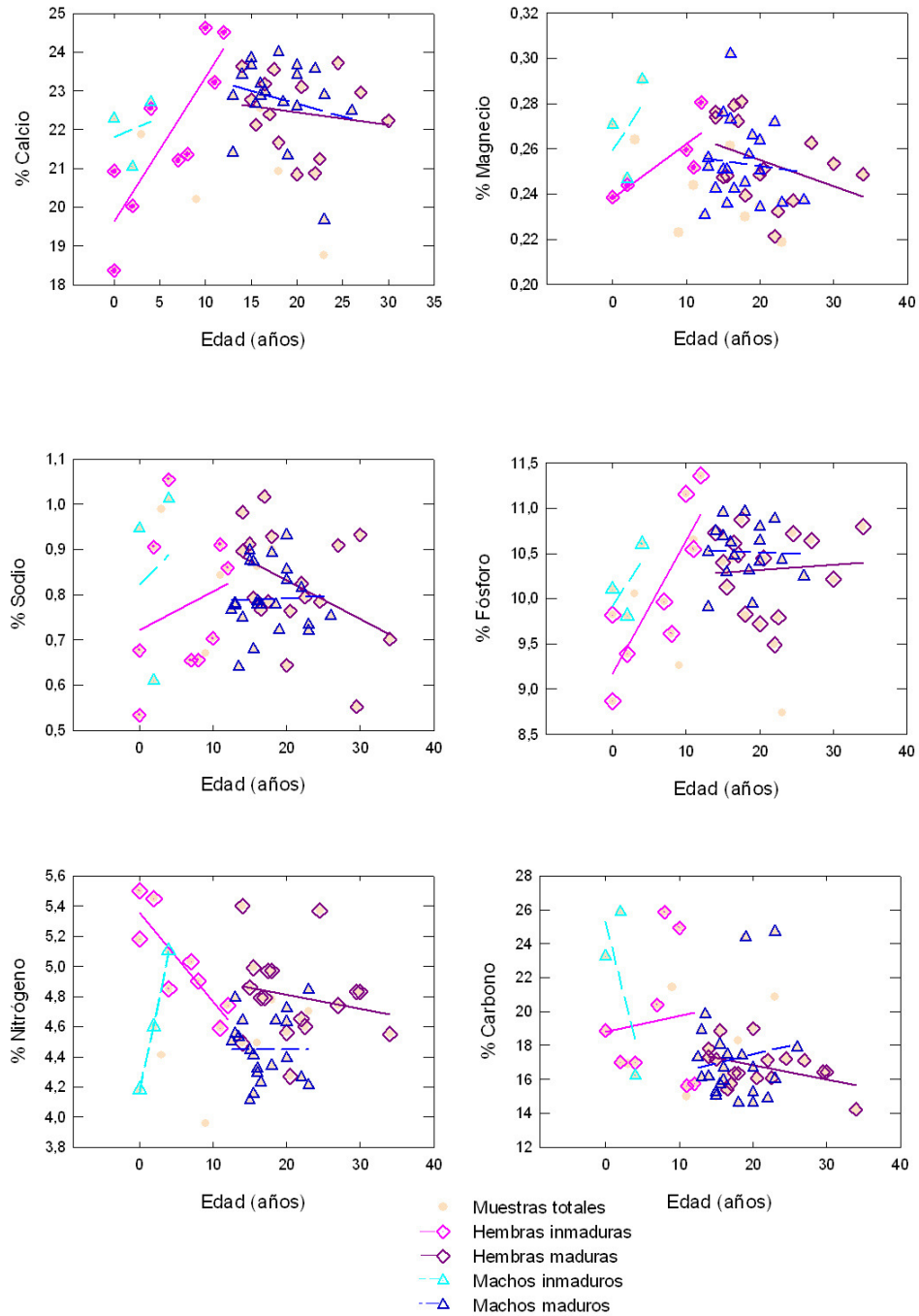


Figura 33. Porcentajes de algunos compuestos químicos en *Stenella coeruleoalba* por edad y por categoría de edad

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

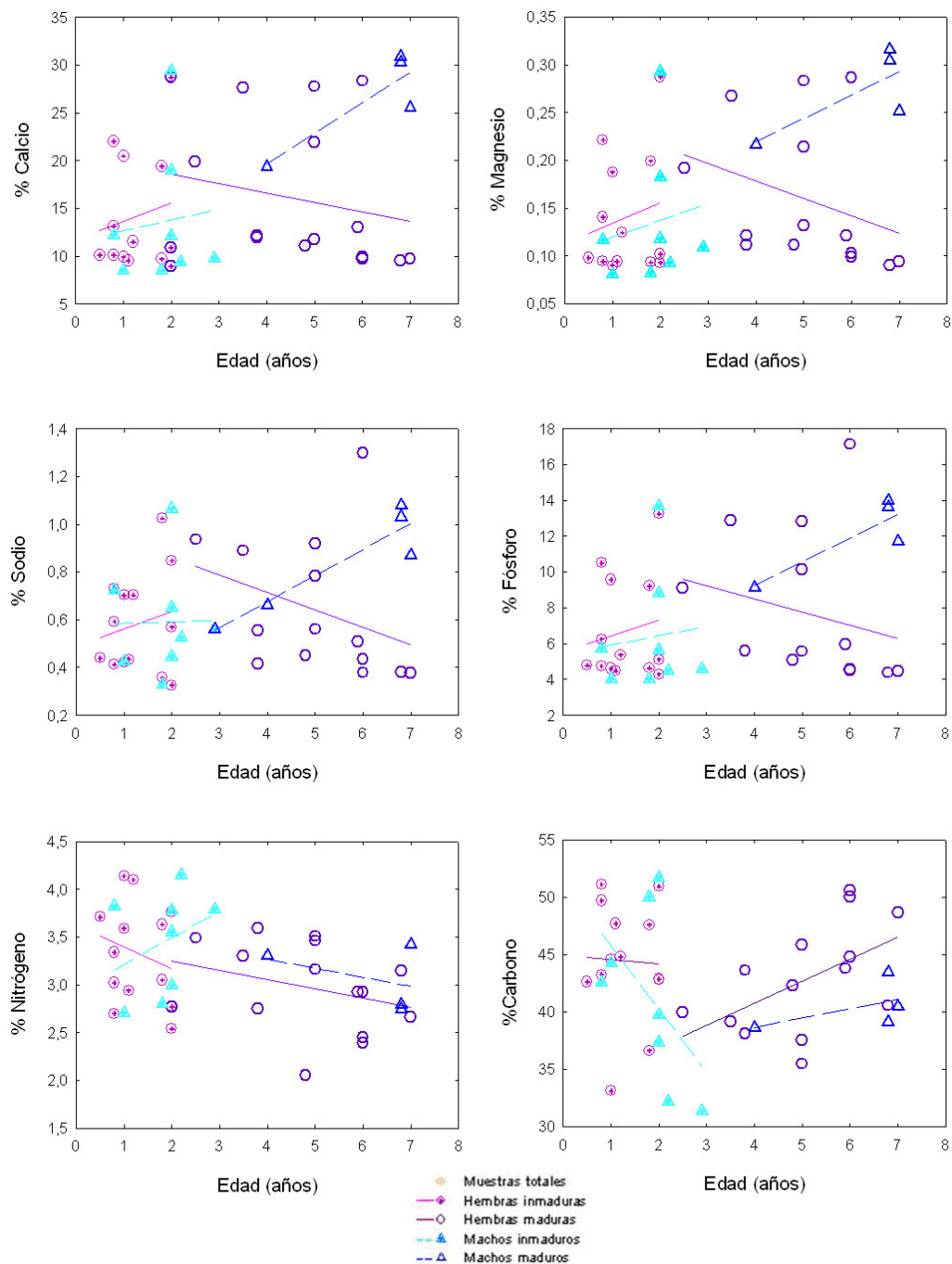


Figura 34. Porcentajes de algunos compuestos químicos en *Pontoporia blainvillei* por sexo, edad y categoría de edad

Para ambas especies, la hidroxiprolina, y por lo tanto el colágeno, al relacionarlos con la edad y con la talla, nos muestran que mientras más crecen las hembras menores son los porcentajes, mientras que para los machos el porcentaje de ambos aumenta con el crecimiento. Estas diferencias entre sexos se observan más

acusadas en hembras de *Pontoporia blainvillei* que en las de *Stenella coeruleoalba* (Figura 35 y Figura 36).

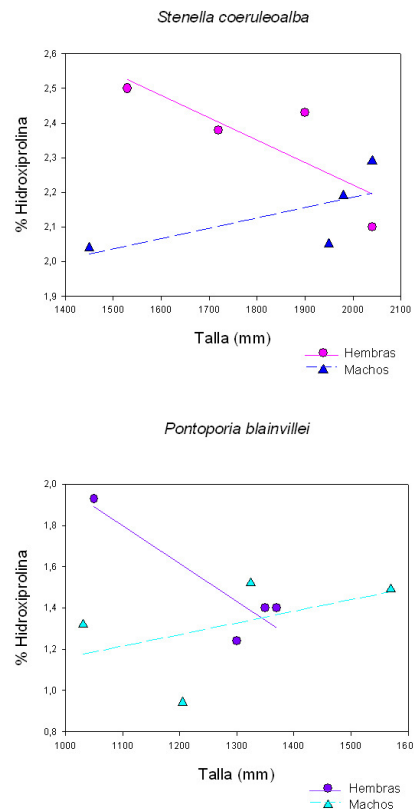


Figura 35. Regresiones entre porcentaje de hidroxiprolina y talla para ambas especies.

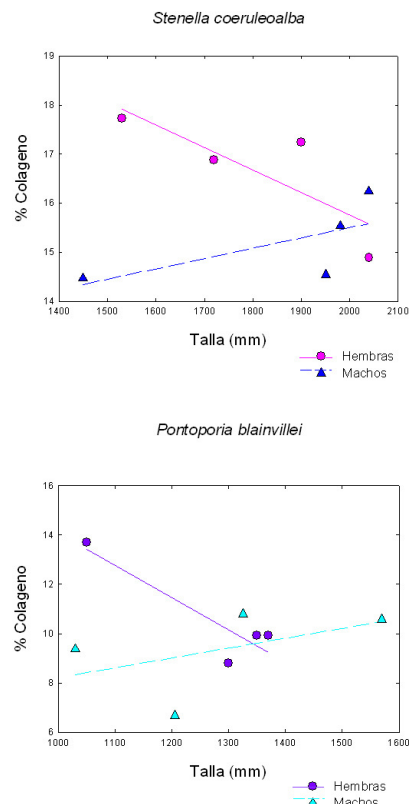


Figura 36. Regresiones entre porcentaje de colágeno y talla para ambas especies.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

4.2.3.2.4 Relación de parámetros mecánicos con los elementos químicos

Al relacionar la resistencia con los porcentajes de elementos químicos, tanto por sexos como por categorías de edad, encontramos que en todos los elementos, los coeficientes de determinación son muy altos para *Stenella coeruleoalba* (Tabla 15); en particular se observa que en machos inmaduros se presenta una regresión casi perfecta, aunque esto podría ser debido al *n* tan bajo. Lo mismo se observa para la superficie cortical (Tabla 16) y para el segundo momento del área (Tabla 17).

Tabla 15. Análisis de regresión entre la resistencia y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo, en categorías de edad, para el radio de *Stenella coeruleoalba*. Abreviaciones: *f* es hembras, *m* es machos, R^2 es coeficiente de determinación, *R* el coeficiente de correlación lineal de Pearson, y *ES* es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R^2	R	ES	Ecuación
Ca	f	Inmaduros	9	0.997	0.998	1.341	$y=18.46+x0.08$
		Maduros	16	0.997	0.998	1.262	$y=26.90+x-0.19$
	m	Inmaduros	3	1	1	0.189	$y=16.12+x0.22^*$
		Maduros	17	0.997	0.998	1.199	$y=23.24+x-0.01$
Mg	f	Inmaduros	3	0.999	0.999	0.011	$y=0.24+x0.0005^*$
		Maduros	18	0.995	0.997	0.017	$y=0.30+x-0.002$
	m	Inmaduros	3	0.996	0.998	0.026	$y=0.18+x0.003^*$
		Maduros	18	0.995	0.998	0.017	$y=0.27+x-0.0008$
Na	f	Inmaduros	9	0.950	0.974	0.197	$y=0.84+x-0.005$
		Maduros	19	0.977	0.988	0.128	$y=0.83+x-0.001$
	m	Inmaduros	3	0.970	0.985	0.262	$y=0.14+x0.02^*$
		Maduros	20	0.990	0.995	0.081	$y=0.89+x-0.004$
P	f	Inmaduros	8	0.999	0.999	0.322	$y=8.37+x0.04$
		Maduros	15	0.997	0.998	0.517	$y=12.37+x-0.08$
	m	Inmaduros	3	0.999	0.999	0.345	$y=8.30+x0.07^*$
		Maduros	15	0.998	0.999	0.376	$y=10.73+x-0.009$
C	f	Inmaduros	6	0.973	0.986	4.306	$y=19.68+x0.06$
		Maduros	19	0.977	0.988	2.782	$y=19.52+x-0.09$
	m	Inmaduros	3	0.991	0.995	3,468	$y=46.35+x-1.03^*$
		Maduros	20	0.978	0.989	2.661	$y=15.72+x0.05$
N	f	Inmaduros	7	0.990	0.995	0.558	$y=5.72+x-0.04$
		Maduros	18	0.996	0.998	0.290	$y=5.20+x-0.02$
	m	Inmaduros	3	0.997	0.998	0.413	$y=1.57+x0.12^*$
		Maduros	20	0.998	0.999	0.211	$y=4.28+x0.005$

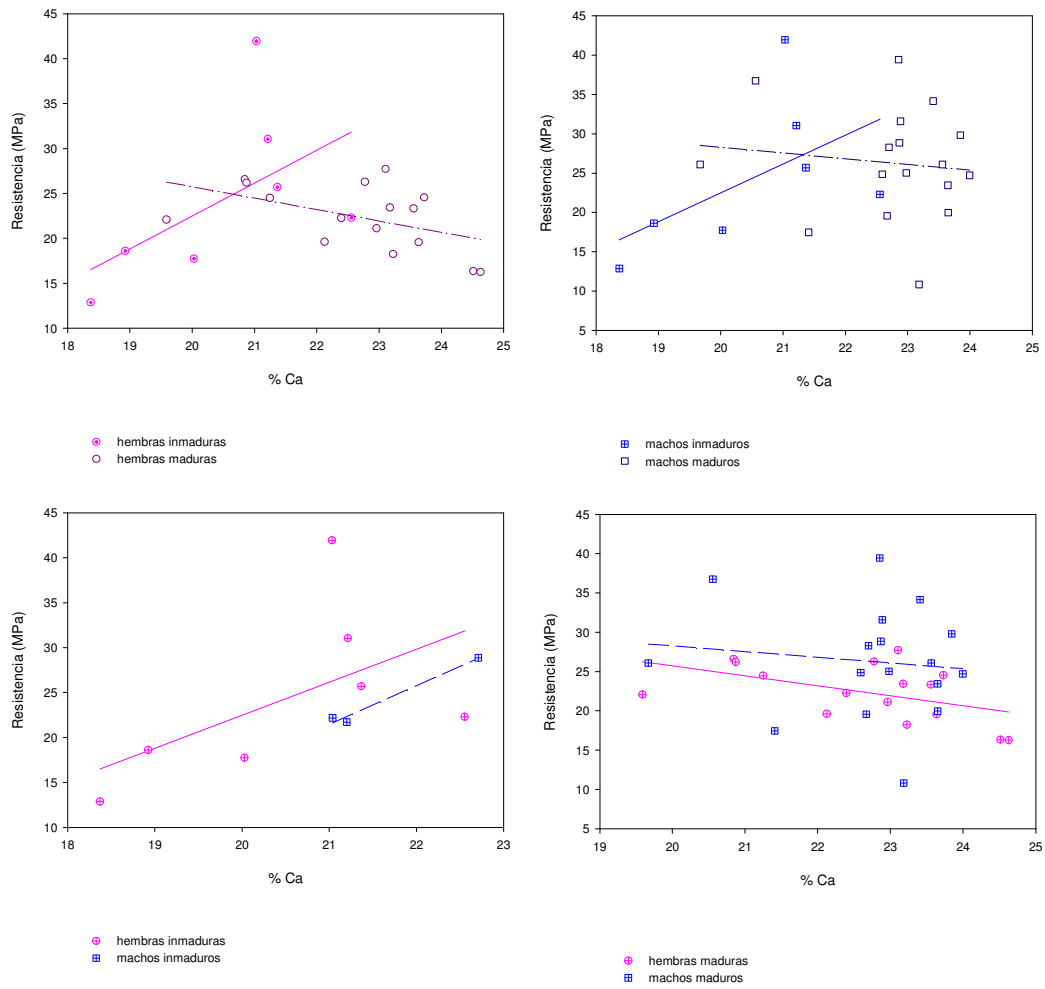


Figura 37. Regresiones entre porcentaje de calcio y la resistencia para *Stenella coeruleoalba*, entre sexos y entre categoría de edad.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 16. Análisis de regresión entre la superficie cortical y los porcentajes de diferentes elementos químicos, para cada sexo según categorías de edad, para el radio de *Stenella coeruleoalba*. Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R^2	R	ES	ecuación
Ca	f	Inmaduros	7	0.996	0.998	1.503	$y=19.08+x0.40$
		Maduros	17	0.997	0.998	1.223	$y=18.35+x0.84$
	m	Inmaduros	3	0.999	0.999	0.918	$y=19.68+x0.60^*$
		Maduros	18	0.997	0.998	1.164	$y=20.08+x0.53$
Mg	f	Inmaduros	3	0.999	0.999	0.013	$y=0.27+x-0.004^*$
		Maduros	19	0.995	0.997	0.019	$y=0.23+x0.004$
	m	Inmaduros	3	1	1	0.00004	$y=0.20+x0.02^*$
		Maduros	19	0.997	0.998	0.014	$y=0.23+x0.003$
Na	f	Inmaduros	7	0.951	0.975	0.195	$y=0.57+x0.04$
		Maduros	20	0.978	0.989	0.124	$y=0.57+x0.04$
	m	Inmaduros	3	0.999	0.999	0.023	$y=0.20+x0.20^*$
		Maduros	21	0.990	0.995	0.079	$y=0.53+x0.05$
P	f	Inmaduros	6	0.997	0.998	0.596	$y=9.32+x0.02$
		Maduros	18	0.997	0.998	0.540	$y=8.78+x0.32$
	m	Inmaduros	3	1	0.999	0.150	$y=9.06+x0.35^*$
		Maduros	17	0.998	0.999	0.373	$y=9.75+x0.14$
C	f	Inmaduros	6	0.979	0.989	3.781	$y=14.83+x1.69$
		Maduros	20	0.978	0.989	2.700	$y=20.53+x-0.61$
	m	Inmaduros	3	0.995	0.997	2,625	$y=34.54+x-4.12^*$
		Maduros	21	0.974	0.987	2.984	$y=23.16+x-1.18$
N	f	Inmaduros	7	0.984	0.992	0.702	$y=4.52+x0.05$
		Maduros	19	0.996	0.998	0.283	$y=4.27+x0.09$
	m	Inmaduros	3	0.989	0.994	0.803	$y=4.37+x0.05^*$
		Maduros	19	0.998	0.999	0.208	$y=4.94+x-0.10$

Tabla 17. Análisis de regresión entre el segundo momento del área y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad para *Stenella coeruleoalba*. Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R² es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R ²	R	ES	ecuación
Ca	f	Inmaduros	7	0,996	0,998	1,546	y=19,98+x0,16
		Maduros	17	0,996	0,998	1,332	y=21,20+x0,24
	m	Inmaduros	3	0,999	0,999	0,893	y=20,50+x0,41*
		Maduros	18	0,997	0,998	1,139	y=21,20+x0,27
Mg	f	Inmaduros	3	0,999	0,999	0,014	y=0,25+x-0,001*
		Maduros	19	0,995	0,997	0,019	y=0,24+x0,001
	m	Inmaduros	3	1	1	0,0008	y=0,23+x0,01*
		Maduros	19	0,997	0,998	0,013	y=0,24+x0,002
Na	f	Inmaduros	7	0,946	0,973	0,204	y=0,70+x0,007
		Maduros	20	0,979	0,989	0,123	y=0,67+x0,02
	m	Inmaduros	3	0,999	0,999	0,031	y=0,48+x0,13*
		Maduros	21	0,990	0,995	0,080	y=0,67+x0,02
P	f	Inmaduros	6	0,997	0,998	0,596	y=9,38+x0,01
		Maduros	18	0,997	0,998	0,573	y=9,85+x0,09
	m	Inmaduros	3	1	0,999	0,136	y=9,55+x0,23*
		Maduros	17	0,998	0,999	0,370	y=10,09+x0,06
C	f	Inmaduros	6	0,983	0,991	3,392	y=17,74+x1,008
		Maduros	20	0,980	0,990	2,618	y=20,24+x-0,48
	m	Inmaduros	3	0,995	0,997	2,462	y=28,85+x-2,78*
		Maduros	21	0,975	0,987	2,933	y=20,82+x-0,62
N	f	Inmaduros	7	0,984	0,992	0,705	y=4,66+x0,02
		Maduros	19	0,996	0,998	0,286	y=4,53+x0,03
	m	Inmaduros	3	0,989	0,994	0,801	y=4,42+x0,04*
		Maduros	19	0,997	0,998	0,216	y=4,56+x-0,02

Al relacionar la resistencia con los porcentajes de elementos químicos, tanto por sexos como por categorías de edad, encontramos que en todos los elementos, los coeficientes de determinación son muy altos para *Pontoporia blainvillei* (Tabla 18); se observa que Ca, Mg, Na y P de machos maduros, donde el n es tan bajo el coeficiente de determinación es menor en comparación machos inmaduros para Ca, Mg y P, mientras que para Na es mayor. Mientras que en la relación de los porcentajes de los elementos químicos con la superficie cortical (Tabla 19) y el segundo momento del áreas, los coeficientes de determinación son mayores en machos maduros que en inmaduros.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 18. Análisis de regresión entre la resistencia y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo, según categorías de edad, para el radio de *Pontoporia blainvillei*. Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R² es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson, y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R ²	R	ES	ecuación
Ca	f	Inmaduros	13	0,877	0,936	5,884	y=7,26+x1,73
		Maduros	13	0,829	0,910	8,665	y=3,47+x2,85
	m	Inmaduros	5	0,959	0,979	4,512	y=-12,61+x7,81
		Maduros	4	0,863	0,727	9,067	y=4,55+x3,22*
Mg	f	Inmaduros	13	0,873	0,935	0,059	y=0,06+x0,01
		Maduros	13	0,824	0,908	0,087	y=0,02+x0,02
	m	Inmaduros	5	0,953	0,976	0,047	y=-0,12+x0,07
		Maduros	4	0,862	0,928	0,094	y=0,10+x-0,01*
Na	f	Inmaduros	13	0,896	0,946	0,215	y=0,48+x-0,025
		Maduros	13	0,858	0,926	0,286	y=0,28+x0,07
	m	Inmaduros	5	0,958	0,979	0,167	y=-0,32+x0,25
		Maduros	4	0,970	0,985	0,161	y=0,29+x0,101*
P	f	Inmaduros	13	0,882	0,939	2,703	y=3,35+x0,83
		Maduros	13	0,832	0,912	3,930	y=1,84+x1,25
	m	Inmaduros	5	0,958	0,979	2,121	y=-5,74+x3,60
		Maduros	4	0,868	0,931	4,140	y=2,63+x1,36*
C	f	Inmaduros	13	0,987	0,993	5,431	y=42,15+x0,57
		Maduros	13	0,989	0,994	4,783	y=40,29+x0,62
	m	Inmaduros	5	0,994	0,997	4,440	y=61,90+x-4,81
		Maduros	4	0,988	0,994	5,445	y=31,37+x1,21
N	f	Inmaduros	13	0,977	0,988	0,546	y=3,56+x-0,05
		Maduros	13	0,977	0,988	0,491	y=2,85+x0,02
	m	Inmaduros	5	0,997	0,998	0,197	y=1,59+x0,43
		Maduros	4	0,992	0,996	0,461	y=3,32+x0,09

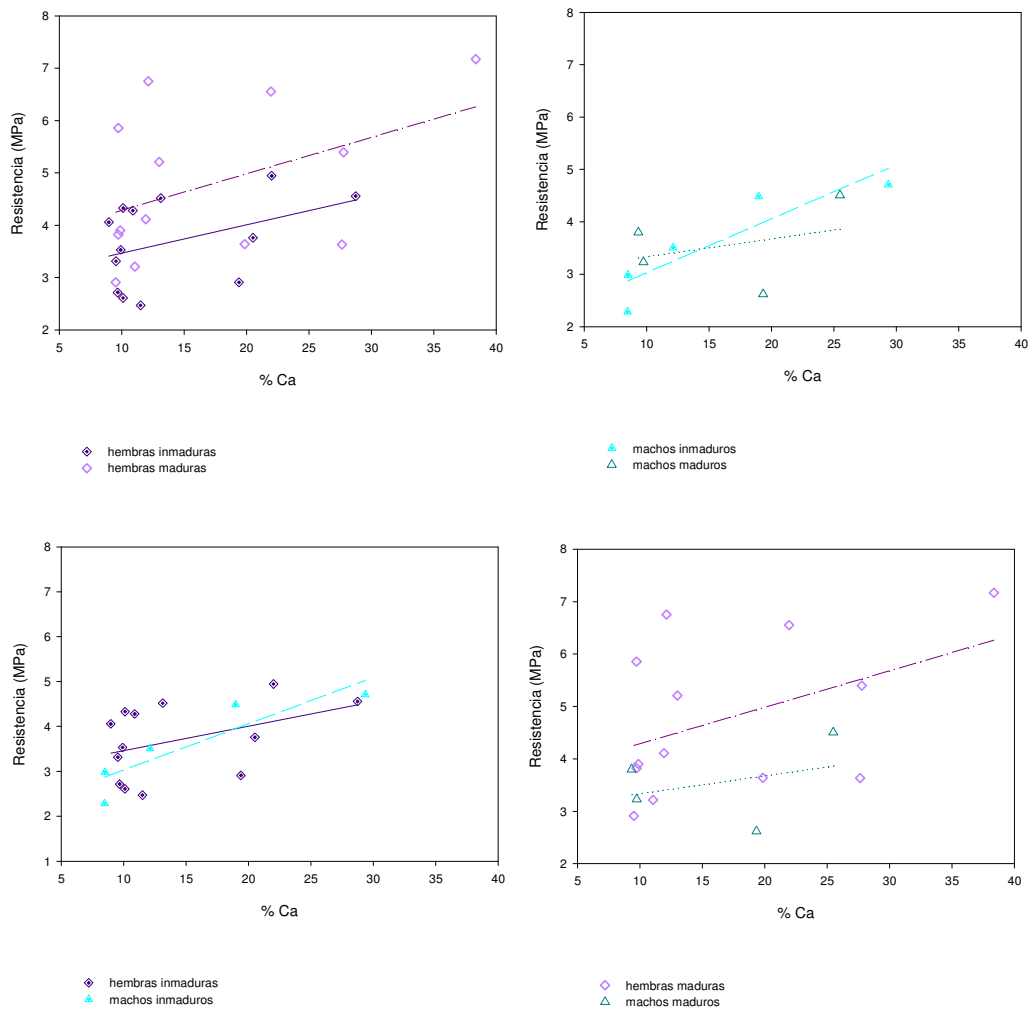


Figura 38. Regresiones entre porcentaje de calcio y la resistencia para, *Pontoporia blainvillei* entre sexos y entre categoría de edad.

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 19. Análisis de regresión entre la superficie cortical y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad, para el radio de *Pontoporia blainvillei*. Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R^2 es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R^2	R	ES	ecuación
Ca	f	Inmaduros	13	0,885	0,941	5,689	$y=31,73+x-12,71$
		Maduros	13	0,829	0,910	8,657	$y=39,53+x-15,87$
	m	Inmaduros	5	0,828	0,909	9,314	$y=36,72+x-14,66^*$
		Maduros	4	0,935	0,967	6,224	$y=-8,35+x14,34^*$
Mg	f	Inmaduros	13	0,884	0,940	0,056	$y=0,32+x-0,13$
		Maduros	13	0,823	0,907	0,087	$y=0,39+x-0,16$
	m	Inmaduros	5	0,816	0,903	0,094	$y=0,35+x-0,14^*$
		Maduros	4	0,959	0,979	0,051	$y=-0,10+x0,16^*$
Na	f	Inmaduros	13	0,908	0,953	0,202	$y=1,03+x-0,32$
		Maduros	13	0,856	0,925	0,289	$y=1,18+x-0,38$
	m	Inmaduros	5	0,864	0,929	0,30	$y=1,33+x-0,52^*$
		Maduros	4	0,977	0,988	0,142	$y=0,23+x0,24^*$
P	f	Inmaduros	13	0,891	0,944	2,591	$y=15,21+x-6,19$
		Maduros	13	0,836	0,914	3,884	$y=18,18+x-7,32$
	m	Inmaduros	5	0,829	0,910	4,323	$y=16,93+x-6,70^*$
		Maduros	4	0,941	0,969	2,775	$y=-3,69+x6,56^*$
C	f	Inmaduros	13	0,987	0,993	5,509	$y=42,60+x1,33$
		Maduros	13	0,993	0,996	3,872	$y=27,96+x10,86$
	m	Inmaduros	5	0,991	0,995	5,408	$y=20,81+x16,42$
		Maduros	4	0,995	0,997	3,551	$y=21,36+x8,41$
N	f	Inmaduros	13	0,977	0,988	0,548	$y=2,86+x0,33$
		Maduros	13	0,982	0,991	0,431	$y=4,17+x-0,87$
	m	Inmaduros	5	0,986	0,993	0,486	$y=4,45+x-0,89$
		Maduros	4	0,999	0,999	0,065	$y=5,22+x-0,91$

Tabla 20. Análisis de regresión entre el segundo momento del área y los porcentajes de diferentes elementos químicos para cada sexo según categorías de edad para *Pontoporia blainvillei*. Abreviaciones: f es hembras, m es machos, R² es coeficiente de determinación, R el coeficiente de correlación lineal de Pearson y ES es el error estándar. Todas con un 95 % de confianza y g.l. de 2.

elemento	sexo	Categoría de edad	n	R ²	R	ES	ecuación
Ca	f	Inmaduros	13	0,872	0,934	5,999	y=21,87+x-24,28
		Maduros	13	0,827	0,909	8,710	y=28,38+x-36,96
	m	Inmaduros	5	0,864	0,930	8,252	y=30,80+x-44,26*
		Maduros	4	0,929	0,964	6,518	y=2,39+x26,67*
Mg	f	Inmaduros	13	0,872	0,934	0,059	y=0,22+x-0,26
		Maduros	13	0,819	0,905	0,088	y=0,27+x-0,36
	m	Inmaduros	5	0,854	0,924	0,084	y=0,30+x-0,43*
		Maduros	4	0,956	0,977	0,053	y=0,01+x0,30*
Na	f	Inmaduros	13	0,907	0,952	0,890	y=0,81+x-0,72
		Maduros	13	0,858	0,926	0,286	y=0,93+x-0,98
	m	Inmaduros	5	0,893	0,945	0,268	y=1,10+x-1,52*
		Maduros	4	0,974	0,986	0,152	y=0,44+x0,42*
P	f	Inmaduros	13	0,878	0,937	2,744	y=10,46+x-11,97
		Maduros	13	0,834	0,913	3,907	y=13,05+x-17,06
	m	Inmaduros	5	0,865	0,930	3,837	y=14,25+x-20,33*
		Maduros	4	0,936	0,967	2,892	y=1,19+x12,29*
C	f	Inmaduros	13	0,987	0,993	5,507	y=43,36+x3,41
		Maduros	13	0,993	0,996	3,970	y=35,74+x24,76
	m	Inmaduros	5	0,992	0,996	4,977	y=31,45+x37,99
		Maduros	4	0,995	0,997	3,523	y=27,33+x16,31
N	f	Inmaduros	13	0,978	0,988	0,543	y=3,01+x1,01
		Maduros	13	0,986	0,993	0,379	y=3,78+x-2,75
	m	Inmaduros	5	0,989	0,994	0,428	y=4,03+x-2,52
		Maduros	4	0,999	0,999	0,085	y=4,55+x-1,75

4.2.3.2.5 Relación de la proporción de fósforo-nitrógeno en el hueso

Los resultados que muestra la proporción del fósforo-nitrógeno se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Análisis descriptivo de la proporción del fósforo y el nitrógeno en las dos especies estudiadas.

sp	n	Media	Mínimo-máximo	Desviación estándar
<i>Stenella coeruleoalba</i>	54	2,20	1,71-2,60	0,22
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	2,39	1,07-5,87	1,22

Los análisis de varianza entre sexos para la proporción P/N solo muestran diferencias para *Stenella coeruleoalba*, mientras que entre categorías de edad presentan diferencias las dos especies (Tabla 22).

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

Tabla 22. ANOVA de la proporción del fósforo y el nitrógeno en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.

sp	n	sexo			categorías de edad			sexo/categorías de edad		
		F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS
<i>Stenella coeruleoalba</i>	54	17,39*	0,001	0,58	5,26*	0,026	0,17	5,52*	0,022	0,18
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	2,37	0,132	2,85	11,29*	0,001	13,53	4,84*	0,034	5,81

Al encontrar diferencia entre el análisis de varianza entre factores sexo/categorías de edad, se realizó una comparación Post hoc con el análisis de comparación Tukey HSD, encontrándose diferencias significativas entre las medias de hembras inmaduras y hembras maduras, hembras inmaduras y machos inmaduros y hembras inmaduras y machos maduros en *Stenella coeruleoalba*. Para *Pontoporia blainvillei* las diferencias entre medias que se encontraron fueron entre hembras inmaduras y machos maduros y entre machos inmaduros y machos maduros.

4.2.3.2.6 Relación de la proporción de carbono-nitrógeno en el hueso

Los resultados que muestra la proporción del carbono-nitrógeno se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Análisis descriptivo de la proporción del carbono y el nitrógeno en las dos especies estudiadas.

sp	n	Media	Mínimo-máximo	Desviación estándar
<i>Stenella coeruleoalba</i>	61	3,93	3,12-6,26	0,80
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	13,90	7,75-20,94	3,67

Los análisis de varianza solo muestran diferencias para *Stenella coeruleoalba*, para la proporción C/N, entre las categorías de edad siendo mayor la proporción en individuos inmaduros que en los maduros. (Tabla 24).

Tabla 24. ANOVA de la proporción del carbono y el nitrógeno en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.

sp	n	sexo			categorías de edad			sexo/categorías de edad		
		F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS
<i>Stenella coeruleoalba</i>	54	0,93	0,338	0,52	10,78*	0,001	6,09	0,07	0,781	0,04
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	1,32	0,258	17,82	0,80	0,375	10,88	0,05	0,809	0,79

4.2.3.2.7 Relación de la proporción de calcio fósforo en el hueso

Los resultados que muestra la proporción del calcio-fósforo se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Análisis descriptivo de la proporción del calcio y el fósforo en las dos especies estudiadas.

sp	n	Media	Mínimo-máximo	Desviación estándar
<i>Stenella coeruleoalba</i>	56	2,16	2,01-2,23	0,04
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	2,14	2,08-2,23	0,03

Los análisis de varianza de la proporción Ca/P presentan diferencias entre categorías de edad para las dos especies (Tabla 26).

Tabla 26. ANOVA de la proporción del calcio y el fósforo en las dos especies estudiadas entre sexos (hembras (f) y machos (m)) y categorías de edad (inmaduros (im) y maduros (m)) y g.l. 1.

sp	n	sexo			categorías de edad			sexo/categorías de edad		
		F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS
<i>Stenella coeruleoalba</i>	56	2,4	0,129	0,002	22,1*	<0,001	0,17	2,1	0,151	0,002
<i>Pontoporia blainvillei</i>	39	1,3	0,25	0,001	19,2*	<0,001	0,01	0,4	0,551	<0,001

4.2.4 Discusiones

4.2.4.1 Patrones de crecimiento

Los resultados encontrados en las curvas de crecimiento para ambas especies en general presentan una amplia variación; esto también se observa en otros trabajos (65, 95, 96, 98, 99, 102, 136-138).

Como se mencionó en la introducción, la mayoría de trabajos relacionan generalmente la longitud total de los animales con la edad. Si observamos lo encontrado en otros trabajos, tenemos que en la mayoría de las especies los machos suelen ser más grandes que las hembras, (*Stenella coeruleoalba* (102), *Delphinus delphis* (116), *Tursiops truncatus* (135), *Sotalia guianensis* (134)), mientras que para *Phocoena phocoena* (98, 138) y para *Pontoporia blainvillei* (121) las hembras son más grandes que los machos.

Al comparar este trabajo con los anteriores que utilizaron las mismas especies, encontramos que para el caso de *Stenella coeruleoalba* obtuvimos que los coeficientes de correlación son mayores, tanto en hembras ($r^2=0,998$) como en machos ($r^2=0,995$), que los obtenidos por Calzada *et al.* (1997) (102) siendo en

4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfine.

hembras 0,72 y en machos 0,79. Estas diferencias también se observan en los parámetros del valor de la asíntota máxima (Z o A), en el descenso exponencial del crecimiento (k) y en el crecimiento inicial (b). Estos análisis no son equivalentes debido a que en este trabajo el número de muestra es menor que en el otro.

Para el caso de *Pontoporia blainvillei* Barreto y Rosas (2006) (121) y Ramos *et al.* (2000) (103) encontraron que las hembras eran más grandes que los machos, mientras que en este trabajo encontramos que los machos son más grandes que las hembras. Esto podrían deberse a dos causas. La primera es que el tamaño de la muestra es pequeño, en particular en machos, si bien ambos sexos presentan una distribución estadística normal. La segunda razón sería debido a que se trata de una especie con una longevidad que en hembras puede llegar a los 21 años, y en machos a los 15 años, y las muestras utilizadas en este estudio llegan sólo hasta los 7 años; sin embargo son considerados como adultos. Otra hipótesis, aunque menos plausible, sería que estas diferencias pueden ser debidas a la variación geográfica, ya que este trabajo únicamente representa a una zona de la población del sur de Argentina mientras que los otros trabajos se han realizado en Brazil (120, 143).

En este tipo de comparaciones hay que tener en cuenta que cada autor describe el crecimiento con diferentes modelos matemáticos (Laird-Gompertz, von Bertalanffy, entre otros) y que estas ecuaciones tienen sus peculiaridades. También se debe tomar en cuenta que en algunos casos se excluyen a los neonatos, además del número de datos totales utilizados, por lo que se tiene que ser muy cauteloso. Y si a eso añadimos que existen diferencias entre poblaciones de una misma especie, podemos decir que este tipo de comparaciones sirven para dar una idea general de cada especie y las diferencias que pueden existir entre poblaciones.

La tasa de crecimiento del diámetro sagital en ambas especies presenta diferencias significativas entre hembras y machos. El dimorfismo sexual en el caso de el delfín listado ya estaba descrito por Calzada y Aguilar (1996) para el gradiente de los centros de osificación secundaria del radio y el cúbito y el cierre de la epífisis, apareciendo primero en hembras que en machos; también hay que considerar que las aletas de las hembras maduran más rápido que los machos (102), aunque es en machos que el diámetro sagital comienza a crecer antes. Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo, en la medida en que el diámetro sagital es mayor para hembras inmaduras, lo que reforzaría las teorías que nos indican que existen diferentes estrategias de crecimiento entre sexos (95, 102, 138).

Sobre las propiedades geométricas de la sección transversal del radio, en los cuatro parámetros (I , J , A , σ), las hembras son las primeras en crecer y las que presentan un mayor crecimiento final, a excepción de la resistencia, en la que son los machos los que la presentan mayor.

Estas propiedades geométricas están relacionadas con la masa ósea, la cual sufre una remodelación continua. Se sabe que en todos los mamíferos, los picos de masa ósea se presentan en los jóvenes adultos, y que el proceso de envejecimiento conduce a una pérdida de ella. Debido a que las hembras tienen una pérdida de masa mayor que los machos, generada por cambios hormonales y por la lactancia, las de *Stenella coeruleoalba*, intentarían compensar estas pérdidas llegando con mayor rapidez al pico máximo. Considerando que las alteraciones de la estructura ósea provocan una disminución de la resistencia mecánica del hueso, lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en este estudio.

En *Pontoporia blainvillei* encontramos que la rapidez del crecimiento que se da en los diámetros sagital y transversal y en la longitud del radio entre hembras y machos inmaduros podría indicarnos, a nivel intraespecífico, que en hembras la importancia de un rápido crecimiento no es prioritario, en comparación con los machos mientras son animales inmaduros; esto quizás es debido a que lo compensa a nivel bioquímico como se observa en el Ca (Figura 34) y microestructural al madurar.

A nivel interespecífico se observa externamente que, a diferencia de las aletas de delfín listado, que son pequeñas y delgadas con el extremo de la punta afilado, en el delfín de La Plata son largas y amplias si se comparan con cualquier otro odontoceto (66). Pinedo (65) encontró un desarrollo precoz en las aletas y relaciona el ancho de la aleta con una adaptación a un ambiente costero. La importancia que podría tener el desarrollo tan diferente del radio entre las dos especies puede estar ligado a los dos diferentes hábitats en los que viven.

Encontramos que al igual que en los pocos trabajos donde se ha relacionado la edad con propiedades mecánicas en diferentes mamíferos, como son osos polares, buey almizclero, ciervo (astas), perros, ratas, ovejas y humanos (109, 128, 144, 145), en delfines también presentan un incremento con la edad de los parámetros mecánicos, siguiendo un patrón semejante al de otros mamíferos.

4.2.4.2 Análisis químicos

Encontramos que la variación de la composición química en los análisis descriptivos muestra que para el delfín listado las medias de la mayoría de los elementos son mayores que para franciscana, a excepción del C y el P en que son menores (Tabla 9 y Tabla 10). Al compararlos con los valores obtenidos para aves por Cubo y Casinos (74), en el que se utilizó la misma metodología, encontramos que son ligeramente superiores a los hallados para el delfín listado, menos el Na que es casi el doble en delfines. Los resultados del porcentaje de hidroxiprolina, para ambas especies, son iguales para los dos trabajos (1,40), encontrándose en aves un valor ligeramente superior de colágeno (10,37 vs. 9,94). Cubo y Casinos dicen que en las aves estudiadas, en comparación, con otros vertebrados, el contenido mineral medio de Ca, P y OH-PRO es ligeramente inferior, lo que nos indicaría que para el delfín listado y sobre todo para la franciscana el contenido mineral de estos elementos en los huesos de las extremidades, es muy inferior en comparación con otros vertebrados (146-148).

Si se comparan con los resultados de astas del alce norteamericano (*Cervus elaphus canadensis*) encontramos que los valores del Ca de la parte cortical son similares a los encontrados en el delfín listado, y los encontrados en el la parte trabecular son similares a los de la franciscana (149); el fósforo y la OH-PRO también presentan valores muy similares (149, 150).

Por otro lado al compararlos con los resultados encontrados por Honda y colaboradores (151), que analizaron la composición de diferentes compuestos químicos en varios huesos de delfín listado, encontramos que para el porcentaje de, Ca ellos obtienen una media de 13,48 y para el porcentaje del P obtienen 19,3. Estos resultados muestran una gran diferencia con los obtenidos en este trabajo para la misma especie (% Ca=22,14, % P=10,24). Esto puede ser debido a que la mayoría de los huesos utilizados en el otro estudio pertenecían a animales inmaduros (n=30 incluyendo fetos, crías y subadultos, y 10 maduros) mientras que en este trabajo la mayoría de las muestras pertenecían a animales maduros (12 inmaduros y 38 maduros). Siendo que la edad afecta al porcentaje de Ca, como ambos trabajos demuestran, la diferencia claramente es debida a las edades de los animales utilizados, sucediendo lo mismo para el P (Figura 33 y Figura 34). Esta misma razón podría explicar el porqué de los resultados tan bajos en franciscana ya que la

proporción de animales inmaduros es mayor a la de maduros, y de los animales maduros no tenemos representación de ejemplares que tengan más de ocho años.

Un resultado que llama la atención es la media tan grande de C que se observa en franciscana (Tabla 10) en comparación con el delfín listado (Tabla 9) o con aves (74). Esto se debe probablemente a la cantidad de grasa (moléculas constituidas por una unión de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno) que contenían las muestras.

Al comparar las tasas de P/N, C/N y Ca/P con los resultados de Zioupos y colaboradores (152) encontramos que la tasa Ca/P es casi la misma que la encontrada por estos autores en los diferentes tejidos de mamíferos marinos. En el caso de la tasa de P/N, nuestros resultados se asemejan más a los del asta del ciervo y de la dentina, que a los del resto de tejidos mineralizados. Esto podría indicarnos que nuestras muestras contienen un porcentaje mayor de colágeno.

En el caso de la proporción del C/N observamos que para el delfín listado es similar al de otros mamíferos (bovinos); mientras que en el caso de franciscana la proporción es muy superior, incluyendo a huesos hipermineralizados como el de *Mesoplodon* (153); esto es debido probablemente, como se explicó anteriormente, a la cantidad de grasa encontrada dentro del hueso.

Los resultados encontrados de la relación Ca/P son muy similares a los de Honda y colaboradores (151), tanto para el delfín listado como para franciscana; además tampoco encontramos diferencias significativas entre sexos; sin embargo si encontramos diferencias para ambas especies entre categorías de edad, a diferencia de lo hallado en el trabajo de Honda.

Que no aparezca diferencia entre sexos, concuerda con lo encontrado en fémur de humanos (154).

Si comparamos esta relación (Ca/P) con la de otros vertebrados (154, 155) observamos que en general es mayor en cetáceos, según los resultados tanto de este trabajo como del de Zioupos (152). Glimcher (156) dice que ciertas enfermedades metabólicas, como la osteoporosis, hacen que la relación Ca/P aumente. Esto concuerda con sugerido por De Buffrénil (46) sobre la presencia de un proceso de osteoporosis secundaria en delfines.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone

4.3.1 Introduction

There are two types of osseous tissues: cancellous bone and cortical bone as illustrated in Figure 39 and Figure 40. Although biologically identical, these tissues differ in their degree of porosity and organisation. Cancellous bone, also called trabecular or sponge bone, is characterized by a sponge-like texture, with numerous cavities, so that it is softer and less dense but at the time stiffer than cortical bone. It consists of extensively connected bony trabeculae, oriented along stress lines, covered by the endosteum. Cancellous bone has a larger surface area to mass ratio and is more metabolically active than cortical bone. Cortical bone, also called compact or dense bone, surrounds the trabecular bone. It represents approximately 4 times the mass of cancellous bone in any long bone and its primary structural unit is the Haversian system (3). (Figure 40). Each Haversian system is a long, often bifurcated, cylinder parallel to the bone long axis, formed by successive deposition of 4-20 (average 6) concentric layers of lamellae.



Figure 39. Bone classification according to cross section texture in dolphin's bone.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

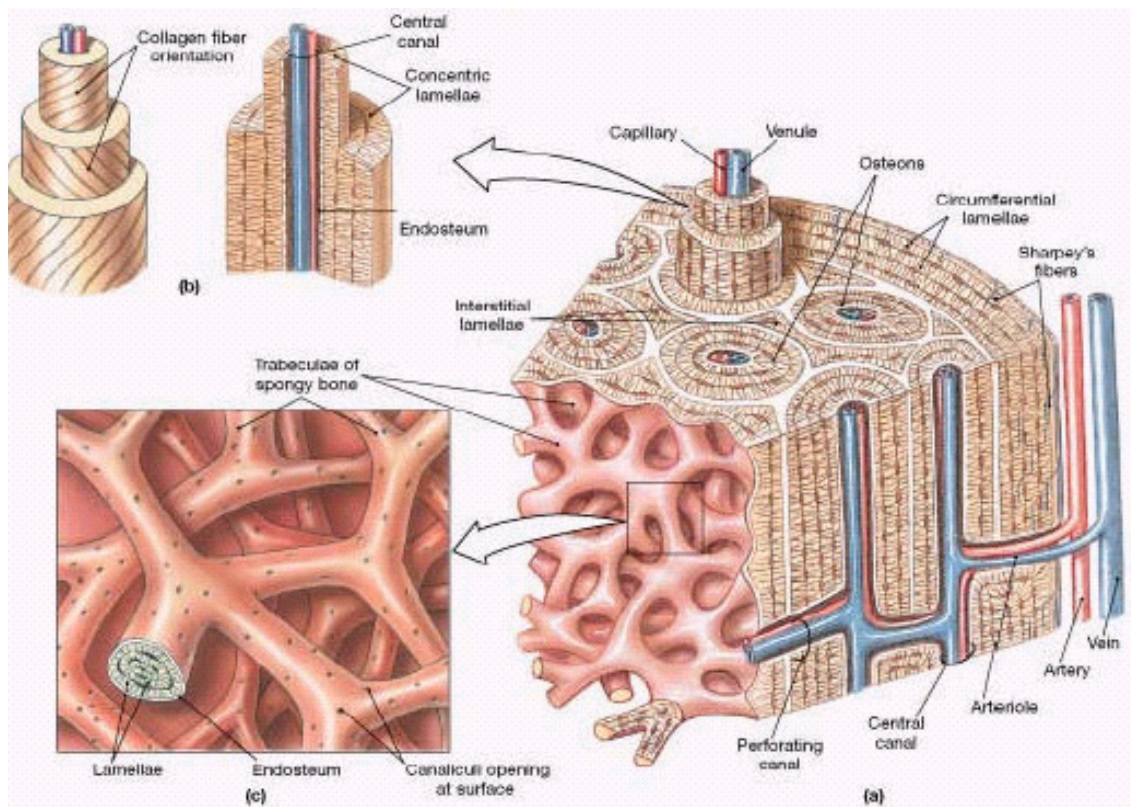


Figure 40. Microscopic bone structures were (a) is a compact bone (b) is a Haversian system and (c) is a trabeculae bone

It is generally regarded almost as a truism that bone architectures are adapted to their mechanical environment. The relationship between mechanical properties and structure is usually ascertained only in terms of macroscopic structural differences, and in particular, the internal histological structure adaptation to the external environment has been the target of very few studies (157, 158). However, the mechanical properties relationship to structure is usually ascertained only in terms of macroscopic structural differences, such as cortical versus cancellous bone. Some studies have attempted to relate their material properties to microscale structures (from tens of microns to nanometers) (159-161). Nevertheless, bone mineral density, geometry, microarchitecture, and composition quality are critical parameters to determine bone strength, that is, its ability to withstand loading. For this reason, microstructural information should be included in the analyses to predict individual mechanical bone properties.

Cetaceans have retarded ossification and a lack of central resorption lead to a very slow attainment of maturity and the creation of bones that are spongy and without open marrow cavities (39). The limb skeletons of cetaceans (dolphins and whales)

present differences with respect to other mammals. On the one hand, they have radical modifications in joints (the only moveable joint in the flipper is the shoulder joint) and on the other hand, the individual bones are lacking medullar cavities. For this, Felts and Spurrell (38, 162) examined the external and internal architectures and the density of dolphin long bones (humerus and radius). They found that cetacean long bones have no marrow cavity and its trabecular part shows a peculiar hourglass image, i.e. two parts of approximately conical shape joined by a cylindrical neck. Yet, radii have absolute densities higher than humeri, although both bones have the same mineralization ratio.

It is well known that bone mechanical properties deteriorate with age. Age-related changes in bones are: mineral density decrease, collagen matrix degradation or porosity increase (163). Microstructural analyses could potentially provide information about bone evolution but currently it is an underexplored method to characterise limb bone adaptations (110). De Buffrenil and Schoevaert described the mechanism responsible for bone porosity in cetaceans during ontogeny. By studying the histomorphometry and histology of the humeral diaphysis in a growth series of common dolphin, they found that bone was becoming more eroded than deposited in the cancellous parts of the cortex during growth, like a disuse osteoporoses process, also similar to the effect of spaceflight on adult human (46).

Bone tissue undergoes ossification process during the whole life, that is, the mineralization of the organic matrix in which various metallic ions are involved. Among the different mineralization processes, calcification is probably the most common, where calcium carbonates such as calcite and aragonite precipitates in the organic matrix. To characterize the effect of ossification on bones, bone hardness has been studied (164, 165). Hardness is the property of matter commonly described as the material resistance to being scratched by another substance or, in other words, as the ability of a material to resist plastic deformation. It depends on mineral composition, as shown by Zioupos et al. (166, 167). Hardness measurement can be carried out at macro-, micro- or nano- scale, depending on the applied forces and generated displacements. For materials showing a fine microstructure, non-homogeneity or prone to cracking. It is best to use micro or nanohardness.

Microhardness is measured by determining the penetration depth when an indenter (such as a Vickers or Knoop indenter) is forced onto the surface with loads in the range of 150 to 10000 mN (167, 168), either continuously or cycled. Indentations

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

are usually so small that they must be measured with a microscope. Depth is determined from the steep gradient with a profilometer.

Nanohardness is measured by indenting bone surface using forces in the range of 0.1 mN to 300 mN and measuring the indentation depth. These tests are based on a precise measurement of the indentation depth and control of the indenting forces. Indentation forces are progressive to determine the maximum indentation load before the sample structure is compromised and the bone no longer stands the plastic deformation.

We used microindentations and nanoindentations to measure dolphin bone tissue hardness properties, in order to evaluate ontogenetic implications. The properties of cortical and trabecular bones in odontocetes (*Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei*) were studied to find a relationship between the material mechanics and chemical composition.

4.3.2 Materials and methods

We performed indentations on a cross section of radius bones of an ontogenetic series of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and La Plata dolphin (*Pontoporia blainvillei*) (find description in chapter 2). The particular studied cross section is illustrated in Figure 41.

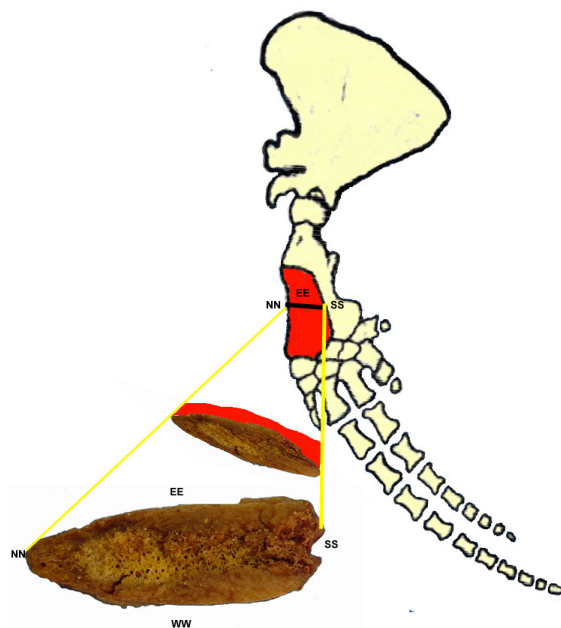


Figure 41. Position of the radii in the pectoral fin (in red) and cross section of the radii along the sagittal diameter.

Cross-sectional sections were cut in 3.5 mm thick plates using a saw Struers Accutom-2 (working at a speed of 4/12 rpm· 100). Each radius plate was dehydrated in a homogeneous solution with 50% methanol (98%) and 50% chloroform (98%) for 24 h. Samples were then put in methanol (98%) for 2 hrs. To clean fat and blood, a sodium hypochlorate solution (3 drops in 250 ml distilled water) was used for 2 h and finally they were rinsed with pressured water. Plates were dried in a stove a 36 °C for 24 hours and later they were embedded in slow cure metilmethacrylate (epoxy resin).

To embed in metilmetracrylate, a plastic tube of 3 cm of diameter was cut in rings of 3 cm length. These rings were placed onto adhesive paper and bone plates were put in inside every ring and fixed to the adhesive. The epoxy resin solution (resin mixing was prepared with a ratio of 10 ml polyester casting resin to 6 drops of hardener) was poured onto the plates that were in the rings. Samples were put in the vacuum chamber for 48 hr at 36 °C.

The next step of sample preparation consisted of grinding them in a rotary wheel (are explained in chapter 2) set at 150 rpm with successive 400, 800, and 1200 grit SiC (silicon carbide) papers with water lubrication. Afterwards, samples were micropolished using naples Metcloth with alumina slurry (0.05 µm). Finally, samples were cleaned and dried to remove moisture excess.

Vickers microhardness of individual samples was measured using an INDETEC model HWDM7, at 10 g (0.1 N) on prepared plates. Measurements were carried out at 9 different points in each plate, symmetrically distributed: 4 in the cortical bone and 5 in the cancellous bone (Figure 42). They are conventionally called north (NN), north-centre (NC), centre (CC), south-centre (SC), south (SS), centre-east (EC), east (EE), centre-west (WC) and west (WW).

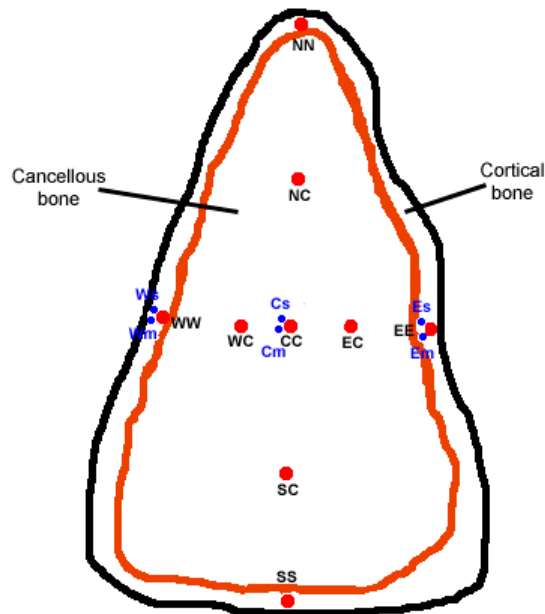


Figure 42. Schematic representation of cross section points where did measured hardness in bone plate.

Vickers nanoindentations were measured with CSM Instruments – Nano Hardness Tester – and the software Indentation 3.5. The position of each indentation was manually selected. 6 indentations were performed in each plate at 3 different points conventionally called west, centre and east. In each point two different indentations tests were made:

1 - Standard test: the indenter load-time sequence is shown in Figure 43. The indenter was loaded and unloaded with a 10 mN load for a single cycle which lasted 30 s. Figure 43b present a typical set of load-displacement data.

2 - Cycled test: nanoindentation is driven under load control using a load-time sequence as shown in Figure 44. The indenter was loaded and unloaded three times. In the first two times the load was held constant with 10 mN for 1 s, while the third load lasted 30 s with the same force.



Fig.43a

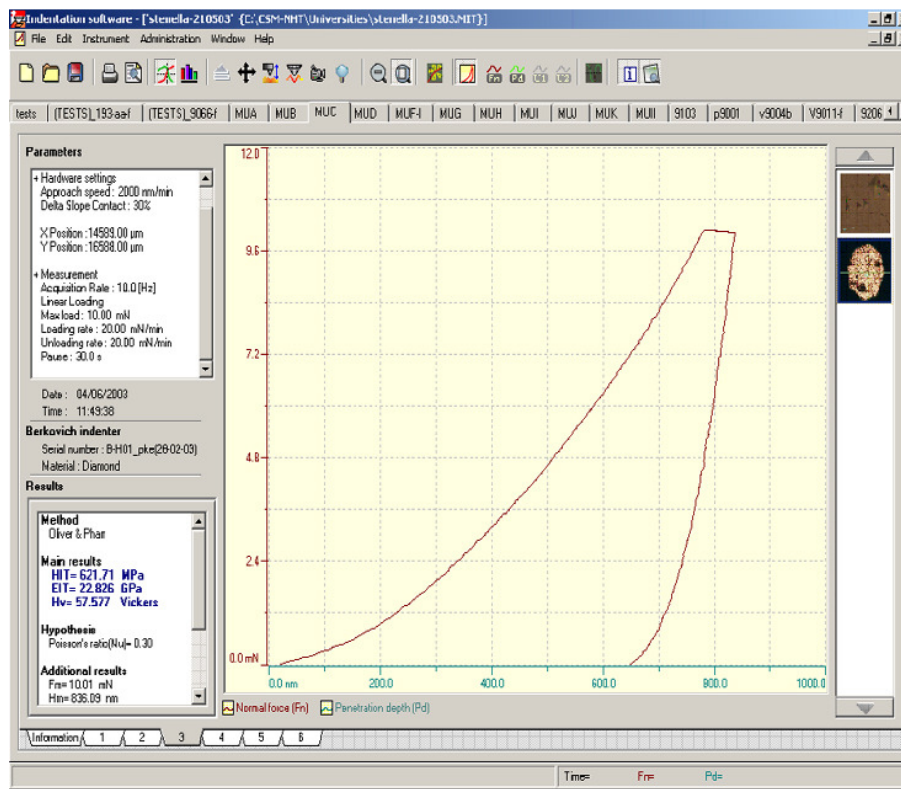


Fig. 43b

Figure 43a. Graphic of standard test where the x-axis represents indentation time (s), blue line a penetration deep (μm), and brown line a normal force. And 43b. Loading displace curves in *Stenella coeruleoalba* sample.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

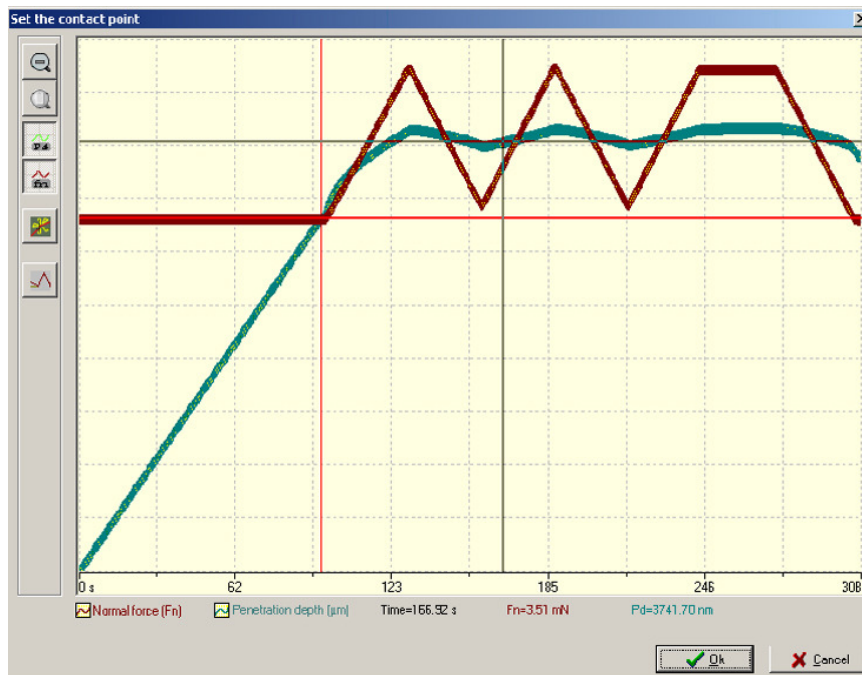


Fig. 44a

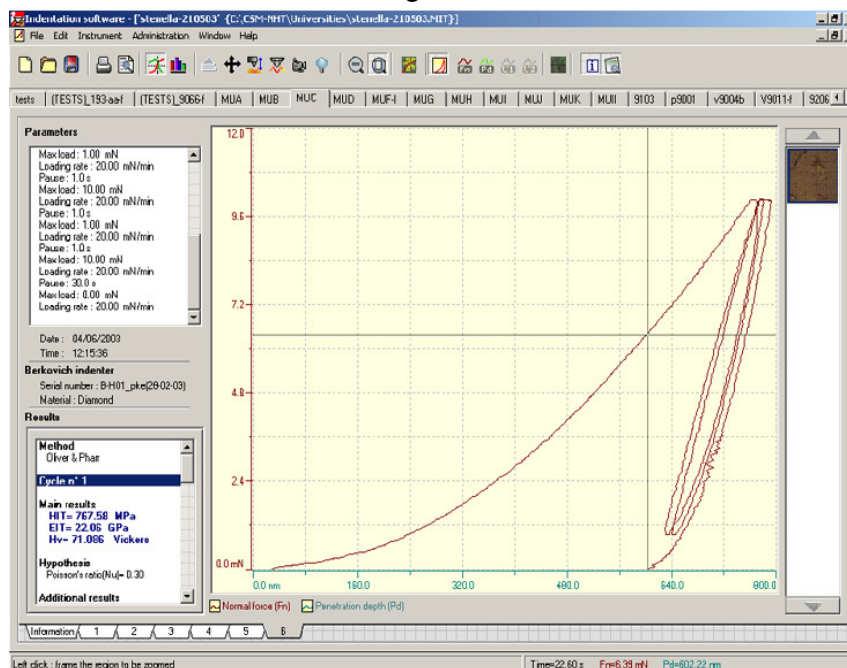


Fig. 44b

Figure 44.a. Graphic of multicycling test where the x-axis represents indentation time (s), blue line a penetration deep (μm), and brown line a normal force and 44b. shows a typical set of load-displacement curves in indentation data for *Stenella coeruleoalba* sample.

Statistical analyses were carried out with “Statistica 6.0” software (StatSoft, Inc 1984-2002). Bone microhardness and nanohardness were examined using basic descriptive statistics analyses for the whole set of samples and, separately, for each parameter: species, sex, type of bone tissue (indentation positions), and age category. To carry out parameter comparisons, we used the t-test (independent by groups)

for/between microhardness and nanohardness. In order to determine the differences in means of microhardness and nanohardness variables, one way and factorial analysis of variance (ANOVA) was performed with post hoc Tukey HSD pair wise comparison test. Finally, age was related to hardness and other physicochemical parameters using linear and Gompertz models.

4.3.3 Results

We performed more than 1900 indentations (micro and nano methods) in 87 samples of *Stenella coeruleoalba* and 39 samples of *Pontoporia blainvillei*. In General Results section 4.3.3.1, we present comparative statistical analyses (descriptive statistics, t-test and ANOVA) of indentation results for both species, to infer odontocetes interspecific trends. Afterwards, we studied each species independently. These results were then compared with physicochemical bone parameters (density, porosity and mineral content).

4.3.3.1 General results:

We carried out descriptive statistics to evaluate the average hardness values of both species and a t-test (independent samples by groups) to evaluate the contribution of each specie. The results in Table 27 show that the nanohardness mean is nearly twice the value of the microhardness mean. However, the standard deviation of the former shows more dispersion than that of the latter. The t-test attributed most of this dispersion to *Pontoporia blainvillei* data. This analysis showed significant statistical differences between species in microhardness (t-value= 2.43 p=0,015) (Figure 45) and nanohardness (t-value=-2.10 p=0,035)(Figure 46). It is striking that the highest microhardness is observed in the striped dolphin while in most nanoindentations it occurs in La Plata dolphin.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

Table 27. Means, maximum and minimum values and standard deviation of total hardness measurements at both micro and nano scale are displayed. Abbreviation: n=sample size and Std. Dev.=standard deviation.

Variable	n	Mean	Minimum	Maximum	Std. Dev.
Microhardness	797	48.4662	23.00	74.00	8.468
Nanohardness	451	78.0200	17.04	175.68	26.844

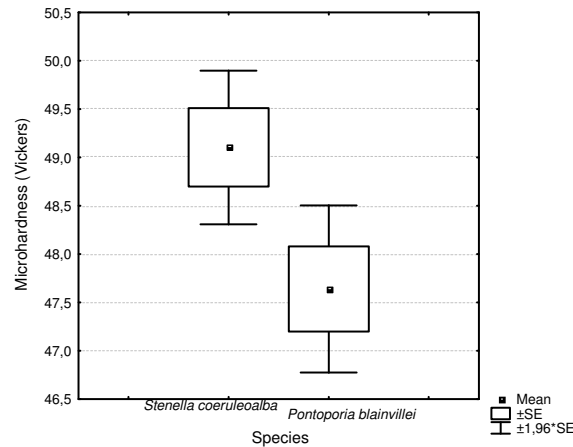


Figure 45. T-test box plot of microhardness for both species. A central circle to indicate the mean, a box to indicate the mean plus/minus the standard deviation and whiskers around the box to indicate the mean plus/minus 1.96*standard deviation (hence if your data follows the normal distribution 95% of data should fall within the whiskers)

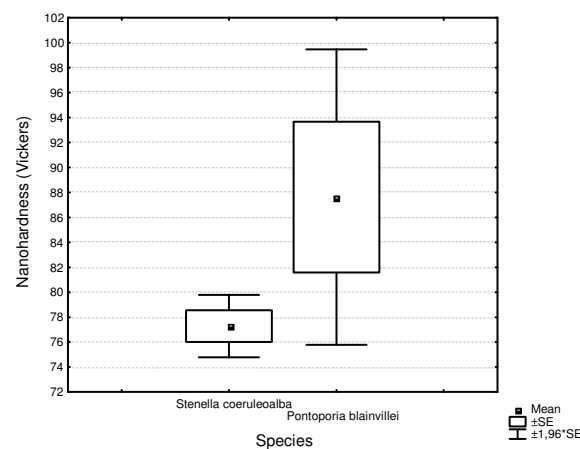


Figure 46. T-test box plot of nanohardness for both species

4.3.3.1.1 Microhardness ANOVA

We carried out the analysis of variance (ANOVA) for microhardness to investigate the effect of each parameter (specie, sex, type of bone and age category). Table 28 shows significant differences for every parameter. However, when we performed the factorial ANOVA to determine the relationship between parameters,

neither significant differences nor interactions between factors were found (see Table A5. 1 in annex 5).

*Table 28 ANOVA test of microhardness measurements for data obtained in different variables in both species with 0.95 confidence intervals. * stands for significant differences.*

Variables	F	p
species	5.91	0.015*
sex	7.86	0.005*
type of bone	28.44	<0.0001*
age category	3.84	0.009*

Microhardness ANOVA test for species and position in the bone (Table 29) did not present significant differences; when including other parameters (factorial ANOVA test) no interactions were found either (see Table A5. 2).

Table 29 ANOVA between species in microhardness in any position with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1.

Position	F	p
CC	1.548	0.217
CN	0.279	0.598
NN	0.529	0.469
SC	0.468	0.495
SS	0.798	0.374
EC	0.074	0.786
EE	0.880	0.350
WC	0.760	0.385
WW	0.170	0.680

4.3.3.1.2 Nanohardness ANOVA

One way nanohardness ANOVA statistics showed significant differences between species, bone type and indentation kind, as depicted in Table 30. No significant differences in most of the variable were found when factorial ANOVA was performed. Differences were only found for those cases which related species with bone type or kind of indentation, and finally, age category with kind of indentation, as illustrated in Table 31.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

Table 30 ANOVA in nanohardness for all parameters with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.

Variables	F	p
species	4.44	0.035*
sex	0.69	0.40
types of bone	19.35	0.00001*
age category	0.45	0.49
kind of indentation	18.11	0.00002*

Table 31. Factorial ANOVA examining the effect of species between means of different variables in nanohardness with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.

Variables	F	p
species/sex	2.03	0.15
species/types of bone	7.43	0.006*
species/age category	0.06	0.81
species/kind of indentation	6.82	0.009*
sex/types of bone	0.39	0.53
sex/age category	0.18	0.67
sex/kind of indentation	0.99	0.32
types of bone/age category	3.42	0.06
types of bone/kind of indentation	0.53	0.46
age category/kind of indentation	4.23	0.04*
species/sex/types of bone	0.89	0.34
species/sex/age category	0.63	0.42
species/sex/kind of indentation	0.19	0.65
species/types of bone/age category	2.63	0.10
species/types of bone/kind of indentation	0.07	0.72
species/age category/kind of indentation	2.95	0.08
sex/types of bone/age category	0.37	0.54
sex/types of bone/kind of indentation	0.83	0.36
sex/age category/kind of indentation	0.12	0.72
types of bone/age category/kind of indentation	0.60	0.43
species/sex/types of bone/age category	0.18	0.67
species/sex/types of bone/kind of indentation	0.09	0.75
species/sex/age category/kind of indentation	0.03	0.85
species/ types of bone/age category/kind of indentation	2.16	0.14
sex/types of bone/age category/kind of indentation	1.77	0.18

If we analyse nanohardness at different positions, we find significant differences for cortical bone for both indentation kinds and between species (Table 32), but when we include the age category factor only differences in the standard indentation for position E are found (Table 33).

Table 32 ANOVA between species in nanohardness for any position, where C is trabecular bone, E and W are cortical bone, with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1. * stands for significant differences.

Position	Standard indentation		Cyclic indentation	
	F	p	F	p
species/C	0.40	0.52	0.72	0.39
species/E	8.99	0.003*	13.87	0.0003*
species/W	9.114	0.003*	15.17	0.002*

Table 33 ANOVA between age categories and species in nanohardness for any position with 0.95 confidence and degree of freedom=1. * stands for significant differences.

Position	Standard indentation		Cyclic indentation	
	F	p	F	p
species/age category/C	0.05	0.80	0.23	0.63
species/age category/E	4.07	0.04*	3.39	0.06
species/age category/W	0.07	0.78	0.05	0.80

4.3.3.2 *Stenella coeruleoalba*

We investigated for *Stenella coeruleoalba* the relationship between micro and nanohardness with sex, type of bone, age category and positions in the bone. We concluded with the ontogenetic study.

4.3.3.2.1 *Microhardness*

4.3.3.2.1.1 Statistical Analyses.

Table 34 shows microhardness descriptive statistics analysis for sex, type of bone, and age category. We observed that male microhardness means and variance are larger than female ones. It is also found that cancellous bone is harder and shows less variance than cortical bone. For age categories, sexually immature samples present a larger microhardness and have a higher variance than the sexually mature.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

Table 34. Descriptive statistics analysis in microhardness of sex of bone for *Stenella coeruleoalba*.

		n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Sex	females bone	234	48.13	62.62	7.91	0.52	47.11-49.15
	males bone	216	50.16	84.61	9.19	0.62	48.92-51.39
Type of bone	Cancellous bone	250	50.70	58.31	7.63	0.48	49.75-51.65
	Cortical bone	200	47.10	86.84	9.31	0.66	45.80-48.40
Age category	Sexually mature	356	46.48	58.83	7.67	0.79	44.88-48.03
	Sexually immature	93	49,80	76.06	8.72	0.46	48.89-50.71

With respect to position in the bone (data in Table 35), comparing the NN position (anterioposterior) and SS (posterior) positions of the radius, we observed that microhardness is lower than in the other positions, being higher all along the transversal diameter (EE, EC, WW and WC) (Table 35 and Figure 47).

Table 35. Descriptive statistics analysis in microhardness of different positions for *Stenella coeruleoalba*.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. err.	C.I. 95%
CC	50	51.41	47.46	6.88	0.97	49.56 - 53.37
NC	50	48.35	67.25	8.20	1.15	46.02 - 50.68
NN	50	42.16	73.06	8.54	1.20	39.74 - 44.59
SC	50	48.44	71.24	8.44	1.19	46.04- 50.84
SS	50	41.77	66.78	8.17	1.15	39.44- 44.09
EC	50	52.90	43.93	6.62	0.93	51.01- 54.78
EE	50	52.59	55.97	7.97	1.05	50.46- 54.71
WC	50	52.40	47.20	6.87	0.97	50.45- 54.36
WW	50	51.87	49.02	7.00	0.99	49.88- 53.86

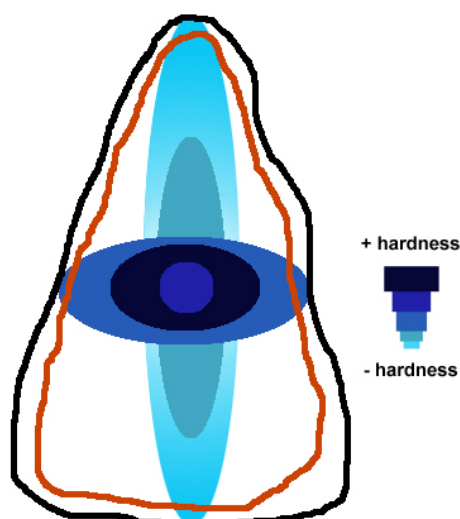


Figure 47. Cross-sectional representation of colors of microhardness average for position, where the dark area has more harshly than the light.

The t-test for independent groups between sexes showed significant differences between females and males for striped dolphin (t -value=-2.52, $p=0.01$) as shown in *Figure 48*.

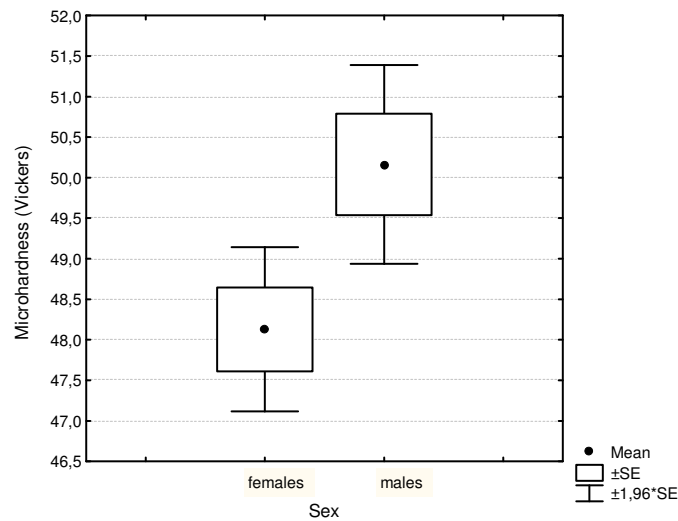


Figure 48. Box plots of microhardness between sexes for Stenella coeruleoalba.

The t-test also showed highly significant differences between types of bone for striped dolphin (t -value=4.50, $p<0.00001$), as shown in *Figure 49*, where no overlapping of the 95 % confidence interval was found.

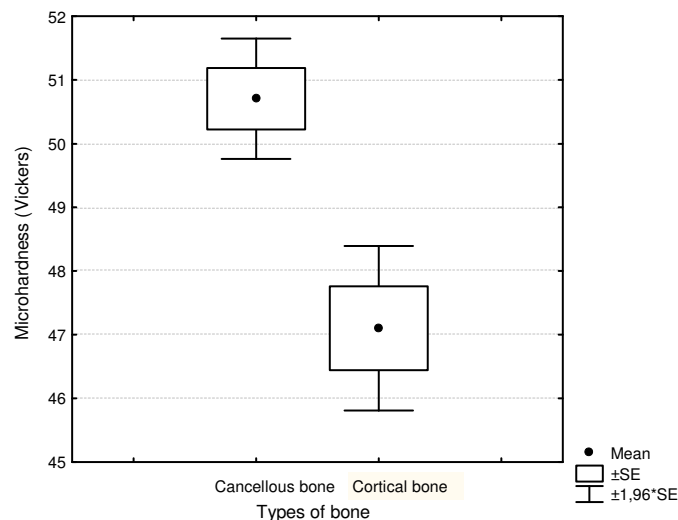


Figure 49. Box plots of microhardness between types of bone for Stenella coeruleoalba.

Finally the t-test for independent samples by groups showed significant differences too, between age categories for striped dolphin (t -value=2.99, $p<0.002$), as shown in *Figure 50*.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

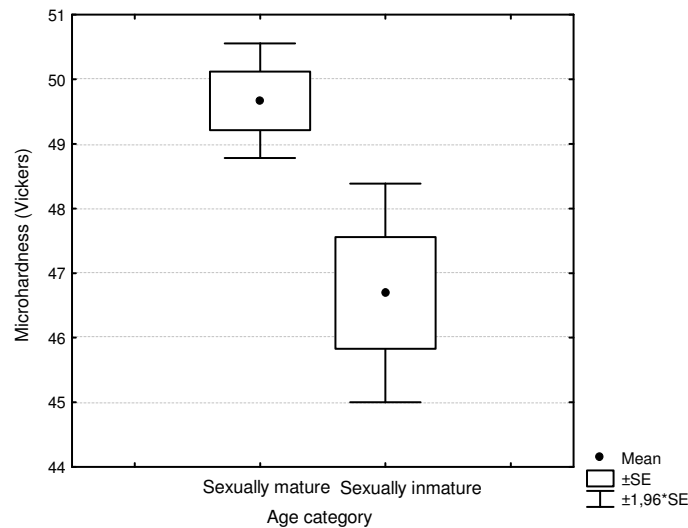


Figure 50. Box plots of microhardness between age categories for *Stenella coeruleoalba*.

The one-way ANOVA analyses for sex, type of bone and age category showed significant differences for microhardness in *Stenella coeruleoalba* as shown in Table 36. Factorial ANOVA test revealed no significant difference (Table 37) between-parameter at the 95% confidence level. However, the post-hoc analysis revealed significant differences for sex/type of bone between cortical bone and cancellous bone in females; between female cortical bone and male cancellous bone; and finally between cortical bone and cancellous bone in males. For sex/age category the post-hoc analysis showed that significant differences between sexually mature males and sexually immature females existed. In the relationship for type of bone/age category, the post-hoc analysis revealed that significant differences between cortical and cancellous bone in sexually mature exist, and also between immature cortical bone and mature cancellous bone.

In sex/type of bone/age category, the post-hoc analysis found significant differences in females between cancellous immature samples bones and cortical mature samples bones. We also found significant differences between cancellous bone samples in mature males with cortical bone samples in both female and male of couple immature and mature samples.

Table 36 Analysis of varianza (ANOVA) of parameters in microhardness for *Stenella coeruleoalba*. * stands for significant differences.

Variables	F	p
Sex	6.35	0.009*
types of bone	19.76	>0.001*
age category	8.78	0.003*

Table 37 Factorial Anova of microhardness for *Stenella coeruleoalba*

Variables	F	p
sex/type of bone	0.47	0.48
sex/age category	0.06	0.79
types of bone/age category	0.17	0.67
sex/type of bone/age category	0.10	0.75

4.3.3.2.1.2 Age relationships

Gompertz model has been commonly used to relate age with other parameters. We have performed the ontogenetic study in Chapter 4. However, hardness and physicochemical characteristics do not fit to this model, so that we have considered using linear regressions. When we relate microhardness vs. age in different cross section positions, we find that both trabecular bone and cortical bone the hardness increases with age. An example of this increase is shown in Figure 51 for trabecular bone and Figure 52 for cortical bone.

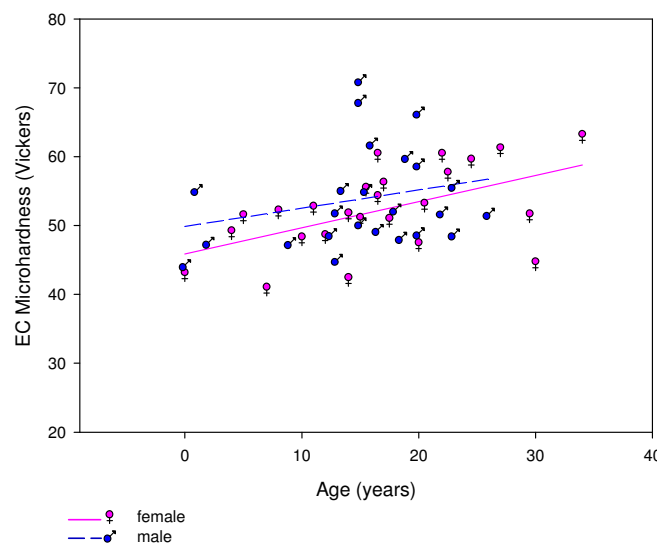


Figure 51. Microhardness in trabecular bone (EC position) against age in *Stenella coeruleoalba*. Regression lines fitted to the data for sex.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

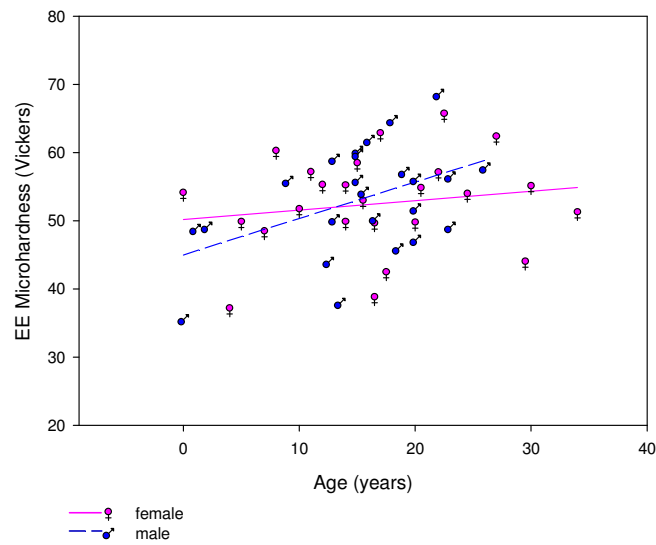


Figure 52. Microhardness in cortical bone (EE position) against age in *Stenella coeruleoalba*. Regression lines fitted to the data for sex.

4.3.3.2.2 Nanohardness

4.3.3.2.2.1 Statistical Analyses

We investigated the basic statistics behaviour of nanohardness for sexes, type of bone, age category (*Table 38*) and kind of indentation (*Table 39* and *Table 40*). We found that males present higher nanohardness means than females (*Table 38*). With respect to the type of bone, both cancellous and cortical bones had similar nanohardness means but cancellous bone presented more variance. Moreover, we also observed that nanohardness in sexually mature individuals is higher than in sexually immature ones. With respect to kind of indentation, significantly higher values of hardness in cycling indentation were found in contrast to standard indentation in all positions. Moreover, trabecular bone presented more variance for both kind of indentations (*Table 39* and *Table 40*).

Table 38. Descriptive statistics analysis in nanohardness of sex, type of bone and age category for *Stenella coeruleoalba*.

		n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Sex	females bone	154	71.47	69.44	12.73	1.02	69.44-73.50
	males bone	141	73.11	122.86	11.08	0.93	71.27-74.96
Type of bone	Cancellous bone	96	72.09	191.97	13.85	1.41	69.28-74.90
	Cortical bone	199	72.40	133.94	11.57	0.82	70.78-74.02
Age category	Sexually mature	207	74.05	143.31	11.97	0.83	72.41-75.69
	Sexually immature	90	68.13	121.75	11.03	1.16	65.82-70.44

Table 39. Descriptive statistics analysis in nanohardness for standard indentation of all positions of bone for *Stenella coeruleoalba*. Cs: centre standard indentation, Es: east standard indentation. Ws: west standard indentation.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Cs	48	69.87	227,70	15.08	2.17	65.49-74.25
Es	50	70.24	87.73	9.36	1.32	67.58-72.90
Ws	50	69.66	203.26	9.36	2.01	65.61-73.71

Table 40. Descriptive statistics analysis in nanohardness for cyclic indentation for all positions of bone for *Stenella coeruleoalba*. Cm: centre cycling indentation, Em: east cycling indentation. Wm: west cycling indentation.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Cm	48	74.31	150.23	12.25	1.76	70.75-77.87
Em	49	75.53	111.43	10.55	1.50	72.50-78.56
Wm	50	74.23	115.49	10.74	1.51	71.17-77.28

The t-test between sexes (females and males) (t-value=1.17, p=0.23) and between types of bone (t-value=-0.64, p=0.52) did not show statistical significant differences for striped dolphin. In contrast, t-test results showed significant differences between sexually mature and sexually immature for striped dolphin (t-value=4.01, p<0.007) as shown in Figure 53. Similarly, we observed statistical significant differences between type of indentation test for striped dolphin (t-value=-3.54, p<0.004) as depicted in Figure 54.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

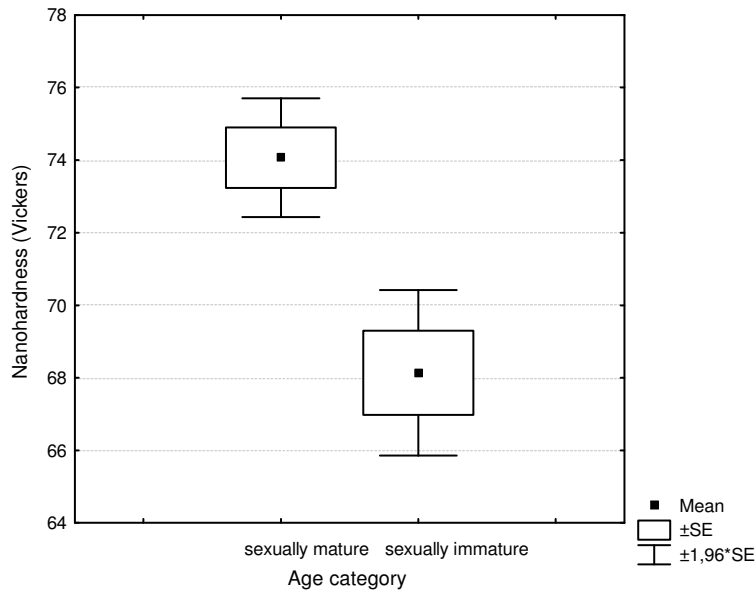


Figure 53. Boxplots of age category in nanohardness can also reveal the independence of samples for *Stenella coeruleoalba*.

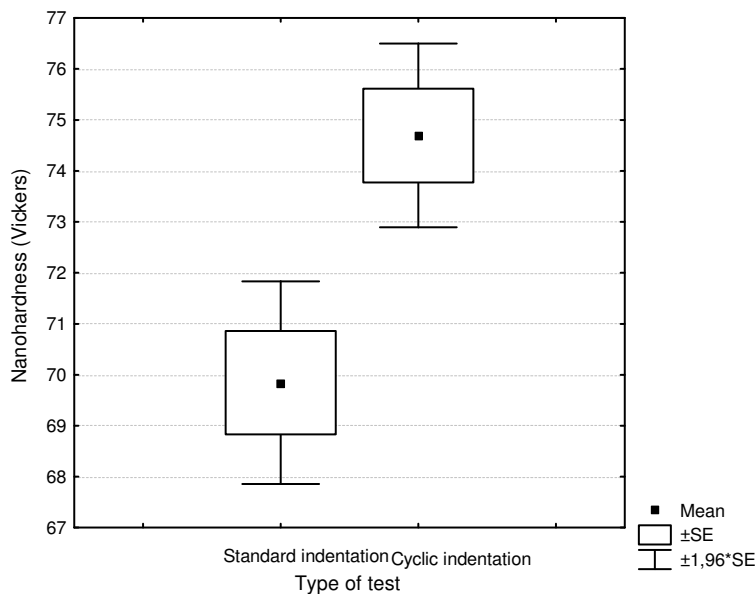


Figure 54. Box plots of type of test in nanohardness can also reveal the independence of samples for *Stenella coeruleoalba*.

One-way ANOVA analysis in types of bone, age category and kind of indentation showed significant differences for nanohardness in *Stenella coeruleoalba* but did not show significant differences for sex and type of bones (Table 41). Yet, none of the factors related to the variance analysis of *Stenella coeruleoalba* nanohardness showed significant differences, as illustrated in Table 42.

Table 41 Anova nanohardness for *Stenella coeruleoalba*. * stands for significant differences.

Variables	F	P
Sex	1.39	0.23
types of bone	0.41	0.52
age category	16.12	<0.001*
kind of indentation	12.57	0.0004*

Table 42 Factorial Anova of nanohardness for *Stenella coeruleoalba*. * stands for significant differences.

Variables	F	p
sex/type of bone	0.002	0.96
sex/age category	3.16	0.07
sex/kind of indentation	0.002	0.96
types of bone/age category	0.001	0.97
types of bone/kind of indentation	0.41	0.52
age category/kind of indentation	0.05	0.81*
sex/type of bone/age category	1.16	0.28
sex/type of bone/kind of indentation	0.22	0.63
sex/age category/kind of indentation	0.18	0.67
types of bone/age category/kind of indentation	0.05	0.81
sex/types of bone/age category/kind of indentation	1.87	0.17

4.3.3.2.2 Age relationships

When we plotted nanohardness vs. age we observed that hardness increased with age in the three analysed positions, for both type of test (standard and cyclic) and for both type of bone (cancellous and cortical). An example of this increase is shown in Figure 55 and Figure 56.

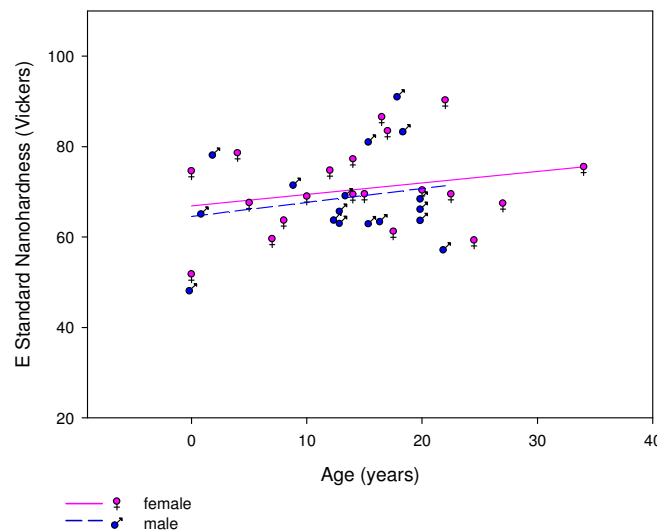


Figure 55. Standard nanohardness in trabecular bone (E position) against age in *Stenella coeruleoalba*. Regression lines were fitted to data for sex.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

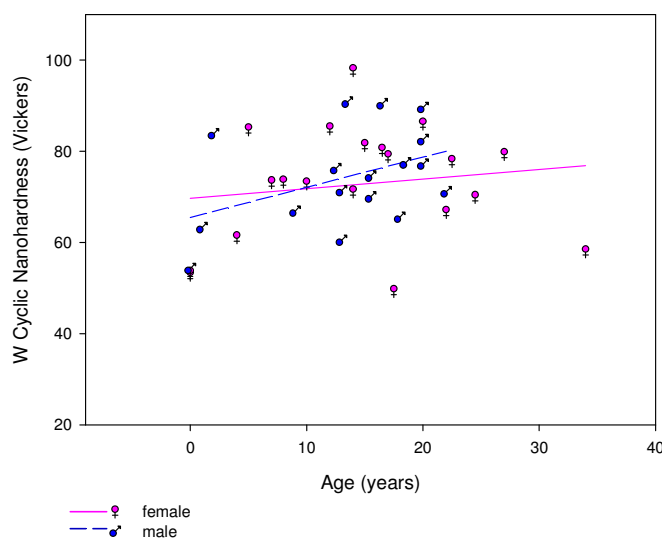


Figure 56. Cyclic nanohardness in trabecular bone (W position) against age in *Stenella coeruleoalba*. Regression lines were fitted to data for sex.

4.3.3.3 *Pontoporia blainvillei*

We carried out an investigation on the relationship between micro and nanohardness with sex, type of bone, age category and positions in the bone for *Pontoporia blainvillei*. Ontogenetic implications are developed at the end of the section.

4.3.3.3.1 *Microhardness*

4.3.3.3.1.1 Statistical analyses

In La Plata dolphin we found that males had a higher microhardness, while females had a higher dispersion (Table 43). We found that cancellous bone had a greater microhardness than the cortical bone and also a greater dispersion. By age category, sexually mature samples showed a greater microhardness and higher dispersion than the sexually immature ones.

Table 43. Microhardness descriptive statistics analyses for sex, type of bone and age category in *Pontoporia blainvillei*.

		n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Sex	females bone	239	47.17	75.76	8.70	0.56	46.06-48.28
	males bone	108	48.66	48.09	6.93	0.66	47.34-49.98
Type	Cancellous bone	189	48.88	66.85	8.17	0.59	47.71-50.06
	Cortical bone	158	46.14	64.49	8.03	0.63	44.88-47.40
Age category	Sexually mature	144	48.17	81.12	9.00	0.75	46.20-48.30
	Sexually immature	203	47,25	57.77	7.60	0.53	46.20-48.30

We found that cancellous bone had a larger microhardness than cortical bone (CC, NC, SC, EC and WC position), finding the hardest in the transverse axis, that is, in the centre, east and west positions (Table 44 and Figure 57).

Table 44. Descriptive statistics analysis in microhardness of different positions for *Pontoporia blaiuillei*.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. err.	C.I. 95%
CC	38	49.19	61.50	7.84	1.27	46.62 - 51.77
NC	38	46.75	69.13	8.31	1.34	44.02 - 49.48
NN	35	42.73	72.75	8.52	1.44	39.80 - 45.66
SC	38	45.33	80.15	8.95	1.45	42.39 - 48.28
SS	36	43.55	71.00	8.42	1.40	40.70 - 46.40
EC	37	51.42	58.60	7.65	1.25	48.86 - 53.97
EE	38	49.22	38.87	6.23	1.01	47.17 - 51.27
WC	38	51.80	39.03	6.24	1.01	49.74 - 53.85
WW	37	50.30	44.28	6.65	1.09	48.08 - 52.52

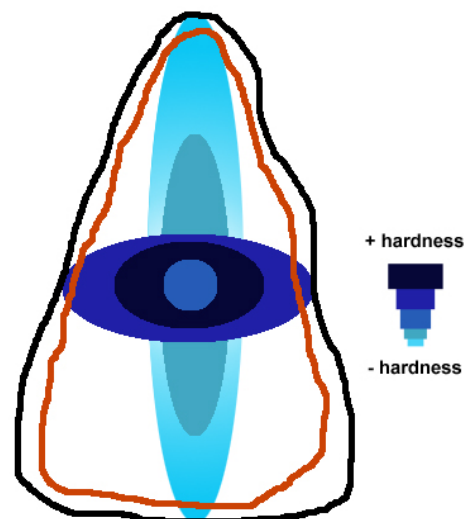


Figure 57. Microhardness cross-sectional representation as a function of position. The transversal diameter presents a larger microhardness than sagittal one.

The t-test for independent samples by groups between sexes did not show statistical significant differences between females and males for La Plata dolphins (t-value=-1.56, p=0.11) as showed in Figure 58. On the contrary, we found highly statistical significant differences between types of bone for La plata dolphin (t-value=3.14, p<0.001) as shown in Figure 59. Finally, no significant differences between age categories for La Plata dolphin were found (t-value=-1.03, p<0.30) as it is inferred from Figure 60.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

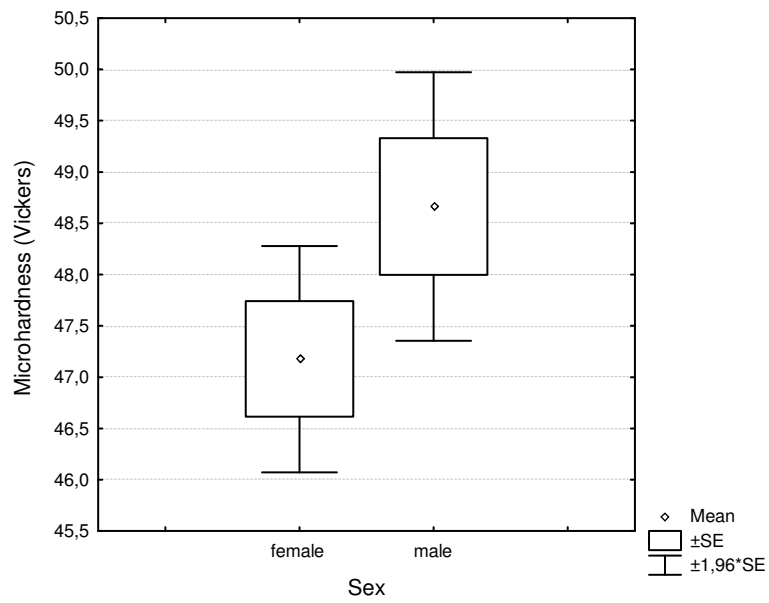


Figure 58. T-test box plot for sex in *Pontoporia blainvillei*.

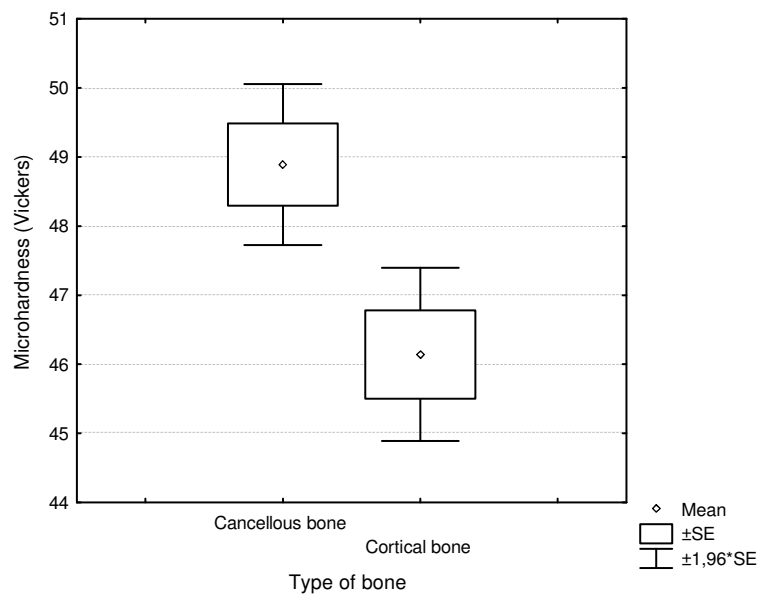


Figure 59. T-test box plots for types of bone in *Pontoporia blainvillei*. Significant difference between are found.

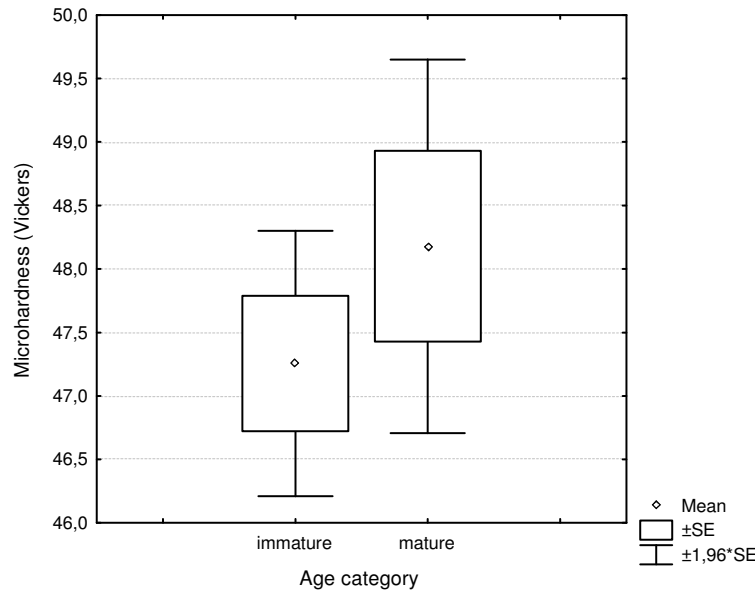


Figure 60. T-test box plot for age category did not show significant differences in *Pontoporia blainvillei*.

One-way Anova microhardness analysis provided significant differences for bone types but for sex and age categories in *Pontoporia blainvillei*, as shown in Table 45. Factorial ANOVA showed significant differences between bone types and age categories (Table 46). In a more specific analyses we considered the post-hoc Tukey HSD test, which showed that these differences were found between sexually immatures for cortical bone and sexually immature for trabecular bone (0.0045) (Figure 61).

Table 45 Analysis of varianza (ANOVA) of parameters in microhardness for *Pontoporia blainvillei*. * stands for significant differences.

Variables	F	p
Sex	2.45	0.11
types of bone	9.87	0.001*
age category	1.06	0.30

Table 46 Factorial ANOVA for microhardness between all parameters in *Pontoporia blainvillei*. * stands for significant differences.

Variables	F	p
sex/type of bone	0.05	0.81
sex/age category	0.11	0.73
types of bone/age category	4.59	0.03*
sex/type of bone/age category	0.28	0.59

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

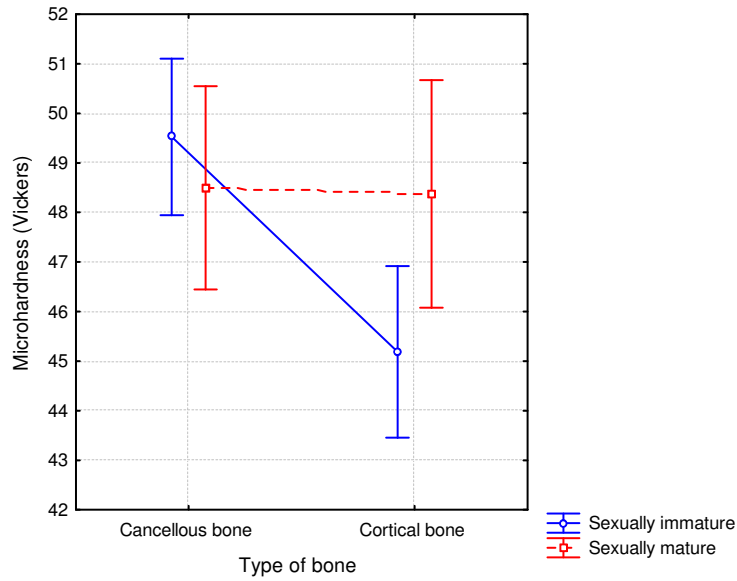


Figure 61. Factorial ANOVA analyses of microhardness for different bone types in *Pontoporia blainvillei*. ANOVA factors between age category and type of bone were $F=4.59$ $p=0.03$ (mean square $MS = 0.8$ and degrees of freedom = 1). The vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

4.3.3.3.1.2 Age relationships

Figure 62 and Figure 63 show that microhardness decreases with age for trabecular bone with no sex dependence, whereas it increases for cortical bone (in a similar way as described in (9)). It is also worth noting that at younger ages, cancellous bone has a slightly larger microhardness than in trabecular one.

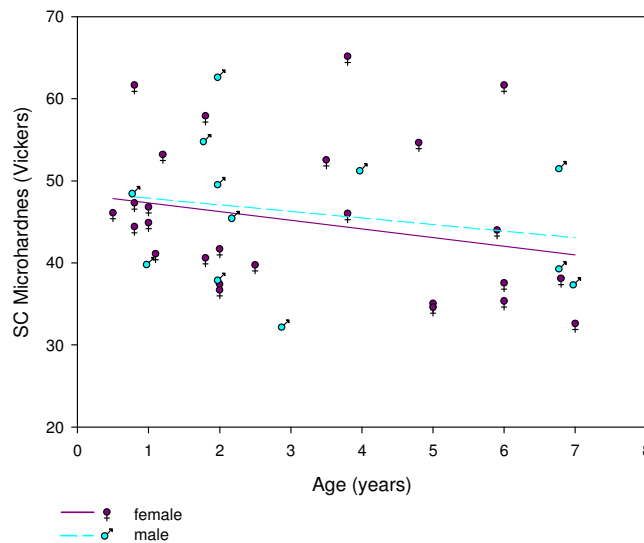


Figure 62. Regression of the microhardness to age for females and males for *Pontoporia blainvillei* in cancellous bone.

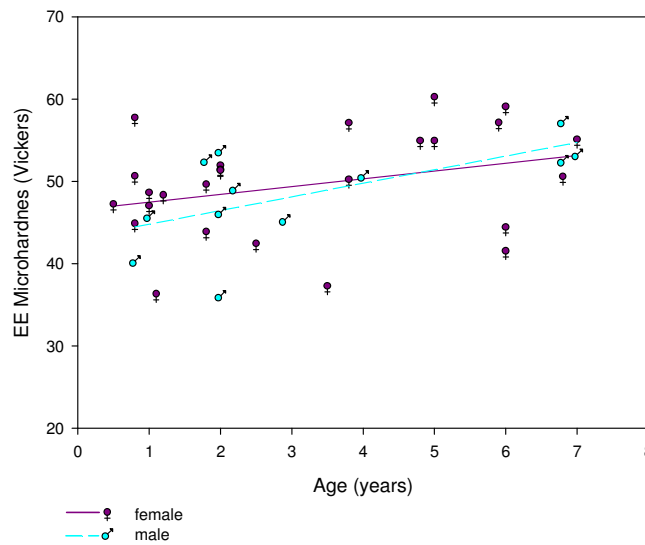


Figure 63. Regression of the microhardness to age for females and males for *Pontoporia blainvillei* in cortical bone.

4.3.3.3.2 Nanohardness

4.3.3.3.2.1 Statistical analyses

The results show that nanohardness mean and dispersion is higher in females than in males. In bone type analyses, we found that cortical bone had a greater nanohardness the cancellous bone and also a greater variance. Among age categories, we found no differences in mean but sexually immatures had a larger variance (Table 47).

Table 47. Descriptive statistics analyses in nanohardness for sex, type of bone and age category in *Pontoporia blainvillei*.

		n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Sex	females bone	151	110.88	5190.86	72.04	5.86	99.30-122.47
	males bone	63	99.03	3728.69	61.06	7.69	83.65-114.40
Type	Cancellous bone	74	89.78	3537.15	59.47	6.91	76.00-103.56
	Cortical bone	140	116.70	5199.72	72.10	6.09	104.65-128.75
Age category	Sexually mature	101	107.04	3989,53	63,16	6.28	94.57-119.51
	Sexually immature	113	107,70	5509.62	74.22	6.98	93.87-121.54

Between types of indentation we found that the means in cyclic indentation were greater than in standard indentation, being at positions E and W of cortical bone where the higher nanohardness were located (Table 48 and Table 49).

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

Table 48. Nanohardness descriptive statistics analysis for standard indentation at all positions of bone for *Pontoporia blainvillei*.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Cs	37	67.05	986,35	31.40	5.16	56.58-77.52
Es	38	101.92	5478.79	74.01	12.01	77.59-126.25
Ws	36	89.04	1785.43	42.25	7.04	74.74-103.34

Table 49. Nanohardness descriptive statistics analysis for cyclic indentation at all positions of bone for *Pontoporia blainvillei*.

Position	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Cm	38	120.58	7458.79	86.36	14.01	92.19-148.97
Em	34	136.87	7537.16	86.81	14.88	106.58-167.16
Wm	32	143.94	4368.03	66.09	11.68	120.11-167.77

The t-test for independent samples by groups between sexes (t-value=1.29, p=0.19), and between age categories (t-value=0.37, p=0.70) did not show statistical significant differences for La Plata dolphin. However, it showed highly statistical significant differences between types of bone (t-value=-2.84, p=0.004) as depicted in Figure 64. This analysis also illustrated a significant difference between type of test for this specie (t-value=-5.01, p<0.001. See Figure 65).

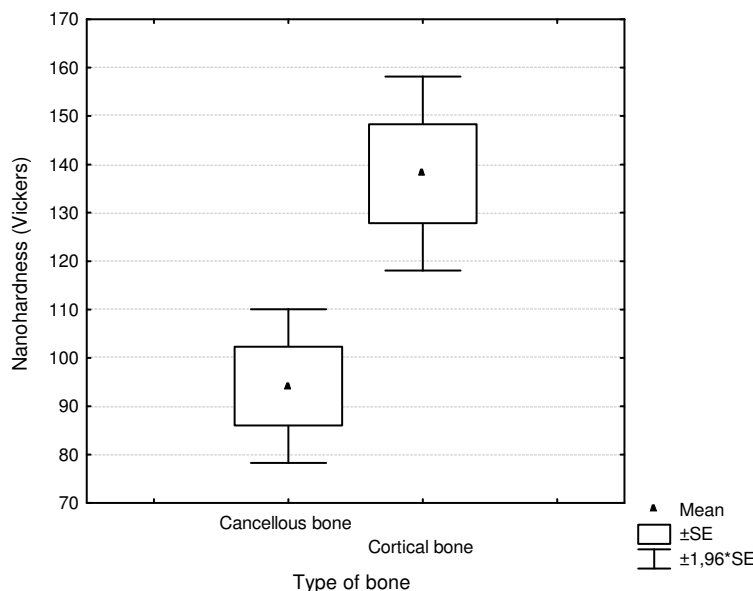


Figure 64. Nanohardness t-test box plots for types of bone in *Pontoporia blainvillei*. Samples present significant differences.

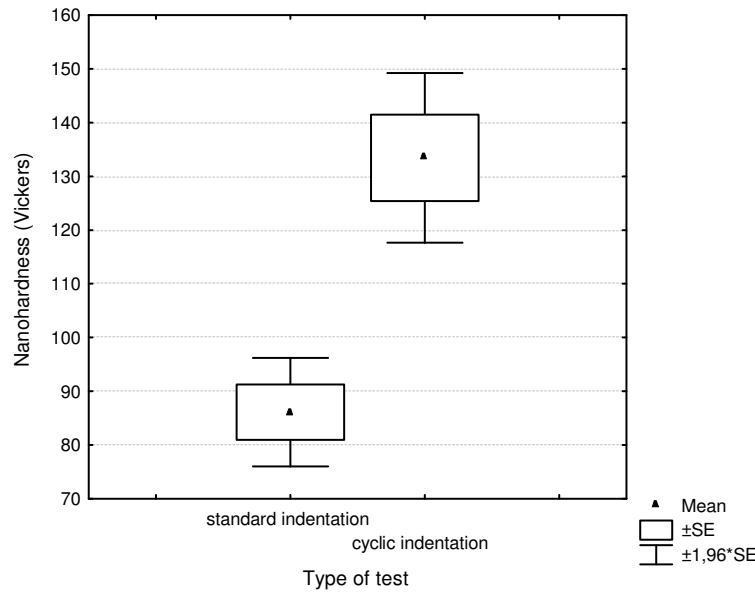


Figure 65. Nanohardness t-test box plots for type of test in *Pontoporia blainvillei*. Significant differences come out.

One-way ANOVA analyses for types of bone and kind of indentation showed significant differences for nanohardness in *Pontoporia blainvillei* but did not show significant differences for sex and age category (Table 50). None of the factors related to the variance analysis in *Pontoporia blainvillei* nanohardness presented significant differences (Table 51).

Table 50 Nanohardness ANOVA for *Pontoporia blainvillei*

Variables	F	p
Sex	1.67	0.19
types of bone	8.11	0.004*
age category	0.13	0.70
kind of indentation	25.19	<0.001*

Table 51 Nanohardness factorial ANOVA for *Pontoporia blainvillei*

Variables	F	p
sex/type of bone	1.65	0.20
sex/age category	0.93	0.33
sex/kind of indentation	0.01	0.89
types of bone/age category	1.45	0.22
types of bone/kind of indentation	0.10	0.74
age category/kind of indentation	0.52	0.46
sex/type of bone/age category	0.38	0.53
sex/type of bone/kind of indentation	1.31	0.25
sex/age category/kind of indentation	0.12	0.72
types of bone/age category/kind of indentation	0.19	0.65
sex/types of bone/age category/kind of indentation	0.000	1.00

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

4.3.3.3.2.2 Age relationships

Nanohardness showed a trend to increase with age for cancellous bone, whereas for cortical bone it decreased, as inferred from Figure 66 and Figure 67. Decrease is much more significant for cortical bone.

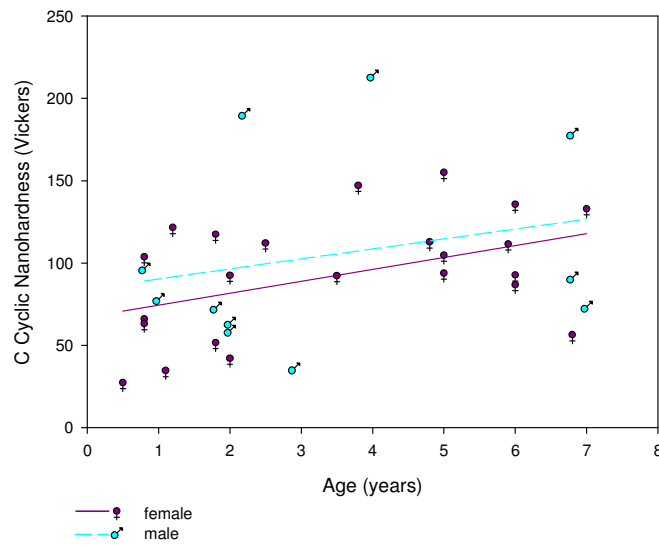


Figure 66. Regression of the nanohardness to age for females and males for *Pontoporia blainvillei* in cancellous bone.

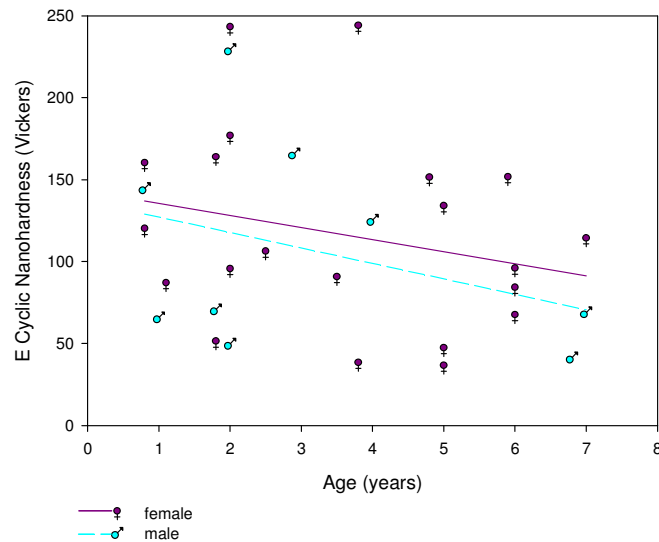


Figure 67. Regression of the nanohardness to age for females and males for *Pontoporia blainvillei* in cortical bone.

4.3.3.4 *Physicochemical characteristics of bone*

In this section, we present the results of real density, porosity and mineral content, from a statistical point of view, allometric and ontogenetic.

4.3.3.4.1 *Statistical analyses*

The following three tables present the basic relationships between structure and composition. The data show similarities between species (Table 52) in the three analysed parameters, being slightly higher for *Pontoporia blainvillei* (Table 54) than for *Stenella coeruleoalba* (Table 53). With regard to dispersion, it is small for real density and mineral content but for porosity in the three studied cases.

Table 52. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterise the bone for all samples.

Parameters	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Real density	84	1.52	0.04	0.20	0.02	1.47-1.56
% Porosity	80	58.59	137.69	11.73	1.31	55.98-61.20
Mineral contend	85	0.64	0.01	0.11	0.01	0.61-0.66

Table 53. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterize the bone for *Stenella coeruleoalba*.

Parameters	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Real density	49	1.40	0.01	0.11	0.02	1.37-1.44
% Porosity	48	56.59	70.68	8.40	1.21	54.15-59.04
Mineral contend	49	0.58	0.005	0.07	0.01	0.55-0.60

Table 54. Descriptive statistics analysis for different parameters that characterize the bone for *Pontoporia blainvillei*

Parameters	n	mean	Variance	Std. dev.	Std. Er.	C.I. 95%
Real density	35	1.67	0.03	0.18	0.03	1.61-1.74
Porosity	32	61.58	228.32	15.11	2.67	56.14-67.03
Mineral contend	34	0.73	0.009	0.09	0.01	0.70-0.77

4.3.3.4.2 *Allometric relationships*

Our allometric analyses between porosity and strength for *Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei* of the whole, female, male and age category

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

for sex, respectively (whole, sexually immature and sexually mature) are shown in Table 55. Although the correlation coefficient was very low, we observed a larger increase of strength with porosity in males than in females for both species. Yet, in *Pontoporia blainvillei* it was also larger for immature males.

Table 56 shows the relationship between real density and strength for *Stenella coeruleoalba* and *Pontoporia blainvillei* for the whole, female, male samples and age category for sex, respectively. These results also shown that the correlation coefficient is very low; however we observed that the increase of real density on the strength is larger in males than in females for both species, and keeps constant for immature males.

Table 55. Allometric relationships of radius bone calculated for the porosity (ρ) related to strength (σ). 95% confidence intervals for a the y -intercept and b the slope are given. Other abbreviations: Sc *Stenella coeruleoalba*, Pb *Pontoporia blainvillei*, ω whole, f females, m males, n sample size, r correlation coefficient, Degrees of Freedom=2. Significant correlation are marked with an asterisk (*). C.I. b of red colour present a negative allometric value.

sp	age category	n	r	equation	C.I. a	C.I. b
Sc	ω	44	0.193	$y=99.37*\rho^{0.37}$	1037.03-9.525	0.211--0.958
	ω f	22	0.121	$y=39.36*\rho^{0.16}$	445.39-3.478	0.446--0.763
	f immature	9	0.010	$y=20.51*\rho^{0.01}$	2375.08-0.177	1.163--1.190
	f mature	13	0.199	$y=56.72*\rho^{0.24}$	1264.72-2.543	0.539--1.016
	ω m	22	0.286	$y=438.17*\rho^{0.73}$	41395.43-4.638	0.406--1.860
	m immature	8	0.606	$y=10507.3*\rho^{1.55}$	347671-3.230	0.478--3.577
	m mature	14	0.068	$y=49.43*\rho^{0.17}$	26307.85-0.093	1.388--1.729
Pb	ω	28	0.144	$y=2.18*\rho^{0.15}$	12.038-0.396	0.569--0.267
	ω f	20	0.008	$y=4.07*\rho^{0.009}$	34.761-0.479	0.528-0.510
	f immature	11	0.029	$y=3.37*\rho^{0.02}$	22.69-0.500	0.485--0.448
	f mature	9	0.319	$y=29.41*\rho^{0.42}$	3050.06-0.284	0.691--1.529
	ω m	9	0.441	$y=0.58*\rho^{0.46}$	16.929-0.020	1.310--0.380
	m immature	7	0.462	$y=0.60*\rho^{0.44}$	28.926-0.013	1.409-0.530
	m mature	4	0.227	$y=0,83*\rho^{0.35}$	2855532-0.0001	4.065--3.360

Table 56. Allometric relationships of radius bone calculated for the real density (dr) related to strength (σ). 95% confidence intervals for a the y-intercept and b the slope are given. Other abbreviations: *Sc* *Stenella coeruleoalba*, *Pb* *Pontoporia blainvillei*, ω whole, f females, m males, n sample size, r correlation coefficient, Degrees of Freedom=2.

Sp	age category	n	r	equation	C.I. a	C.I. b
Sc	ω	46	0.191	$y=16.99*dr^{0.41}$	26.026-11.095	1.047--0.224
	ωf	24	0.128	$y=19.02*dr^{0.16*}$	27.190-13.311	0.712--0.389
	f immature	9	0.458	$y=12.62*dr^{0.70}$	27.265-5.844	1.914--0.512
	f mature	15	0.167	$y=24.51*dr^{0.16}$	35.855-16.764	0.415--0.743
	ωm	22	0.354	$y=4.27*dr^{2.47}$	35.248-0.515	5.510--0.565
	m immature	8	0.655	$y=0.39*dr^{5.93}$	40.087-0.004	12.763--0.891
	m mature	15	0.112	$y=15.37*dr^{0.69}$	226.704-1.042	4.505--3.133
Pb	ω	28	0.492	$y=2.24*dr^{1.12}$	3.313-1.522	1.880-0.370
	ωf	20	0.421	$y=2.36*dr^{1.07}$	4.209-1.330	2.148--0.002
	f immature	11	0.293	$y=2.43*dr^{0.77}$	6.124-0.967	2.553--1.004
	f mature	9	0.492	$y=2.84*dr^{1.01}$	6.372-0.269	2.462--0.444
	ωm	9	0.524	$y=2.29*dr^{0.94}$	4.294-1.227	2.294--0.421
	m immature	7	0.357	$y=0.73*dr^{3.26}$	78.024-0.007	13.063--6.534
	m mature	4	0.721	$y=2.32*dr^{1.01}$	11.101-0.488	3.975--1.946

4.3.3.4.3 Age relationships

4.3.3.4.3.1 Real density

Figure 67 illustrates the regression of real density to age for *Stenella coeruleoalba*. The slope of the regression curves is larger for males than for females, that is, bone density increases with age more for males than females. Correlation coefficient (r^2) is very low for the whole samples and both sexes. In *Pontoporia blainvillei* (Figure 69) real density increases with age, being slightly higher in females than in males.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

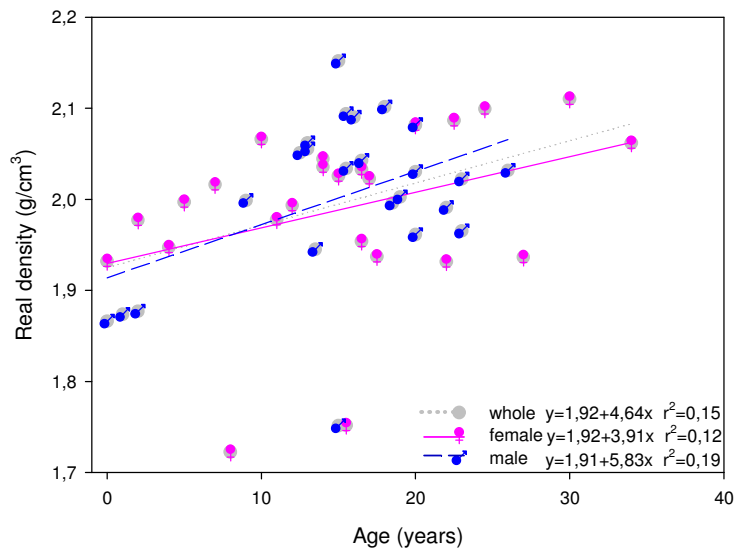


Figure 68. Relationships between real density and age for sex in *Stenella coeruleoalba*, which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)

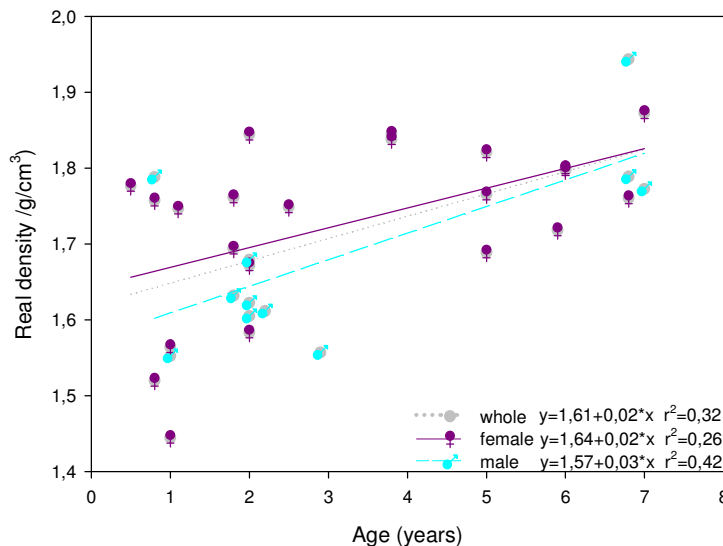


Figure 69. Relationships between percentage of real density and age for *Pontoporia blainvillei*, which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)

4.3.3.4.3.2 Porosity

We did not observe significant changes when relating the porosity to age in either specie. In a comparison between sexes, we observed the same for *Stenella coeruleoalba* for both sexes (see Figure 70), but for *Pontoporia blainvillei* (see Figure 71) we noted that males presented a small increase in porosity while it decreased in females.

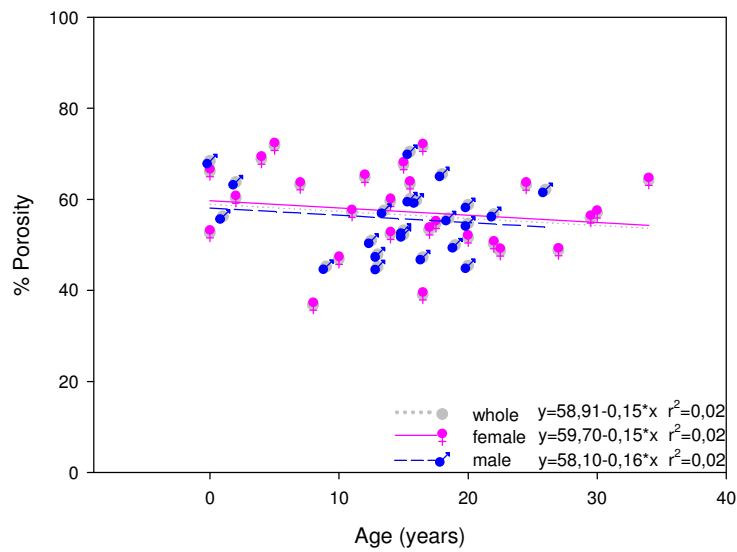


Figure 70. Relationships between percentage of porosity and age for *Stenella coeruleoalba* in whole samples and for sexes. The linear equation and coefficient of determination (r^2) is included.

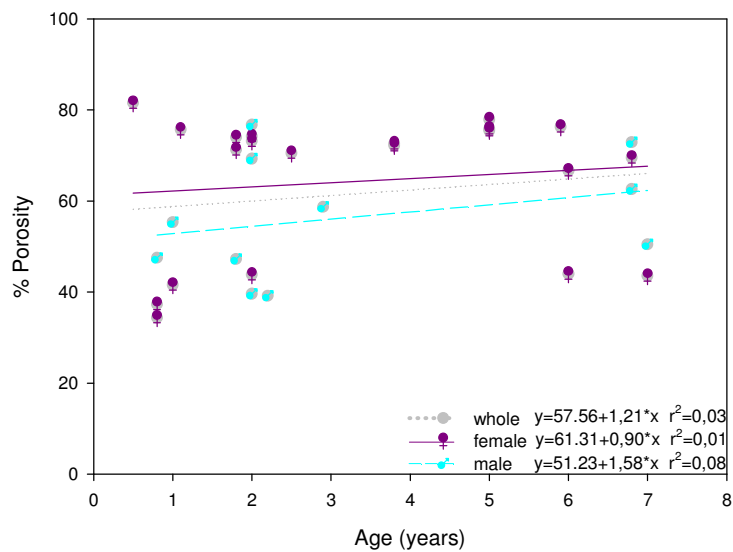


Figure 71. Relationships between percentage of porosity and age for *Pontoporia blainvillei*. The linear equation and coefficient of determination (r^2) is included.

4.3.3.4.3.3 Mineral content

The growth of mineral content is shown in Figure 72 and Figure 73. Again, there is an important dispersion of values in both species. However, important differences are found when the mineral content is analysed. *Pontoporia blainvillei* presents a higher mineral content values in contrast to *Stenella coeruleoalba*. The immature females have a higher mineral content than immature males. For *Stenella*

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

coeruleoalba, the mineral content increase with age is faster in males than in females (Figure 72), as it is inferred from the slopes of the regression curve. On the contrary, in *Pontoporia blainvillei* we observed that males always have a higher mineral content than females, since the slope was almost the same for both sexes. (Figure 73).

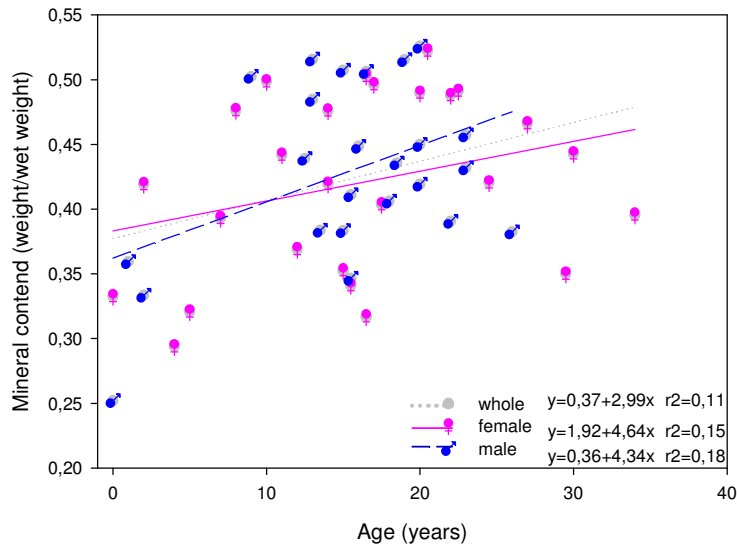


Figure 72. Relationships between percentage of mineral content and age for *Stenella coeruleoalba*, which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)

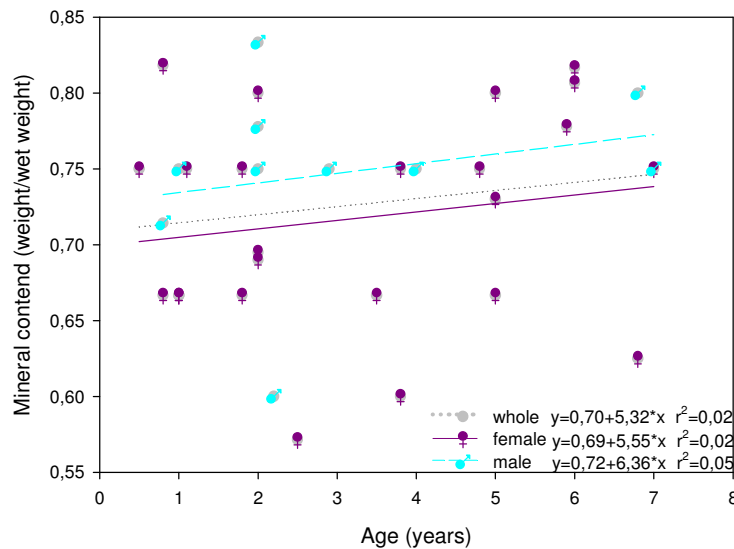


Figure 73. Relationships between percentage of mineral content and age for *Pontoporia blainvillei*, which includes the linear equation and coefficient of determination (r^2)

4.3.3.4.4 Percentage porosity relationships

When we related the porosity with parameters as real density, mineral content and strength, we found unusual results as described below. In females, when porosity increases also does real density. However, in males, when porosity increases, real density decreases too (Figure 74 and Figure 75). This is observed for both studied species. As in humans and several species studied (168), in *Stenella coeruleoalba* the mineral content decreases with increasing porosity (Figure 76). *Pontoporia blainvillei*, unlike *Stenella coeruleoalba*, maintains the mineral content when porosity increases (Figure 77).

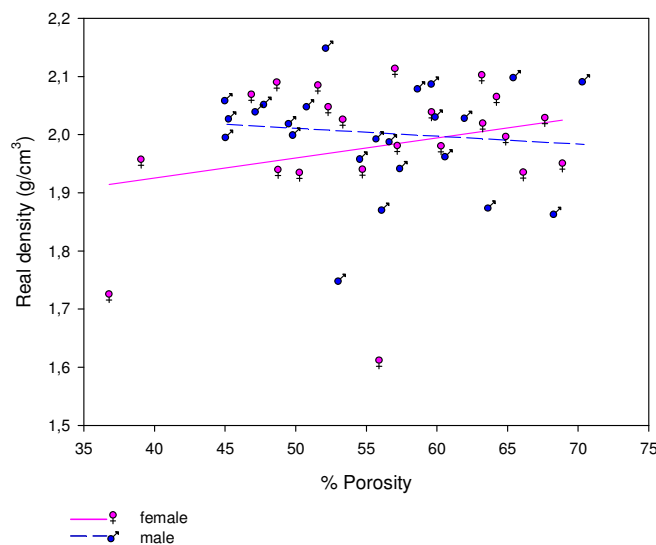


Figure 74. Relationships between real density and percentage of porosity for *Stenella coeruleoalba* between sex.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

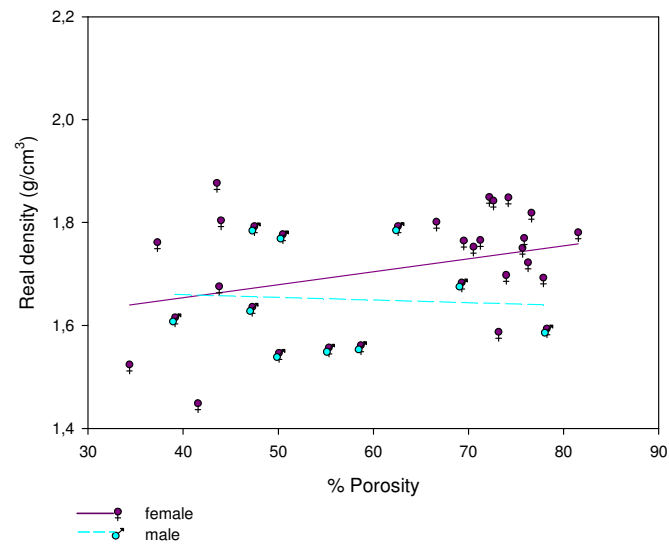


Figure 75. Relationships between real density and percentage of porosity for *Pontoporia blainvillei*, for females and males.

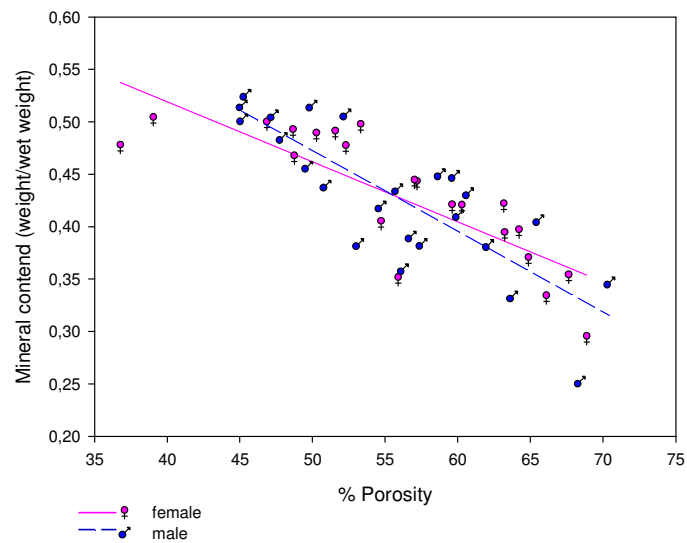


Figure 76. Relationships between mineral content and percentage of porosity for *Stenella coeruleoalba*, for females and males.

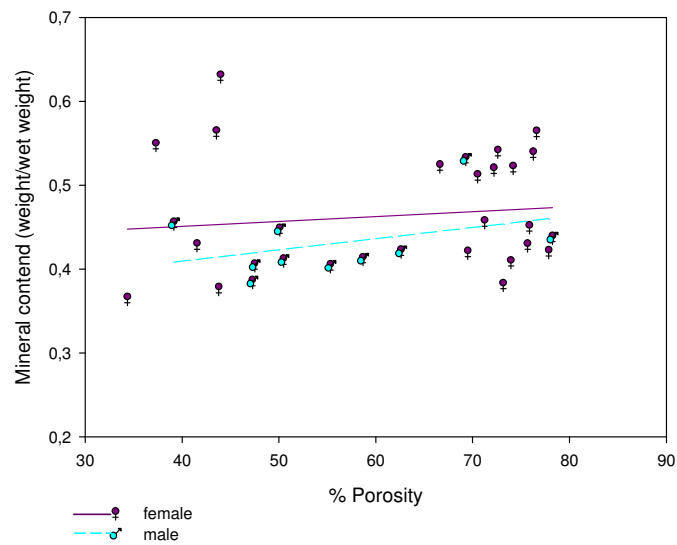


Figure 77. Relationships between mineral content and percentage of porosity for *Pontoporia blainvillei*, for females and males.

When porosity increases, we do not observe significant changes in the strength that the bone is able to undertake in either species; bone resistance only decreased slightly in males of *Stenella coeruleoalba* (Figure 78 and Figure 79).

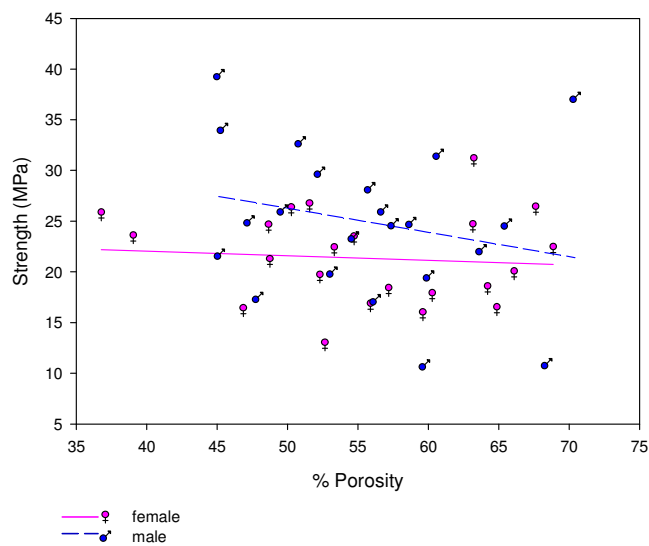


Figure 78. Relationships between strength and percentage of porosity for *Stenella coeruleoalba*, for females and males.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

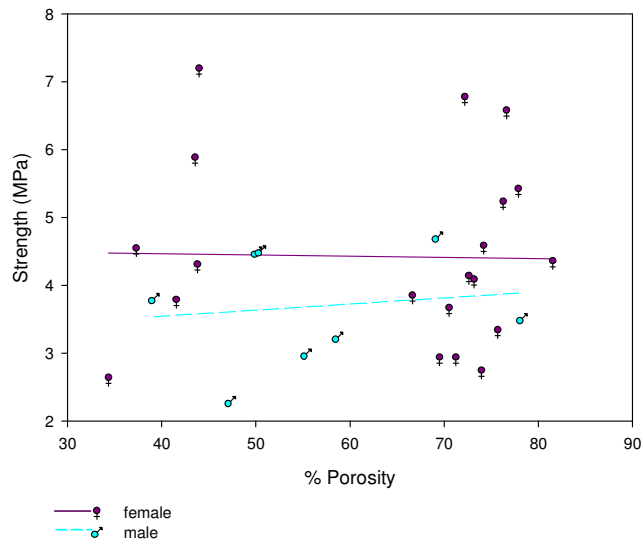


Figure 79. Relationships between strength and percentage of porosity for *Pontoporia blainvillei*, for females and males.

4.3.4 Discussions

4.3.4.1 General results

Our characterization of bone's architecture showed clear mechanical differences in hardness at different scales (micro and nanohardness as inferred from Table 27). The average values of microhardness (Figure 45) correspond to similar values of other mammal such as: rats (17) bovine femur (169) and humans (154, 170, 171). Nanohardness average values scale (Figure 46) also corresponds similar to those found in rats (172, 173).

It may surprise that the magnitude of the nanohardness is greater than the microhardness; however, as Zhang et al. (174) suggest, these differences are likely due to defects (pores, Haversian canals) in bone, which create a 'softening' influence on the load/deformation characteristics in microhardness measurement. In other words, this differences may be due to the complexity that arises from the hierarchical structural organization of bone at microscopic level (4); specially in cancellous bone, which is made of an interconnecting framework of trabeculae in a big number of combinations (175).

The large dispersion observed in nanohardness measurements (Figure 46) could be due that the measures were conducted in different lamellae, between which

there is a wide variation as Rho et al (176) observed and can be explained by the bone structural units at nanoscopic scale (177).

From Table 28, it is reasonable to accept microhardness differences in species, as Zioupos et al. (166) or Whitenack et al.(178) have reported for several species, especially when the two species belong to different families. Similarly, type of bone presents also significant differences because of their different structure, as described in the introduction of the chapter. However, sex and age category present differences at the micro level, but these differences disappear at the nano level, as shown in Table 30.

It is also worth pointing out that each species had an opposite behavior at microstructural and nanostructural levels. *Stenella coeruleoalba* showed a higher microhardness and lower nanohardness while *Pontoporia blainvillei* had a lower microhardness and higher nanohardness. This suggests that microstructural heterogeneity can influence the fracture toughness of bone (9). Thus, these compensation mechanisms underlying bone properties behave differently in each species.

The significant difference between species and type of bone (cancellous and cortical) for hardness was clear both at micro and nano levels, showing the influence of these two factors on bone mechanical properties. These results, evaluated for species of the same suborder agree with Zioupos et al. results for different orders (166, 179). However, it is noteworthy that although there were significant differences between sexes and age category for microhardness, they were not noted for nanohardness. This could be because, at nanostructural level, factors such as sexes and age category are not affected by the behaviour of bone structural units (177).

In microhardness, no significant differences were found for indentations performed at different positions. However, when we plotted the results, three distinct areas were observed (Figure 80): the first group containing Nn and Ss positions is cortical bone, the second group containing Nc, Sc, and Cc positions is trabecular and the third contains the Ec, Ee, Wc and Ww positions, for both cortical to trabecular bone. Thus, microhardness decreases from the center of the bone towards the outer surface.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

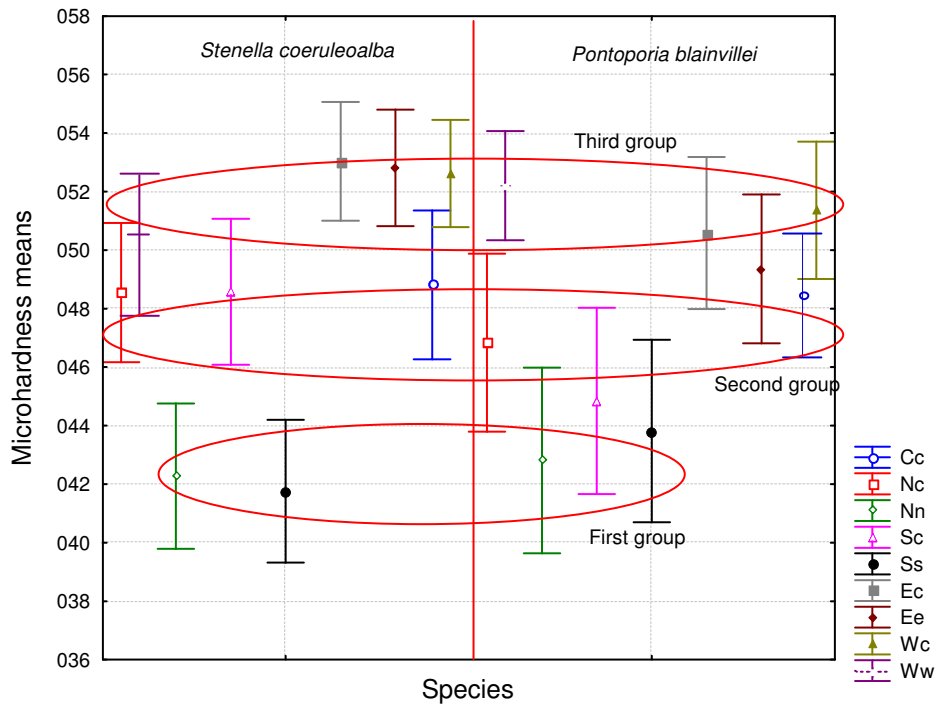


Figure 80. Plot for two species to show microhardness means for positions, shows three groups: the first is down, the second in the middle and third in the top.

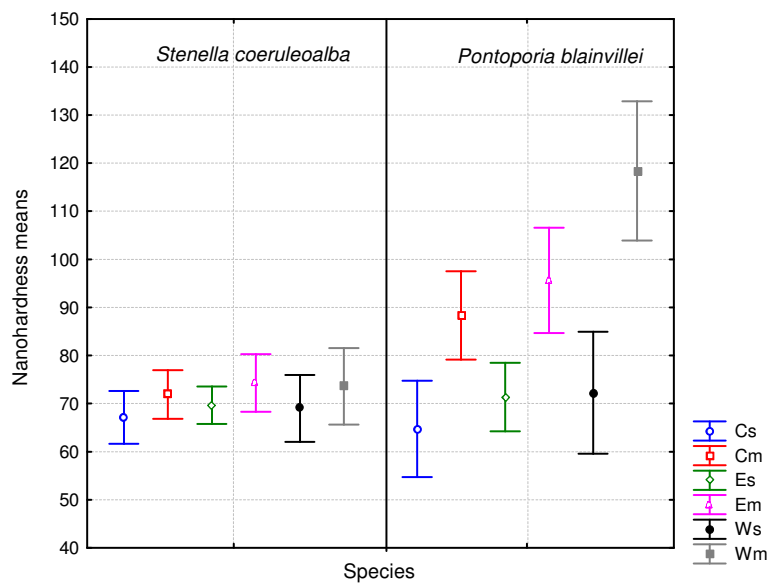


Figure 81. Plot for two species to show nanohardness means for positions.

For nanohardness measurements, we found significant differences between species. Taking into consideration Table 39 and Table 40, and Figure 81, we observe that multicycle indentations show larger values than simple indentations for both species. This last observation is more significant for *Pontoporia blainvillei* than for *Stenella coeruleoalba*.

4.3.4.2 *Results per species*

Figure 47 and Figure 57 colors plotted the position of microhardness in the cross section radio of both species, which shows two axes: the horizontal axis and the sagittal axis. We found that the transverse axis had higher microhardness than the sagittal axis. This is consistent with Bernoulli's equation ($V^2/2\rho+P=\text{constant}$, where V = fluid velocity at the section considered, P = pressure and ρ = density of fluid), since the form along the streamline and hydrodynamic fin will have to have a higher hardness in dorsal and ventral sides to withstand the pressure of the fluid (water) and less severe will be the front of the fin and back in radioulna joint (134, 180).

Due to the importance of the sagittal axis in the long bones and especially the radius on the fin of a dolphin, nanohardness variation along this axis was studied, finding a greater hardness in cortical bone than in trabecular one for both species. This agrees with Hengsberg and colleagues (181), who assumed that it was due to the mineral content of each type of bone. In fact, higher values were found for La Plata Dolphin, which also has a larger mineral content than that *Stenella coeruleoalba* as already shown in Table 53 and Table 54.

4.3.4.3 *Stenella coeruleoalba*

Stenella coeruleoalba microhardness results (Figure 48, Figure 49 and Figure 50) show significant differences in all variables for a one way ANOVA (sex, bone type and age category). When sex is not related to the type of bone, we found significant differences between males and females, as Coats (154) found in humans. However, when we related sex with type of bone no significant differences were found (Table 39). These results agree with Huja et al. (182) and Zioupos et al. (179), where neither differences between sexes for cortical bone nor mechanical properties of bone were found.

In the present study, microhardness in *Stenella coeruleoalba* increases with age for both types of bone. These results are similar to those reported for baboon bone (163) but are different to those reported for mice bones (183). This discrepancy may be attributed to differences between species.

4.3 Micro- and nanohardness characterization of dolphin radius bone.

This study used nano-indentation to investigate the mechanical properties of the microstructure of bone between sexes, type of bone, age category and kind of indentation. In most of the previous studies, (181, 184-188) only specimens of one sex to avoid disparity in their results were considered, but in the species studied there were no differences between sexes (*Table 38*), although the mean of males was higher than of females and this is consistent with the findings for Hoffler et al. (189). Coinciding with the findings of Fan et al. (190) in children with osteogenesis imperfecta, we also found no differences between types of bone for nanohardness, this differs with the findings of Rho et al. (188) in human vertebrae and tibiae.

Nanohardness has been studied as a function of age (134, 184, 190) but not as a function of age category. Because it is often difficult to exactly know the age of a specimen, age category shows the same behaviour that age, thus simplifying the analysis.

An interesting results in ANOVA factor was that differences were only found for standard/cycle indentation related to category age (*Table 42*). Considering that we performed two different indentation procedures, it is acceptable to find different nanohardness values.

Figure 55 and

Figure 56 suggest that there were overall a slight increase with age, both in standard nanoindentations and cyclic nanoindentations and to both types of bone, agreeing with the findings in Rho et al (184) in human femoral bone. Moreover, Rho et al. (78) investigated nanohardness in osteons cross sections, along the different lamellas of a single osteon; in general, they found a decline in both elastic modulus and hardness from the centre of the osteon outward. These results were achieved using a similar methodology to our multicycle indentations.

4.3.4.4 *Pontoporia blainvillei*

Unlike *Stenella coeruleoalba*, *Pontoporia blainvillei* showed no significant differences between sexes for microhardness (*Figure 58*), although males, like other species, have larger hardness than females. This was also observed in Coats work (154) for osteoarthritis and osteoporosis in human bones. The only parameter which showed significant differences in *Pontoporia blainvillei* was type of bone; several studies that evaluated microhardness for different type of bone have always found

significant differences regardless of the species (163, 191, 192). When we related variables of factorial ANOVA (Table 46), we observe that there were significant differences in type of bone with age category between sexually immature.

Cortical bone hardness, like in *Stenella coeruleoalba*, increases with age (Figure 63). while it decreases for the trabecular bone (Figure 62). This can be due to the changes undergone by this type of bone, which is constantly growing and remodeling due to the large number of osteoblasts.

4.3.4.4.1 *Nanohardness*

Nanohardness results in La Plata dolphin draw attention because they present very high variances (Table 47, Table 48 and Table 49). This dispersion of nanohardness measurements could be attributed to the many samples that belong to individuals who were in growth stage. This could induce some differences with respect to *Stenella coeruleoalba*, since no significant differences between age categories were found. However we found differences between types of bones, as in other species, and type of test. However, no differences in sex were found.

Nanohardness of cancellous bone increases in *Pontoporia blainvillei* with age (Figure 62), coinciding with what was found in *Stenella coeruleoalba* (Figure 55). However, we find that it decrease for cortical bone with age; this could occur because compact bone, as mentioned above, presents a great variety of internal architectures. One of them is “primary” lamellar bone (mostly formed by modeling on periosteal or endosteal surfaces during growth) and another one, secondary, is lamellar bone, composed of secondary osteons (formed by remodeling). Secondary bone is weaker than primary bone (193); because older individuals have more secondary osteons. Statistical differences between species can be attributed to having a reduced number of adults in this species compared with *Stenella coeruleoalba*.

4.3.4.5 *Physicochemical characteristics of bone*

Generally, the relationships explored in this study follow a theme that is present in many current studies, that is, quantitatively describing tissue mechanical properties via organizational and compositional characteristics. The uniqueness of this study was in extent of the parameters used; in addition to integrating an allometric relationship between these parameters (Table 1 and Table 56); and finally relate to

age (Figure 68, Figure 69, Figure 70, Figure 71, Figure 72 and Figure 73) and with porosity.

It is noteworthy that unlike humans, in odontocetes real density increases with age (Figure 68 and Figure 69) and porosity measurements is maintained (Figure 70 and Figure 71). For many mammals, including humans, it is common that bone's porosity increases with age but our results do not show this behaviour because we measured the overall porosity in cortical and trabecular bone. Thus, comparisons with other studies are not possible, either due to the methodology used (168) or to study only one type of bone, usually the compact bone (194-196). However, it could be attributed to a secondary adaptation to the marine environment, where both density and mineral content increase to keep the porosity constant, and thus avoiding either disuse osteoporosis or simply cracks and fractures in the bones.

5 Discusión general

En este capítulo se discute de manera general los resultados específicos encontrados con las diferentes técnicas de análisis. Primero se evalúan las comparaciones a nivel de especie y sexo y luego se analizan las relaciones entre los resultados de los subcapítulo 4.2 y 4.3 análisis químicos y durezas de material, pues es patente la relación entre dureza del material y su composición química.

Comparación a nivel de especie.

En cetáceos el tamaño y la forma de las aletas ha sido asociada con la ecología de cada especie (197-199). Por otro lado, se ha observado una relación de la escala alométrica de los huesos de las aletas como respuesta de las exigencias ecológicas. (45). Los resultados obtenidos en este estudio también muestran claramente que la asociación alométrica se ajusta a esta premisa, tanto en *Stenella coeruleoalba* como en *Pontoporia blainvillei*. De esta manera se justifica que mientras *Stenella coeruleoalba* presenta alometrías negativas por tratarse de una especie pelágica que requiere de grandes velocidades de natación (199), *Pontoporia blainvillei* presenta alometrías positivas por tratarse de una especie estuarina de natación lenta y precisa. Está adaptación ecológica también es sugerida en Sanchez & Berta (198). Cabe destacar también que las alometrías presentes en *Pontoporia blainvillei* son superiores a las de algunos mamíferos terrestres.

Los resultados encontrados en las curvas de crecimiento muestran un crecimiento más rápido para *Stenella coeruleoalba* y uno más lento en *Pontoporia blainvillei*. Crecimientos diferentes en diferentes especies son esperables, tal como se ha reportado anteriormente (61, 91, 92, 94, 95, 98, 129-131).

Finalmente, es de destacar que la composición química del hueso es significativamente distinta en *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*. En la primera, el porcentaje de calcio varía entre 20 % y 25 % para el total de muestras, mientras que en la segunda varía entre 8 % y 30 %. Este patrón de dispersión se

manifiesta en todos los elementos. Por último, destacar que, por lo general la relación de mineralización vs. materia orgánica es del 70 % - 30 %, como se ha presentado en la introducción. El nivel habitual de carbono ronda el 8 %. Un aumento de carbono conlleva que los huesos sean más débiles. En *Stenella coeruleoalba* el porcentaje de carbono es del orden del 18 %, pero en *Pontoporia blainvillei* este porcentaje varía entre el 35 % y el 50 %, como se desprende de las figuras 33 y 34. Podemos correlacionar estos resultados con los análisis de durezas. La microdureza (Figura 45) es mayor en *Stenella coeruleoalba* que en *Pontoporia blainvillei*, cosa razonable atendiendo a la relación mineralización-materia orgánica. Caso contrario ocurre en nanodurezas, donde el valor medio y la dispersión de los resultados son superiores en *Pontoporia blainvillei* (Figura 45). La dispersión de las nanodurezas está claramente ligada a la dispersión de composición química, mientras que el valor medio lo atribuimos a la estructura interna del hueso.

Comparación a nivel de sexo.

Los patrones alométricos son muy similares entre sexos en ambas especies, como era esperable. Por lo que respecta al crecimiento, en ambas especies se ha hallado un dimorfismo sexual, como se había planteado en Calzada y Aguilar (68); y en Barreto y Rosas (121) y Ramos et al. (103). Nosotros corroboramos también este comportamiento ya que la tasa de crecimiento del diámetro sagital en ambas especies presenta diferencias significativas entre hembras y machos. Lo asociamos a diferentes estrategias de crecimiento entre sexos, como se había planteado ya en cetáceos (93, 100, 135).

Relación ontogénica dureza-densidad/porosidad

Si analizamos la densidad real, que es un parámetro estrechamente relacionado con la dureza, no encontramos diferencias entre sexos. Contrariamente al estudio de McCalden et al. (200), en nuestro caso se concluye que el contenido mineral no está relacionado con la edad, tal como se desprende de las Figuras 71 y 72)

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la porosidad con la edad en *Stenella coeruleoalba* (del 60 % al 52 % para la serie ontogenética Fig. 70) y un aumento en *Pontoporia blainvillei* (del 58 % al 62 % para la serie ontogenética Fig. 71) mientras que la densidad aumenta en ambas especies (8% vs. 27 %). Esto implica un cambio en la composición química del hueso, que se manifiesta en un aumento del contenido mineral 37 al 47 % en *Stenella coeruleoalba* y del 70 % al 73 % en *Pontoporia blainvillei*.

El hueso de *Pontoporia blainvillei* es más poroso que el de *Stenella coeruleoalba* en adultos y su mineralización también es más elevada. El hueso de *Pontoporia blainvillei* resiste mucho menos las fuerzas externas que *Stenella coeruleoalba* tal como se ilustra en la Figura 82, lo que implica que una alta mineralización es contraproducente para garantizar la flexibilidad del hueso.

La mineralización del hueso no es homogénea ni espacialmente ni temporalmente. A medida que envejece el hueso (y aumenta su mineralización), por un lado disminuye la microdureza trabecular (9 % en la Figura 62) pero aumenta la cortical (8 % en la Figura 63) y por otro aumenta la nanodureza trabecular y disminuye la cortical (Figuras 66 y 67). El comportamiento de la microdureza debe asociarse a la proporción de porosidad del hueso (163, 171) mientras el de la nanodureza a la mineralización. El tamaño del indentador micro hace un promedio mientras que el nano permite ajustar la zona compacta y por ende, inferir con más precisión los efectos de la mineralización.

Relación ontogenética de la resistencia y la composición química del hueso.

No son frecuentes en la literatura trabajos que estudien la variación ontogenética de las propiedades mecánicas. Por ejemplo, se ha relacionado la edad con la resistencia en diferentes mamíferos (osos polares, buey almizclero, astas de ciervo, perros, ratas, ovejas y humanos) (109, 126, 128, 144) y se ha encontrado que ésta aumenta con la edad.

En este trabajo hemos relacionado la edad con la resistencia y la composición química del hueso (Figura 82) para las dos especies de delfín. Se observa un incremento de la resistencia con la edad, siguiendo el patrón de otros mamíferos.

Recuperando también las Figuras 37 y 38, podemos decir que la resistencia presenta dos regímenes de comportamiento: para individuos inmaduros, la resistencia aumenta con la concentración de calcio. Por el contrario, para individuos maduros, la resistencia decrece con ese mismo parámetro. Esto es significativo porque a medida que el hueso envejece pierde calcio y por tanto, su resistencia aumenta, tal como se indica en los estudios citados. Destacar también que la resistencia del hueso de *Stenella coeruleoalba* es 8 veces mayor que la de *Pontoporia blainvillei*, hecho que puede justificarse por una mayor concentración de materia orgánica en el hueso y por la relación C/N, que también se usa para indicar el grado de mineralización del hueso.

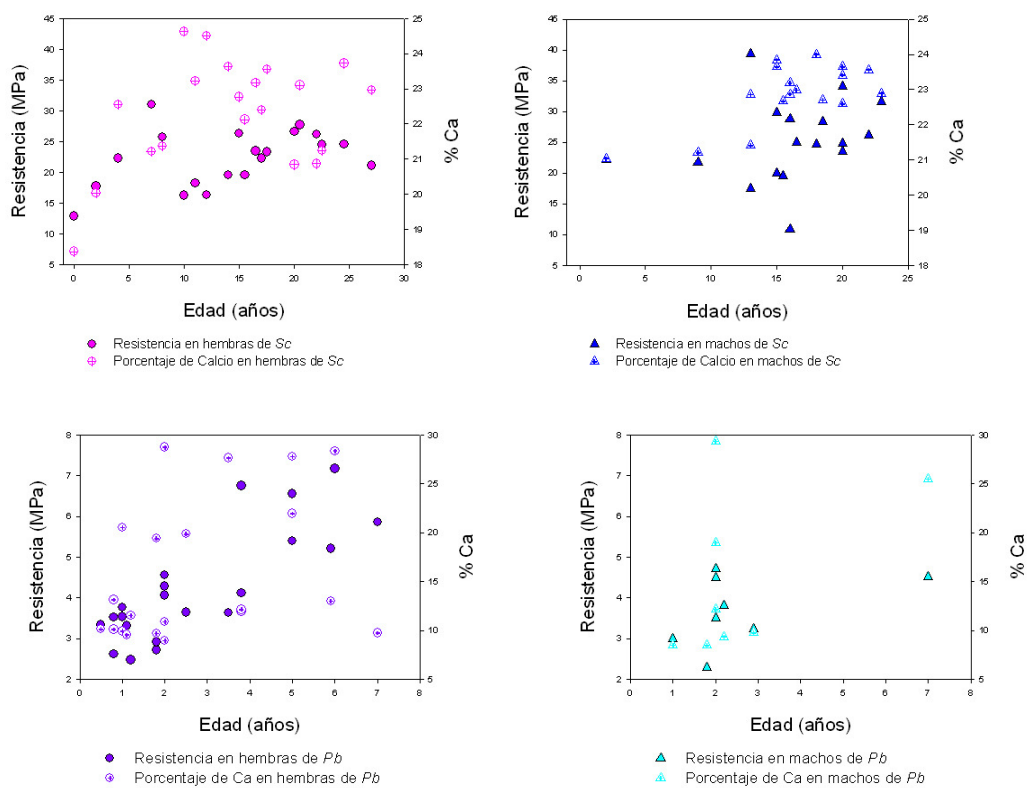


Figura 82 – Representación de la resistencia y del porcentaje de calcio en función de la edad y el sexo para *Stenella Coreuleoalba* y *Pontoporia Blainvillei*.

Relación porosidad-dureza-resistencia (micro-nano hardness)

En este trabajo se determinó y comparó algunas de las propiedades mecánicas como son microdureza y nanodureza, tanto entre sexos y edades como las

diferencias que hay entre el hueso cortical y el trabecular. Por otro lado se ha medido la densidad y porosidad del hueso y finalmente la resistencia del material.

Para comparar el comportamiento a nivel estructural, hay que resaltar que las durezas se han medido perpendicularmente a la sección transversal del hueso, para poder discriminar la dureza de las lamelas. Por el contrario, la resistencia se ha evaluado en la dirección paralela a la sección transversal, para comprobar cómo se rompería debido a una fuerza externa transversal. Dado que el hueso cortical está formado por canales y lamelas longitudinales paralelas, que lo convierte en un sistema anisotrópico, lo que debemos relacionar es la capacidad de estas estructuras para acomodar los esfuerzos transversales, mientras que las durezas nos indicarán la reacción del hueso a esfuerzos longitudinales. A nivel general, no se puede relacionar la dureza con la carga perpendicular ni con el módulo de Young (201). En este marco observamos que la resistencia en *Stenella coeruleoalba* disminuye con el aumento de la porosidad (Figura 78), comportamiento esperable que se da generalmente en otros mamíferos (179). Los resultados de *Pontoporia blainvillei* no son suficientes para extraer una conclusión al respecto. Nótese que en las Figuras 62 y 62 para *Pontoporia blainvillei*, la microdureza aumenta en el cortical (aproximadamente de 47 a 52 Vickers) y disminuye en el trabecular (de 48 a 40 Vickers). Este resultado implica que con la edad, el hueso pasa de tener una dureza homogénea a una dureza asimétrica, mayor en la envoltura cortical que el interior trabecular. Esta asimetría podría justificar una disminución de la resistencia con la edad, porque la estructura puede colapsar de manera más fácil con el interior “más hueco” (202). En *Stenella coeruleoalba* la microdureza aumenta con la edad tanto en el hueso cortical como en el trabecular.

Relación contenido mineral – análisis químicos.

En los resultados de contenido mineral se determinó el porcentaje de minerales por diferencia de densidades (171). Los análisis químicos se llevaron a cabo por espectrometría óptica, de acuerdo con la metodología normal (74). La tendencia obtenida para el conjunto de las muestras se comporta bien en ambos casos, pero en general la suma individual de porcentajes de calcio, magnesio, fósforo

y sodio obtenidos por espectrometría da valores ligeramente inferiores a la del contenido mineral global obtenido por diferencia de densidades. Estas ligeras diferencias se achacan a la variabilidad de las técnicas y muestras.

Evaluación global.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos muy interesantes para poder decir que ambas especies de odontocetos *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*, como consecuencia de su adaptación secundaria extrema al medio acuático, son capaces de neutralizar las limitaciones gravitatorias inherentes al medio terrestre. Esto a niveles evolutivos tendría una gran relevancia, debido a que al compararlo con la evolución de otro mamífero marino como es el manatí, que se caracteriza por presentar una hipermineralización de sus huesos, comprobaría esta diferencia entre las adaptaciones secundarias al medio acuático y daría una visión más clara de los diferentes procesos evolutivos (41).

Finalmente, pero no menos importante, la proporción de Ca/P para ambas especies es mayor que la presente en otros vertebrados, lo que puede sugerir un proceso de osteoporosis secundaria no patológica en estos delfines (140, 202).

6 Conclusiones

Morfología y crecimiento.

1. Se han encontrado patrones alométricos negativos en el radio de *Stenella coeruleoalba* como sucede en otros odontocetos oceánicos. Por el contrario, los patrones alométricos son positivos en *Pontoporia blainvillei*. Estas diferencias biomecánicas del radio en ambas especies podrían ser debidas a una adaptación a los medios respectivos (oceánica vs. estuarina).
2. Las diferencias encontradas entre sexos en *Stenella coeruleoalba* pueden atribuirse al esfuerzo correspondiente que realizan machos y hembras de acuerdo a su estructura social compleja, en la que los machos presentan una mayor actividad física que las hembras.
3. En *Stenella coeruleoalba* los parámetros mecánicos crecen más y más rápido en las hembras que en los machos. Puede tratarse de una posible compensación de la pérdida de masa ósea respecto a los machos, generada por cambios hormonales y de lactancia, alcanzando el pico máximo con mayor rapidez. *Pontoporia blainvillei* el crecimiento es más lento y no se observa este tipo de compensación.
4. La tasa inicial de crecimiento del diámetro sagital del radio para *Stenella coeruleoalba* muestra que los machos empiezan a crecer antes que las hembras, pero en estas el crecimiento es más rápido. Contrariamente en *Pontoporia blainvillei* el diámetro sagital empieza a crecer antes en las hembras que en los machos. Estas diferencias ya habían sido descritas por otros autores
5. El diámetro sagital es menos sensible a las variaciones de talla, masa y edad que el diámetro transversal, hecho que está asociado a la fuerza hidrodinámica de estabilización de la aleta.

Análisis químicos.

6. *Pontoporia blainvillei* presenta una hipermineralización del hueso en comparación con los contenidos minerales considerados normales, entre los

que se encuentra *Stenella coeruleoalba*. Como consecuencia, sus huesos ofrecen menos resistencia contra fuerzas transversales.

7. La relación Ca/P encontrada para ambas especies, es mayor en animales maduros que en otros vertebrados y es similar a la que presenta el hueso como consecuencia de enfermedades metabólicas, lo que puede sugerir un proceso de osteoporosis no patológica secundaria en estos delfines, que concuerda con lo descrito en *Delphinus delphis*.
8. La cuantificación de contenido mineral mediante técnicas de densidad y espectrometría óptica lleva a resultados comparables dentro del error experimental y muestral.

Arquitectura y Durezas.

9. Contrariamente a lo previsto, la porosidad no aumenta con la edad en *Stenella coeruleoalba* pero sí lo hace en *Pontoporia blainvillei*. En cambio, la densidad aumenta tanto en una especie como en la otra. Lo que sí es cierto es que el hueso de las hembras es más poroso que el de los machos.
10. La resistencia del hueso no depende tanto de su porosidad como de su composición química y de su arquitectura. Así, el hueso de *Stenella coeruleoalba* es mucho más resistente que el de *Pontoporia blainvillei*, lo que concuerda con una mayor densidad y menor porosidad y contenido mineral.
11. La microarquitectura del hueso es una función espacial y temporal. Desde el punto de vista espacial, de acuerdo con los resultados de microdurezas y las nanodurezas, el hueso es más duro desde el centro hacia el exterior. Desde el punto de vista temporal, la dureza promedio del hueso (microdureza) cambia con la edad, aumentando en todo el hueso de *Stenella coeruleoalba* y en el cortical de *Pontoporia blainvillei* y disminuyendo en el hueso trabecular de *Pontoporia blainvillei*. Esta observación, junto con el hecho que el hueso sea más denso, permitiría inferir que la microarquitectura dota a la estructura de mayor resistencia.
12. La dureza es ligeramente mayor en machos que en hembras, hecho que está de acuerdo también con la mineralización, una menor porosidad y una mayor resistencia.

7 References

1. Gil de Bernabé E. Atlas de anatomía: Edibook; 1991.
2. Hildebrand M. Analysis of vertebrate structure. 3er ed. ed. New York: Wiley; 1988.
3. Poirier J, Cohen I, Bernaudin JF. Cuadernos de Histología. Madrid: Editorial Marban; 1984.
4. Cruess RL. Physiology of bone formation, function and destruction. In: Cruess RL, editor. The musculoskeletal system: Embryology, biochemistry, and physiology. New York: Churchill Livingstone; 1982. p. 191.
5. Nordström A. Bone mass and physical activity. Umea, Swedish.: Umea University; 2004.
6. Gómez-Ortega JL, Elizondo-Villarreal N, Guerrero-Villa HM. Visualización cristalográfica de hidroxipatita. Ingenierías. 2004;VII(24):46-50.
7. Neuman RE, Logan MA. The determination of hydroxyproline. 1949. p. 299-306.
8. Jacob SW, Francone CA, Lossow WJ. Anatomía y Fisiología Humana. 4ª ed. ed. México: Nueva Editorial Interamericana, S.A.; 1982.
9. Martínez-Maza C. Ontogenia y filogenia del modelado óseo en el esqueleto facial y la mandíbula de los hominoideos: Estudio de la línea filogenética neandertal a partir de las muestras de Atapuerca-sh y el Sidrón. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2007.
10. Francillon-Vieillot H, De Buffrénil V, Castanet J, Géraudi J, Meunier FJ, Sire JY, et al. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In: Carter JG, editor. Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends. New York: Van Nostrand Reinhold; 1990. p. 832.
11. Zárate A, Hernández M, Morán C, Ángeles L. El enfoque moderno de la osteoporosis. Revista de la Facultad de Medicina. 2003 Abril;46(2):49-51.
12. Templeton K. Secondary Osteoporosis. journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2005;13(7):475-86.
13. Homminga J, McCreadie BR, Ciarelli TE, Weinans H, Godstein SA, Huiskes R. Cancellous bone mechanical properties from normals and patients with hip fractures differ on the structure level not on the bone hard tissue level. Bone. 2002;30(5):759-64.
14. Wimalawansa SM, Chapa MT, Wei JN, Westlund KN, Quast MJ, Wimalawansa SJ. Reversal of weighlessness-induced musculoskeletal losses with androgens: quantification by MRI. J Appl Physiol. 1999;86(6):1841-6.
15. Boyle IT. Secondary Osteoporosis. Bailliere's Clinical Rheumatology: International Practice and Research. 1993;7(3):515-8.
16. Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. Journal of bone and Mineral Research. 1998;13(5):763-73.
17. Bateman TA, Zimmerman RJ, Ayers RA, Ferguson VL, Chapes SK, Simske SJ. Histomorphometric, Physical, and Mechanical Effects of Spaceflight and Insulin-like Growth Factor-I on Rat Long Bones. Bone. 1998;23(6):527-35.
18. Turner RT. Physiology of a microgravity environment Invited Review: What do we know about the effects of spaceflight on bone. J Appl Physiol. 2000;89(2):840-7.

19. Sibonga JD, Zhang M, Evans GL, Westerlind KC, Cavolina JM, Morey-Holton E, et al. Effects of spaceflight and simulated weightlessness on longitudinal bone growth *Bone*. 2000 27(4):535-40.
20. Rohlf J. Morphometrics. *Annu Rev Ecol Syst*. 1990;21:299-316.
21. Rasskin D. Modelos geométricos y topológicos en morfología [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 1995.
22. Bou J. Contribució al coneixement de la Biomecànica de la Locomoció als Micromamífers. Barcelona: Universitat de Barcelona; 1988.
23. Cubo J. A mechanical study of the long bones of birds. Barcelona: Universidad de Barcelona; 1997.
24. Casinos A, Quintana C, Viladiu C. Allometry and adaptation in the long bones of a digging group of rodents (Ctonomyinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1993;107:107-15.
25. Vassallo AI. Alometrias e isometrias de varias especies de roedores caviomorfos, con comentarios sobre la estructura del aparato masticatorio del orden rodentia. *J Neotrop Mammal*. 2000;7(1):37-46.
26. Alexander RM. *Animal Mechanics*. 2th ed. Oxford: Blackwell; 1983.
27. Currey JD. The mechanical properties of materials and the structure of bone. *The mechanical adaptation of bone*. Princeton: University Press; 1984. p. 3-7.
28. Smith GK. Biomechanics pertinent to fracture etiology, reduction, and fixation. In: Nunemaker DM, editor. *Textbook of small animal orthopaedics*. Lippincott, Philadelphia: Newton, Ch. A.; 1985. p. Chapter 12.
29. Byers PD, Woods CG. The Growth, Architecture and Structure of Bone. In: Salisbury JR, Woods CG, Byers PD, editors. *Diseases of Bones and Joints*. London: Chapman & Hall Medical; 1994. p. 509-26.
30. Stein BR. Bone density and adaptation in semiaquatic mammals. *Journal of Mammology*. 1989;70(3):467-76.
31. Thewissen JGM, Fish FE. Locomotor evolution in the earliest cetaceans: functional model, modern analogues and paleontological evidence. *Paleobiology*. 1997;23(4):482-90.
32. Maas MC. Bones and Teeth, Histology In: Perrin W, Würsig B, Thewissen JGM, editors. *Encyclopedia of Marine Mammals*. San Diego California: Academic Press; 2002. p. 116-22.
33. Berta A, Sumich JL. *Marine Mammals Evolutionary Biology*. London, United Kingdom: Academic Press; 1999.
34. Thewissen JGM, Bajpai S. Whale origins as a poster child for macroevolution. *BioScience*. 2001;51(12):1037-49.
35. Thewissen JGM, Williams EM, Roe LJ, Hussain ST. Skeletons of terrestrial cetaceans and the relationship of whales to artiodactyls. *Nature*. 2001;413(September):277-81.
36. Madar SI. Structural adaptations of early archaeocete long bones. In: Thewissen JGM, editor. *The Emergence of Whales*. Ohio: Plenum Press; 1998. p. 353-78.
37. Gingerich PD, Uhen MD. Likelihood estimation of the time of origin of cetaceans and the time of divergence of cetaceans and artiodactyla. *Paleontologia Electronica*. 1998;1(2 [http://palaeo-electronica.org/1998_2/ginger_uchen/issue2.htm]):45 pp.
38. Felts WJL, Spurrell FA. Some structural and developmental characteristics of cetacean (Odontocete) radii. A study of adaptive osteogenesis. *American Journal of Anatomy*. 1966;118:103-34.

39. Felts WJL. Some functional and structural characteristics of cetacean flippers and flukes. In: Norris KS, editor. Whales, dolphins and porpoises. Berkeley: University of California Press; 1966. p. 225-76.
40. De Buffrénil V, Sire JY, Schoevaert D. Comparaison de la structure et du volume squelettiques entre un delphinidé (*Delphinus delphis* L.) et un mammifère terrestre (*Panthera leo* L.). Canadian Journal of Zoology. 1986;64:1751-6.
41. Reidenberg JS. Anatomical adaptations of aquatic mammals. The Anatomical Record. 2007;290:507-13.
42. Gray NM, Kainec K, Madar SI, Tomko L, Wolfe S. Sink or Swim? Bone density as a mechanism for buoyancy control in early cetaceans. The Anatomical Record. 2007;290:638-53.
43. Sedmera D, Misek I, Klima M. On the development of cetacean extremities. II. Morphogenesis and histogenesis of the flippers in the spotted dolphin (*Stenella attenuata*). European Journal of Morphology. 1997;35(2):117-23.
44. Cooper LN, Dawson SD, Reidenberg JS, Berta A. Neuromuscular anatomy and evolution of the cetacean forelimb. The Anatomical Record. 2007(290):1121-37.
45. Dawson SD. Allometry of cetacean forelimb bones. Journal of Morphology. 1994;222:215-21.
46. De Buffrénil V, Schoevaert D. On how the periosteal bone of the delphinid humerus becomes cancellous: Ontogeny of histological specialization. Journal of Morphology. 1988;198:149-64.
47. Archer F, Perrin W. *Stenella coeruleoalba*. Mammalian Species. 1999;603:1-9.
48. Calzada N, Aguilar A, Sorensen TB, Lockyer C. Reproductive biology of female striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the western mediterranean. J Zool Lond. 1996;240:581-91.
49. Reeves RR, Smith BD, Crespo EA, di Sciara GN. Dolphins, Whales and Porpoises: 2002-2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans. . Gland, Switzerland and Cambridge, UK.: IUCN; 2003.
50. Archer F. *Stenella coeruleoalba*. In: Perrin W, Würsig B, Thewissen H, editors. Encyclopedia of Marine Mammals. San Diego, CA.: Academic Press; 2002. p. 1201-3.
51. Reeves RR, Stewart BS, Clapham PJ, Powell JA. Sea Mammals of the World. A complete guide to whales, dolphins, seals, sea lions and sea cows. London: A & C Black; 2002.
52. Van Waerebeek K, Felix F, Haase B, Palacios D, Mora-Pinto D. Inshore records of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, from the Pacific coast of South America. . Rep Int Whal Commn. 1998;0(48):525-32.
53. VVAA. Libro Rojo de los vertebrados de España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Publicaciones del Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA); 1992.
54. Crespo EA. Franciscana - *Pontoporia blainvillei*. In: Perrin W, Würsig B, Thewissen JGM, editors. Encyclopedia of Marine Mammals. San Diego, CA.: Academic Press; 2002. p. 482-7.
55. Bordino P, Thompson PM, Iñiguez MA. Ecology and behaviour of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Bahía Anegada, Argentina. Journal of Cetacean Reserch Management. 1999;1(2):213-22.
56. Monzón F, Corcuera J. Franciscana: *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny): PNUMA; 1991. Report No.: 138.
57. Danilewicz D, Claver JA, Perez-Carrera AL, Secchi ER, Fontourra NF. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia:

- Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fishery Bulletin*. 2004;102(4):581-92.
58. Siciliano S. Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal waters of Brazil. *Rep Int Whal Commn*. 1994;15:241-50.
59. Crespo EA, Harris PA, González R. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Marine Mammal Science*. 1998;14(4):845-9.
60. Azevedo AF, Fragoso ABL, Lailson-Brito JJ, Cunha HA. Records of the Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the southwestern Rio de Janeiro and northernmost Sao Paulo state coasts Brazil. *LAJAM*. 2002;1(1):191-2.
61. Siciliano S, Di Benedetto AP, Ramos R. A toninha, *Pontoporis blainvillei* (Gervais & Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterizações dos habitats e fatores de isolamento das populações. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*. 2002;476:1-15.
62. Secchi ER, Danilewicz D, Ott PH. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. *Journal of Cetacean Reserch Management*. 2003;5(1):61-8.
63. Secchi ER, Kinan PG, Muelbert M. Incidental catches of franciscan in coastal gillnet fisheries in franciscana management area III: period 1999-2000. *LAJAM*. 2004;3(1):61-8.
64. Secchi ER, Zerbini AN, Basoi M, Dalla-Rosa L, Moeller LM, Rocha-Campos CC. *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnets in southern Brazil: 1994-1995. In: Commission IW, editor. *Forty Seventh Report of the International Whaling Commission Covering the Forty Seventh Financial Year 1995 1996; 1998*. p. 653-8.
65. Pinedo MC. Development and variation of the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Santa Cruz: University of California; 1991.
66. Brownell RL. Franciscana *Pontoporia blaenvillei* (Gervais and d'Orbigny, 1844). *Handbook of Marine Mammals: Academic Press Limited*; 1989. p. 45-55.
67. Calzada N, Aguilar A. Geographical variation of body size in western mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Z Säugetierkunde*. 1995;60:257-64.
68. Calzada N, Aguilar A. Flipper development in Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*. 1996;245:708-16.
69. Corcuera J, Monzon F, Crespo EA, Aguilar A, Raga JA. Interaction between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Buenos Aires Province, Argentina). *Rep Int Whal Commn*. 1994;15:283-90.
70. Norris KS. Standardized methods for measuring and recording data on the smaller cetaceans. *Journal of Mammology*. 1961;42(471-476).
71. Calzada N, Lockyer C, Aguilar A. Age and sex composition of the striped dolphin die-off in the western Mediterranean. *Marine Mammal Science*. 1994;10(3):299-301.
72. Cubo J, Casinos A. Biomechanical significance of cross-sectional geometry of avian long bones. *European Journal of Morphology*. 1998;36(1):19-28.
73. Cubo J, Casinos A. The variation of the cross-sectional shape in the long bones of birds and mammals. *Annales des Sciences naturelles*. 1998;1:51-62.
74. Cubo J, Casinos A. Mechanical properties and chemical composition of avian long bones. *European Journal of Morphology*. 2000;38(2):112-21.
75. Jackson AP. Bone, nacre, and other ceramics. In: Vincent JFV, editor. *Biomechanics Materials A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p. 33-56.

76. Cubo J, Casinos A. Flight lessness and long bone allometry in palaeognathiformes and sphenisciformes. *Netherlands Journal of Zoology*. 1997;47(2):209-26.
77. Calle-Trujillo G, Castro A, Montoya M. Adaptación de un sistema de reconocimiento de imágenes Brinell y Vickers. *Scientia et Technica*. 2004;X(26):79-85.
78. Rho JY, Zioupos P, Currey JD, Pharr GM. Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation. *Bone*. 1999;25(3):295-300.
79. Verlinden M. On the acid decomposition of human blood and plasma for the determination of selenium. *Talanta*. 1982;29(10):875-82.
80. Bertram JEA, Biewener AA. Differential scaling of the long bones in the Terrestrial carnivora and other mammals. *Journal of Morphology*. 1990;204(2):157-69.
81. Ricker WE. Linear regressions in fishery research. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1973;30:409-34.
82. Laws EA, Archie JW. Appropriate use of regression analysis in Marine Biology. *Marine Biology*. 1981;65:13-6.
83. Sokal RR, Rohlf J. *The principles and practice of statistics in biological research*. 2^o ed. ed. San Francisco: Freeman and Co; 1981.
84. Thompson DAW. Galileo and the principle of similitude. *Nature*. 1915;95(2381):426-7.
85. Slijper EJ. *Whales*. London: Hutchinson; 1979.
86. Bejder L, Hall BK. Limbs in whales and limblessness in other vertebrates: mechanisms of evolutionary and developmental transformation and loss. *Evolution & Development*. 2002;4(6):445-58.
87. Swartz SM, Biewener AA. Shape and scaling. In: Biewener AA, editor. *Biomechanics (Structures and Systems): a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p. 290.
88. Brown JH, West GB, Enquist BJ. Scaling in Biology: patterns and processes causes and consequences. In: Brown JH, West GB, editors. *Scaling in biology*. Oxford: Oxford University Press; 2000. p. 352.
89. Economos AC. Elastic and/or geometric similarity in mammalian design? *J Theor Biol*. 1983;103:167-72.
90. Calder III WA. *Size, function, and life history*. Cambridge: Harvard University Press; 1984.
91. Schmidt-Nielsen K. *Scaling: Why is animal size so important?* Cambridge: Cambridge University Press; 1984.
92. Ruff CB. Allometry between length and cross-sectional dimensions of the femur and tibia in *Homo sapiens sapiens*. *American Journal of Physical Anthropology*. 1984;65:347-58.
93. Lanyon LE, Rubin C. Functional adaptation in skeletal structures. In: Hildebrand M, Bramble DM, Liem KF, Wake BD, editors. *Functional vertebrate morphology*. Harvard: Harvard University Press; 1985. p. 1-25.
94. Benke H. Investigations on the osteology and the functional morphology of the flipper of whales and dolphins (Cetacea). In: Pilleri G, editor. *Investigation on Cetacean*. Paciano, Italia: Museum of Natural History; 1993. p. 9-252.
95. Read AJ, Tolley KA. Postnatal growth and allometry of harbour porpoises from the Bay of Fundy. *Canadian Journal of Zoology*. 1997;75:122-30.
96. Lockyer C. Investigation of aspects of the life history of the harbour porpoise *Phocoena phocoena*, in British waters. *Rep Int Whal Commn*. 1995(special issue 16):189-97.

97. McLellan WA, Koopman HN, Rommel SA, Read AJ, Potter CW, Nicolas JR, et al. Ontogenetic allometry and body composition of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*, L.) from the western North Atlantic. *J Zool Lond.* 2002;257:457-71.
98. Galatius A. Sexually dimorphic proportions of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) skeleton. *J Anat.* 2005;206:141-54.
99. De Buffrénil V, Collet A, Pascal M. Ontogenetic development of skeletal weight in a small delphinid, *Delphinus delphis* (Cetacea, Odontoceti). *Zoomorphology.* 1985;105:336-44.
100. Miyazaki N, Fujise Y, Fujiyama T. Body and organ weight of striped and spotted dolphins off the Pacific coast of Japan. *Sci Rep Whales Res Inst.* 1981(33):27-67.
101. Perrin W, Roberts EL. Organ weights of non-captive porpoise (*Stenella* sp.). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences.* 1972 April 1972;71(1):19-32.
102. Calzada N, Aguilar A, Lockyer C, Grau E. Patterns of growth and physical maturity in the western Mediterranean striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* (Cetacea, Odontoceti). *Canadian Journal of Zoology.* 1997;75:632-7.
103. Ramos R, Di Benedetto AP, Lima NRW. Growth parameter of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Mammals Journal.* 2000;26(1):65-75.
104. Gould SJ. Allometry and size in ontogen and phylogeny. *Biol Rev.* 1966;41:587-640.
105. Del Castillo DL, Panebianco MV, Negri MF, Capozzo HL. Morphological Analysis of the Flippers in the Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*, Applying X-Ray Technique. *The Anatomical Record.* 2014;297:1181-8.
106. Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Brownell RL. Evolution of river dolphins. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 2001;268:549-56.
107. Erickson GM, Catanese J, Keaveny TM. Evolution of the biomechanical material properties of the femur. *The Anatomical Record.* 2002;268:15-124.
108. Biewener AA. Bone strength in small mammals and bipedal birds: Do safety factors change with body size? *Journal of Experimental Biology.* 1982;98:289-301.
109. Heinrich RE, Ruff CB, Adamczewski JZ. Ontogenetic changes in mineralization and bone geometry in the femur of muskoxen (*Ovibos moschatus*). *J Zool Lond.* 1999;247:215-23.
110. Ruff CB, Runestad JA. Primate limb bone structural adaptations. *Annu Rev Anthropol.* 1992;21:407-33.
111. Polk JD, Demes B, Jungers WL, Biknevicius AR, Heinrich RE, Runestad JA. A comparison of primate carnivore and rodent limb bone cross-sectional properties: are primates really unique. *Journal of Human Evolution.* 2000;39:297-325.
112. Currey JD. What determines the bending strength of compact bone? *The Journal of Experimental Biology.* 1999;202:2495-503.
113. Valverde E, Casinos A, Alba-Fernández C, Del Río L. Lumbar ontogenetic allometry and dimorphism in humans. A case for comparison between interspecific and intraspecific scaling. *European Journal of Morphology.* 2005;42(4/5):185-92.
114. Carrier DR. Postnatal ontogeny of the musculo-skeletal system in the Black-tailed jack rabbit (*Lepus californicus*). *J Zool Lond.* 1983;201:27-55.
115. Carrier DR, Leon LR. Skeletal growth and function in the California Gull. *J Zool Lond.* 1990;222:375-89.
116. Murphy S, Rogan E. External morphology of the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis*: growth allometric relationships and sexual dimorphism. *Acta Zoologica.* 2006;87:315-29.

117. Christiansen P. Locomotion in terrestrial mammals: the influence of body mass, limb length and bone proportions on speed. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2002;136:685-714.
118. Alexander RM. Body support, scaling and allometry. In: Hildebrand M, Bramble DM, Lirm KF, Wake BD, editors. *Functional vertebrate morphology*. Cambridge: Harvard Univerity Press; 1985. p. 26-37.
119. Ford SM, Corruccini RS. Intraspecific, interspecific, metabolic, and phylogenetic scaling in platyrrhines primates. In: Jungers WL, editor. *Size and Scaling in Primate Biology*. New York: Plenum Press; 1985. p. 401 – 35.
120. Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha-Campos CC. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Canadian Journal of Zoology*. 1998;76:1622-7.
121. Barreto AS, Rosas FCW. Comparative growth analysis of two populations of *Pontoporia blainvillei* on the brazilian coast. *Marine Mammal Science*. 2006;22(3):644-53.
122. Gould SJ. *Ontogeny and Phylogeny*: Harvard University Press.; 1977.
123. Begon M, Harper JL, Townsend CR. *Ecología: Individuos, poblaciones y comunidades*. Barcelona.: Ed. Omega.; 1988.
124. Van der Meulen MCH, Ashford MWJ, Kirtli BJ, Bachrach LK, Carter DR. Determinants of femoral geometry and structre during adolescent growth. *Journal of Orthopaedic Research* 1996;14(1):22-9.
125. Cartes DR, Hayes WC. Fatigue life of compact bone. Effects of stress amplitude temperature and density. *Journal of Biomechanics*. 1976;9(1):27-34.
126. Moine RM, Rivera MC, Ferraris GR, Natali J, Galán AM, Gigena MS, et al. Descripción histologica de la substancia cortical dorsal en la parte media de la diáfisis del metacarpiano III en yegua mestiza. *Rev Chil Anat*; 2001. p. 39-43.
127. Biewener AA, Taylor CR. Bone strain: A determinant of gait and speed? *Journal of Experimental Biology*. 1986;123:383-400.
128. Brear K, Currey JD, Pond CM. Ontogenetic changes in the mechanical properties of the femur of the polar bear *Ursus maritimus*. *J Zool Lond*. 1990;222:49-58.
129. Currey JD. The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *The Journal of Experimental Biology*. 1999;202:3285-94.
130. Currey JD. *Bones: structure and mechanics*. Princenton.: Princenton University Press.; 2002.
131. Griffiths AD, Brook BW. Body size and growth in tropical small mammals: examining variation using non-linear mixed effects models. *J Zool Lond*. 2005(267):211-20.
132. Maunz M, German RZ. Craniofacial heterochrony and sexual dimorphism in the short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Journal of Mammology*. 1996;77(4):992-1005.
133. German RZ, Hertweck DW, Sirianni JE, Swindler DR. Heterochrony and sexual dimorphism in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *American Journal of Physical Anthropology*. 1994(93):373-80.
134. Weber-Rosas FC, Barreto AS. Age and growth of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) (Cetacea, Delphinidae) on the Paraná coast, southern Brazil. *Fisheries Bulletin*. 2002;101(2):377-83.
135. Read AJ, Wells RS, Hohn AA, Scott MD. Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *J Zool Lond*. 1993(231):107-23.

136. Stolen MK, Odell DK, Barros NB. Growth of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the indian river lagoon system, Florida, U.S.A. *Marine Mammal Science*. 2002;18(2):348-57.
137. Kasuya T, Brownell RL. Age determination, reproduction, and growth of the Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Sci Rep Whales Res Inst*. 1979(31):45-67.
138. Read AJ, Gaskin DE. Changes in growth and reproduction of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, from the Bay of Fundy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1990;47:2158-63.
139. Bryden MM. Age and growth. In: Bryden MM, Harrison RJ, editors. *Research on Dolphins*. Oxford: Clarendon Press; 1986. p. 211-24.
140. Tzaphlidou M, Zaichick V. Sex and age related Ca/P ratio in cortical bone of iliac crest of healthy humans. *Journal of Radionalytical and Nuclear Chemistry*. 2004;259(2):347-9.
141. Zullinger E, Ricklefs RE, Redfors KH, Mace GM. Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves. *Journal of Mammology*. 1984(65):607-36.
142. Phillips JR. ZunZun.com Online Data Modelling. Interactive 2-Dimensional and 3-Dimensional Data Modeling. <http://www.zunzun.com>; 2002.
143. Lázaro M, Lessa EP, Hamilton H. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Marine Mammal Science*. 2004;20(2):201-14.
144. Currey JD. Interactions between age, pregnancy and lactation and some mechanical properties of the femoral of rats. *Calc Tiss Res*. 1973;13:99-112.
145. Swartz SM, Middleton KM. Biomechanics of the bat limb skeleton scaling, material properties and mechanics. *Cell Tissue Organs*. 2008;187:59-84.
146. Field RA, Riley ML, Mello FC, Corbridge JC, Kotula AW. Bone composition in cattle, pigs, sheep and poultry. *Journal of Animal Science*. 1974;39:493-9.
147. Moreno J, Forriol F. Effects of preservation on the mechanical strength and chemical composition of cortical bone: an experimental study in sheep femora. *Biomaterials*. 2002;23:2615-9.
148. Hodgkinson R, Currey JD, Evans GP. Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone. *Journal of Orthopaedic Research*. 1989;7(5):754-8.
149. Chen PY, Stokes AG, McKittrick J. Comparison of the structure and mechanical properties of bovine femur bone and antler of the North American elk (*Cervus elephus canadensis*). *Acta Biomaterialia*. 2009;5:693-706.
150. Rajaram A, Ramanathan N. Tensile properties of antler bone. *Calcified Tissue International*. 1982;34:301-5.
151. Honda K, Fujise Y, Tatsukawa R, Miyazaki N. Composition of chemical components in bone of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*: Distribution characteristics of major inorganic and organic components in various bones and their age-related changes. *Agric Biol Chem*. 1984;48(2):409-18.
152. Zioupos P, Currey JD, Casinos A. Exploring the effects of hypermineralisation in bone tissue by using an extreme biological example. *Connective Tissue Research*. 2000;41(3):229-48.
153. Currey JD, Zioupos P, Davies P, Casinos A. Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone. *The Royal Society*. 2001;268:107-11.
154. Coats AM, Zioupos P, Aspden RM. Material properties of subchondral bone from patients with osteoporosis or osteoarthritis by microindentation testing and electron probe microanalysis. *Calcified Tissue International*. 2003;73:66-71.

155. Biltz RM, Pellegrino E. The chemical anatomy of bone: I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1969;51:456-66.
156. Glimcher MJ. Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation. In: Sahai N, Schoonen MAA, editors. *Medical mineralogy and geochemistry*. Chantilly, Virginia, U.S.A.: The mineralogical society of america; 2006. p. 223-82.
157. Currey JD. The many adaptations of bone. *Journal of Biomechanics*. 2003;36(10):1487-95.
158. Rho JY, Currey JD, Zioupos P, Pharr GM. The anisotropic young's modulus of equine secondary osteones and interstitial bone determined by nanoindentation. *The Journal of Experimental Biology*. 2001;204:1775-81.
159. Ziv V, Wagner HD, Weiner S. Microstructure-Microhardness Relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone*. 1996;18(5):417-28.
160. Stauber M, Müller R. Volumetric spatial decomposition of trabecular bone into rods and plates. A new method for local bone morphometry. *Bone*. 2006;38(4):475-84.
161. Hengsberger S. Mechanical characterization of bone from the tissue down to the lamellar level by means of nanoindentation [Docteur ès Sciences]. Saarbrücken: Universität des Saarlandes; 2002.
162. Felts WJL, Spurrell FA. Structural orientation and density in cetacean humeri. *American Journal of Anatomy*. 1965;116:171-204.
163. Phelps JB, Hubbard GB, Wang X, Agrawal CM. Microstructural heterogeneity and the fracture toughness of bone. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;51:735-41.
164. Weaver JK. The microscopic hardness of bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1966;48:273-88.
165. Currey JD, Brear K. Hardness, Young's modulus and yield stress in mammalian mineralized tissues. *Journal of Materials Science*. 1990;1:14-20.
166. Zioupos P, Currey JD, Casinos A. Exploring the effects of hypermineralisation in bone tissue by using an extreme biological example. *Connective Tissue Research*. 2000;41(3):229-48.
167. Anonimos. Material hardness. Calce and Universit of Maryland; 2001.
168. Wang XD, Masilamani NS, Mabrey JD, Alder ME, Agrawal CM. Changes in the fracture toughness of bone may not be reflected in its mineral density porosity and tensile properties. *Bone*. 1998;23(1):67-72.
169. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*. 1997;90:979-90.
170. Dall'Ara EÖ, C; Baleani, M.; Viceconti, M. The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone. *Journal of Biomechanics*. 2007;40:3267-70.
171. Zioupos P, Gresle M, Winwood K. Fatigue strength of human cortical bone: Age, physical, and material heterogeneity effects. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008;86(3):627-36.
172. Hengsberger S, Ammann P, Legros B, Rizzoli R, Zysset P. Intrinsic bone tissue properties in adult rat vertebrae modulation by dietary protein. *Bone*. 2005;36:134-41.
173. Jämsä T, Rho JY, Fan Z, MacKay CA, Marks SCJ. Mechanical properties in long bone of rat osteopetrotic mutations. *Journal of Biomechanics*. 2002;35:161-5.

174. Zhang J, Niebur GL, Ovaert TC. Mechanical property determination of bone through nano-and micro-indentation testing and finite element simulation. *Journal of Biomechanics*. 2008;41(2):267-75.
175. Carnelli D. Orientation and Length-Scale Dependent Mechanical Properties in Lamellar Bone at the Micro and Nanostructural Hierarchical levels. Milan: Politecnico di Milano; 2010.
176. Rho JY, Roy M, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;45:48-54.
177. Bala Y, Farlay D, Delmas PD, Meunier PJ, Boivin G. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*. 2010;46:1204-12.
178. Whitenack LS, D.C.; Motta, P.J.; Hirai, M.; Kumar, A. Young's modulus and hardness of shark tooth biomaterials. *Archives of oral Biology*. 2010;55(2010):203-9.
179. Zioupos P, Smith CW, An YH. Factors affecting mechanical properties of bone. In: An YH, Draughn RA, editors. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 65-85.
180. Fish FE, Howle LE, Murray MM. Hydrodynamic flow control in marine mammals. *Integrative and Comparative Biology*. 2008;48(6):788-800.
181. Hengsberger S, Kulik A, Zysset P. A combined atomic force microscopy and nanoindentation technique to investigate the elastic properties of bone structural units. *European Cell and Materials*. 2001;1:12-7.
182. Huja SS, Katona TR, Roberts WE. Microhardness testing of bone. In: An YH, Draughn RA, editors. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton FL: CRC Press; 2000. p. 247-56.
183. Grabner B, Landis WJ, Roschger P, Rinnerthaler S, Peterlik H, Klaushofer K, et al. Age and genotype dependence of bone material properties in the osteogenesis imperfecta murine model (iom). *Bone*. 2001;29(5):453-7.
184. Rho JY, Zioupos P, Currey JD, Pharr GM. Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *Journal of Biomechanics*. 2002;35:189-98.
185. Sun L, Fan Y, Li D, Zhao F, Xie T, Yang X, et al. Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation. *Acta Biomaterialia*. 2009.
186. Huja SS, Beck FM, Thurman DT. Indentation Properties of Young and Old Osteons. *Calcified Tissue International*. 2006;78:392-7.
187. Hoffler CE. Heterogeneity of bone lamellar level elastic moduli. *Bone*. 2000;26(6):603-9.
188. Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*. 1997;18(1997):1325-30.
189. Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset P, Goldstein SA. Age, gender, and bone lamellae elastic moduli. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000;18(3):432-7.
190. Fan ZF, Smith P, Rauch F, Harris GF. Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. *Composites Part B*. 2007;38:411-5.
191. Bonser RHC. Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *Journal of Experimental Biology*. 1995;198:209-12.

192. Rapoff AJ, Rinaldi RG, Hotzman JL, Daegling DJ. Elastic modulus variation in mandibular bone: a microindentation study of *Macaca fascicularis*. *American Journal of Physical Anthropology*. 2008;135:100-9.
193. Martin RB. Determinants of the mechanical properties of bones. *Journal of Biomechanics*. 1991;24(Supp. 1):79-88.
194. Stein MS, Feik SA, Thomas CDL, Clement JG, Wark JD. An automated analysis of intracortical porosity in human femoral bone across age. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(4):624-32.
195. Bousson V, Bergot C, Meunier A, Barbot F, Parlier-Cuac C, Laval-Jeantet AM. CT of middiaphyseal femur: cortical bone mineral density and relation to porosity. *Radiology*. 2000;217:179-87.
196. Kohles SS, Martinez DA. Elastic and physicochemical relationships within cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;49:479-88.
197. Woodward BI, Winn JP, Fish FE. Morphological specializations of baleen whales associated with hydrodynamic performance and ecological niche. *Journal of Morphology*. 2006;267:1284-94.
198. Sanchez A, Berta A. Comparative anatomy and evolution of the odontocete forelimb. *Marine Mammal Science*. 2010;26(1):140-60.
199. Weber PW, Howle LE, Murray MM, Reidenberg JS, Fish FE. Hydrodynamic performance of the flippers of large-bodied cetaceans in relation to locomotor ecology. *Marine Mammal Science*. 2014;30(2):413-32.
200. McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1993;75:1193-205.
201. Lemaitre J, Chaboche J-L. *Mechanics of Solid Materials*. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.
202. Li Z, Pasteris JD. Tracing the pathway of compositional changes in bone mineral with age: Preliminary study of bioapatite aging in hypermineralized dolphin's bulla. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1840(2014):2331-9.

8 Resumen

8.1 Capítulo 1: Introducción

El hueso es un tejido dinámico y complejo, cuyas funciones son el control del metabolismo de Ca, P y Mg (función fisiológica) y de soporte y protección de órganos (función mecánica). Si bien los huesos tienen diferentes formas y tamaños, poseen una estructura común: una corteza de hueso compacto o cortical, que por su superficie interna está en contacto con el hueso esponjoso o trabecular, que se caracterizan por:

- Hueso cortical: con aspecto de una masa sólida y continúa, su superficie externa está recubierta por el periostio. Compuesto por sustancia intersticial calcificada, la matriz ósea, depositada en capas llamadas lamelas. Se caracteriza por espacios abiertos parcialmente rellenos ubicados en la cavidad medular recubierta por el endóstio. En su interior existe una red de finos canales longitudinales (canales de Havers) y transversales (canales de Volkmann) que transportan los vasos que posibilitan su nutrición y los nervios que transmiten sensibilidad.

- Hueso trabecular: Se encuentra en la parte interna del hueso cortical. Presenta una disposición tridimensional de trabéculas, con médula ósea en su interior y que se entrecruzan en diferentes direcciones.

La diferencia principal entre ambos tejidos óseos viene dada por la porosidad que en el hueso cortical varía entre el 5 % y el 30 %, mientras que en el hueso trabecular varía entre el 30 % y el 90 %.

Este trabajo versa sobre los huesos largos que son en los que predomina la longitud sobre anchura y espesor. Presentan una capa exterior gruesa de hueso compacto y contienen hueso esponjoso.

Cuando los huesos pierden una cantidad excesiva de proteínas y minerales, especialmente calcio se produce la osteoporosis, significa literalmente "huesos porosos". Con el tiempo, se reduce la masa ósea, y por lo tanto la fuerza del hueso. Como resultado, los huesos se vuelven frágiles y se rompen fácilmente.

La mayoría de los casos de osteoporosis se producen como una aceleración del proceso de envejecimiento normal, lo que se conoce como osteoporosis primaria y es mayor en hembras que en machos. La osteoporosis también puede ser causada como consecuencia de otros procesos como son: el uso prolongado de ciertos medicamentos y a consecuencia de otras enfermedades especialmente la inmovilización prolongada que resultan en la pérdida de hueso. Si es así, esto se denomina osteoporosis secundaria o de desuso.

Una de las técnicas más utilizadas para la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma biológica y su variación es la morfometría. Existe una gran diversidad de formas y tamaños en la naturaleza que presentan unas normas generales que determinan un patrón básico de organización las cuales se han tratado de relacionar con una modelización matemática. Una de ellas es el estudio de las proporciones animales, por medio de una ecuación que permite describir el crecimiento de una región con respecto a otras o respecto al organismo en su

conjunto. Este análisis consiste básicamente en el ajuste de las variables a estudiar a la función potencial $y = a * x^b$, conocida como ecuación de crecimiento alométrico.

Para analizar el movimiento y otras características mecánicas de los seres vivos se utiliza la Biomecánica. El comportamiento mecánico del hueso puede estudiarse bien por las características materiales del tejido, a través de pruebas mecánicas de secciones del hueso, por las propiedades estructurales, tomando el hueso como una unidad anatómica entera; o bien considerando su forma y arquitectura, que configuran su geometría. Ambos métodos, con el objetivo de registrar las resistencias y las deformaciones óseas que acontecen en las situaciones de carga, permiten crear curvas y modelos para el estudio de la resistencia, energía de absorción, plasticidad, elasticidad y modelos arquitectónicos. El hueso es el único tejido capaz de adaptarse mecánicamente, y modificar su calidad y geometría en respuesta a cargas impuestas sobre el mismo. Las propiedades mecánicas del hueso son modeladas por fuerzas intrínsecas y extrínsecas. Las primeras pueden ser consideradas fisiológicas, mientras que las fuerzas extrínsecas no tienen límite en su magnitud y dirección. Ambos tipos de fuerzas causan alteraciones en la geometría del hueso, las características microscópicas, la densidad, el grado de mineralización, y la orientación y disposición de las fibras colágenas.

Los huesos responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico. La primera fase de deformación es elástica y depende de la rigidez del hueso. En esta fase, la deformación es temporal, y se mantiene solo durante el tiempo de aplicación de la fuerza, tras lo cual el hueso recupera su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica, y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido, se produce la fractura.

Los huesos formados fundamentalmente por tejido óseo compacto o cortical son elásticos y poco plásticos. En estos huesos, la resistencia será mayor cuando la fuerza se aplique de forma vertical al sentido de la carga.

En los huesos integrados por tejido óseo esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo del eje vertical de las trabéculas vertebrales, y también cuando es paralela a los sistemas trabeculares del cuello femoral. Estos huesos, al ser menos densos que los formados por tejido óseo cortical, son menos elásticos y más plásticos, por lo que pueden presentar deformaciones mayores.

El desarrollo y la estructura de los huesos de las extremidades son algunas de las características más interesantes de la anatomía de los cetáceos, ya que pueden revelar mucho sobre la adaptación al medio pues muestran modificaciones drásticas de proporciones y articulaciones en comparación con los mamíferos terrestres. En particular, la extremidad pectoral o aletas de los cetáceos representa una adaptación muy avanzada de una extremidad mamíferos primitivos en el medio acuático

Galileo (1638) sugirió que los esqueletos de los vertebrados acuáticos fueron proporcionalmente más ligeros (en relación a la masa corporal) y crecieron más lentamente que los de los vertebrados terrestres. Este hecho se entiende como una consecuencia de que los huesos en agua no tienen que soportar el peso del cuerpo (Thompson, 1915). De Buffrénil et al. (1985), demostró que la masa ósea de los delfines comunes (*Delphinus delphis*) fue proporcionalmente menor que la de los mamíferos terrestres, lo cual es consistente con las predicciones de Galileo sobre vertebrados marinos.

En los cetáceos, los huesos de las aletas carecen de una cavidad medular libre y tienen una textura esponjosa y, además, de Buffrénil y Schovaert (1988) sugieren que durante la vida de *Delphinus delphis* hay una actividad intensa de remodelación en la estructura interna de las aletas, que se asemeja un proceso osteoporótico.

8.2 Capítulo 2 : Materia y Métodos

En esta investigación se han estudiado dos especies, *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*, de las que se disponía series ontogenéticas de huesos de la aleta pectoral que abarcaban desde neonatos hasta individuos plenamente adultos. Se eligió el radio por ser uno de los huesos largos generalmente más estudiados en biomecánica. Las mencionadas especies no sólo fueron escogidas por la disponibilidad del material sino también porque se trataba de animales distanciados tanto desde el punto de vista filogenético como ambiental.

Las muestras de *Stenella coeruleoalba*, provienen de animales muertos en 1990 durante la epidemia de morbilivirus epizootica que se dio en el Mediterráneo occidental. Se utilizaron un total de 97 ejemplares (47 hembras, 38 machos y 12 animales de sexo indeterminado) con edades comprendidas entre 0 a 34 años y, longitudes entre 94 cm (fetos) hasta 211 cm (adultos).

Las muestras de *Pontoporia blainvillei* provienen de animales atrapados en las redes de enmalle frente Necoche (Argentina) entre 1988 y 1992. Estas muestras contiene 37 ejemplares (26 hembras y 11 machos), con edades comprendidas entre 6 meses y 7 años, y con longitudes que variaban de 101 cm a 157 cm.

En ambos casos, los radios de aletas se han conservado congelados.

Para los análisis biométricos, la longitud total o talla (L) de los delfines se midió usando el método Norris. Para la masa corporal (M_b) se utilizó una balanza estándar. La edad (a) de los organismos se calculó utilizando las líneas de crecimiento de los dientes.

Se extrajeron los radios de las aletas en ambas especies, se limpiaron y midieron varios parámetros geométricos: la longitud (l), el diámetro sagital (sd) y el diámetro transversal (td) para cada radio con un pie de rey MITUTOYO (± 0.1 mm de grado de precisión).

Para relacionar las medidas de los siguientes parámetros l , sd , td , l , sc y σ respecto a la L y a M_b y L con respecto a M_b ; en cada una de las especies estudiadas se utilizó un modelo basado en una relación alométrica normal.

Se realizaron ensayos de flexión para calcular la carga de fractura con una maquina hidráulica universal INSTRON 8511 (Universitat de Barcelona) para *Stenella coeruleoalba* y una maquina Dartec Series HC10 (Cranfield University) para los huesos de *Pontoporia blainvillei*. Para ambas especies se utilizó el método en flexión por tres puntos. Los huesos se cargaron en dirección del plano sagital, en el punto medio de la longitud del radio y se llevaron a fractura. La velocidad del actuador fue de 0,5 mm/min, con una fuerza estática de 10 kN y de 5 kN de fuerza dinámica en la célula de carga. La envergadura de los puntos de flexión dependió de la longitud del hueso.

Se determinó la resistencia (σ) en función de la carga máxima (P_{max}), la envergadura (S), la superficie cortical (sc) y el diámetro sagital (sd). Se hicieron fotografías de cada sección transversal de los huesos (Canon Powershot G-3), mostrando la superficie de ruptura; con las cuales se estimaron la superficie cortical (sc) y el segundo momento del área (I) mediante el programa IMAT (Serveis Científico Tècnics de la Universitat de Barcelona).

Después de los ensayos de flexión, se cortaron 3 placas de las muestras por la sección transversal de cada hueso en segmentos semicirculares de 3 mm aprox. Se limpiaron con metanol-cloroformo (50% por 48 h), después con metanol (100 % por 2

h) y finalmente en agua destilada (250 ml) con 3 gotas de hipoclorito de sodio en constante movimiento mediante una rotadora (Stuart Scientific Roller SRT1). Posteriormente cada placa fue limpiada a presión con agua caliente, y secada en una estufa (modelo Gallenkamp) a 36° C por 24 horas.

Para el análisis de dureza superficial (Microdurezas y Nanodurezas), una de las placas de cada muestra, se envolvió de resina (10 ml de Polyester casting y 6 gotas de endurecedor), dentro de anillos de PVC previamente etiquetados, se colocaron en una bomba de vacío (Bauhler Vacuum) durante 12 horas. Las muestras se dejaron secar en la estufa por 48 horas a 36°C para posteriormente lijar y pulir en una pulidora (*Metaserv Rotary Pregrinder* con lijas de SiC e irrigación constante de agua y con micropulidor de *aluminio*).

Las técnicas cuantitativas de micro y macro dureza se realizaron utilizando dos indentadores. Para las microindentaciones se usó un indentador HWD7M7 Indentec, con el que se realizaron 9 indentaciones con cargas de 10 g. por muestra. Las nanoindentaciones se realizaron con un Nano Hardness Tester de CSM Instruments y el software Indentation. Se realizaron 6 indentaciones, 3 con la secuencia “estándar” con 10 mN con 30 s de carga, 30 s estacionado y 30 s de descarga del indentador y 3 con la multicíclica con cargas de 10 mN, y los tiempos fueron de 30 s carga, 10 s estacionado, 30 s descarga, 1 s descanso, 30 s carga, 10 s estacionado, 30 s descarga, 1 s descanso, 30 s carga, 30 s estacionado, 30 s descarga

Se utilizó otra placa del hueso de cada una de las muestras para realizar los análisis químicos, la cual fue triturada para homogeneizarla en un mortero de ágata y después puesta a secar en una estufa a 105 ° C durante 24 h para poder realizar los siguientes análisis químicos:

-Análisis de metales (Ca, Mg, Na y P). Se realizó por descomposición ácida de las muestras (0,075 gr de hueso en franciscana y 0,040 gr para el delfín listado) en Selecta Bloc-digest con ácido nítrico concentrado y ácido perclórico. Se analizaron en el espectrómetro óptico de emisión de plasma acoplado por inducción simultánea (ICP-OES) modelo PerkinElmer Optima 3200 RL.

- Análisis de elementos no metálicos (C y N). Se pesaron 100 mg de la muestra homogeneizada y se cuantificaron ambos elementos utilizando un analizador elemental NA 1500 (C.E. Instruments).

- Análisis de amonoácidos (prolina y hidroxiprolina). Se estimó la cantidad de colágeno presente en los huesos por medio de la cromatografía de intercambio iónico.

Para determina la densidad, porosidad y contenido mineral de las muestra, la última placa se corto y pulió hasta darle la forma de un paralelepípedo. Se obtuvieron la masa y el volumen inicial (V), la masa seca (W_d), la masa húmeda (W_w), la masa sumergida (W_s) y el volumen de la matriz (V_m).

La W_d se determino después de poner las muestras en la estufa a 36° por 12 horas, pesando todas las muestras con una balanza (Mettler Toledo ®). Para calcular la W_w se pusieron las muestras, en agua destilada durante 12 horas. Después se centrifugaron en agua a 3000 r.p.m. por 2 minutos y se pesaron. Para calcular la W_s se utilizo el método de imbibición que consiste en poner las muestras en agua destilada por 12 horas, después se centrifugaron a 1000 r.p.m. por 5 minutos, y

finalmente se pesaron sumergiéndolas en una vaso con agua destilada y tarada previamente, mediante una báscula digital.

Se calculó la densidad real (d_r) por medio de la densidad aparente (d_a) $d_a = W_w/V$. A partir de estos datos se infirió el contenido mineral (C_m) poniendo las muestras en una solución EDTA durante 14 días cambiándose cada 2 días y se enjuagaron con agua destilada para después secarlas en la estufa a 36° C durante 12 horas.

Para analizar las relaciones alométricas se utilizaron dos modelos de regresión: el modelo de mínimos cuadrados (I), y el modelo la mediana geométrica (II), por medio del programa estadístico Alometra.

El modelo I se utilizó cuando la variable dependiente se calculaba indirectamente (para los parámetros l y σ) y el modelo II se utilizó cuando la variable dependiente se medía directamente (para los parámetros l , sd , td , y sc). Paralelamente se calcularon los coeficientes de correlación en cada análisis. Las regresiones se calcularon para el total de la muestra y para cada sexo, por separado y para cada una de las especies (*Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei*)

Para comparar las correlaciones de los parámetros L y M_b se utilizó una prueba de hipótesis Z-test para la igualdad de dos correlaciones utilizando el paquete estadístico SYSTAT v.9.

Para comparar las diferencias entre sexos en cada especie se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA).

Para relacionar diferentes parámetros con la edad se utilizó el modelo de crecimiento de Gompertz.

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos básicos y pruebas de comparación múltiple por medio del ajuste de Tukey, también se hicieron ANOVAs de un factor y de varios factores utilizando el paquete estadístico STATISTICA v.6 (1984-2002 StatSoft Inc.)

8.3 Capítulo 4: Resultados

8.3.1 4.1 Alometría estructural de los parámetros de la sección transversal de radio en dos especies de delfines.

Existían desde hace muchos años algunos interrogantes que se formulaban con frecuencia sobre las modificaciones estructurales presentes en la masa o la estructura del esqueleto de los mamíferos marinos. Desde el siglo XVII se había asumido que los esqueletos de vertebrados acuáticos eran proporcionalmente más ligeros que los de los vertebrados terrestres, basándose en el hecho que los animales acuáticos tienden a la flotabilidad neutra (D'Arcy Thompson, 1915). La confirmación empírica fue hecha por de Buffrénil (1985) que mostró que la masa esquelética del delfín común (*Delphinus delphis*) era proporcionalmente más baja que la correspondiente en los mamíferos terrestres.

La aleta pectoral de los cetáceos representa el paso de la extremidad de mamífero plesiomórfica a una extremidad de mamífero acuático altamente adaptado, de tal manera que los huesos se han modificado drásticamente tanto en sus proporciones como en sus articulaciones en comparación con el modelo que existe en los mamíferos terrestres (Felt and Spurrell, 1966). Aunque estructuralmente las modificaciones ontogenéticas de los huesos de la aleta (como son los cambios en la textura y los procesos de remodelación) se entienden bien después del trabajo realizado por de Buffrénil (1988), no hay datos en lo que respecta a la longitud ni a los diferentes parámetros de las secciones transversales. El único antecedente hasta la fecha del tema, desde el punto de vista interespecífico, es el de Dawson (1994) que realizó un estudio alométrico de la longitud y de los diámetros en el húmero, el radio y el cúbito de 23 especies de cetáceos.

La existencia de relaciones alométricas entre dos o más dimensiones corporales produce cambios en la forma de los organismos. La expresión de estos cambios de forma se asocia a los cambios de tamaño corporal, manifestándose a lo largo de trayectorias tanto ontogenéticas como filogenéticas. La alometría entre caracteres morfológicos, fisiológicos y/o reproductivos es sin duda una de las fuentes más importantes de diversificación. Sin embargo, en biología evolutiva es muy discutido el significado adaptativo de estos cambios en las proporciones.

Se analizaron las proporciones óseas del radio en *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei* con el modelo potencial alométrico. Los parámetros geométricos medidos fueron longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ), las medidas se realizaron en los planos transversal y sagital. La longitud total y la masa de estos especímenes ya fueron publicados (Calzada N et al. 1996; Calzada N & A. Aguilar, 1995 and 1996 and; Calzada N et al. 1997). Se utilizó el programa IMAT para calcular, la sección transversal para los parámetros el I y J . Los análisis se realizaron para el total de las muestras de cada especie y para los dos sexos utilizando el Modelo I o el Modelo II de regresiones según los parámetros calculados y se compararon las diferencias entre sexos con ANCOVA.

El resultado de este trabajo proporciona los datos de la variación morfológica durante la ontogenia del radio en el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y el delfín de La Plata (*Pontoporia blainvillei*) basado en diversas medidas.

Se relacionaron los parámetros antes mencionados con talla y peso. Se encontró que hay correlación con todos los parámetros en *Stenella coeruleoalba*, mientras que en *Pontoporia blainvillei* hay un número mayor de correlaciones con la talla que con el peso y se presentan mayormente en machos.

Stenella coeruleoalba muestra alometría negativa para muchos parámetros (l , td y sd). Se encontraron resultados similares al estudio interespecífico/filogenético de Dawson (1994) en cetáceos; mostrando que los diámetros radio exhiben alometría negativa con respecto a la longitud de los huesos y la masa corporal. De hecho, el análisis alométrico en *Phocoena phocoena* a partir de mediciones externas del cuerpo (Read AJ, Tolley KA, 1997) y de diferentes mediciones esqueléticas (Galatius A., 2005) también mostró alometría negativa.

El delfín de La Plata presentó alometría positiva para casi todos los parámetros, siendo mayores que algunos mamíferos terrestres. Esto es sorprendente si se tiene en cuenta que los mamíferos marinos no están expuestos a las fuerzas de la gravedad como los mamíferos terrestres. Esto podría atribuirse al origen evolutivo de esta especie; la familia Pontoporidae es más antigua (del Mioceno Medio) que la familia Delphinidae (alrededor del Mioceno tardío) (Hamilton H, 2001). Es decir, géneros más antiguos, como Pontoporidae, muestra una alometría positiva mientras que las especies más evolucionadas, como las marsopas y los delfínidos, presente alometría negativa, tal y como presento *Stenella coeruleoalba* para casi todos los parámetros, como se esperaría de un mamífero marino. Por lo tanto, las diferencias biomecánicas del radio entre las dos especies de delfines son considerables.

Se ha propuesto que, en cetáceos modernos, las extremidades han adquirido una nueva función para estabilizar y dar dirección; no generan ninguna fuerza de propulsión (Felts WJL, 1966). Varios cambios morfológicos facilitaron estas adaptaciones funcionales ya que la extremidad se somete a diferentes fuerzas transversales debido a la resistencia del agua. Se podría inferir que la evolución de una alometría positiva a una negativa sería una consecuencia del desarrollo de nuevas funciones como el aumento de la velocidad de natación (100).

Pinedo (1991) mostró que *Pontoporia blainvillei* está bien adaptada al medio ambiente costero, donde las aguas turbias no requieren nadar rápidamente, pero sí de movimientos más eficaces y rápidos, coordinado por un timón hábil. Por otro lado, *Stenella coeruleoalba* es un cetáceo de mar abierto, considerado uno de los cetáceos más ágiles y rápidos (Archer, F., 2002 and Reeves, R.R. et al, 2002), estas características atléticas junto con la necesidad de un timón rápido encajaría la estructura (Felts, WJL, 1966) del hueso radio y justificaría la alometría negativa, característica de muchos de los mamíferos marinos de la aleta pectoral (Murphy, S, & E. Rogan, 2006).

Pontoporia blainvillei resiste mayores cargas de flexión que *Stenella coeruleoalba*. La mayor fortaleza podría ser debido a, como se mencionó anteriormente, hacen movimientos rápidos y repentinos en el medio ambiente costero.

En delfines listados, encontramos que para las relaciones alométricas con la longitud del cuerpo (L), en las hembras todas son negativas excepto el diámetro sagital (sd) y momento polar (J) y en machos las alometrías son positivas en casi todos los parámetros, exceptuando la longitud del radio (l) y el diámetro sagital (sd). Estos resultados concuerdan con los resultados de Van Utrecht para aletas (como menciona Galeatus 2005).

Para los delfines de La Plata, el tamaño en toda la longitud del radio aumenta más en hembras que en machos. Sin embargo, el diámetro sagital aumenta más rápido en los machos que en las hembras.

Al realizar la comparación entre sexos para cada especie, se encontraron diferencias significativas en los delfines listados para los parámetros longitud (l) y la superficie cortical (A) vs. talla y la superficie cortical (A) vs. masa corporal. Sin embargo, para el delfín de La Plata la única diferencia entre sexos está en momento de inercia (I) vs. talla..

Para *Stenella coeruleoalba* estas diferencias entre los sexos para longitud del radio y la superficie cortical podrían atribuirse a diferencias en el esfuerzo físico realizado por machos y hembras en función de su estructura social compleja, lo que queda reflejado en los tres tipos de escuelas: juvenil, adulto y mezclado que presentan. Las escuelas de adultos y mixtos se dividen en escuelas de cría y no cría (Archer F , 2002 & Van Waerebeek K. et al., 1998). Si suponemos que las hembras dedican más tiempo que los machos en las escuelas de cría para su cuidado, mantendrían una velocidad media más constante, sin alejarse de las crías para hacer saltos acrobáticos. En consecuencia, la proporción de geometría en radio hembras podría mostrar una tasa de crecimiento más lento en comparación con los machos.

8.3.2 4.2 Estudio del crecimiento ontogénico del radio de dos especies de delfines.

Haeckel (1866) definió la ontogenia como el desarrollo de un órgano u organismo desde su origen hasta su formación definitiva.

Durante la ontogenia, el desarrollo de la estructura del esqueleto es una combinación compleja inherente al crecimiento relativo de la edad y a la adaptación mecánica a las cargas aplicadas. La edad afecta a todas las propiedades del hueso en animales durante la vida del individuo, a la vez que el hueso se ve afectado por procesos externos e internos. Los externos terminan en una remodelación estructural y los internos remodelan su arquitectura interna.

Los cambios relativos a la edad en las propiedades materiales son debidos principalmente al resultado del incremento de la mineralización del hueso. La concentración del contenido mineral del hueso varía con la especie, la edad, la función mecánica del hueso y la condición fisiopatológica del individuo. Todos estos factores son interdependientes y cada uno hace del hueso lo que es. Los constituyentes inorgánicos de la matriz ósea son principalmente sales minerales en forma cristalizada (fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita, carbonato cálcico y en cantidades menores sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio).

Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, un exceso de ellos implica una mayor fragilidad del hueso. Es precisamente el retículo de colágeno y otras proteínas presentes en la matriz lo que le aporta al hueso su flexibilidad y la resistencia a la tensión

El crecimiento en mamíferos es una función no lineal de la edad y está condicionada a la energía disponible, al gasto energético de mantenimiento de los individuos y al crecimiento potencial de los tejidos. El modelo de crecimiento de Gompertz, es el más recomendado para odontocetos ya que presenta un punto de inflexión.

La curva de crecimiento de Gompertz se calculó usando el programa *online* de internet *Zunzun*, que utiliza la ecuación sigmoidea 2D de Gompertz $y = Ze^{-be^{-kt}}$; donde y es la variable calculada, Z es el valor de la asíntota máxima de y , e es la base de los logaritmos naturales, k es el descenso exponencial del crecimiento, t es la edad y el parámetro b describe el crecimiento inicial.

Las variables que se relacionaron con la edad fueron talla (L), peso (Mb), longitud del radio (l), diámetro transversal (td), diámetro sagital (sd), segundo momento del área (I), superficie cortical (A), momento polar (J) y resistencia (σ).

Se utilizaron regresiones lineales (Modelo I) para analizar los cambios a través del tiempo, del porcentaje de la composición química (Ca, Mg, Na, P, C y N), por lo que se dividieron los individuos sexados de cada especie en individuos maduros e inmaduros (Calzada et al. (1994) y Corcuera et al. (1994)).

Se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para analizar la proporción de hidroxiprolina y calcular el colágeno. Se analizaron cuatro muestras de cada sexo por especie, que representaban diferentes categorías de edad.

Se hicieron análisis estadísticos descriptivos básicos para los porcentajes de los elementos químicos de ambas especies. Para las diferencias entre sexos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (sexo); también se utilizaron análisis univariantes de covarianza para ver las diferencias por categorías de edad. Las pruebas de comparaciones múltiples entre categorías de edad se llevaron a cabo mediante el ajuste de Tukey.

Los resultados muestran que la ecuación de Gompertz describe adecuadamente el crecimiento en el de ambas especies. Los resultados encontrados en las curvas de crecimiento para ambas especies en general presentan una amplia variación; esto también se observa en otros trabajos (Pinedo 1991; Read & Tolley 1997; Lockyer C 1995; Galatius A 2005; De Buffrénil et al. 1985; Calzada N et al. 1997; Stolen MK et al. 2002; Kasuya & Brownell 1979; Read & Gaskin 1990).

Al comparar este trabajo con los anteriores que utilizaron las mismas especies, encontramos que para el caso de *Stenella coeruleoalba* obtuvimos que los coeficientes de determinación son mayores, tanto en hembras como en machos, que los obtenidos por Calzada *et al.* (1997). Estas diferencias también se observan en los parámetros del valor de la asíntota máxima (Z o A), en el descenso exponencial del crecimiento (k) y en el crecimiento inicial (b).

Llama la atención en *Pontoporia blainvillei* que presente un crecimiento más lento, con asíntotas poco pronunciadas en comparación con *Stenella coeruleoalba*, observándose diferencias entre sexos mucho más marcadas, siendo generalmente los machos mayores en casi todos los parámetros.

Para el caso de *Pontoporia blainvillei* Barreto y Rosas (2006) y Ramos et al. (2000) encontraron que las hembras eran más grandes que los machos, mientras que en este trabajo encontramos que los machos son más grandes que las hembras. Esto podrían deberse a que el tamaño de la muestra es pequeño, en particular en machos, si bien presentan una distribución estadística normal. Otra razón sería debida a que es una especie con una longevidad que en hembras puede llegar a los 21 años, y en machos a los 15 años, y las muestras utilizadas en este estudio llegan sólo hasta los 7 años; sin embargo son considerados como adultos. Otra hipótesis, aunque menos plausible, sería que estas diferencias pueden ser debidas a la variación geográfica, ya que este trabajo únicamente representa a una zona de la población del sur (113, 136). Aparentemente el crecimiento entre hembras, machos y muestras totales es diferente; sin embargo de las variables analizadas en *Stenella coeruleoalba* solamente encontramos diferencia significativa, en el parámetro de crecimiento llamado tasa inicial de crecimiento (x_0), para el diámetro sagital (sd), encontrando que es mayor en hembras que en muestras totales y machos. Esto descrito biológicamente muestra que los diámetros sagitales empiezan a crecer antes en los machos que en las hembras, siendo éste más lento y llegando a su crecimiento máximo a una edad mayor que en las hembras, es decir, en hembras el diámetro sagital empieza a crecer después y su crecimiento es más rápido. Un patrón similar se observa en la grafica del diámetro transversal; aunque no presenta una diferencia significativa.

Para *Pontoporia blainvillei* encontramos diferencias significativas en la tasa de crecimiento (x_0), para el diámetro sagital (sd) y para diámetro transversal (td), encontrando en ambos casos una menor tasa de crecimiento en hembras que para muestras totales y machos. También encontramos diferencias significativas en las variables longitud del radio (l) encontrando diferencias tanto en el total de la muestra, como para ambos sexos.

Por lo anterior podemos decir que la tasa de crecimiento del diámetro sagital en ambas especies presenta diferencias significativas entre hembras y machos. El dimorfismo sexual en el caso de el delfín listado ya estaba descrito por Calzada y Aguilar (1996); también hay que considerar que las aletas de las hembras maduran más rápido que los machos (Calzada et al. 1997), aunque es en machos que el diámetro sagital comienza a crecer antes. Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo, en la medida en que el diámetro sagital es mayor para hembras inmaduras, lo que reforzaría las teorías que nos indican que existen diferentes estrategias de

crecimiento entre sexos (Read & Tolley 1997, Calzada et al 1997, Read & Gaskin 1990).

A nivel interespecifico se observa externamente que a diferencia de las aletas de delfín listado, que son pequeñas y delgadas con el extremo de la punta afilado, en el delfín de La Plata son largas y amplias si se comparan con cualquier otro odontoceto (62). Pinedo (61) encontró un desarrollo precoz en las aletas y relaciona el ancho de la aleta con una adaptación a un ambiente costero. La importancia que podría tener el desarrollo tan diferente del radio entre las dos especies puede estar ligado a los dos diferentes hábitats en los que viven.

Al relacionar la resistencia con los porcentajes de elementos químicos, tanto por sexos como por categorías de edad, encontramos que en todos los elementos, los coeficientes de determinación son muy altos para *Stenella coeruleoalba*. Lo mismo se observa para la superficie cortical y para el segundo momento del área. Este patrón es semejante al de otros mamíferos.

Los análisis de los elementos químicos estudiados mostraron poca variación. No se encontraron diferencias significativas entre sexos en los elementos químicos en franciscana, mientras que para delfín listado solo encontramos diferencias significativas en el nitrógeno

En el análisis por categoría de edad en ambas especies, encontramos diferencias significativas en Ca y P, y para franciscana también en Mg. Siendo las diferencias significativas para delfín listado, tanto en Ca como en P, entre hembras inmaduras y maduras y entre hembras inmaduras y machos maduros. En franciscana las categorías de edad que presentan diferencias significativas en el Ca son: los machos maduros con las hembras inmaduras, con las hembras maduras y con los machos inmaduros; para el P se encontraron diferencias significativas solo entre machos inmaduros y maduros y para el Mg entre machos maduros y hembras inmaduras

En las regresiones de los porcentajes de los elementos químicos con la edad, encontramos que no siguen ningún patrón concreto

Para ambas especies, al relacionar la hidroxiprolina y el colágeno con la edad y con la talla, se observa que mientras más crecen las hembras menores son los porcentajes, mientras que para los machos el porcentaje de ambos aumenta con el crecimiento. Estas diferencias entre sexos se observan más acusadas en hembras de *Pontoporia blainvillei* que en las de *Stenella coeruleoalba*. Aunque presentan valores muy similares a otros vertebrados.

Los análisis de la proporción Ca/P presentan diferencias entre categorías de edad para las dos especies Si comparamos esta relación (Ca/P) con la de otros vertebrados (Biltz & Pellegrino, 1969 y Coats et al. 2003) observamos que en general es mayor en cetáceos, según los resultados tanto de este trabajo como del de Zioupos et al. (2000). Glimcher et al. (2006) dicen que ciertas enfermedades metabólicas, como la osteoporosis, hacen que la relación Ca/P aumente. Esto concuerda con sugerido por De Buffrenil & Schoevaert (1988) sobre la presencia de un proceso de osteoporosis secundaria en delfines.

8.3.3 4.3 Caracterización de micro y nanodureza en radio del delfín.

La capacidad del hueso para llevar a cabo las cargas macroscópicas está claramente determinada por su microestructura interna. A nivel microscópico, y teniendo en cuenta la sección transversal, como se dijo anteriormente, el hueso se clasifica en dos componentes estructurales básicos: el hueso esponjoso y el cortical.

Generalmente se considera casi como una obviedad que las arquitecturas de los huesos se adaptan a su entorno mecánico. Sin embargo, la estructura histológica interna de la adaptación al entorno externo no se ha investigado hasta hace poco y no se han alcanzado conclusiones claras todavía. (Currey 2003 y Rho et al. 2001) La relación de propiedades mecánicas de la estructura sólo se comprueba por lo general en términos de diferencias estructurales macroscópicas, tales como hueso cortical frente a esponjoso. Algunos estudios han tratado de relacionar las propiedades con las estructuras a microescala (desde decenas de micras a nanómetros) (Ziv et al. 1996, Hengsborg 2002 y Stauber & Müller 2006). Sin embargo, la densidad mineral ósea, la geometría, la microarquitectura y la calidad de su composición son parámetros críticos para determinar la resistencia del hueso. Por esta razón, la información microestructural se debe incluir en los análisis para predecir las propiedades mecánicas individuales del hueso.

El esqueleto de las extremidades en cetáceos tienen modificaciones radicales en las articulaciones y los huesos carecen de cavidad medular; tal y como encontraron Felts y Spurrell (1966 y 1965) que examinaron la arquitectura externa e interna y la densidad de los huesos largos de delfines, encontrando también que la parte trabecular muestra una forma de reloj de arena peculiar. Sin embargo, los radios tienen densidades absolutas más altas que los húmeros, aunque ambos huesos tienen la misma proporción de mineralización.

Las propiedades mecánicas del hueso se deterioran con la edad. Estos cambios comprenden la disminución de la densidad mineral, la degradación de la matriz de colágeno o el aumento de la porosidad (Phelps et al. 2000). Los análisis microestructurales pueden proporcionar información sobre la evolución del hueso pero en la actualidad es un método poco explorado para caracterizar las adaptaciones óseas de las extremidades (Ruff & Runestad, 1992).

Para caracterizar la osificación en los huesos se ha estudiado la dureza del hueso (Weaver, 1966 y Currey JD, & Brear 1990). La dureza es la propiedad de la materia comúnmente descrita como la capacidad de un material para resistir la deformación plástica, y depende de la composición mineral, tal como muestran Zioupos et al. (2000). La medición de la dureza se puede llevar a cabo a nivel macro, micro o nanoescala, dependiendo de las fuerzas aplicadas y los desplazamientos generados. El estudio de la macrodureza es un método rápido y simple para obtener las propiedades mecánicas del material en general. Sin embargo, para los materiales que muestran una microestructura fina, falta de homogeneidad o propensos a agrietarse, es mejor utilizar las micro o nano-mediciones de dureza

Se utilizó un indentador modelo INDETEC HWDM7 para medir la microdureza (10 g (0,1 N)). Las mediciones se llevaron a cabo en 9 puntos diferentes en cada placa, distribuidos simétricamente: 4 en el hueso cortical (norte=NN, sur=SS, este=EE y oeste=WW) y 5 en el hueso esponjoso (norte-centro=NC, central=CC, sur-central=SC, centro-este=CE y centro-oeste=WC).

Las nanoindentaciones (Vickers) se realizaron con un Nano Durómetro de CSM Instruments con el software Indentation 3.5. La posición de cada indentación fue seleccionada manualmente (cerca de las posiciones de las microindentaciones WW, CC y EE). Se realizaron 6 hendiduras en cada placa en 3 puntos diferentes: oeste (Ws y Wm), centro (Cs y Cm) y el este (Es y Em). En cada punto se realizaron dos muescas diferentes: prueba estándar y prueba de un ciclo. Para examinar los resultados se utilizaron diferentes análisis estadístico tanto para el total de las muestras y para cada parámetro (especie, sexo, tipo de hueso (posición) y categoría de edad).. Se relacionó la edad con la dureza y otros parámetros físico-químicos por medio de modelos lineales y Gompertz.

Los resultados en *Stenella coeruleoalba* Muestra que la varianza de microdureza en machos son más grandes que en hembras. También se encontró que el hueso esponjoso era más duro y presenta menos varianza que el hueso cortical. Por lo que respecta a las categorías de edad, los sexualmente inmaduros presentaron una microdureza más grande y mostraban una varianza superior a la madurez sexual.

Con respecto a la posición en el hueso, la posición NN (anterioposterior) y SS (posterior), presentan una microdureza menor que las posiciones que se encuentran a lo largo del diámetro transversal (EE, CE, WW y WC).

Se encontraron diferencias significativas entre sexos, entre los tipos de hueso y entre las categorías de edad para delfín listado. Al relacionar las diferentes variables se observó diferencias significativas entre sexo/tipo de hueso para el hueso cortical y hueso esponjoso en hembras; entre el hueso cortical de hembras y hueso esponjoso de machos; y, finalmente, entre el hueso cortical y el hueso esponjoso de machos. Para sexo/categoría de edad el análisis mostró diferencias significativas entre machos sexualmente maduros y hembras sexualmente inmaduras. En la relación de tipo de hueso/categoría de edad, existen diferencias significativas entre el hueso cortical y trabecular en los sexualmente maduros, y también entre el hueso cortical y los sexualmente inmaduros y hueso esponjoso y los sexualmente maduros.

Al relacionar sexo/tipo de hueso/categoría de edad, el análisis encontró diferencias significativas en hembras entre hueso esponjoso y sexualmente inmaduras y hueso cortical y sexualmente maduras. También encontramos diferencias significativas entre las muestras de hueso esponjoso en machos sexualmente maduros con muestras de hueso cortical, tanto en hembras y machos de ambas categorías de edad, sexualmente inmaduras y sexualmente maduras.

Cuando relacionamos microdureza vs. edad en diferentes posiciones de la sección transversal, encontramos que tanto hueso trabecular y cortical la dureza aumenta con la edad.

En *Stenella coeruleoalba* los resultados del análisis de nanodureza por sexos, el tipo de hueso, categoría de edad y tipo de indentación. Se encontró que los machos presentan mayor nanodureza que las hembras. Con respecto al tipo de hueso, los huesos esponjoso y cortical tienen similares nanodurezas, pero el hueso esponjoso presente más varianza. También se observó que nanodureza en individuos sexualmente maduros es mayor que en sexualmente inmaduros. Con respecto al tipo de indentación, los valores significativamente más altos de dureza se presentan en la indentación cíclica para todas las posiciones. Por otra parte, el hueso trabecular presentó mayor variación para ambos tipos de indentación.

No se muestran diferencias significativas para delfín listado entre sexos (hembras y machos) y entre tipos de hueso. Pero sí entre sexualmente maduros y sexualmente inmaduros. También se observan diferencias significativas entre el tipo de indentación.

La ANOVA de nanodureza en *Stenella coeruleoalba* mostró diferencias significativas en categoría de edad y tipo de indentación pero no para sexo y tipo de huesos. Sin embargo, ANOVA factorial de nanodureza para *Stenella coeruleoalba* no mostró diferencias significativas.

Cuando se compara nanodureza vs. edad se observó que aumenta la dureza con la edad en las tres variables analizadas, tipo de indentación (estándar y cíclica) y para ambos tipo de hueso (trabecular y cortical).

En *Pontoporia blainvillei* en el análisis de microdureza encontramos que los machos presentan una mayor microdureza, mientras que las hembra tienen una mayor dispersión. El hueso esponjoso presenta una microdureza mayor que el hueso cortical y también una mayor dispersión. Por categoría de edad, los individuos sexualmente maduros mostraron una mayor microdureza y mayor dispersión de los sexualmente inmaduros.

Se encontró que el hueso esponjoso (posiciones: CC, NC, SC, CE y WC) tiene una microdureza menor que el hueso cortical, encontrando las mayores en las posiciones este y oeste en el diámetro sagital.

Se encontraron diferencias altamente significativas en el delfín de La plata entre los tipos de huesos. Por el contrario no mostraron diferencias entre sexos ni entre categoría de edad.

En *Pontoporia blainvillei*. la ANOVA factorial únicamente presentó diferencias significativas para tipos de hueso/categorías de edad, un análisis específico post-hoc de Tukey HSD, mostró que estas diferencias se encuentran entre individuos sexualmente inmaduros para hueso cortical y sexualmente inmaduros para el hueso trabecular.

Al relacionar la microdureza con la edad encontramos que disminuye con la edad para el hueso trabecular sin dependencia del sexo, mientras que aumenta para el hueso cortical.

En el delfín de La plata la nanodureza es mayor en hembras que en machos y también presentan mayor dispersión. Entre los tipo de hueso encontramos que el hueso cortical tenía una mayor nanodureza que el hueso esponjoso y también una mayor varianza. Entre las categorías de edad, los individuos sexualmente inmaduros presentan una mayor varianza pero no se encontraron diferencias con los sexualmente maduros.

Entre los tipos de indentación, se encontró la indentación cíclica fue mayor que la indentación estándar, siendo en las posiciones E y W del hueso cortical, donde encuentra la nanodureza más grande.

El análisis de varianza no presentó diferencias significativas entre sexos ni entre categorías de edad para el delfín de La Plata. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre tipos de hueso y entre el tipo de indentación.

El análisis de ANOVA factorial no mostró diferencias significativas para ninguno de los factores relacionados en nanodureza para *Pontoporia blainvillei*. Al relacionar la nanodureza con la edad se observa una tendencia a aumentar con los años en el hueso esponjoso, mientras que para el hueso cortical disminuye.

En *Stenella coeruleoalba* y *Pontoporia blainvillei* los resultados de la relación alométrica entre la densidad real y la resistencia tanto para las muestras totales como para ambos sexos y las categorías de edad, muestran coeficientes de correlación muy bajos. Sin embargo se observó que la densidad real relacionada con la resistencia es mayor en machos que en hembras para ambas especies, y se mantiene constante para machos inmaduros.

En *Stenella coeruleoalba* la relación de la densidad real a la edad presenta la pendiente de las curvas de regresión es mayor para los machos que para hembras, es decir, aumenta la densidad ósea en machos con la edad. El coeficiente de correlación es muy bajo para el total de la muestra y ambos sexos. En *Pontoporia blainvillei* aumenta la densidad real con la edad, siendo ligeramente mayor en hembras que en machos.

No observamos cambios significativos al relacionar la porosidad de la edad, en cualquiera de las especies. Al comparar entre sexos, tampoco observamos diferencia en *Stenella coeruleoalba*, pero en *Pontoporia blainvillei* observamos que los machos presentan un pequeño aumento en la porosidad y disminución en hembras.

Nuestra caracterización de la arquitectura del hueso mostró diferencias mecánicas claras en la dureza en diferentes escalas (micro y nanodureza). Los valores promedio de microdureza, corresponden a valores similares de otro mamífero, tales como: ratas fémur (16) bovina (161) y los seres humanos (147, 162, 163). Para nanodureza valores promedio de la escala corresponde también similares a los encontrados en las ratas (164, 165).

Puede sorprender que la magnitud de la nanodureza es mayor que la microdureza; Sin embargo, como Zhang et al. (166) sugieren, estas diferencias pueden deberse a la complejidad que surge de la organización estructural jerárquica de hueso a nivel microscópico (152).

La gran dispersión observada en las mediciones nanodureza podría ser debido que se llevaron a cabo las medidas en diferentes láminas, entre las cuales hay una amplia variación como observamos Rho et al (167) y se puede explicar por las unidades estructurales de hueso a escala nanoscópica (168).

Es razonable aceptar las diferencias de microdureza en especie, tal y como Zioupos et al. (158) o Whitenack et al. (169) han encontrado en varias especies, especialmente cuando los dos especies pertenecen a diferentes familias. Del mismo modo, el tipo de hueso presenta también diferencias significativas debido a su diferente estructura, como se describe en la introducción del capítulo. Sin embargo, el sexo y categoría de edad presentan diferencias en el nivel micro, pero estas diferencias desaparecen a nivel nano.

Cada especie presento un comportamiento opuesto a niveles microestructurales y nanoestructurales. *Stenella coeruleoalba* mostró una mayor microdureza y una menor nanodureza mientras *Pontoporia blainvillei* una menor microdureza y mayor nanodureza. Esto sugiere que la heterogeneidad microestructural puede influir en la resistencia a la fractura de los huesos (155). Por lo tanto, estos mecanismos de compensación subyacentes propiedades óseas se comportan de manera diferente en cada especie.

La diferencia significativa entre las especies y tipo de hueso (trabecular y cortical) para la dureza fue claro tanto en micro y nano niveles, que muestra la influencia de estos dos factores en las propiedades mecánicas del hueso. Estos resultados, evaluados para especies del mismo suborden de acuerdo con Zioupos et al. resultados para diferentes pedidos (158, 170). Sin embargo, hay que destacar que, si bien había diferencias significativas entre sexos y categoría de edad de microdureza, no se destacan por nanodureza. Esto podría deberse a que, a nivel nanoestructural, factores como el sexo y categoría de edad no se vean afectados por el comportamiento de las unidades estructurales de hueso (168).

Debido a la importancia del eje sagital en los huesos largos y, especialmente, el radio en la aleta de un delfín, se estudió la variación nanodureza largo de este eje, la búsqueda de una mayor dureza en el hueso cortical que en una trabecular para

ambas especies. Esto concuerda con Hengsborg et al. (172), que suponen que era debido al contenido mineral de cada tipo de hueso. De hecho, se encontró que los valores más altos del delfín de La Plata, también tiene un contenido mineral más grande que el que presenta *Stenella coeruleoalba*.

Resultados de microdureza *Stenella coeruleoalba* muestran diferencias significativas en todas las variables para un ANOVA de una vía (sexo, tipo de hueso y categoría de edad). Cuando el sexo no está relacionado con el tipo de hueso, encontramos diferencias significativas entre machos y hembras, como Coats (147) encontro para humanos. Sin embargo, cuando los relacionamos sexo con tipo de hueso no se encuentran diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con Huja et al. (173) y Zioupos et al. (170), donde no encontraron diferencias entre sexos para hueso cortical ni para las propiedades mecánicas del hueso.

En el presente estudio, microdureza en *Stenella coeruleoalba* aumenta con la edad para ambos tipos de hueso. Estos resultados son similares a los reportados para el hueso de babuino (155), pero son diferentes a los reportados para ratones huesos (174). Esta discrepancia puede atribuirse a las diferencias entre las especies.

Este estudio utiliza nano-indentación para investigar las propiedades mecánicas de la microestructura del hueso entre sexos, el tipo de hueso, categoría de edad y tipo de indentación. En la mayoría de los estudios previos, (172, 175-179) sólo ejemplares de un mismo sexo para evitar la disparidad de sus resultados se consideran, pero en las especies estudiadas no hubo diferencias entre sexos (Tabla 38), aunque la media de los machos era más alta que en hembras y esto es consistente con los hallazgos de Hoffler et al. (180). Coincidiendo con las conclusiones de Fan et al. (181) en niños con osteogénesis imperfecta, también encontraron diferencias entre los tipos de hueso para nanodureza, esto difiere con los hallazgos de Rho et al. (179) en las vértebras y tibias humanas.

A diferencia de *Stenella coeruleoalba*, *Pontoporia blainvillei* no mostró diferencias significativas entre sexos para microdureza, aunque los machos, al igual que otras especies, tiene dureza mayor que las hembras. Esto también se observó en el trabajo Coats (147) para la osteoartritis y osteoporosis huesos en humanos. El único parámetro que mostró diferencias significativas en *Pontoporia blainvillei* es el tipo de hueso; varios estudios han encontrado diferencias significativas entre el tipo de hueso independientemente de la especie (155, 182, 183). Cuando nos relacionamos variables de ANOVA factorial, se observa que existen diferencias significativas en el tipo de hueso con la categoría de edad entre sexualmente inmaduros.

Resultados nanodureza en La Plata delfines llaman la atención porque presentan altas varianzas Esta dispersión de las mediciones nanodureza podría atribuirse a las muchas muestras que pertenecen a individuos que están en etapa de crecimiento. Esto podría inducir a algunas diferencias con respecto a *Stenella coeruleoalba*, ya que se encontraron diferencias significativas entre las categorías de edad. Sin embargo, encontramos diferencias entre los tipos de huesos; como en otras especies, y el tipo de indentación. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre sexos.

Es de destacar que a diferencia de los seres humanos, en odontocetos aumenta la densidad real con las mediciones de la edad y la porosidad se mantiene. Para muchos mamíferos, incluyendo el hombre, es común que la porosidad del hueso aumente con la edad, nuestros resultados no muestran este comportamiento; porque medimos la porosidad total que incluía tanto hueso cortical como trabecular. Por lo que no son comparables con otros estudios debido a la metodología utilizada (160) ya que generalmente estudian solo el hueso compacto (185-187). Sin embargo, podría ser atribuido a una adaptación secundaria para el medio marino, donde tanto la densidad

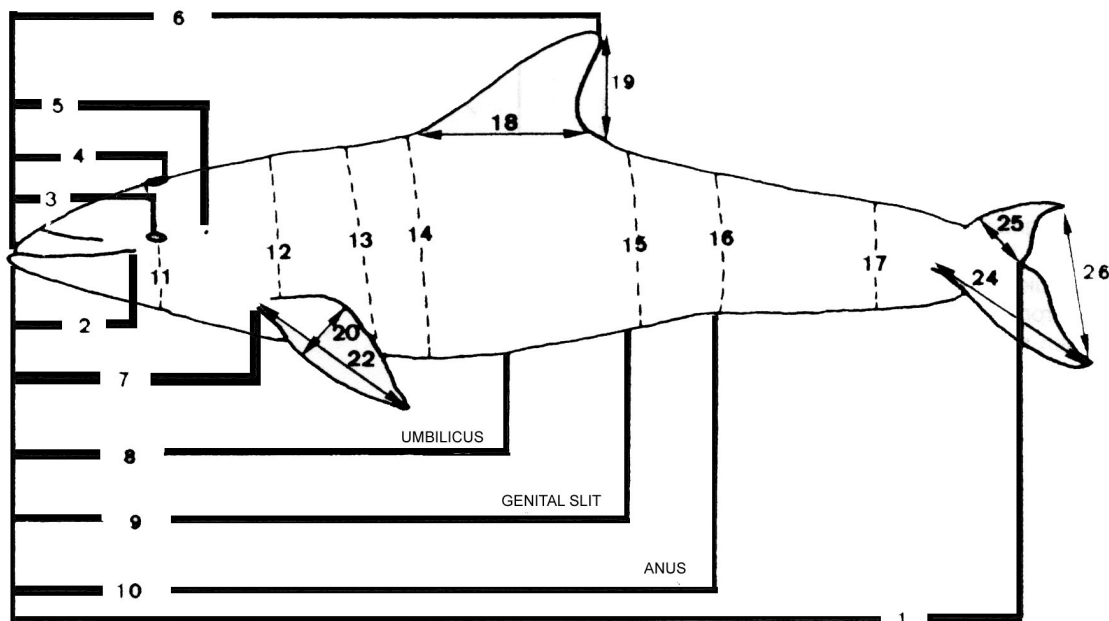
y aumento de contenido de minerales para mantener la porosidad constante, y por lo tanto evitando ya sea osteoporosis por desuso o simplemente grietas y fracturas en los huesos.

9 Anexos

9.1 Anexo 1. Datos de los parámetros utilizados en el estudio.

Parámetro	datos cedidos	datos medidos	datos calculados
Longitud o talla	X		
Peso	X		
Longitud del radio		X	
Diámetro sagital		X	
Diámetro transversal		X	
Edad	X		
Segundo momento de área			X
Superficie cortical			X
Momento polar			X
Resistencia			X
Módulo de Young			X

9.2 Anexo 2 Medidas Externas



1. Longitud estándar: la punta de la mandíbula superior a lo más profundo de muesca en la aleta caudal. [1]
2. Longitud de la apertura de la boca: la punta de la mandíbula superior al ángulo de la apertura de la boca [3]
3. Longitud, la punta de la mandíbula superior hasta el centro del ojo. [2]
4. Longitud, la punta de la mandíbula superior hasta el borde posterior del espiráculo
5. Longitud, la punta de la mandíbula superior al meato auditivo externo.
6. Longitud, la punta de la mandíbula superior a la punta de la aleta dorsal. [11]

7. Longitud, la punta de la mandíbula superior a la inserción anterior de la aleta.
8. Longitud, la punta de la mandíbula superior al punto medio del ombligo [12]
9. Longitud, la punta de la mandíbula superior al borde anterior de la hendidura genital.
10. Longitud, la punta de la mandíbula superior al punto medio del ano. [14]
11. Circunferencia, a nivel de los ojos.
12. Circunferencia, a nivel de la axila. [21]
13. Circunferencia, en el punto medio entre la axila y la inserción anterior de la aleta dorsal
14. Circunferencia, a la inserción anterior de la aleta dorsal. [22]
15. Circunferencia, en la inserción posterior de la aleta dorsal.
16. Circunferencia, a nivel del ano. [23]
17. Circunferencia, en el punto medio entre el ano y la parte más profunda de muesca en aleta caudal.
18. Longitud de base de la aleta dorsal. [33]
19. Altura de la aleta dorsal: la punta de la aleta a la base. [32]
20. Ancho máximo de la aleta izquierda [31]
21. Ancho de la base de la aleta izquierda en la inserción.
22. Longitud anterior izquierda aleta, de inserción anterior a punta. [29]
23. Longitud posterior izquierda aleta, desde la axila hasta la punta. [30]
24. Duración de la aleta caudal: desde la inserción hasta la punta izquierda de la aleta caudal.
25. Profundidad de la aleta caudal: distancia más corta de la muesca a anterior fronteriza de la aleta caudal. [35]
26. Ancho de la envergadura de aleta caudal de punta a punta. [34]

9.3 Anexo 3 Principio de similitud.

Hipótesis de similitud geométrica: Las relaciones proporcionales que se esperarían encontrar (22, 26), en series interespecíficas de adultos, son:

$$L \propto M_b^{0.33}$$

$$L^3 \propto M_b$$

$$sd \propto L$$

$$td \propto L$$

$$I \propto L^{1.33}$$

$$I \propto M_b^{1.33}$$

$$I \propto L^{3.99}$$

$$sd \propto M_b^{0.33}$$

$$td \propto M_b^{0.33}$$

$$sc \propto L^2$$

$$sc \propto M_b^{0.66}$$

$$\sigma \propto M_b^{0.33}$$

Hipótesis de similitud geométrica:

$$L \propto M_b^{0.25}$$

$$sd \propto M_b^{0.375}$$

$$td \propto M_b^{0.375}$$

$$A \propto M_b^{0.75}$$

$$I \propto M_b^{1.5}$$

$$J \propto M_b^{1.5}$$

$$\sigma \propto M_b^{0.0}$$

$$Pmax \propto M_b^{0.875}$$

$$E \propto M_b^{0.0}$$

$$F/x \propto M_b^{0.75}$$

9.4 Anexo 4 Equivalencia de las ecuaciones del Modelo de Gompertz

Donde y es la variable calculada, Z es el valor asintótico de la ecuación, el parámetro b es la constante de integración, t es la edad, e es la base de los logaritmos naturales y x_0 es la edad inicial.

$$y = Ze^{\left(-e^{-\left(\frac{t-x_0}{b}\right)}\right)}$$

$$y = Ze^{\left(-e^{-\frac{t+x_0}{b}}\right)}$$

$$y = Ze^{\left(-e^{-\frac{t e^{x_0}}{b}}\right)}$$

$$y = Ze^{\left(-b'e^{-\frac{t}{b}}\right)}$$

$$y = Ze^{(-b'e^{-tk})}$$

donde

$$b' = e^{\frac{x_0}{b}}$$

$$k = \frac{1}{b}$$

9.5 Annex 5 Other tables and graphs of Subchapter 4.3

Factorial ANOVA test of microhardness examining effect of species (Stenella coeruleoalba and Pontoporia blainvillei) between different variables with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1

Variables	F	p
species/sex	0.00	0.97
species/type of bone	0.99	0.31
species/age category	2.42	0.12
sex/ type of bone	0.02	0.89
sex/age category	0.04	0.84
type of bone /age category	2.29	0.13
species/sex/type of bone	0.21	0.64
species/sex/age category	0.43	0.51
species/type of bone/age category	2.19	0.13
sex/type of bone/age category	0.13	0.71
species/sex/type of bone/age category	0.15	0.69

ANOVA between age categories and species in microhardness in any position with 0.95 confidence intervals and degree of freedom=1

Position	F	P
species/age category/Cc	0.794	0.375
species/age category /Cn	0.288	0.593
species/age category /Nn	0.057	0.811
species/age category /Sc	2.128	0.148
species/age category /Ss	0.852	0.358
species/age category /Ec	3.400	0.068
species/age category /Ee	0.003	0.954
species/age category /Wc	3.227	0.076
species/age category /Ww	3.545	0.063

A two-way analysis in microhardness using sex and type of bone not showed significant differences (F=0.36 p=0.54) but the post-hoc Tukey HSD test showed significant differences between cortical and cancellous bone in females, and between female cortical bone and males cancellous bone, and finally between cortical and cancellous bone in males.

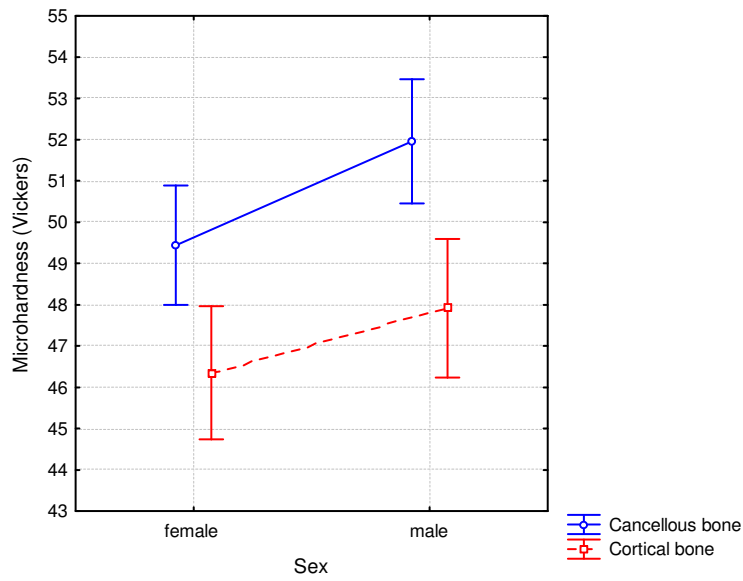


Figure A5.82. Anova for two factors between sex and type of bone of *Stenella coeruleoalba*.

A two-way analysis in microhardness using age category and types of bones showed no significant differences ($F=0.10$ $p=0.74$) but the post-hoc Tukey HSD test shown that exist significant differences between cortical and cancellous bone in sexually mature, and between immature cortical bone and mature cancellous bone.

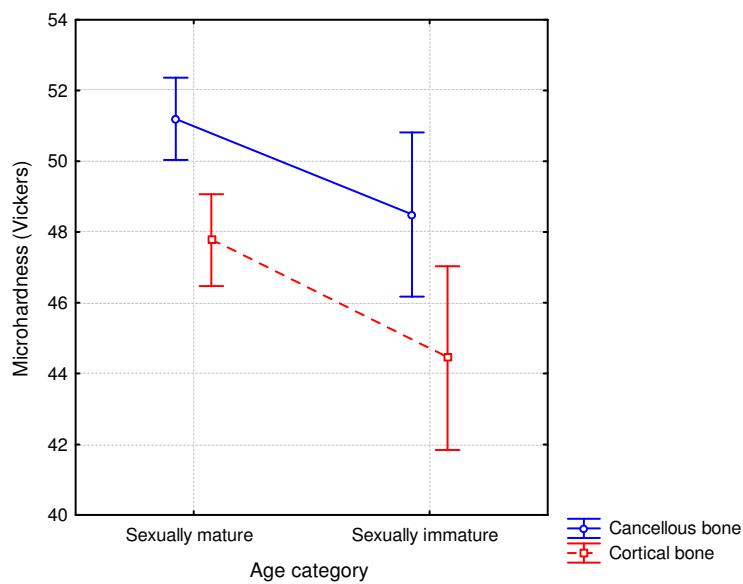


Figure A5.83. Anova for two factors between type of bone and age category of *Stenella coeruleoalba*.

A two-way analysis in microhardness using sex and age category no show significant differences ($F=0.05$ $p=0.82$) together but the post-hoc Tukey HSD test shown that exist significant differences between sexually mature males and sexually immature females

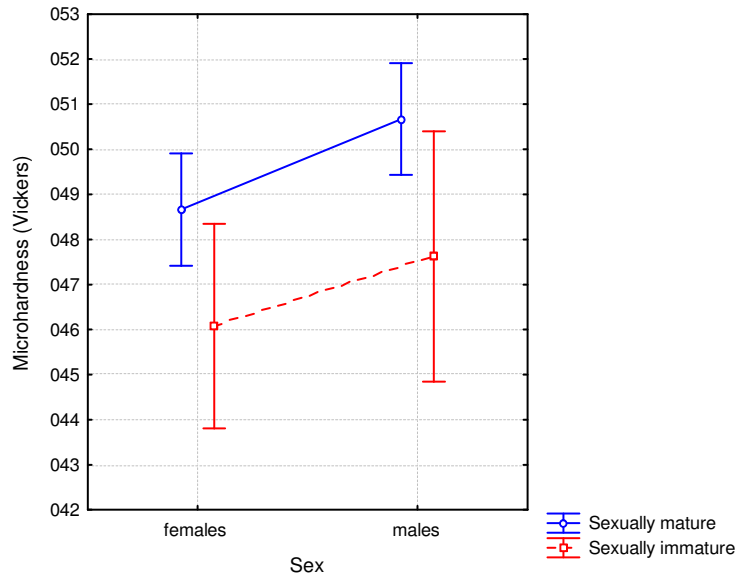


Figure A5.84. Anova for two factors between sex and age category of *Stenella coeruleoalba*.

The t-test for independent samples by groups between sexes do not show statistically significant differences between females and males for striped dolphin (t-value=1.17, p=0.23 and F-ratio variances=1.31, p=0.09) as showed in Figure A5.85.

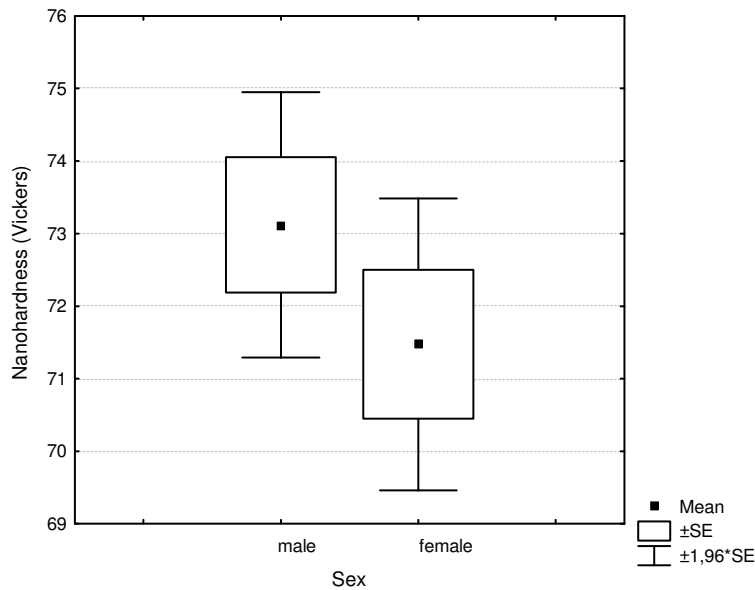


Figure A5.85. Box plots of sex in nanohardness for *Stenella coeruleoalba*.

The t-test for independent samples by groups showed highly statistically significant differences between types of bone for striped dolphin (t-value=-0.64, p=0.52 and F-ratio variances=1.55, p=0.01) is shown in Figure A5.86

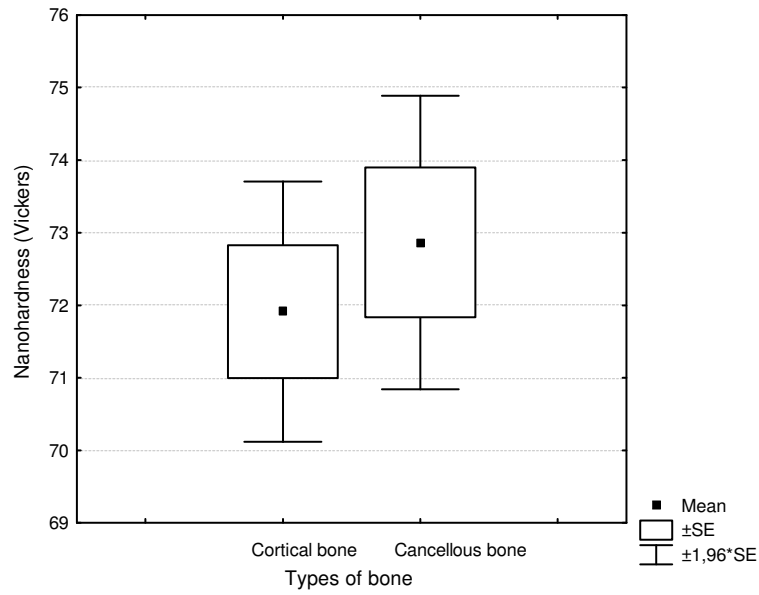


Figure A5.86. Box plots of types of bone in nanohardness for *Stenella coeruleoalba*.

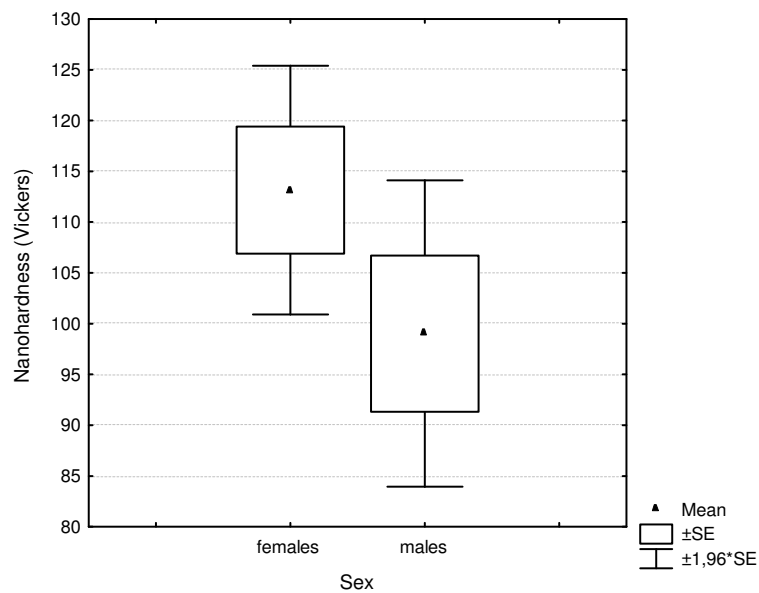


Figure A5.87. Box plots of sex in nanohardness for *Pontoporia blainvillei*.

The t-test for independent samples by groups not showed statistically significant differences between age categories for La Plata dolphin is shown in Figure A5.88.



Figure A5.88. Boxplots of age category in nano hardness for *Pontoporia blainvillei*.