Estudio comparativo de diferentes métodos de determinación de la edad en el lobo ibérico, *Canis lupus signatus*, (Cabrera, 1907).

Técnicas imaginológicas, histológicas, biométricas y de apreciación visual.

Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria.

Universidad de León

Adrián Romairone Duarte

León, 2015

Estudio comparativo de diferentes métodos de determinación de la edad en el lobo ibérico, *Canis lupus signatus*, (Cabrera, 1907).

Técnicas imaginológicas, histológicas, biométricas y de apreciación visual.

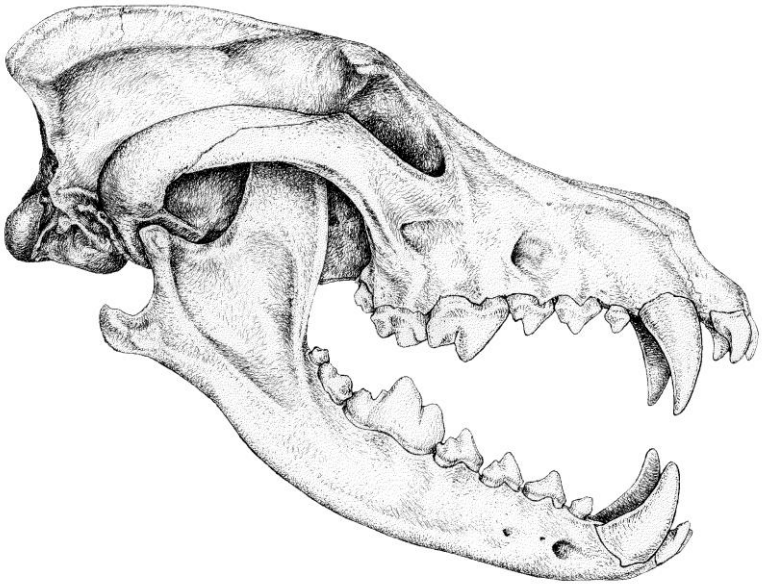
Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria.

Universidad de León

Memoria de tesis presentada
por Adrián Romairone Duarte
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de León

León, 2015

A mi hermosa y generosa familia. A los lobos.



AGRADECIMIENTOS

I. AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento, con el mayor énfasis que la vida me permita, a todas las personas de mi familia, que han hecho posible que esta tesis doctoral sea una realidad.

A Victoria, paciente compañera de mi vida en todos sus avatares, y con especial tenacidad en estas lides de la excelencia profesional. Nada sería posible sin su incondicional apoyo.

A Juan, mi hijo mayor, por haberme contagiado su fervorosa admiración hacia el lobo, y por las horas dedicadas a la corrección de este trabajo.

A Valentina, mi hija, sinónimo de optimismo, empatía, alegría y fuerza en la lucha diaria.

A Pablo, el menor de la saga, por ser la alegría que completa, junto con Frida y Romina (nuestras “lobitas”), el núcleo familiar que ha aguantado con estoica resignación mis horas de estudio para este trabajo de tesis.

Por supuesto, no puedo dejar de mencionar al lobo ibérico, como fuente de inspiración y como una expresión de deseo, poder contribuir con esta aproximación a su datación, un paso más para la conservación de sus poblaciones.

Alicia Serantes Gómez, veterinaria, profesora con mayúsculas, directora de tesis, profesora de mis cursos de doctorado, ejemplo de autoestima y superación personal, pero por sobre todas las cosas un ser humano íntegro, sin dobleces ni medias tintas.

Manuel Gonzalo Orden como codirector de esta memoria de tesis por su consejo y disposición a restar tiempo de su trabajo para colaborar con quien lo necesite.

Ana María Carvajal Urueña, profesora de Enfermedades infecciosas y Epizootiología por su colaboración en el estudio estadístico.

Sandra Cruz Marcos, nutricionista de profesión con amplios conocimientos de estadística por su interés en que esta memoria estuviera sólidamente justificada a través del análisis estadístico de los resultados.

Isabel Rey Fraile, bióloga del Museo de Ciencias Naturales de Madrid, investigadora del CSIC y responsable de los cortes histológicos que hoy avalan esta tesis, y también por haber aportado una valiosa y abundante bibliografía en los inicios de esta memoria.

José Manuel Onrubia Baticón, Tomás Vegas y Emma Rodríguez Pérez, mis compañeros del Centro de Recuperación de Animales Silvestres de Valladolid, por su colaboración en la recogida de muestras, medidas, preparación de cadáveres y estímulo a continuar cuando las circunstancias fueron adversas.

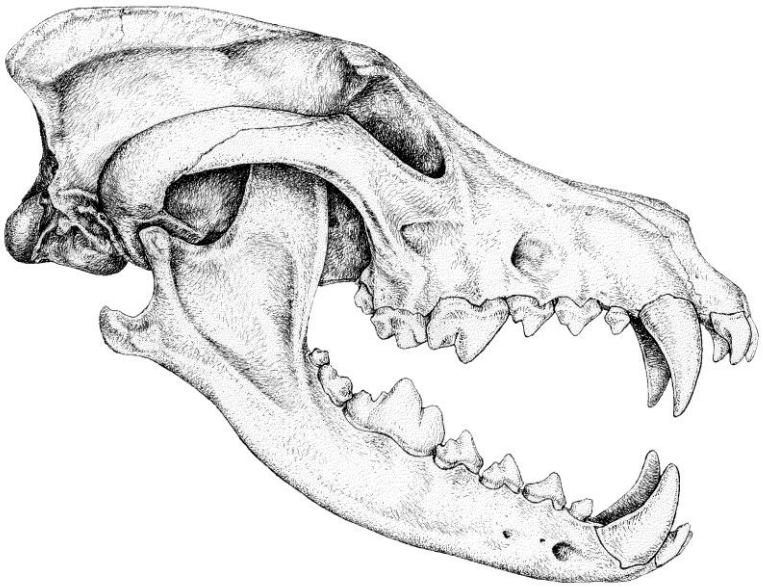
A la Consejería de Fomento y Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, por los permisos para el estudio de los cadáveres que forman parte de esta tesis.

A Jesús Rabadán Callejo, agente medioambiental y apasionado del lobo, por sus constantes aportaciones de conocimiento sobre la especie en el campo, pero sobre todo por su incondicional amistad.

A los agentes medioambientales de la Junta de Castilla y León, con especial mención a los más cercanos como Ernesto Madejón, Juan Ortega, Pedro Moldon,

celador de la Sierra de la Culebra y otros muchos más con los que he mantenido largas conversaciones sobre el lobo y sus andanzas.

Es imposible hablar del lobo ibérico en cualquiera de sus aspectos y no mencionar un agradecimiento a Luis Mariano Barrientos, Javier Talegón, Jorge Echegaray y Fernando Jubete, porque son el tipo de personas a las que me gustaría poder parecerme por lo que ellos representan: integridad, constancia, conocimientos y convencimiento en defensa del lobo.



PREFACIO

II. PREFACIO

El lobo ha acompañado al hombre en su periplo evolutivo desde que este comenzó a tener conciencia de sí mismo y posiblemente, según el registro fósil, desde mucho antes de este acontecimiento crucial en la evolución humana.

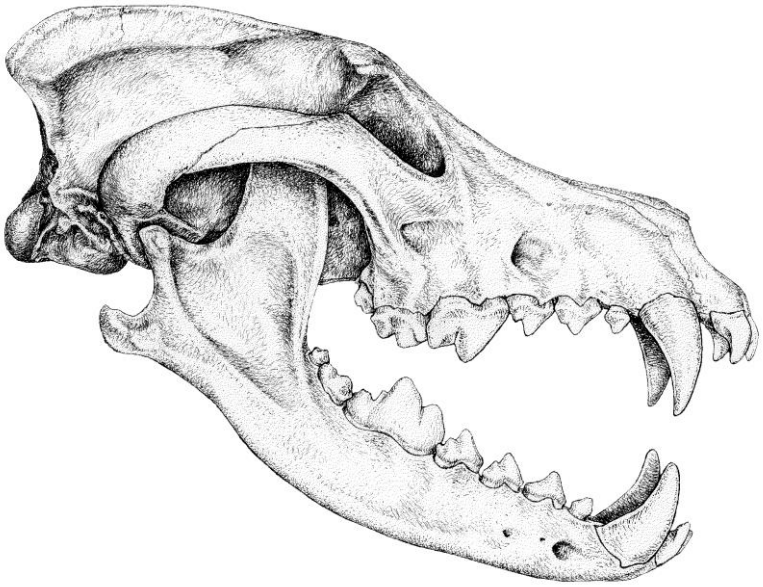
El lobo como especie ha legado al ser humano el animal de compañía más extendido en el mundo, el perro, y el más estudiado desde todos los aspectos posibles, llegando hasta el conocimiento completo de su genoma, casi en paralelo al del genoma humano.

El lobo constituye un eslabón vivo entre el hombre de las cavernas y el hombre actual. Ha recorrido miles de años en la historia del mundo en el que vivimos, fiel a sus costumbres, su forma de alimentarse, de reproducirse y de interactuar con su entorno.

Las costumbres de los grandes carnívoros que interactúan con los intereses del ser humano no son fácilmente aceptadas y de este conflicto se alimenta un ancestral antagonismo entre el lobo y el ser humano. Históricamente, las consecuencias negativas para el lobo han sido desproporcionadas, surgiendo la necesidad de conocer la estructura de las manadas o grupos de lobos, con el fin de adelantar las acciones que permitirán preservar la especie en un hábitat cada vez más hostil para su normal desarrollo vital.

Esta memoria de tesis desea reivindicar a los dientes del lobo como testigos del tiempo, y a *Canis lupus signatus* como testigo de una evolución humana que no siempre ha sido reconocida, pero de la que es protagonista y espectador obligado.

La resistencia de la estructura histológica de los dientes constituye el fundamento del estudio en hallazgos arqueológicos que forman el registro fósil de muchas especies, incluido el hombre. El paso del tiempo, medido en millones de años en algunos casos, no ha podido con la resistencia del esmalte que recubre la corona dental. Una metáfora de esta resistencia se podría adjudicar a la desigual lucha del lobo por sobrevivir. Por eso es un emblema que muchos admiramos y respetamos. Por eso el lobo ibérico ha sido elegido para esta tesis.



ABREVIATURAS

III. ABREVIATURAS

BIC	Bloque incisivo canino
BI	Bloque incisivo
ID	Identificación
CSI Lt	Canino superior izquierdo. Longitud total
CSI Ab	Canino superior izquierdo. Anchura de base
CSD Lt	Canino superior derecho. Longitud total
CSD Ab	Canino superior derecho. Anchura de base
CII Lt	Canino inferior izquierdo. Longitud total
CII Ab	Canino inferior izquierdo. Anchura de base
CID Lt	Canino inferior derecho. Longitud total
CID Ab	Canino inferior derecho. Anchura de base
4º PMI Ab	Cuarto premolar izquierdo. Anchura de base
4º PMI Cusp	Cuarto premolar izquierdo. Cúspide mayor
4º PMD Ab	Cuarto premolar derecho. Anchura de base
4º PMD Cusp	Cuarto premolar derecho. Cúspide mayor
3º ISI Lt	Tercer incisivo superior izquierdo. Longitud total
3º ISI Ab	Tercer incisivo superior izquierdo. Anchura de base
3º ISD Lt	Tercer incisivo superior derecho. Longitud total
3º ISD Ab	Tercer incisivo superior derecho. Anchura de base
CP	Cavidad pulpar
P	Peso
EV	Edad por apreciación visual (desgaste)
ECH	Edad por corte histológico
AC	Anchura de la base del canino superior izquierdo
LC	Longitud total del canino superior derecho

IV. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Vista frontal de los dientes incisivos. Flor de lis
Figura 2	Disposición de los dientes incisivos
Figura 3	Disposición de los dientes caninos
Figura 4	Disposición de los dientes premolares
Figura 5	Dentición decidua
Figura 6	Aspecto general de una dentadura nueva
Figura 7	Desgaste de incisivos superiores
Figura 8	Desgaste de incisivos superiores e inferiores
Figura 9	Aspecto de zonas pigmentadas asociadas al desgaste
Figura 10	Surco de atrición en un canino inferior
Figura 11 y 12	Representación de la medida de BI y BIC
Figura 13 y 14	Representación de la medida del CSD ab y CSD lt
Figura 15 y 16	Representación de la medida del 4º PMD ab y cúspide mayor
Figura 17	Modelo de ficha de biometría
Figura 18	Representación de la obliteración incremental
Figura 19	Captura de pantalla de Adobe Photoshop
Figura 20 y 21	Radiografía e ilustración de la medida de cavidad pulpar
Figura 22	Gráfico de barras. Edad *vs* Corte histológico en relación al sexo
Figura 23	Gráfico de barras. Edad *vs* Apreciación visual en relación al sexo
Figura 24	Gráfico de barras. Edad *vs* Cavidad pulpar en relación al sexo
Figura 25 y 26	Gráfico de dispersión. BIC *vs* CSD Ab / BIC *vs* CSI Ab
Figura 27 y 28	Gráfico de dispersión. BIC *vs* 4º PMD cusp / BIC *vs* 4º PMI cusp
Figura 29 y 30	Gráfico de dispersión. BIC *vs* 4º PMD Ab / BIC *vs* 4º PMI Ab

Figura 31 y 32 Gráfico de dispersión. CP *vs* CSD Ab / CP *vs* CSI Ab

Figura 33 Gráfico de dispersión. CP *vs* BIC

Figura 34 Distribución de los residuos. Gráfico de Bland-Altman

Figura 35 Prueba de normalidad

Figura 36 y 37 Gráficas de dispersión de distribución de los residuos

Figura 38 y 39 Gráficas de dispersión de las variables AC y LC

Figura 40 Anomalía dentaria. Malformación e hipoplasia

Figura 41 Anomalía dentaria. Hipoplasia del esmalte

Figura 42 Anomalía dentaria. Osteolisis del alveolo

Figura 43 Anomalía dentaria. Osteolisis del alveolo

Figura 44 Anomalía dentaria. Poliodoncia

Figura 45 Anomalía dentaria. Poliodoncia

Figura 46 Anomalía dentaria. Abrasión del esmalte

Figura 47 Anomalía dentaria. Oligodoncia

Tabla 1 Representación de la fórmula dental del lobo, decidua o de leche y permanente

Tabla 2 Partes que componen el diente

Tabla 3 Características de los anillos de cemento

Tabla 4 Términos asociados a la actividad de la boca

Tabla 5 Número de raíces presentes en el grupo funcional maxilar y mandibular

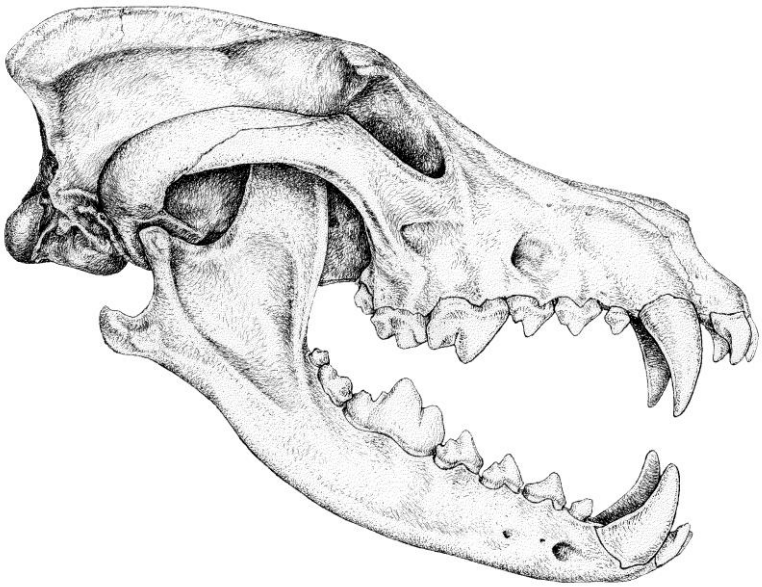
Tabla 6 Estadísticos descriptivos obtenidos entre la técnica de corte histológico *vs* apreciación visual.

Tabla 7 Estadísticos sobre los residuos

Tabla 8 Resumen del procesamiento de los casos

Tabla 9 Tabla de contingencia Edad - Corte histológico (años - categorías)

Tabla 10 Medidas simétricas



ÍNDICE

V. ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS **7**

II. PREFACIO **12**

III. ABREVIATURAS **15**

IV. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS **16**

V. INDICE **20**

1. INTRODUCCIÓN **25**

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO **31**

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **34**

3.1 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL **34**

3.1.1 MORFOLOGÍA DENTAL Y DENTICIÓN EN *Canis lupus* **36**

3.1.2 DESCRIPCIÓN GRUPOS FUNCIONALES **39**

3.1.2.1 INCISIVOS **39**

3.1.2.2 CANINOS **41**

3.1.2.3 PREMOLARES **41**

3.1.2.4 MOLARES **41**

3.1.3 TERMINOLOGÍA Y PARTES ANATÓMICAS DE INTERÉS **42**

3.2 TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DEL ORDEN CARNIVORA **51**

3.2.1 ORDEN CARNIVORA **52**

3.2.2 FAMILIA CANIDAE **53**

3.2.3. EL LOBO COMO ESPECIE *Canis lupus* **54**

3.2.4. EL LOBO IBÉRICO *Canis lupus signatus* **55**

3.3 TÉCNICAS DE DATACIÓN. EDAD DENTAL **56**

3.3.1 DATACIÓN POR APRECIACIÓN VISUAL (DESGASTE) **65**

3.3.2 DATACIÓN POR ESTUDIO DE LA CAVIDAD PULPAR **75**

3.3.3 DATACIÓN POR MEDIDA BIOMÉTRICA DE LOS DIENTES **80**

3.3.4 DATACIÓN POR CORTE HISTOLÓGICO **81**

4. MATERIAL Y MÉTODOS **84**

4.1. MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO **85**

4.1.2 MATERIAL INVENTARIABLE **86**

4.1.3 MATERIAL FUNGIBLE **88**

4.2 MÉTODOS **90**

4.2.1 BIOMETRÍA DE LOS CADÁVERES **90**

4.2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS (CRÁNEOS) **90**

4.2.3 EXTRACCIÓN DE LOS DIENTES **90**

4.2.4 PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS **92**

4.2.5 DATACIÓN POR APRECIACIÓN VISUAL **93**

4.2.6 DATACIÓN POR BIOMETRÍA DENTAL **94**

4.2.7 DATACIÓN POR VALORACIÓN DE LA CAVIDAD PULPAR **100**

4.2.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO **103**

5. RESULTADOS **106**

5.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA **106**

5.2 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DEL CORTE HISTOLÓGICO **106**

5.3 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA APRECIACIÓN VISUAL **108**

5.4 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA CAVIDAD PULPAR **109**

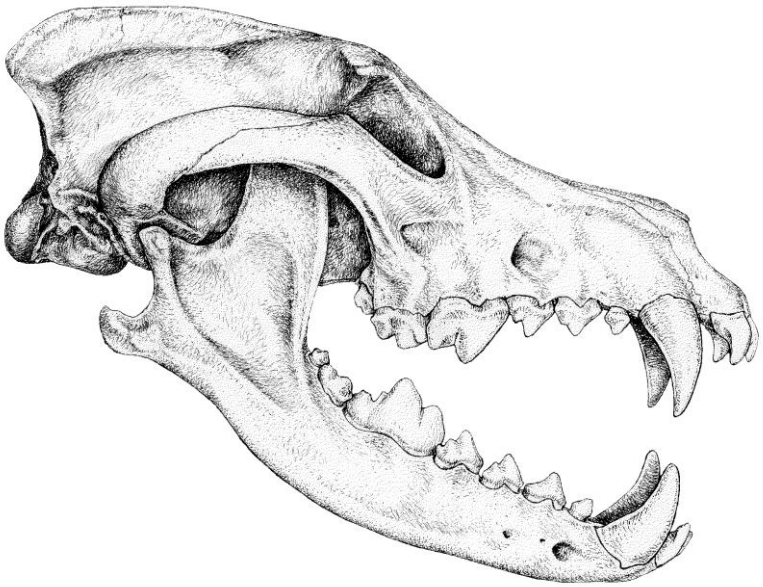
5.5 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA BIOMETRÍA DENTAL **110**

5.6 CONCORDANCIA ENTRE MÉTODOS DE DATACIÓN **118**

5.6.1 CORTE HISTOLÓGICO *vs* APRECIACIÓN VISUAL **118**

5.6.2 CORTE HISTOLÓGICO *vs* CAVIDAD PULPAR **121**

5.7 DESARROLLO DE UNA FÓRMULA DE DATACIÓN EN BASE A TÉCNICAS BIOMÉTRICAS 125
5.8. OTRAS VARIABLES 130
5.8.1 PESO 130
5.8.2 ANOMALÍAS DENTARIAS 131
6. DISCUSIÓN 136
6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 137
6.2 SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE DATACIÓN 138
6.3 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DEL CORTE HISTOLÓGICO 139
6.4 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA APRECIACIÓN VISUAL 143
6.5 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA CAVIDAD PULPAR 146
6.6 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA BIOMETRÍA DENTAL 149
6.7 CONCORDANCIA DE LOS MÉTODOS DE DATACIÓN 151
6.8 MODELOS DE REGRESIÓN 151
6.9 OTRAS VARIABLES 152
6.10 RESUMEN DE RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE DIENTES DE CARA A LA DATACIÓN DE ESPECÍMENES 155
7. PROYECTOS DE FUTURO 158
8. CONCLUSIONES 162
9. BIOSEGURIDAD 165
10. RESUMEN 170
11. SUMMARY 171
12. BIBLIOGRAFÍA 172
13. APÉNDICES 183
APENDICE I. TABLAS DE DATOS EN BRUTO 183
APENDICE II. ESTUDIO FOTOGRAFICO 193
APENDICE III. GRÁFICAS ESTUDIO ESTADÍSTICO 225



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Se han estudiado diversos métodos de datación, entre los más destacados, varios relacionados con la dentadura de los mamíferos, que van desde la simple observación de las modificaciones experimentadas por la erupción y el desgaste, la medición de longitud y el grosor de las piezas dentales y de la extensión de la cavidad pulpar, hasta métodos más invasivos como el estudio de los anillos de cemento a través del corte histológico de un diente. En el ámbito de la medicina humana, uno de los estudios pioneros en estructuras dentales data de mediados del S. XX, cuando por primera vez se acuñó el término “antropología dental” (Klastky y Fisher, 1953). Los dientes poseen una resistencia estructural que les permite permanecer prácticamente inalterados con el paso del tiempo. Es posible aislar ADN de su estructura contribuyendo al estudio, entre otros aspectos, de la ecología, el comportamiento y la dieta del organismo al que han pertenecido.

Paralelamente, empezaron a surgir los primeros estudios en los que a la morfología y estructura se sumaron otras variables, como la edad del individuo. A tenor de esta nueva tendencia, Laws (1952), como fruto de sus investigaciones, demostró que la dentina y los anillos de cemento estaban correlacionados con la edad. Klevezal y Kleinenberg (1967) ofrecieron una completa revisión sobre la aposición incremental de la dentina, cemento y el tejido óseo relacionada con la edad. Morris (1972), a su vez, publicó una revisión general sobre los diferentes métodos de determinación de edad en mamíferos. Contar los anillos de cemento de un diente es una de las medidas más precisas de determinación de la edad para muchas especies de mamíferos (Thomas, 1977).

Otros métodos, como el peso de los cristalinos, el cierre de las suturas craneales o el estudio de la maduración y consolidación de los cartílagos de crecimiento, la longitud y el peso del hueso peneano, aportan puntos de referencia complementarios en la apreciación de la edad de un individuo, pero ninguno por sí solo tiene la entidad necesaria para ser considerado como el método más idóneo. Se debería considerar a la estimación de la edad como **el** conjunto de indicadores que permiten establecer, con un rango mínimo de error, la edad de un individuo.

La importancia de este establecimiento preciso de la edad de los individuos de una determinada especie en un ecosistema dado radica en que el estudio de la distribución de la edad y la proporción entre sexos constituye uno de los pilares básicos para la investigación demográfica de una población. Conocer la edad es un requisito estadístico imprescindible para la estratificación de una población en base a su pirámide poblacional. Los distintos grupos de edad que conforman una manada de lobos, pueden tener requerimientos nutricionales distintos, necesidades de espacio vital diferentes así como una dinámica poblacional poco predecible si no se conocen las distintas edades que lo componen. Por otra parte, conocer la distribución de estos grupos de edad es un valioso indicador de la salud global y las perspectivas de futuro de esa misma manada y, por ende, del ecosistema en el que se asienta.

La dinámica de una población no se puede determinar sin información precisa sobre la composición de la edad, la edad de madurez sexual, la edad de la primera reproducción y longevidad natural (Myrick *et al.,* 1983; Hohn, 2002).

Conocer los indicadores de edad y la precisión con que éstos la miden, la facilidad para llevarlos a cabo, así como el impacto que su medición puede representar

para el animal vivo, requiere la comprensión de una gama amplia de posibilidades cuando se intenta datar ejemplares de la especie *Canis lupus signatus*.

Además, el estudio de la distribución de la edad en un grupo de lobos, proporciona información esencial para la estimación de la fecundidad, la dinámica de la población, o las tasas de mortalidad (Hohn, 2002).

La gran variedad de cambios morfológicos que sufre un animal a lo largo de su vida, justifica la elaboración de protocolos que permitan al menos una aproximación al cálculo de su edad.

Estos cambios pueden ser fácilmente perceptibles y medibles, como la erupción de los dientes, el cambio de dentición de leche a permanente, el aumento de peso y de volumen, el cambio de pelaje, y otros más difíciles de valorar o imperceptibles, como el cambio en la transparencia y elasticidad del cristalino, el desgaste de las articulaciones y la rigidez de la columna vertebral por envejecimiento progresivo de los discos intervertebrales, así como la artrosis progresiva del esqueleto óseo.

El estado de la dentición se ha relacionado desde tiempos inmemoriales con el vigor y las expectativas de vida, basta recordar el triste ejemplo del comercio humano en los mercados esclavistas del siglo XVII y XVIII, donde los esclavos eran seleccionados por el estado de su dentadura como un certificado de su vigor físico.

Dentro del grupo de los carnívoros, existen diversos estudios que abarcan un gran número de especies en los cuales se ha estudiado su dentadura, por ejemplo, *Canis lupus*, *Canis latrans*, *Enhydra lutris*, *Crocuta crocuta*, *Panthera pardus,*

Vulpes vulpes y otros carnívoros (Garshelis, 1984; Stander, 1997; Landon *et al.,* 1998, van Horn *et al*., 2003; González Machado, 2004; Fajardo Tolosa, 2008).

Todas las técnicas disponibles para la estimación de la edad en carnívoros tienen elementos de subjetividad (Gipson *et al*., 2000). Esta subjetividad, sin embargo, se puede minimizar a través de un correcto, metódico y extenso proceso de validación. Para estudios de la edad, se necesitan *tejidos que sufran procesos incrementales medibles*, con el fin de estandarizar con qué frecuencia ocurren los cambios y de qué forman quedan impresos para poder ser cuantificados.

Gipson et al. (2000) sugieren que es necesario desarrollar metodologías no invasivas, fiables y de bajo coste que permitan determinar la edad en los lobos. Una de las técnicas más extendidas ha sido contar los anillos de cemento (y dentina en algunos casos) en los dientes (Ballard *et al.,* 1995; Landon *et al.,* 1998), aunque para llevar a cabo esta metodología de investigación de la edad, el diente debe ser extraído, hecho que obliga a considerar esta técnica dentro de los procedimientos invasivos, que como tal podría acarrear problemas al individuo. Dimmick y Pelton (1994) proponen desarrollar técnicas alternativas que cumplan los requerimientos de bienestar animal, evitando problemas asociados a la extracción de la pieza dentaria (ej. dolor, pérdida de funcionalidad, etc).

Basándonos en el estudio de la dentadura del lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) se analizan distintos métodos de estimar la edad, a través de los cambios que experimenta la dentadura desde el nacimiento.

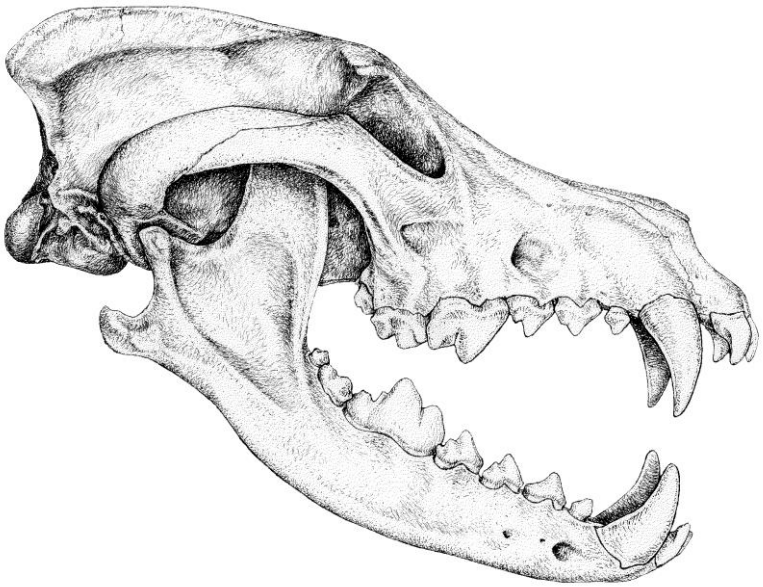
Los componentes estructurales del diente sufren cambios durante toda la vida del individuo, en forma de desgaste, cambiando la fisonomía original de la pieza

dentaria por dos causas principales: 1) **abrasión**: producida por el contacto con materiales extraños, asociados a la alimentación, al juego y al acicalamiento, y 2) **atrición**: producto del contacto diente con diente.

En muchas especies de mamíferos, los anillos de cemento se incrementan con una periodicidad constante, dejando marcas objetivas y cuantificables que se pueden correlacionar con la edad del individuo. La consistencia física de la comida (textura) y su contenido en materiales abrasivos, son las principales acciones que influyen en el desgaste dental (Schatten, 2012). La estacionalidad de los partos en el lobo, la erupción de los dientes y el cambio a la dentición de adulto (paso de la dentición decidua o "dientes de leche" a la dentición permanente), la variación de tamaño que experimentan los cachorros desde el nacimiento hasta la consolidación de su peso y tamaño adulto, permiten una fácil aproximación de la edad en esta etapa. Incluso, aunque coincidan los tamaños en el paso de subadulto a adulto, la radiografía de la cavidad pulpar ofrece resultados inequívocos que permiten discriminar a los ejemplares más jóvenes de los adultos de edad indeterminada.

Tradicionalmente se ha utilizado en diversas especies la erupción de los dientes (el cambio de dentición de leche a dentición permanente) así como el desgaste de la dentadura como pauta de valoración de la edad.

Por todo lo anteriormente expuesto, los dientes constituyen una gran fuente de datos para diferentes ciencias como la arqueología, antropología física, medicina legal y forense, odontología, paleontología, paleozoología, zoología y biología de fauna silvestre en general y biología de la conservación en particular.



OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo genérico

La presente tesis doctoral tiene como objetivo la comparación de diferentes métodos de estimación de la edad en el lobo ibérico, con el fin de poder determinar cuál de ellos aporta mayor fiabilidad para la determinación de la edad en estudios poblacionales, así como en investigación forense o la simple separación de grupos de edades en colecciones de museo. Con este fin se compararán con respecto a un método de referencia, otras formas de medir la edad en la especie *Canis lupus signatus* (Cabrera, 1907), en base a los datos obtenidos de la dentadura de los ejemplares en estudio.

Objetivos específicos

Pretendemos alcanzar este objetivo genérico a través de los siguientes objetivos específicos:

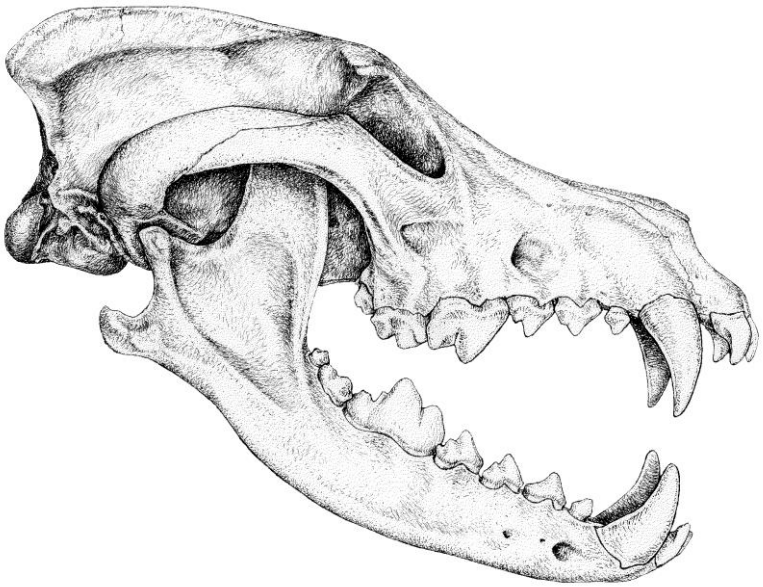
1. Validación de la fiabilidad y precisión de la datación mediante medidas determinadas con calibre para cada tipo de diente seleccionado (biometría dental), aplicadas sobre caninos superior e inferior, tercer incisivo superior y cuarto premolar superior o muela carnicera, así como medidas en conjunto de los dientes incisivos superiores (bloque incisivo) y de los dientes incisivos superiores más los caninos superiores (bloque incisivo + caninos).

2. Validación de la fiabilidad y precisión de la datación mediante medidas obtenidas del estudio radiográfico de la cavidad pulpar de los caninos, valorando las imágenes obtenidas a través de la digitalización de la imagen radiográfica y posterior tratamiento en un software de edición de imágenes.

3. Validación de la fiabilidad y precisión de la datación mediante medidas obtenidas de la valoración de los anillos de cemento a través del corte histológico de un diente seleccionado para el estudio (preferiblemente, 1er premolar inferior, o, en su defecto, 1er premolar superior o el 3er molar inferior, debido a su condición de unirradicular, raíz suficiente para el estudio y al hecho de producir el menor impacto estético sobre la colección de cráneos).

4. Validación de la fiabilidad y precisión de la datación mediante valoración visual del desgaste de los incisivos, colmillos, impresiones de atrición y coloración en informes de necropsia. Esta forma tradicional de asignación de edad conlleva un error de subjetividad ligado a la experiencia del observador, la congruencia de la dentición y la naturaleza de la textura del alimento entre otras muchas variables, pero su simplicidad sumada a la posibilidad de establecer un patrón de desgaste comparado y estadísticamente establecido, con la base de datos paramétricos contrastables, como los mencionados con anterioridad, puede transformar este método de datación en un objetivo atractivo para trabajos de investigación posteriores.

5. Determinación del método que por sí solo, o de los métodos que conjuntamente, pueden considerarse como de mayor fiabilidad para la asignación de la edad en *Canis lupus signatus*, ajustándose a criterios de: fiabilidad, estandarización, costos del procedimiento, rapidez y sencillez.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL

El concepto de ***adaptación dental*** es de suma importancia en el proceso de evolución de una especie, llegando a determinar su éxito evolutivo o su desaparición por falta de adaptación a la oferta de alimentos de un nicho ecológico determinado. Crusafont y Truyols (1956) definieron los términos de *hipercarnívoros* y de *hipocarnívoros* basados en su morfología dental.

HIPERCARNÍVORO es el animal en el que se ha alargado la superficie de corte de las muelas carniceras (tijera formada por el cuarto premolar superior y primer molar inferior) en base a disminuir la superficie de trituración o molienda de los molares. El ejemplo más característico de animal hipercarnívoro es el gato y la mayoría de los grandes felinos. Esta adaptación parece tener un punto de partida en la gran oferta de recursos alimenticios (ej. carne) para alimentarse (Wang y Tedford, 2008), más que la opción contraria, es decir una especialización a partir de un diseño de dentición previo *("la comida hace al diseño y no al revés"*) (Wang , 2008; Derr, 2011).

HIPOCARNIVORO*,* en contraste, es un animal que ha sufrido una disminución de la especialización y superficie de corte (muelas carniceras) en base a aumentar la zona de trituración o molienda (molares). El ejemplo más característico de hipocarnívoro es el oso. Un animal con esta dentición tiende a tener una dieta mucho más variada que incluye, por ejemplo, carne, insectos, frutos y raíces (Wang y Tedford, 2008).

MESOCARNÍVOROS: Los cánidos en general y el lobo en particular se encuentran a medio camino de estas dos especializaciones dentales en base a la dieta, pudiendo ser definidos como mesocarnívoros**,** ya que poseen una dentición intermedia, ni especialmente hipercarnívora como muchos componentes de la familia Felidae, ni particularmente hipocarnívora como los mencionados de Ursidae. Esta adaptación es la que, sin duda, ha permitido el éxito evolutivo de muchos grupos de cánidos en entornos cambiantes de la prehistoria (Derr, 2011).

Wang y Tedford (2008) afirman que aquellos grupos de cánidos que no pudieron adaptarse debido a una estructura poco plástica y muy conservadora de su dentición, como los cánidos ancestrales *Hesperocyon, Archaeocyon y Leptocyon,* desaparecieron por esta falta de adaptación dental evolutiva. Sin duda, el lobo representa el éxito de miles de años de evolución, y su transferencia de información filogenética al perro doméstico confirma el enorme valor de *Canis lupus signatus* como ejemplo adaptativo a variados cambios climáticos (que caracterizaron el final del Pleistoceno), de entorno y de especialidad hostilidad (glaciación, falta de recursos, competencia) de acuerdo al avance de la evolución de la especie humana.

El estudio de la dentición es una fuente de información muy amplia acerca de la edad, la salud, de diversos procesos de enfermedad y en el estudio de paleontología de vertebrados, una puerta abierta al conocimiento de la dieta durante la evolución de muchas especies (Wang , 2008).

La característica común a la mayoría de los mamíferos de nacer con una dentición y tras un tiempo de adaptación pasar a tener una dentición permanente,

se define como dentición *difiodonta*, y el poseer distintos tipos o formatos de dientes, se clasifica como dentición *heterodonta*.

Los animales que nacen sin dientes son definidos como *edéntulos*, en esa primera etapa de su vida. El período que abarca desde el nacimiento hasta la aparición de los dientes se corresponde con una etapa fundamental en la vida de los mamíferos: la lactación, que comienza en el momento del nacimiento y finaliza durante la erupción y consolidación de la dentición de leche. Los primeros estímulos dolorosos que provocan los cachorros en las glándulas mamarias con sus incipientes dientes, son los primeros anuncios del inicio del destete. Las dos generaciones de dientes, y su distinta etapa de aparición, conocidas coloquialmente como "*dientes de leche*" y "*dientes permanentes*", permiten establecer períodos de tiempo bastante regulares para la especie en estudio, pero esta posibilidad de datación se limita a la etapa entre el período de erupción y el cambio a la dentición permanente.

3.1.1 MORFOLOGÍA DENTAL Y DENTICIÓN EN *Canis lupus*

El lobo ibérico (*Canis lupus signatus)* pertenece al orden Carnivora, Familia Canidae. Los carnívoros son **mamíferos placentarios** (euterios) que tienen el cuarto premolar superior y el primer molar inferior desarrollados y con función cortante (Fernández Salvador, 1991). El conjunto cumple una función de tijera, cortando el tejido muscular de las presas. Al cuarto premolar se lo denomina "muela carnicera".

- Familia Canidae

Siguiendo la clasificación de Martin (1989), los cánidos son carnívoros que se caracterizan, en cuanto a su dentadura, por tener la dentición más primitiva dentro de los caniformes, ya que no han sufrido reducción o pérdida de piezas en la evolución. Conservan el tercer molar y un talónido bicúspide en el primero (Fernández Salvador, 1996).

Los cánidos ocupan una gran variedad de hábitats en el mundo, desde los desiertos más hostiles a la Antártida y los trópicos. Dentro de esta familia se encuentran especies con pautas de conducta y comunicación muy elaboradas, que permiten la cohesión del grupo, así como tareas grupales de búsqueda de alimento y caza. Un claro ejemplo de la Familia Canidae, el lobo (*Canis lupus*), es una especie de depredador flexible y oportunista (Peterson y Ciucci, 2003) que habita en todos los tipos de vegetación presentes en el Hemisferio Norte, y es uno de los mamíferos más adaptables (Mech y Boitani, 2003).

La mayoría de las especies son maduras sexualmente con un año de vida, excepto el caso particular del lobo, que no alcanza la madurez sexual hasta el tercer año de vida aproximadamente. Las crías suelen abrir los ojos entre los 7 a 15 días, siendo cuidadas y amamantadas hasta la aparición de los primeros dientes, entre la tercera y cuarta semana de vida.

El cachorro de lobo nace sin dientes. En las primeras tres semanas de vida comienza con la erupción de la dentición de leche, hasta completar un total de 28 piezas deciduas (“de leche”).

Si falta un diente deciduo, también faltará el permanente, ya que ambos se desarrollan a partir de los mismos tejidos embrionarios (Wiggs y Lobprise, 1997).

Estos dientes de transición, son reemplazados por una dotación permanente de 42 dientes repartidos según las fórmulas dentales detalladas a continuación (Tabla 1).

- FÓRMULA DENTAL

La fórmula dental define, mediante números y letras, la cantidad y tipos de dientes presentes en la especie.

Existen diversas fórmulas para describir el tipo, número y función de los dientes en los mamíferos, que dependiendo de los autores y la especie, varían en cuanto a la información que recogen y también los datos que aportan.

La complejidad de muchas de ellas, hace que prácticamente hayan entrado en desuso, ya que en forma teórica aportan mucha información, pero son poco útiles y difíciles de utilizar en las tareas rutinarias de clínica o de campo.

Así mismo, al utilizar muchas de ellas códigos alfanuméricos y gráficos, son complicadas de informatizar para someterlas a estudios estadísticos extensos.

Por ello, aunque a continuación se describirán los modelos más utilizados en odontología veterinaria y en descripción de los dientes en carnívoros, en este trabajo de tesis se utilizará una simplificación del sistema taquigráfico dental de identificación anatómica (Holstrom, 1994), denominando a cada diente con un número ordinal para identificar su posición, seguido de una letra para indicar su función (I= incisivo, C= canino, PM= premolar y M= molar) y por último, el hueso al que están fijados (mandíbula o maxilar), pudiendo esto último reemplazarse, en algunos casos, por superior o inferior. Se diferencia el tipo de dentición (decidua o

permanente) utilizando letras minúsculas para la primera y mayúsculas para la segunda.

Cuando la descripción de la boca se hace en conjunto, es decir, que se habla de los 42 dientes en total, no es necesario hablar de izquierda o derecha, pero en el caso de describir anomalías dentarias, si es preciso mencionar su posición en la simetría longitudinal

La fórmula siempre refiere a una mitad, superior e inferior, representada como si fuera una fracción, donde el numerador representa a un hemimaxilar y el denominador a una hemimandíbula; por consiguiente para saber el número total de dientes representado en la fórmula, se debe multiplicar por 2.

Tabla 1. Representación de la fórmula dental del lobo, decidua o de leche y permanente.

	FÓRMULA DENTAL
DECIDUA O DE LECHE	$2 \text{ x } \frac{3i\ 1c\ 3pm\ 0m}{3i\ 1c\ 3pm\ 0m} = 28$ dientes
PERMANENTE	$2 \text{ x } \frac{3I\ 1C\ 4PM\ 2M}{3I\ 1C\ 4PM\ 3M} = 42$ dientes

3.1.2 DESCRIPCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES

3.1.2.1 INCISIVOS

Número total: 12 (6 superiores o maxilares y 6 inferiores o mandibulares). Los incisivos son relativamente anchos, sin ninguna especialización funcional, salvo las de ritualización sexual (*display*), acicalamiento (Hawkins, 2003) o advertencia,

cuando se exteriorizan, junto con los caninos, retrayendo los belfos (labios superiores).

Se hallan dispuestos verticalmente y muy juntos entre sí. Aumentan de tamaño del primero al tercero (de la posición central a la lateral). Forman un bloque con una ligera convexidad labial (externa) y concavidad lingual (interna). Los incisivos superiores son trilobulados, denominándose esta formación como “flor de lis”, debido a la similitud con esta figura, mientras que los incisivos inferiores son bilobulados (Figura1).

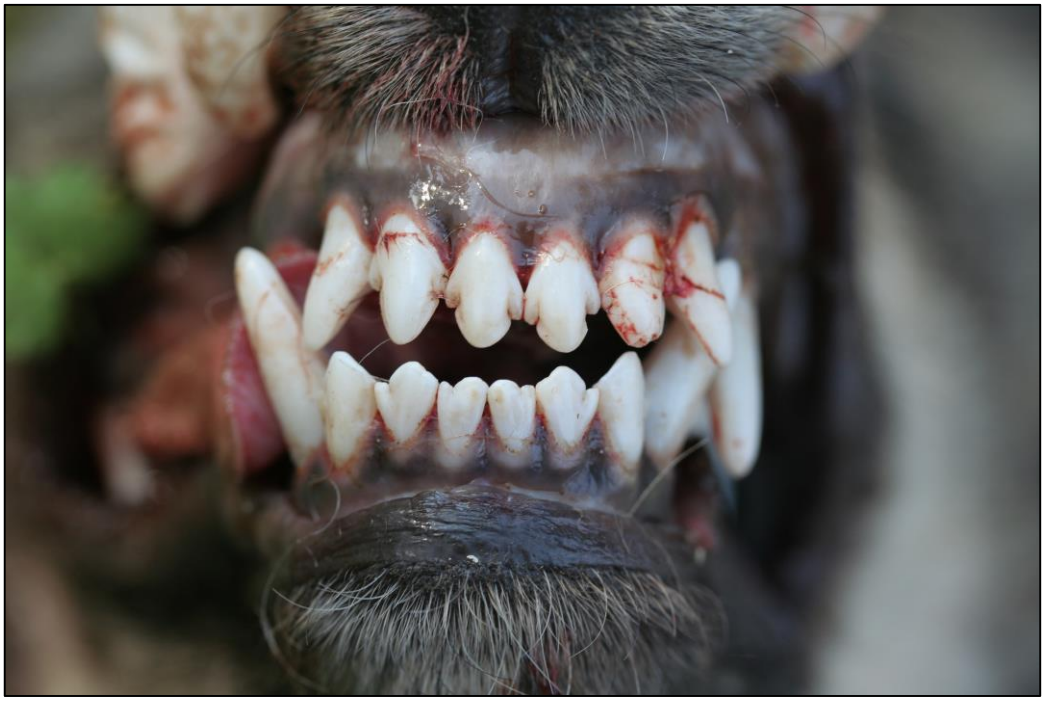


Figura 1. Imagen donde se aprecia la disposición y las formaciones que caracterizan a los incisivos superiores trilobulados (“flor de lis”) e inferiores bilobulados.

3.1.2.2 CANINOS

Número total: 4 (2 superiores o maxilares y 2 inferiores o mandibulares). Los caninos, también denominados colmillos, son grandes, cónicos y curvos. Están separados del tercer incisivo superior por un diastema (separación entre dientes) que es ocupado por el canino inferior o colmillo inferior cuando la boca está cerrada.

3.1.2.3 PREMOLARES

Número total: 16 (8 superiores o maxilares y 8 inferiores o mandibulares). Los premolares presentan proyecciones agudas con bordes cortantes. Están comprimidos lateralmente y separados por pequeños espacios entre sí. No existe precursor deciduo del primer premolar (Hawkins, 1992).

3.1.2.4 MOLARES

Número total: 10 (4 superiores o maxilares y 6 inferiores o mandibulares). Ocupan el lugar más caudal en la distribución anatómica. La superficie masticatoria es cuadrangular y multilobulada. En condiciones normales se encuentran 4 molares superiores (2 en cada hemimaxilar) y 6 molares inferiores (3 en cada hemimandíbula). No existen precursores deciduos de los molares (Hawkins, 1992). Los carnívoros en general cuentan con menos superficie masticatoria, y dentro de ellos la familia *Felidae* mucho menos que la *Canidae* (Gorrel, 2010).

3.1.3 TERMINOLOGÍA Y PARTES ANATÓMICAS DE INTERÉS EN LA DATACIÓN DENTAL.

El estudio del diente de un carnívoro exige la comprensión o el conocimiento, siquiera somero, de las partes que lo componen. Así, clásicamente se estudian las siguientes partes: esmalte, dentina, cemento, pulpa y periodonto o tejido periodontal (Tabla 2, Cate 1998; Ash 2003; Boitani 2012).

Tabla 2. Partes que componen el diente.

Esmalte	El esmalte es el tejido mineralizado (hidroxiapatita) más duro del organismo, si bien el de los Canidae / Felidae es más delgado que el del ser humano. Se trata de un tejido sin vascularización y sin inervación, que carece de capacidad regenerativa..
Dentina	Es el tejido más representado en la estructura del diente. Se forma y deposita durante toda la vida del animal. Se puede clasificar en dentina primaria, secundaria o fisiológica y terciaria o reparadora.
Cemento	Tejido avascular muy similar al hueso. Está menos calcificado que el esmalte y la dentina. Se deposita en forma cíclica durante toda la vida del animal, constituyendo la base del estudio de la edad a través del estudio secuencial de los anillos (annuli) de cemento
Pulpa	Tejido conjuntivo delimitado por odontoblastos. Se encuentra abierto en el ápice radicular en el animal joven y a través de aberturas o foraminas en el animal adulto. El cierre de la abertura radicular, también constituye un parámetro a ser considerado, juntos con otros, para la determinación de la edad.
Tejido periodontal	Es el tejido de sostén y anclaje del diente en los alvéolos óseos mandibulares y maxilares. Otorga elasticidad a la unión diente – alvéolo durante la prensión, desgarro, corte y masticación. Es un tejido muy vascularizado e irrigado

El hecho de que el cemento se deposite, a lo largo de toda la vida del animal, de forma cíclica, determinando la aparición de capas o anillos que se van superponiendo anualmente, ofrece una excelente posibilidad de datación de especímenes, en base a las particulares características que adquiere, que se reflejan en la Tabla 3 (Hawkins, 2003).

Tabla 3. Características de los anillos de cemento .

Anillos	Capas anuales de cemento que se pueden visualizar en un corte histológico. Están compuestas de dos bandas, una clara y una oscura. La clara se desarrolla con mayor grosor y corresponde a la época de primavera – verano, y la capa más oscura es más fina y se corresponde con la estación de otoño – invierno.
Cemento	El cemento es hueso modificado que cubre la raíz, como el esmalte cubre la corona. Una nueva capa de cemento se añade con el transcurrir de los años.
Cemento oscuro o línea oscura	Se caracteriza por ser un cemento acelular y que capta los colorantes con mayor intensidad. Se produce principalmente en invierno, aunque también se puede producir en otras épocas del año, aunque no con la intensidad que se corresponde al invierno.
Cemento claro	Tiene un componente celular abundante y no capta tan intensamente los colorantes histológicos. Se produce fundamentalmente en primavera – verano.

Los anillos de cemento se identifican fácilmente en el corte histológico del diente precisamente por los diferentes colores o tonalidades de los distintos tipos de cemento (cemento claro u oscuro), que al depositarse preferiblemente en una determinada época del año o situación, facilitan la datación de especímenes. Así,

durante el invierno, cuando el diente está creciendo más lentamente, la mancha es más oscura que en verano, cuando el crecimiento es más rápido. (Klevezal et al, 1969), (Grue, 1976), (Grue y Jensen, 1979)

En el estudio del corte histológico del diente del lobo, de cara a su datación, hemos de tener presente que la raíz no se cierra hasta el primer año, por lo que la primera línea de cemento que se observa alrededor del ápex ("la primera línea que da la vuelta") corresponde al segundo año de vida del animal (Matson, 1981).

Por otra parte, estas líneas de cemento proporcionan otros datos de gran valor a la hora de estimar aspectos de vital importancia ecológica para las manadas y los ecosistemas en estudio: así, por ejemplo, el hecho de que, durante la cría, el calcio circulante en la hembra se destine principalmente a la producción de leche, explica que las líneas sean más difusas o puedan incluso estar ausentes, de modo que, por este tipo de eventos que quedan "impresos" en la estructura interna del diente, es posible saber cuándo una hembra ha amamantado, y con un estudio detallado de las líneas del diente, se podría saber cuántas veces ha parido (Rogers, 1975).

Otros investigadores sugieren que la formación de los anillos de cemento responde a cambios metabólicos, estableciendo diferencias entre ellos, debido entre otras causas a la escasez invernal y la abundancia primaveral de alimento (Klevezal y Kleinenberg, 1969; Grue, 1976; Grue y Jensen, 1979). En carnívoros, coincidiendo con el aumento del fotoperíodo estival, se producen eventos metabólicos y hormonales (aumento de la secreción de melatonina, aumento de la prolactina, aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina) que podrían estar

relacionados con la definición de los anillos de cemento (Bubenik *et al.,* 1986), tal como se ha estudiado en ungulados de vida silvestre.

Otros conceptos de interés en cualquier intento de datación del lobo a través de las características de sus dientes son los de oclusión y maloclusión, asociados a la actividad masticatoria, tal y como se definen en la Tabla 4.

Tabla 4. Términos asociados a la actividad de la boca.

OCLUSIÓN [1]	Se denomina oclusión al cierre de la boca que permite el contacto de distintas superficies de los dientes entre sí.
MALOCLUSIÓN	La coaptación inexistente o inadecuada entre dientes maxilares y mandibulares se denomina maloclusión. En la mayoría de los casos se debe a factores genéticos de carácter poligénico (ya que se atribuye un origen hereditario a la longitud de la mandíbula, así como a la posición del diente embrionario o germen dentario), y también a factores ambientales (Gorrel, 2010). La falta de congruencia en la maloclusión o “mordida” también puede ser de origen traumático o adquirido.

[1] OCLUSION O MORDIDA NORMAL

Se caracteriza por:

1. Mordida en tijera (Harvey y Emily, 1993) de los dientes incisivos. Los incisivos superiores son rostrales (están por delante) de los incisivos inferiores, durante la oclusión o mordida (Figura 2)

Figura 2. En la imagen se observa la posición rostral de los incisivos superiores en relación a los inferiores cuando la boca está cerrada.

2. Existe interdigitación de los caninos. El canino inferior ocluye en el diastema entre el tercer incisivo superior y el canino superior, quedando equidistante entre ambos (Figura 3)

Figura 3. La imagen destaca el espacio o diastema entre el tercer incisivo superior y el canino superior que ocupa el canino inferior cuando la boca está cerrada.

3. Existe interdigitación de los premolares. El primer premolar inferior debería ser el más rostral de todos los premolares; las cúspides de los premolares ocluyen con los espacios interdentales opuestos (no contactan entre sí), es lo que se denomina efecto cizalla (De Bowes, 1995) (Figura 4)

Figura 4. Los premolares ocupan el espacio entre los caninos y los molares, contribuyendo, por su forma y disposición al corte y prensión del alimento. Su tamaño aumenta en forma progresiva en dirección oral - aboral.

4. Existe una relación premolar – molar característica. La superficie lateral (mesiovestibular) del primer molar inferior debe cerrar (ocluir) sobre la superficie oclusal palatina (medial) del primer molar superior.

Los carnívoros no tienen una dentición adaptada a la trituración, favorecida por la práctica ausencia de movimientos laterales (Dyce *et al*., 2007). Si a esta limitación biomecánica le sumamos la escasa superficie para la molienda del alimento (superficie oclusal de los molares) podríamos definir a los carnívoros de la familia Canidae en particular, como trituradores deficientes.

La adaptación a distintos tipos de dietas (García-Perea, 1996) ha llevado a los investigadores a reconocer taxones hipercarnívoros como *Felidae y Mustelidae* con escaso desarrollo morfológico y funcional de la dentición postcarnicera (molares) y alta especialización en caninos y premolares; taxones intermedios (mesocarnívoros) como *Canidae* que comen carne pero también vegetales, reteniendo la fisiología y morfología cortante y trituradora, y los taxones hipocarnívoros, como *Ursidae y Procyonidae* con especial desarrollo de las estructuras postcarniceras, con función trituradora (molares), mientras que la función cortante es prácticamente inexistente. (Flynn *et al.,* 1988).

En el orden Carnivora, los primeros molares inferiores (componente de la tijera, junto con el cuarto premolar superior) están situados en un punto situado a mitad de distancia entre la articulación temporomandibular y los incisivos. Según Greaves (1983), esto supone una disposición geométrica óptima para la fuerza (potencia) de la mordida, con una apertura máxima de la boca.

Por último, el hecho de mantener la principal función cortante en dos dientes, (4º PM superior y 1º M inferior) ha permitido a los Carnivora una enorme capacidad de adaptación a distintos tipos de dieta, ya que el resto de los componentes de la dentición (38 si se restan los 4 con función cortante), fueron adaptándose, junto con el orden, permitiendo un mayor éxito evolutivo (García-Perea, 1996).

Tabla 5. Número de raíces presentes en el grupo funcional maxilar y mandibular.

Grupo funcional maxilar	**Nº raíces**
Incisivos, caninos y 1º premolar	1
Premolar 2º y 3º	2
Premolar 4º y 1º y 2º molar	3
Grupo funcional mandibular	
Incisivos, caninos y 1º premolar	1
Premolar 2º 3º, 4º y 1º molar, 2º molar	2
3º molar	1

3.2 TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DEL ORDEN

- **Sistemática**

Orden CARNIVORA (Bowdich, 1821) CARNÍVOROS

Suborden CANIFORMIA (Kretzoi, 1945) CANIFORMES

Familia CANIDAE (Fischer, 1817) CÁNIDOS

Género *CANIS* (Linnaeus, 1758) Lobos, chacales y coyotes

Canis adustus (Sundevall, 1847) Chacal rayado

Canis aureus (Linnaeus, 1758) Chacal dorado

Canis latrans (Say, 1823) Coyote

Canis lupus (Linnaeus, 1758) **Lobo**

Canis mesomelas (Schreber, 1775) Chacal de lomo negro

Canis rufus (Audubon y Bachman, 1851) Lobo rojo

Canis simensis (Rüppell, 1840) Lobo de Abisinia

3.2.1 ORDEN CARNIVORA

Los carnívoros son mamíferos placentarios (euterios) que tienen el cuarto premolar superior y el primer molar inferior desarrollados y con función cortante. El conjunto cumple una función de tijera, cortando el tejido muscular de las presas. Al cuarto premolar se lo denomina “muela carnicera” (Fernández Salvador, 1996).

La denominación de cuarto premolar o primer molar para la muela carnicera ha sido, según describe González Machado (2004), motivo de controversia, y en esta tesis coincidimos plenamente con su afirmación de clasificarla como primer molar superior debido a sus características anatómicas y a la diferencia sustancial de poseer tres raíces, a diferencia de los premolares típicos que solo poseen dos como máximo, aunque por razones justificadas por el uso continuado, y sobre todo por no prestar a confusión en las fórmulas dentales, seguiremos denominando a la muela carnicera como cuarto premolar.

Con más de 260 especies vivas, Carnivora es uno de los órdenes más ricos en especies dentro de los mamíferos.

Cabe destacar, como punto de partida importante, que Carnivora es una clasificación filogenética y Carnívoro (“comedor de carne”) una clasificación ecológica, que hace referencia a la dieta del animal y no a su posición taxonómica o de antecesores filogenéticamente emparentados (Goswani, 2010).

Evolutivamente el orden Carnivora se divide en dos ramas principales: *Feliformia y Caniformia* (Flynn *et al*., 2010). Esta división engloba una gran diversidad taxonómica y una importante amplitud ecológica que va desde un gato doméstico

(*Felis catus*), un león (*Panthera leo*) y una jineta (*Genetta genetta*) en los Feliformes, hasta un oso pardo (*Ursus arctos*), pasando por el perro (*Canis lupus*) y un león marino (*Zalophus* sp.), ya dentro del grupo Caniformia.

El orden Carnivora posee un abundante registro fósil (Flynn et al, 2005): existen unos 355 géneros del orden Carnivora extinguidos (McKenna y Bell, 1997) y 129 aún vivos. Estos datos nos obligan a pensar que, si la tercera parte del orden ya se ha extinguido, debemos asumirlo como un proceso irreversible que comenzó hace miles de años y que el ser humano en su afán de progreso, solo imprime velocidad a este fenómeno.

Los primeros carnivoromorfos ("con forma de carnívoro") proceden del Paleoceno temprano de Estados Unidos (Wyss, 1993). Eran muy diferentes a los carnívoros que conocemos hoy, pero ya compartían una característica dental: la muela carnicera o tijera, formada por el cuarto premolar superior y el primer molar inferior con morfología y función cortante (Wesley y Flynn, 2005).

3.2.2 FAMILIA CANIDAE

Los primeros integrantes de esta familia aparecen en América del Norte durante el Mioceno temprano, extendiéndose a Europa a finales de esta era. La colonización hacia América del Sur se produce a finales del Plioceno y comienzos del Pleistoceno, cuando surge el istmo de Panamá que uniría a los dos grandes grupos continentales entre sí (Marshall *et al.,* 1982).

Los cánidos actuales son de tamaño medio, omnívoros en general, con el rostro alargado, de apoyo digitígrado, de costumbres gregarias y con fuertes lazos entre los integrantes del grupo (Goswani, 2010).

El cráneo de los lobos es alargado, especialmente en su parte rostral, con una longitud anteroposterior mayor pero muy armónica con el resto, es decir, sin predominio notorio entre su longitud y su anchura, pudiendo ajustarse a la clasificación de mesocefálico por estas características. Las bullas timpánicas son anchas y los arcos cigomáticos se proyectan hacia fuera (García-Perea, 1996)

Los cánidos son especies intermedias dentro de los carnívoros en cuanto a la proporción de carne que incluyen en su dieta (Fernández Salvador, 1991). Las especies que cazan en grupo, como *Canis lupus, Lycaon*, pueden ser estrictamente carnívoras, mientras que las de hábitos solitarios son más bien omnívoras, complementando su dieta con alimento vegetal, como *Vulpes y Canis latrans*, o con insectos y carroña como *Canis aureus*.

Como información general para el lector interesado en los carnívoros ibéricos y su entronque filogenético con la especie objeto de este trabajo, es de destacar la existencia de tres grupos de cánidos en el registro fósil de la Península Ibérica: *Amphycioninae, Thaumastocyoninae, Caninae,* este último representado por *Canis cipio, Canis sp, Nyctereutes aff. donnezani, Vulpes* y ocasionalmente *Cuon* y formas afines (Morales, 1996)

La familia *Canidae* está integrada por carnívoros especializados en dar captura a sus presas a la carrera. Para ello han desarrollado adaptaciones como extremidades semirrígidas y alargadas (radio y ulna fusionados) para evitar una excesiva rotación de las extremidades cuando están corriendo (Fernández, 1996).

3.2.3. EL LOBO COMO ESPECIE *Canis lupus*

El lobo es el mamífero con mayor área de distribución natural. Originalmente se extendía por casi toda Europa, Asia y Norteamérica (Mech 1970), ocupando casi todo el hemisferio norte. La persecución por parte del hombre ha provocado su desaparición del sureste asiático y de la mayor parte de los Estados Unidos de Norteamérica (excepto Alaska) y Europa occidental (Mech 1970). Las principales poblaciones actuales se encuentran en la Federación Rusa, Alaska y Canadá (Mech y Boitani 2003).

3.2.4 EL LOBO IBÉRICO *Canis lupus signatus*

Las poblaciones de lobo de la península ibérica pertenecen a los taxones *Canis lupus signatus* (Cabrera, 1907) o lobo ibérico y *Canis lupus italicus* (Altobello, 1921) o lobo italiano, este último de reciente aparición, procedente de la colonización de los Alpes y Pirineos franceses. Una tercera subespecie, *Canis lupus deitanus* (Cabrera 1907), también formó parte de las poblaciones de la península ibérica, aunque se la considera ya extinguida.

Las principales características que diferencian la morfología del lobo ibérico (*C. lupus signatus*) de otros taxones de su misma especie son una serie de manchas que contribuyeron a su categorización subespecífica como *signatus* (Cabrera 1907). Estas manchas características son: las manchas blancas en los belfos ("bigoteras"), líneas verticales negras o muy oscuras que recorren la parte anterior de sus extremidades torácicas (“signatus” o señal característica propia de la subespecie) y las marcas oscuras a lo largo de su cola y alrededor de la cruz que recuerdan la forma de una "silla de montar") (Vilá, 1993).

En el manto de los lobos ibéricos dominan los tonos marrones grisáceos en conjunto, aunque existen ejemplares más oscuros y otros de tonalidad más rojiza. Los individuos jóvenes presentan generalmente tonalidades grisáceas muy apagadas durante el invierno, mientras que en el verano tienen un color marrón más oscuro (Valverde, 1972)

El peso del lobo ibérico es intermedio entre el de los grandes lobos europeos y norteamericanos y el de los lobos más pequeños que pueblan Oriente Próximo. Según Vilà (1993) los machos pueden pesar una media de 33,1 kg. (rango: 25 - 41) y las hembras 28,2 kg. (rango: 21,6 - 34,5).

La distribución del lobo ocupaba casi toda la superficie de la península ibérica, pero en el siglo XX comenzó un proceso de regresión que alcanzó su nivel más preocupante en la década de los 70 (Valverde, 1972; Garzón, 1979; Grande del Brío, 1985), cuando la especie llegó a encontrarse en grave peligro de extinción.

3.3 TÉCNICAS DE DATACIÓN. EDAD DENTAL

La expectativa de vida del lobo (*Canis lupus*) ha sido abordada por diversos investigadores, aportando valores muy similares en la mayoría de los casos, aunque con valoraciones dispares según se trate de estudios a campo o de lobos en cautividad, pudiendo encontrarse en la bibliografía valores medios de edad comprendidos entre los 9 años y ocasionalmente hasta los 17 años (Young y Goldman, 1944; Goodwin y Ballard, 1985; Okarma y Koteja, 1987; Mech y Boitani, 2003).

Mech (1988) refiere que la expectativa de vida en libertad raramente excede los 13 años. Peterson (1997), refiriéndose a la población del Parque Nacional de la

Isla Royal, coincide con los valores aportados por Mech (1988), describiendo edades entre los 10 a 12 años y algún valor de 14.

Holyan et al. (2005), a su vez, revisaron en un trabajo de campo los datos aportados por los autores mencionados con anterioridad, encontrando un valor promedio de 12,2 años de expectativa de vida.

Conocer la edad real de un individuo implica conocer la fecha de su nacimiento (edad cronológica) o poder estimar mediante distintos métodos su grado de maduración (edad biológica) de acuerdo a la especie, hábitat, condiciones nutricionales, sexo, etc.

Podemos afirmar, desde un punto de vista biológico, que la edad cronológica es un criterio numérico asignado, ya que otorga como punto de partida para el cálculo del tiempo de vida, la fecha del inicio de la vida extrauterina.

El grado de maduración adquirido por el feto en el útero materno, abarca períodos que van desde un par de meses, como es el caso de los carnívoros más conocidos, hasta casi el año de vida intrauterina que alcanzan algunos grandes mamíferos.

Siendo muy estrictos, podríamos asegurar que la estimación cronológica no es la edad real del individuo, pero la diferencia entre ambas (vida intrauterina o período de gestación) no implica grandes variaciones en el objetivo de la mayoría de los estudios sobre animales, por lo que se asumen ambos valores como un único valor real. Establecida la diferencia entre edad biológica y edad cronológica, se describen a continuación los métodos más utilizados para la estimación de la edad en animales.

El peso, el registro de medidas corporales, la erupción dental y el desgaste permiten una aproximación a la edad en animales vivos (Grau *et al*, 1970; Gipson *et al*., 2000). Otros indicadores, como la osificación (cierre) de las metáfisis en radio y cúbito, la evolución de las suturas del cráneo (Sanderson, 1961; Junge y Hoffmeister, 1980) morfología, longitud y peso del *os penis* (Sanderson, 1961; Johnson, 1970), o el estudio de la masa ovárica y testicular, pueden ser muy precisos, pero tienen la desventaja de ser invasivos y que no pueden utilizarse en animales vivos.

Existe una dependencia real entre el tamaño corporal (masa corporal) y la edad, sobre todo si se tiene en cuenta el evidente dimorfismo sexual entre machos y hembras de grupos homogéneos de edad, en los que los valores coincidentes hayan sido descartados (hembras muy grandes o machos muy pequeños).

Las variables reproductivas estudiadas por Mech (2006) incluyeron la masa corporal, el tamaño testicular y el desarrollo de los pezones, encontrando valores reseñables para establecer una cronología seriada y fiable de un animal valorando su aptitud reproductiva a partir de los 5 – 6 años en los machos, y 3 – 4 años en las hembras, si bien es cierto que, al igual que otro parámetro mencionado en esta tesis como la cavidad pulpar, solo tienen potencia discriminante para establecer grupos de animales jóvenes, adultos y viejos.

El dimorfismo sexual con respecto a la aparición de la línea de cemento oscura, podría estar justificado, según las observaciones de Kvam (1978), en el período anual de malnutrición asociado a la época de búsqueda de hembras durante la estación del apareamiento.

Para muchas especies de mamíferos, el recuento de los anillos de cemento es el método más preciso para estimar la edad (Thomas, 1977).

Más de 40 especies de mamíferos han sido datados con este método desde que Laws (1952) demostrara por primera vez la correlación entre los anillos de cemento y la edad. Con posterioridad, Klevezal y Kleinenberg (1967) y Morris (1972) aportaron mayores investigaciones que demostraron la validez del método.

En el inicio de los estudios, sobre todo en especies marinas, se utilizaban los anillos o bandas de dentina para estimar la edad.

Con el tiempo, se comprobó que la aposición de dentina estaba limitada a lo que se pudiera alojar en el interior de la cavidad pulpar, haciendo muy difícil su valoración a partir de cierta edad (Morris, 1972; Mitchell, 1967).

Harris (1978) también comprobó las limitaciones del estudio de las bandas de dentina, al momento de alcanzar la madurez el individuo en estudio.

Los jóvenes del año pueden ser identificados sin mayores complicaciones si se tiene la posibilidad de acceder a radiografías de la cavidad pulpar, de los cartílagos de crecimiento o a una mínima base de datos que incluya medidas del cráneo, tamaño y peso corporal (Larson y Taber, 1980). La complicación surge cuando se necesita datar a animales de mayor edad. En este caso, el recuento de los anillos de cemento resulta el procedimiento de mayor precisión para lograr un resultado con un grado alto de certeza.

La influencia del clima en la aparición de las líneas incrementales de cemento y dentina quedó demostrada en el trabajo realizado por Grue y Jensen (1976) en zorros de Groenlandia y Dinamarca. En este estudio también se valoró, aparte de

la distribución geográfica de las distintas poblaciones en estudio, la diferencia entre grupos de zorros capturados en el campo y grupos de zorros mantenidos en cautividad en granjas productoras de piel. Las granjas danesas mantenían a los animales en jaulas fuera de recintos, a diferencia de las granjas de Groenlandia, que las mantenían en naves que los protegían de las condiciones climáticas más adversas.

El estudio de los cortes histológicos de ambas poblaciones arrojaba resultados que permitieron constatar la influencia de la temperatura ambiente en la formación y en la intensidad de los anillos de cemento. Las condiciones estacionales extremas determinan una mejor y más clara distribución de los anillos de cemento (Klevezal, 1973). La influencia del clima en la variación de los anillos de cemento ya había sido estudiada en *Cervus elaphus* por Lowe (1967) y en *Canis familiaris* por Grue (1976).

Investigadores como Gandal (1954), Morris (1972) y Spinage (1973), entre otros, revisaron y desarrollaron técnicas propias de datación individual en distintas especies. Con esta finalidad, tuvieron en cuenta parámetros como:

- **Dimensiones y peso corporal**. Suponen una variable incremental en la etapa juvenil, cuya utilidad disminuye cuando el animal estabiliza su crecimiento y alcanza la edad adulta.
- **Dimensiones del *os penis***. Estudiar el peso, longitud y volumen del hueso peneano (báculo) puede aportar información para establecer criterios de edad en un individuo. Como desventaja de este método, hay que considerar que solo se puede utilizar en machos y que los valores

obtenidos sirven para categorizar grupos de edad (juveniles, subadultos, adultos), no para establecer la edad.

- **Desgaste dental**. Es un parámetro tradicionalmente utilizado que relaciona la edad con el desgaste (abrasión) de la corona de los dientes. Es poco precisa y su valoración depende mucho del observador. La mayoría de los estudios indican que tiende a sobrevalorar la edad real.
- **Erupción**. Considerando el patrón de erupción de la especie, se pueden obtener datos precisos pero muy acotados en el tiempo. La utilidad de este período pierde validez con el transcurso de los años del individuo (Taber, 1969; Larson y Taber, 1980; Dimmick y Pelton, 1996).
- **Estudio de la cavidad pulpar**. Al igual que las dimensiones del *os penis*, sus resultados solo establecen categorías, pero no es válido para determinar unidades de tiempo (meses, años) ni para desarrollar estudios de dimorfismo sexual, si bien resulta de utilidad cuando se utiliza conjuntamente con otros parámetros.
- **Peso del cristalino**. El peso del cristalino es variable y aumenta con la edad. Morris (1972) informó de la precisión de este método en animales de tamaño medio y pequeño. Harris (1978), por su parte, descartó el procedimiento para la datación en zorros. Es una técnica agresiva, que no conserva la estructura en estudio, que por su propia naturaleza se reserva para protocolos en cadáveres. Necesita de planteamientos teóricos sólidos y técnicas de medición muy precisas (Friend, 1968; Morris, 1972).
- **Fusión de líneas epifisiarias**. El grado de fusión de los cartílagos epifisiarios (determinados por rayos X) de huesos largos como el radio, húmero y fémur, ha sido utilizado para determinar grupos de edad en

distintas especies, como murciélago, conejo y zorro (Sullivan y Haugen, 1956), aunque otros autores como Wight y Consway (1962), lo consideraron poco preciso con respecto a otros métodos.

- **Resistencia del colágeno**. La resistencia del colágeno a la rotura, fue estudiada por Sherman et al. (1985) para estimar la edad en ardillas *Spermophilus beldingi.* Dichos estudios confirmaban una mayor resistencia del colágeno a la tracción en animales jóvenes y mayor en animales viejos.
- **Medidas**. Longitud de la oreja, de la cola, alzada, longitud total, etc.
- **Anillos de cemento**.
- **Otras:**
- **Metilación del ADN**. La capacidad de medir el envejecimiento de perfiles moleculares a través del estudio de la metilación del ADN (la metilación es una modificación de la cadena del ácido nucleico que altera la secuencia del ADN y puede ser cuantificada) (Hannum, 2013)
- **Racemización del ácido aspártico** (Barriga, 2012) , **medidas de las líneas de periostio**, **estudio de microestructuras óseas**, **líneas de crecimiento en cuernos, medida del tamaño de las huellas en grandes mamíferos** (elefantes), entre otras. Independientemente del método o conjunto de métodos que se utilice, se debe tener en cuenta la validación en el número de muestras, así como la adaptación para cada especie que se decida estudiar. La mayor parte de los estudios publicados coinciden en que, en el caso de los carnívoros, la técnica de mayor precisión para ser considerada como referencia es **el corte histológico y el** recuento **de los anillos de cemento**, pero que debe ser validada con datos de animales

procedentes de la misma región o área de estudio debido a las variaciones que puede sufrir de acuerdo a la dieta habitual (Costello *et al*., 2004).

Existen extensos trabajos de comparación de técnicas en especies como lobo gris, *Canis lupus* (Gipson *et al*., 2000), oso negro, *Ursus americanus* (McLaughlin *et al*., 1990; Keay, 1995; Harshyne *et al*., 1998; Costello *et al*., 2004) y en mapache, *Procyon lotor* (Fiero y Verts, 1986).

Olifiers et al. (2010) proponen la validación de un método no invasivo para estimar la edad basado en la condición dental y medidas corporales en dos especies de carnívoros, *Nasua nasua* y *Cerdocyon thous,* procedentes de El Pantanal, en Brasil. Basan sus investigaciones en la recogida de seis parámetros de medidas corporales y la clasificación de la condición dental en base a tres categorías de desgaste, condición del esmalte y coloración, estado de la dentición y otras como presencia de sarro, rotura o tipo de desgaste observado.

La edad estimada a partir de patrones de erupción y desgaste dental se ha propuesto para distintas especies como lobo, coyotes, nutrias, hienas, leopardos y otros carnívoros (Garshelis, 1984; Stander, 1997; Landon *et al.,* 1998; Van Horn *et al*., 2003).

Esta metodología no invasiva, en base al patrón de erupción y el desgaste, ha resultado eficaz en lobo (*Canis lupus*) de hasta 4 años de edad y muy eficaz durante toda la vida en el caso de la hiena manchada (*Crocuta crocuta*) (Landon *et al.,* 1998; Van Horn *et al*., 2003).

Linhart y Knowlton (1967), Bowen (1982) y Gipson (2000) consideraron a la apreciación de edad por el desgaste comparable a la datación por el recuento de los anillos de cemento, aunque con una precisión menor.

Nelson y Chapman (1982) llevaron a cabo un estudio sobre 210 zorros rojos (*Vulpes vulpes*) trampeados en Maryland, USA, desarrollando un extenso trabajo de recogida de información, que les permitió caracterizar la población por edad y condición física, utilizando parámetros como el peso del cristalino, el cierre de los cartílagos de crecimiento humerales, peso del hueso peneano (báculo u *os penis*), corte histológico y recuento de los anillos de cemento y medidas de los cráneos. Para la valoración de la condición física, aprovecharon el estudio de los cadáveres para obtener medidas de las glándulas adrenales, bazo y panículo adiposo. Todas las medidas fueron analizadas en conjunto, obteniendo datos concluyentes para la estratificación de la población de zorros en Maryland y su posterior protección frente a la captura indiscriminada que había sufrido la especie en décadas anteriores.

Todas las técnicas disponibles, inclusive las más avanzadas tecnológicamente, poseen elementos de subjetividad que deben ser reducidos al máximo con la adopción de protocolos y técnicas de validación estadísticas de reconocida potencia discriminatoria.

3.3.1 DATACIÓN POR APRECIACIÓN VISUAL (DESGASTE)

La estimación de la edad a través del desgaste dental y la cronología de la erupción ha sido propuesta para *Canis lupus*, *Canis latrans*, *Enhydra lutris*, *Crocuta crocuta*, *Panthera pardus* y otros carnívoros (Garshelis, 1984; Stander, 1997; Landon *et al*., 1998, van Horn *et al*., 2003). Este método se ha considerado preciso para estimar la edad en lobos de hasta cuatro años de edad y a lo largo de toda la vida en hienas manchadas (Landon *et al*., 1998; van Horn *et al*., 2003). Algunos autores otorgan a este método una validez similar a la del estudio de los anillos de cemento, aunque otros (Linhart y Knowlton, 1967; Bowen, 1982; Gipson *et al*., 2000) lo consideran de menor valor predictivo.

En todo caso, cualquier método de datación basado en la apreciación visual de determinadas características en los ejemplares a valorar, exige el establecimiento previo de una serie de eventos o sucesos que en la especie en cuestión tengan lugar en momentos o etapas concretas de la vida del animal. Es el caso de la osificación del cartílago de crecimiento de los huesos largos, que tiene lugar entre los 12 y los 14 meses (Rausch, 1967), a partir de los cuales la estatura ya no varía; o de la masa corporal, que, como demuestran los estudios de Mech (2006), varía a lo largo de la vida del animal, aumentando hasta los 5 – 6 años de vida, a través del aumento de la masa muscular, grasa y hueso, para, aparentemente, disminuir a partir de entonces.

En cuanto a los aspectos relacionados con la dentición que pueden ser utilizados para el establecimiento de la edad del individuo en estudio, podríamos considerar no solo eventos o sucesos puntuales (erupción, por ejemplo), sino también el

desgaste y la aparición de marcas en el diente que pueden ser utilizados en la valoración visual con fines de datación:

Los dientes de leche son reemplazados por los dientes permanentes a los 6 meses de edad (Mech, 1970; Van Ballenberghe y Mech, 1975). Conviene tener presente, además, que en la dentición decidua o de leche no existen molares ni tampoco precursores del 1º premolar (Figura 5).

Figura 5. La dentición decidua o "dientes de leche" presentan un número total de piezas menor que la dentición permanente. Son más pequeños y de extremos más afilados.

Los primeros eventos tienen lugar a los 4 – 5 meses, con el inicio de la erupción del colmillo permanente. Durante un tiempo puede coexistir un pequeño saliente del nuevo colmillo y el colmillo deciduo o de leche. A los 8 – 10 meses se produce lo que se conoce como boca completa: ya han hecho erupción todos los dientes permanentes. En esta etapa es posible contabilizar 42 dientes de un color blanco nacarado sin ningún tipo de defecto o pigmentación (Figura 6).

Figura 6. Aspecto general de una dentadura nueva. Brillante y sin pigmentaciones evidentes. Color blanco nacarado

El comienzo del desgaste de los incisivos superiores puede marcar una etapa importante en la cronología del rasamiento. Es necesario establecer valores paramétricos para este momento (Figura 7).

Figura 7. Comienzo del rasamiento con la desaparición de la flor de lis en los incisivos superiores.

Figura 8 Ausencia de cúspides principales en los incisivos superiores (“flor de lis”) y en los inferiores.

Este desgaste comienza por el lóbulo central de los tres que caracterizan al incisivo superior (“flor de lis”), pasando en una segunda etapa a iniciar el rasamiento o desgaste del lóbulo principal de los dos que forman las cúspides del incisivo inferior (Figura 8).

El cambio de coloración abarca tonalidades desde el blanco nacarado en la boca de un animal a partir de los 7 – 8 meses, pasando a un blanco opaco (empieza a perder el brillo del esmalte inicial), hasta llegar a una tonalidad amarillenta con impresiones ocre o de color cobre, posiblemente relacionadas con algún pigmento de la saliva (Figura 9).

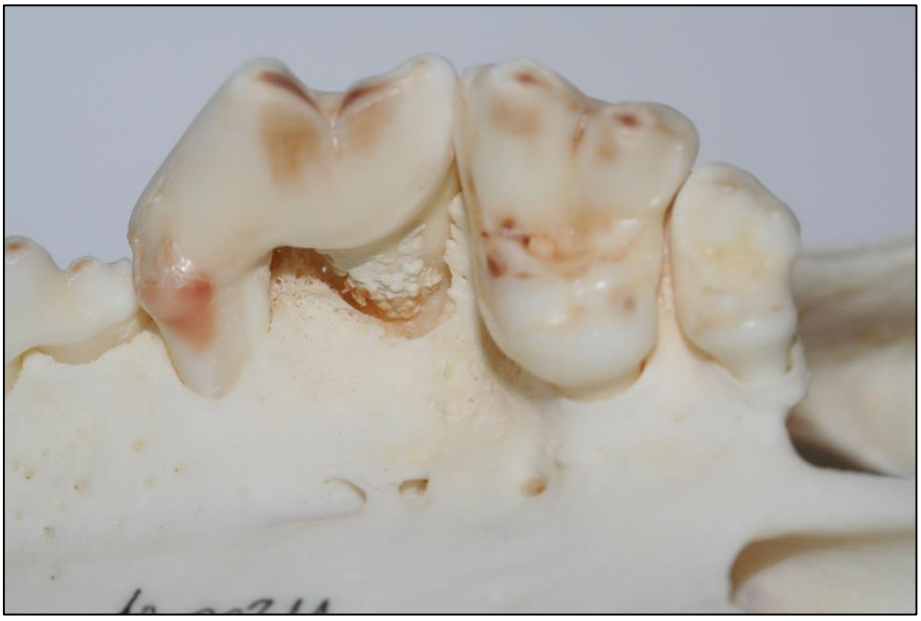


Figura 9. Las zonas pigmentadas caracterizan a la dentadura de animales con un desgaste considerable del cemento. Es una peculiaridad de los animales viejos.

Los *surcos de atrición* (Figura 10) producidos por el rozamiento de las superficies de diente contra diente, también denominado como “desgaste oclusal” (Gorrel, 2010) se deben diferenciar de las superficies de abrasión o desgaste producidas por la textura del alimento habitual de la especie (la abrasión se refiere al desgaste de las superficies de los dientes que no están en contacto entre sí). Los surcos de atrición más notorios son los que se producen en la cara cóncava o posterior del colmillo inferior por el rozamiento del colmillo superior y la impresión que produce el colmillo inferior al posicionarse entre el tercer incisivo superior y el colmillo superior en el momento del cierre de la boca u oclusión.

Figura 10. Surco de atrición en un canino inferior producido por el rozamiento con su congénere superior.

Aunque el valor predictivo del desgaste dental sea menor que otras técnicas de mayor precisión, es necesario tener en cuenta que puede ser de gran utilidad en aquellos casos en los que no es posible llevar a cabo otro tipo de estudio, sobre todo si se considera el impacto que la extracción de un diente puede tener sobre el animal, así como la preparación necesaria para realizar el corte histológico y posterior interpretación (Godwin y Ballard, 1985; Dimmick y Pelton, 1994). La apreciación visual del desgaste de los dientes ofrece una valoración cualitativa de su estado y permite deducir en forma indirecta una edad para el sujeto en estudio, mientras que la obtención de medidas o el corte histológico, otorga un enfoque cuantitativo y contrastable del valor de edad asignado.

Si bien la valoración cuantitativa disminuye el error inter e intraobservador (Steele y Weaver, 2012), es posible afirmar que ni los métodos cualitativos ni los cuantitativos pueden explicar satisfactoriamente las variaciones atribuidas al desgaste individual atribuido fundamentalmente a la textura de la dieta o las condiciones de vida propia del sujeto.

Esta situación obliga a los investigadores a tener en cuenta grandes tamaños de muestra con el fin de disminuir el impacto de las variaciones individuales en los resultados finales (Klein *et al.,* 1981; Steele, 2005). Todas las técnicas disponibles para la estimación de la edad en mamíferos poseen elementos de subjetividad (Gipson *et al*., 2000).

La precisión de los estudios sobre la estimación de la edad en carnívoros aumenta cuando se utiliza más de un método, aunque la exactitud varía, según los autores consultados, entre el 60 y el 100 % (Grau *et al.,* 1970; Harshyne *et al*., 1998; Costello *et al*., 2004) y del 31 al 100 % (Fiero y Verts, 1986) cuando se estudian animales hasta los 4 años de edad.

El desgaste dental ha sido ampliamente utilizado para la determinación de grupos de edad para estudios taxonómicos o de grupos de población.

Spinage (1973) observó que el patrón de desgaste seguía una curva exponencial negativa, situación que podía conllevar que animales jóvenes pudieran ser clasificados como viejos en relación a su edad real. Harris (1978) encontró que el 65,5 % de una población de zorros rojos examinados por él, tuvieron un error de 1 año con edades asignadas en base al desgaste dental. La datación de la edad fue muy precisa (93,3% de los casos) en zorros de más de 4 años de edad, cuando el

patrón de desgaste era mucho más constante. Generalmente la técnica de datación basada en el desgaste, es muy práctica, pero es considerada menos precisa que el recuento de los anillos de cemento u otras técnicas como la erupción dentaria en cohortes de animales jóvenes (Morris, 1972).

La precisión de esta técnica depende del tipo de diente examinado: los incisivos son muy útiles para la datación en la mayoría de especies de canidos (Harris, 1978), mientras que los molares lo son en mayor medida para el grupo taxonómico de los cérvidos (Taber, 1969).

El desgaste se inicia en los incisivos y caninos progresando hacia los premolares y molares. Es importante tener en cuenta que los patrones de desgaste pueden variar mucho con la dieta (textura del alimento) (Grau *et al*., 1970, en *Panthera leo*; Harris *et al.*, 1992, en *Meles meles*; Stander, 1997, en *Panthera pardus*), por eso es necesario sumar los datos obtenidos a los resultados de otros métodos de datación, con el fin de aumentar la precisión en la asignación de edad en la mayoría de las especies de carnívoros.

La cronología de la erupción es también un evento importante como punto de partida para la valoración de la edad. Para muchas especies de carnívoros, la cronología de la erupción y el reemplazo de la dentición permiten estimaciones precisas de la edad en animales jóvenes (Saunders, 1964, en *Lynx* sp.; Linhart, 1968, en *Vulpes vulpes*; Rausch, 1969, en *Ursus* sp.; Silver y Silver, 1969, en *Canis latrans*).

El presente trabajo pretende contribuir al inicio de la comprensión del desgaste de los dientes y el patrón que sigue con mayor frecuencia, y al establecimiento de un

sistema de datación fiable y reproducible en base al desgaste y rasamiento dental.

El desgaste permite establecer categorías de edad o correlaciones con otros criterios objetivos, que sumados a él puedan aportar mayor precisión a la estimación de la edad a campo.

Cross y Sanson (2008), en el marco de un estudio sobre datación en el búfalo, en el parque nacional Kruger, han comprobado que los datos obtenidos no son fiables en esta especie, debido a la falta de una correlación que permita establecer un patrón incremental constante en la formación de los anillos de cemento, la longitud de los incisivos y el desgaste de la dentadura.

La técnica de cálculo de la edad en base al desgaste dental ha sido empleada en especies de la Familia Canidae como: *Canis latrans* (Gier, 1968); *Urocyon cinereoargenteus* (Wood, 1958); *Canis lupus* (Gurskii, 1973) y *Canis familiaris* (Silver, 1969) con resultados poco precisos en muchos casos (Root y Payne, 1984) debido entre otras causas a la influencia de la textura del alimento, la variación estacional del mismo, la diferencia en el patrón de desgaste entre un lado y otro de la boca, la presencia de roturas o falta de piezas dentales, etc.

Menos del 50 % de una población de zorros rojos (*Vulpes vulpes*) de edad conocida, pudo ser datada en base al desgaste dental, con una precisión aceptable, en un trabajo realizado por Van Bree et al. (1974) y Harris (1978).

Root y Payne (1984) consideraron inadecuada o poco precisa esta técnica para la datación en zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*), concluyendo, en

comparación, que el cierre del foramen apical tenía mayor correlación con la edad que los valores atribuidos por desgaste.

3.3.2 DATACIÓN POR ESTUDIO DE LA CAVIDAD PULPAR

Los hallazgos radiológicos del estudio de la cavidad pulpar de un diente como el canino superior o inferior en el lobo, permiten establecer grupos de edad de gran importancia en estudios poblacionales. El estudio de la cavidad pulpar es un método poco invasivo, rápido y económico (Tumlison y McDaniel, 1983).

En muchas especies, la ratio de deposición de la dentina es muy grande durante el primer año de vida (Johnston y Watt, 1981). Por esta razón, la precisión de este método se limita a los primeros años de vida, y la utilización como referencia de animales de edad conocida, ya que a partir de un porcentaje de ocupación de la cavidad puede ser muy difícil la asignación de una edad, quedando su uso limitado a la posibilidad de separar animales jóvenes del año, de ejemplares más viejos (Dix y Strickland, 1986; Jenks, 1986; Simon y Freydendall, 1981; Root y Payne, 1984).

La reducción del tamaño de la cavidad pulpar y su relación con la edad, fue estudiada en distintas especies como el **zorro rojo** (*Vulpes vulpes*, Churcher, 1960; Grue y Jensen, 1973; Frydendall, 1981), **coyote** (*Canis latrans*, Knudsen, 1976) **lince** (*Lynx rufus*, Mahan, 1979), **zorro ártico** (*Alopex lagopus*, Grue y Jensen, 1976; Bradley *et al*., 1981), **zorro gris** (*Urocyon cinereoargenteus*, Tumlison y McDaniel, 1984), **nutria** (*Lutra canadensis*, Kuehn y Berg, 1983) y **tejón** (*Meles meles*, Graf y Wandeler, 1982) entre otras especies.

La datación por radiografía de la cavidad pulpar fue utilizada con éxito, aparte de las especies ya mencionadas, en zorros árticos (*Alopex lagopus*) por Grue y Jensen (1976), gato montés (*Felis rufus)* por Johnson et al. (1981), zorro rojo

(*Vulpes vulpes*) por Simon y Freydendall (1981), marta pescadora (*Martes pennanti*) por Kuehn y Berg (1983) y Jenks (1984), nutria de río (*Lutra canadensis*) por Kuehn y Berg (1983), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) por Tumlison y McDaniel (1983), mofeta listada (*Mephitis mephitis*) por Frederickson (1983) y marta americana (*Martes americana*) por Dix y Strickland (1986) y Jenks (1986).

Entre los numerosos métodos de datación o estimación de la edad en base al estudio de los dientes, la obliteración incremental de la cavidad pulpar en base a la ocupación con dentina, es utilizada en estudios forenses (Drusini, 2008) y estudios de dinámica poblacional (Knowlton y Whittmore, 2001; Poole, Lee y Gunn, 1994).

Asociada al envejecimiento existe una reducción constante del tamaño de la cavidad pulpar, originada en la dentinogénesis fisiológica o deposición fisiológica de dentina producida por los odontoblastos (Solheim, 1992).

La dentina se divide en primaria, secundaria y terciaria o reactiva. La dentina primaria es la que se localiza en primer lugar por debajo del esmalte o del cemento durante la formación del diente. La *dentina secundaria* es la que se produce gradualmente a partir de los odontoblastos y rellena la cavidad pulpar, mientras que la *dentina terciaria* se forma a partir de estímulos que actúan sobre la pieza dentaria, tales como traumatismos o infecciones (caries).

En esqueletos humanos de la Edad Media, Stefano de Luca et al. (2011) basándose en la metodología establecida por el también autor del artículo, Roberto Cameriere, establecieron las bases para datación de esqueletos en

cementerios de la Edad Media en España e Italia. El fundamento se basa en el estudio radiológico de la ocupación de la cavidad pulpar con depósitos de dentina secundaria. En este trabajo, queda ampliamente demostrada la fiabilidad del estudio de la cavidad pulpar, debido a que otras medidas o valoraciones como el desgaste dental, las suturas craneales (Galera *et al.,* 1998; Meindy y Lovejoy, 1985), el estudio de las sínfisis púbica (Suchey y Katz, 1998; Todd, 1921) y las superficies de la pelvis [superficie auricular del ilion] (Lovejoy *et al.,* 1985), en restos arqueológicos dependen mucho de las alteraciones inducidas por el sustrato y el paso de los años (efecto tafonómico), situación que no afecta de igual manera a la estructura de los dientes.

Bodecker (1925) relacionó la aposición de dentina secundaria con la edad cronológica. Gustafson (1950), estudió la relación entre la aposición de dentina, la transparencia a los rayos X y la edad. En la actualidad, el estudio de la aposición de dentina es una herramienta muy útil e imprescindible en medicina forense para la estimación de la edad (Cunha, 2009; Drusini, 1997).

Todos estos estudios, realizados en medicina humana, pueden y deben suponer un punto de referencia y una motivación para ampliar los conocimientos de la obliteración incremental de la cavidad pulpar en distintas especies del ámbito de estudios de biólogos y veterinarios.

Los hallazgos radiológicos del estudio de la cavidad pulpar de un diente como el canino superior o inferior en el lobo, se extiende entre dos límites bien diferentes entre sí, encontrando desde una cavidad pulpar prácticamente vacía (radiolúcida al paso de los RX) en los animales jóvenes hasta una cavidad pulpar completamente obliterada (radiopaca al paso de la radiación) en los animales más

viejos. Conociendo estos dos extremos, es factible establecer grupos de edades muy diferentes entre sí, accediendo a una primera segmentación en conjuntos de animales jóvenes (animales nacidos en el año), animales adultos y animales viejos o añosos (Knowlton y Whittmore, 2001; Poole *et al.*, 1994)

Esta primera clasificación en grupos de edades, permite evitar tiempo y costos innecesarios en estudios sobre grandes cantidades de muestras, en las que es necesario realizar estudios más específicos, como por ejemplo, el corte histológico para la valoración de los anillos de cemento, ya que desde un principio permite seleccionar el grupo de animales a estudiar.

El estudio descriptivo y cuantificación porcentual (%CVP) de la aposición de dentina (ocupación progresiva de la cavidad pulpar) a través del estudio radiográfico, permite establecer grupos de edades en base a un dato objetivo y cuantificable.

$$\% \text{ CVP} = \frac{\text{CVP} \times 100}{\text{ET}}$$

Cuantos más indicadores de edad se utilicen, más preciso será el resultado, por consiguiente, varios métodos de estimación de edad en conjunto, arrojan mejores resultados que uno aislado.

El estudio de la obliteración incremental de la cavidad pulpar (Camariere *et al*., 2007) es fácil de aplicar, no invasivo ni destructivo sobre la muestra, fácil de someter a pruebas de comparación por otros investigadores y no requiere de un equipamiento especializado y caro. La utilidad de la valoración de la cavidad pulpar y la ratio obtenida mediante radiografías, se ha validado en muchos

trabajos por comparación, por ejemplo con la determinación de los anillos de cemento y el desgaste (Knowlton y Whittemore, 2001), logrando precisar la edad con mayor fiabilidad.

Cuando estos datos son analizados estadísticamente, aumenta la posibilidad de distinguir entre sí los grupos más difíciles de datar, como son los de mayor edad

(Jenkis *et al.,* 1984; Dix y Strickland, 1986; Nagorsen, 1988). El estudio de la cavidad pulpar no establece parámetros de dimorfismo sexual. Según los datos aportados por estudios antropológicos (Murray, 2002; Camariere, 2007), la aposición de dentina secundaria no depende del sexo en el ser humano. Es de esperar idéntico resultado en otras especies, ya que no existen indicios hasta el momento, que pudieran corroborar lo contrario. Los criterios externos de apreciación de la edad y los patrones de desgaste, así como los de erupción, fusión de las epífisis de los huesos largos y la cavidad pulpar han sido utilizados para separar grupos de edad, sobre todo juveniles de adultos, especialmente los jóvenes del año o de primera edad (Rausch, 1967; Van Ballenberghe *et al.,* 1975; Fuller y Keith, 1980; Fritts y Mech, 1981; Gasaway *et al.,* 1983; Peterson *et al.,* 1984).

Para esta etapa, Parker y Maxwell (1986) establecieron los parámetros de un trabajo de investigación basado en la aposición de dentina en 139 cráneos de lobo procedentes de Quebec y de Labrador, con el fin de conocer el impacto de la población de lobos sobre las manadas de caribú (*Rangifer tarandus caribou*) del George River (Parker y Luttich, 1986). En este trabajo el espesor de la dentina estudiado estaba por debajo de los 2 mm en ejemplares con el foramen apical abierto. El espesor de la dentina del subgrupo de 1,5 años (“los indefinidos”)

tenían el foramen apical cerrado, pero no existía una definición clara del primer anillo de cemento, pudiendo establecer dos grupos con diferencias significativas ($p<0,001$). Esta diferencia les permite establecer un criterio muy importante como punto de partida en la asignación de la edad en el lobo, que es añadir 1,5 años a la aparición del primer anillo de cemento (Parker y Maxwell, 1986).

3.3.3 DATACIÓN POR MEDIDA BIOMÉTRICA DE LOS DIENTES

Foresman (2012) menciona como medidas standard en el estudio de los dientes en el manejo a campo de carnívoros a las siguientes:

Longitud y anchura del canino. Usando un calibre, a longitud del canino se mide desde la punta o extremo libre, hasta la línea de la encía. En animales jóvenes coincide con la superficie del esmalte dental, pero en animales viejos y debido a la retracción de la encía, puede exponerse el hueso alveolar o el cemento si existe resorción alveolar.

Longitud (mencionada como ancho de base en esta tesis) del cuarto premolar superior o muela carnicera.

En un estudio de dimorfismo sexual en *Canis lupus signatus*, Guitián Rivera y Sánchez Casals (1979) utilizan parámetros dentales propuestos por Delibes (1974) para estudios de dimorfismo sexual en ginetas *(Genetta genetta)*. Dichas medidas se corresponden con algunos de los parámetros propuestos en esta tesis, aunque con distinta finalidad. Guitián Rivera y Sánchez Casals (1979) concluyen que el número de muestras de su trabajo es pequeño y produce un solapamiento de datos en valores cercanos a los 13 mm que impiden que sean utilizados con precisión para poder separar machos de hembras; no obstante, y

pese a lo pequeño del conjunto de cráneos estudiados, es posible ver en su estudio la utilidad de combinar más de una medida (en este trabajo, cruzan datos de medidas craneales como la longitud cóndilo basilar y longitud cóndilo molar con la anchura del canino), lo que les permite comprobar una dispersión de datos favorable al objetivo de diferenciar los cráneos por sexo en base a medidas. Al igual que los datos obtenidos por González Machado (2004), la distribución del sexo en la muestra en estudio representa en forma muy aproximada una distribución del 50 % para machos y 50 % para las hembras. Exactamente, González Machado (2004) trabajó en su tesis con un 55,26 % de machos y 44,74 % de hembras. En esta tesis, el grupo de animales jóvenes, de menos de un año, era de un 40,35 %, a diferencia de lo apuntado por Valverde et al. (1979), que refiere a este grupo de edad con un porcentaje del 25,7 %. Esta discrepancia en las cifras podría justificar en el futuro una revisión sobre la composición demográfica de las poblaciones estudiadas a finales de los años 70 y en el primer lustro del presente siglo.

3.3.4 DATACIÓN POR CORTE HISTOLÓGICO

El estudio de las líneas de crecimiento en la raíz de los dientes ha sido ampliamente utilizado en la datación de diferentes especies. Laws (1952) publica los primeros trabajos en mamíferos marinos. Le siguen investigaciones en alce, oso (Stoneberg y Jonkel, 1966), en caribú (Miller, 1974) y otros trabajos que seguirán en años posteriores, comienzan una trayectoria de descubrimientos continuos en esta técnica. Harris (1978), estudiando poblaciones de zorro rojo, se limita a realizar cortes y estudio de las líneas de crecimiento en el cemento (raíz)

de los dientes, encontrando mayor representación de la edad y menor variabilidad que cuando el corte histológico incluía todo el diente.

Existen dos formas de realizar el corte para el estudio de las líneas incrementales de cemento: descalcificando la muestra o sin descalcificarla. La diferencia radica en el tipo de material de corte y el producto obtenido.

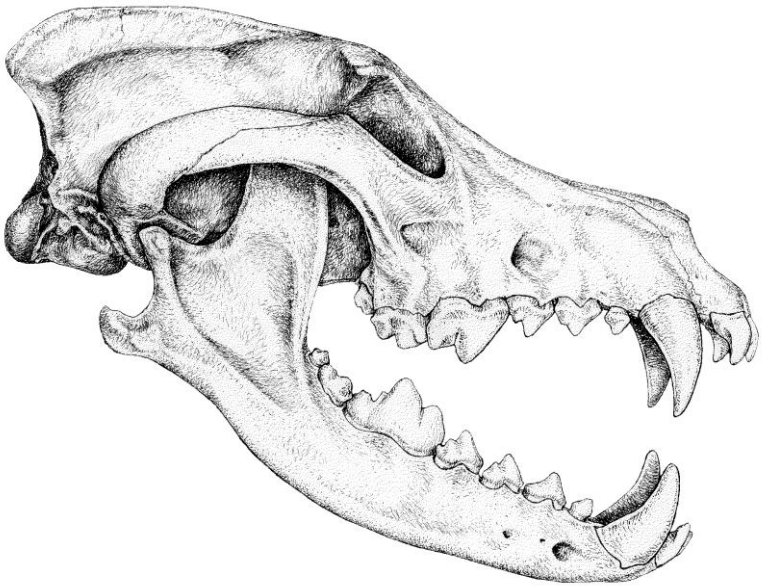
Sin descalcificar, se debe reducir la muestra por desgaste hasta la apreciación de los anillos o líneas estacionales de cemento, y en el caso de la descalcificación, el primer paso consiste en inducir en el diente la pérdida de la rigidez estructural que lo caracteriza por medio de su inclusión en sustancias que sustraigan el calcio. Erickson y Seliger (1969) y Morris (1972) describen varios métodos para la preparación de secciones de dientes para estudios de edad. Cuando el diente es grande (focas, morsas o grandes herbívoros) la preparación se realiza mediante el corte en seco con un disco de carbono, reduciendo por desgaste el grosor hasta que es posible observar los anillos con una lupa estereoscópica.

En el caso de especies con dientes más pequeños, se lleva a cabo un reblandecimiento en base a la descalcificación con ácido fórmico, ácido nítrico (Morris, 1972) o también con una solución propuesta por Tumlison y McDaniel (1983) consistente en la mezcla de: 0,7 grs de etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,2 grs de tartrato de sodio y potasio y 1 litro de ácido clorhídrico al 10 %.

Schneider (1973) describe el método de descalcificación con formalina (formol) al 10 % y ácido clorhídrico aclarado en cada paso con agua corriente. Se utilizan dos planos de corte, uno sagital medio y uno longitudinal.

Bingham y Purchase (2002) proponen utilizar el siguiente protocolo de trabajo: Se realiza un corte de un segmento de 1 milímetro con cuchillas de diamante, se descalcifica con una solución descalcificante compuesta por: 1,5 % de ácido clorhídrico, 17,5 % solución de cloruro de sodio y el resto de agua durante 2- 3 días.

Posteriormente se conserva en alcohol al 70 % hasta el momento del corte histológico. Se incluye en parafina, se realiza el corte y luego se tiñe con una solución de hematoxilina – eosina.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este trabajo, se dispuso, en principio, del siguiente material biológico:

40 cortes histológicos de piezas dentales (22 correspondientes al tercer molar inferior, 16 al primer premolar inferior y dos terceros premolares inferiores) , para establecer el método de referencia.

39 ejemplares para el método de medidas obtenidas por calibre (biometría).

33 ejemplares que fueron sometidos a estudio radiológico para la determinación de los valores de la cavidad pulpar. Del total, 29 caninos fueron extraídos completamente para la radiografía y 4 fueron hechas dentro de la estructura ósea (28 fueron caninos inferiores, 5 caninos superiores).

42 cadáveres para la estimación de la edad por apreciación visual.

El análisis estadístico por SPSS, determina que de todos los ejemplares medidos por los distintos métodos podrán compararse los siguientes:

Para el método del corte histológico: 40 ejemplares

Para la biometría mediante mediciones con calibre: 30 ejemplares.

Para la determinación de la cavidad pulpar mediante estudio radiológico: 31 ejemplares

Para la estimación de la edad mediante apreciación visual: 33 ejemplares

Los ejemplares estudiados procedían de: atropellos en carretera, control poblacional, intoxicaciones y muerte por causas desconocidas.

Geográficamente, todos los cráneos proceden de la comunidad de Castilla y León.

En todos los casos, salvo excepciones por limitaciones inherentes a las muestras (pérdida de piezas dentales, excesivo deterioro en atropellos, entre otros) se extrajeron muestras dobles de dientes unirradiculares, con el fin de mantener una muestra de reposición, intentando producir el menor deterioro posible en el cráneo.

Se eligió el tercer molar (3º M) inferior para la mayoría de los casos (n = 22) y el 1º premolar (1º PM) inferior (n = 16) cuando la primera opción no era posible. En dos de las muestras se extrajo el 3º PM inferior.

4.1.2 MATERIAL INVENTARIABLE

- PESO DE CADÁVERES EN CAMPO Y SALA DE NECROPSIA

Para el pesaje de los cadáveres, utilizamos una **báscula electrónica** de acero inoxidable Gram Serie Z1/Z1, con capacidad (peso máximo) de 150 kgs. y precisión (error): ± 20 grs, y un **Dinamómetro** (báscula de mano), calibrado periódicamente con báscula de precisión Gram, reseñada anteriormente, con capacidad (peso máximo) de 50 kgs. y precisión (error): ± 20 grs.

- BIOMETRÍA

Cinta métrica: Para la obtención de las medidas generales de los cadáveres se utilizo una cinta métrica de fibra de vidrio fiberglass tape. Marca: Medid ®**,** de 15 metros de longitud.

Calibre: Para la obtención de medidas de las piezas dentales se utilizó un calibre digital, marca Sesa® Tools, SA inox. Ref. 112/G; Unidades: mm/inch. (0 – 150 mm).

- MICROTOMO

Para realizar los cortes histológicos se utilizó un criostato MICRON M505N.

- MICROSCOPIO

Leica DM 500 con cámara incorporada Leica ICC50 HD para la observación y valoración de los cortes histológicos.

- RADIOLOGÍA

Equipo de RX: para la obtención de las radiografías, se utilizó un equipo de Radiología convencional Rx Sedecal. APR Vet. MS Toshiba, 125 Kv/300 ma. Rotanode. DFP = 100 cms. Sin bucky.Colimador: Ralco R 104.

Revelado: para el revelado de las radiografías obtenidas, se dispuso de un equipo de revelado automático compuesto por la Reveladora SRX 101 A. Konica Minolta.

Chasis: en este trabajo se utilizaron Chasis radiográficos de aluminio, con pantalla intensificadora de tierras raras, que emiten luz verde, de 30 x 40 y 24 x 30 cm.

Negatoscopio: Para el mejor estudio de las radiografías, se visualizaron sobre un negatoscopio convencional, sobre el cual se realizaron fotografías de cada una de las imágenes radiológicas obtenodas, para facilitar su análisis detallado con el programa informático de procesamiento de imágenes Adobe Photoshop

- INSTRUMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN DENTAL

Para la obtención de los dientes, procedentes de los cadáveres, se recurrió a un equipo básico de instrumental quirúrgico de uso convencional en odontología de pequeños animales (Bisturí, elevadores de periostio y de raíces, botadores, pinzas de extracción…)

- EQUIPO FOTOGRÁFICO

Para el registro de las imágenes utilizadas en este estudio, empleamos una cámara fotográfica digital Canon EOS X Rebel T y un objetivo Canon de 60 mm / f 2.8

- EQUIPOS INFORMÁTICOS**:**

Para el tratamiento de las imágenes obtenidas, así como para los estudios estadísticos y el almacenamiento de la información, se utilizaron los programas Adobe Photoshop y SPSS Vs-18, instalados en un ordenador MacBook Apple de 13 pulgadas (2008).

4.1.3 MATERIAL FUNGIBLE

- PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS**:**

Para la obtención y transporte de las piezas dentales se utilizaron hojas desechables de bisturí de diversos tamaños, guantes de látex y botes plásticos herméticos de conservación de muestras orgánicas, así como rotuladores indelebles para el adecuado marcado e identificación permanente de los botes.

Peróxido de hidrógeno. Agua oxigenada 110 vol. 30 % (Peróxido de hidrógeno de 1,12. Código producto: 0466 GA. Jerrican de 28 kgs. Cofarcas, SA. Productos Químicos Industriales).

Acetona. Acetona 99 %. (C_3H_6O . 2 propanona, dimetilcetona d 0,79. Código producto: 00156. Jerrican de 21 kgs. Cofarcas, SA. Productos Químicos Industriales).

Otros: Agua destilada. Ácido nítrico. EDTA. Hematoxilina de Ehrlich. Portaobjetos. Cubreobjetos. Cubetas, bandejas, etc.

- REALIZACIÓN DE LAS RADIOGRAFÍAS**:**

Película radiográfica: Las imágenes radiográficas fueron obtenidas sobre película estándar de contraste de grano fino y alta definición para radiografía general, ortocromática sensible a la luz verde, Konica Minolta. MG – SR Plus N, en tamaños 30 x 40 – A3WF y 24 x 30 – A3WH

Líquidos de revelado: La reveladora automática empleada fue cargada con los líquidos revelador y fijador adecuados para el procesado de películas radiográficas.

- TRANSPORTE DE LA INFORMACIÓN

A lo largo de la realización de este trabajo, se utilizaron, para el transporte de información, lápices de memoria USB Toshiba TransMemory de 32 GB, así como Discos CD-R Verbatim® de 700 MB.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 BIOMETRÍA DE LOS CADÁVERES

De todos los ejemplares, salvo de aquellos de los que solo se encontraron restos, se realizó un estudio biométrico, con especial atención al peso, sexo, longitud total, altura a la cruz.

Todas las medidas fueron obtenidas en kilogramos (Kg), centímetros (cm) y milímetros (mm).

4.2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS (CRÁNEOS)

Salvo 2 cráneos, que fueron encontrados en el campo, uno en estado de esqueletización y el otro en avanzado estado de descomposición, el resto fueron procesados mediante cocción en agua, por períodos comprendidos entre 2 y 4 horas, dependiendo del tamaño y la cantidad de restos orgánicos adheridos al cráneo. Finalizada la cocción en agua, La grasa fue eliminada mediante lavado continuado con agua caliente y posterior inmersión en acetona industrial.

4.2.3 EXTRACCIÓN DE LOS DIENTES

En todos los casos, salvo excepciones por limitaciones inherentes a las muestras (pérdida de piezas dentales, excesivo deterioro en atropellos, entre otros) se extrajeron muestras dobles de dientes unirradiculares, intentando producir el menor deterioro posible en el cráneo.

Para el estudio histológico de los anillos de cemento, se eligió el primer premolar (1º PM) inferior en primera instancia, por tratarse de un diente de raíz única, pequeña, y corte recto, y el tercer molar (3º M) inferior cuando la primera opción no fue posible. Para el estudio radiológico de la cavidad pulpar, a su vez, se utilizó el canino inferior.

La extracción de las piezas dentales, sacándolas de su posición en el alvéolo correspondiente, en los cadáveres en fresco, previa a la cocción, se realizaba mediante técnica dental por avulsión y tracción cuidadosa con material *ad hoc*, ya sea por tracción simple, favorecida por la desintegración del ligamento periodontal por cocción o putrefacción, o por rotura del ligamento con botador, luxación y extracción de la pieza dentaria, mediante la aplicación de técnicas odontológicas básicas. Una extracción realizada con una técnica adecuada ayuda a preservar la parte del ligamento periodontal adherida al diente.

Respetando esta estructura, se asegura la presencia de la misma en el corte histológico, transformándose, junto con la unión dentina – cemento, en los límites, externo e interno respectivamente, que servirán para el recuento de los anillos de cemento. Una vez extraída la pieza dental, se procedía a su inclusión en un bote plástico, doblemente rotulado, con tinta indeleble, en el cuerpo y en la tapa del mismo. Se considera imprescindible la rotulación en el cuerpo del bote.

- DIENTE DE REPOSICIÓN

Debido a la necesidad de tener en cuenta las posibles incidencias que pudieran surgir durante el envío de las muestras al laboratorio, como en el proceso de descalcificación, inclusión, corte y tinción del diente en estudio, se tuvo en todo

caso la previsión de guardar una muestra similar (diente contralateral) como diente de reposición, siguiendo las recomendaciones de Matson *et al*. (1993).

4.2.4 PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Una vez limpios los dientes, se prepararon sus raíces, separándolas de la corona con un instrumento cortante (sierra de mano).

A continuación, se procedió a la descalcificación de las raíces, sumergiéndolas en una solución de EDTA durante una semana, cambiando los líquidos cada dos días. Se consideró descalcificado el diente cuando cedía a la presión realizada con un instrumento manual (pinza) en ambos ejes.

Únicamente el ejemplar nº 41 (0044) no se descalcificó, por lo que, tras lavarlo en agua destilada durante un día, se continuó la descalcificación con ácido nítrico al 7%, a razón de unas 5 horas diarias, al final de las cuales, se comprobó el grado de descalcificación presionando levemente con pinza para controlar la dureza del diente, hasta que se comprobó que, como en el resto de los casos, cedía ligeramente a la presión en ambos ejes.

La descalcificación podía durar varios días, por lo que las muestras se dejaron en agua destilada en la nevera entre sesiones. Una vez descalcificado el diente se dejó al menos un día en agua destilada, cambiando un mínimo de dos veces el líquido, antes de cortarlo en el criostato. Finalmente, se cortaron los dientes a 18 micras, llegando hasta la parte central de los mismos.

Preparados los cortes, se tiñeron con hematoxilina de Ehrlich durante 2 horas, a continuación se sumergieron en agua del grifo durante 2-3 horas, con un cambio entre medias. A continuación, se colocaron en el portaobjetos con un medio de montaje acuoso.

Una vez finalizada la preparación histológica del diente, se rotuló con la mayor cantidad de información posible, y se conservó con el fin de integrar un archivo para lecturas posteriores.

4.2.5 DATACIÓN POR APRECIACIÓN VISUAL

Los datos usados para asignar, a cada uno de los dientes, una edad por apreciación visual basada en el desgaste, marcas de atrición y coloración, de cara a la comparación con la técnica considerada *Gold Standard* (corte histológico) en el presente estudio, se basan en la cronología de los eventos relacionados con la erupción, el cambio de la dentición y los cambios que a lo largo de la vida del lobo se producen en el aspecto físico de la dentadura: dentadura decidua, cambio a dentadura permanente, con periodo de coexistencia de dientes de ambas, desgaste progresivo de los incisivos superiores, desgaste progresivo de los incisivos inferiores, aparición de líneas de atrición, disminución de la cúspide mayor de la muela carnicera, desgaste generalizado, pérdida de piezas dentales, desgaste pronunciado de ambas cúspides de la muela carnicera, y cambio de coloración progresivo (blanco nacarado, pérdida del brillo, tonalidad amarillenta opaca, amarilla, líneas de atrición de color cobrizo).

Además de la asignación individual de la edad de cada uno de los ejemplares del estudio, conforme a la bibliografía consultada y la experiencia personal, para el análisis estadístico de los datos, al tratarse de variables no paramétricas, se procedió a categorizar tres grupos de edad, distinguiendo los siguientes: de 0 a 3 años, de 3 a 5 años, y mayor de 5 años.

4.2.6 DATACIÓN POR BIOMETRÍA DENTAL

Al realizar las medidas en la parte libre del diente (corona), y salvo en los casos en que existió una falta evidente del alvéolo dentario, no se apreciaron diferencias significativas por la presencia de la encía en el cráneo sin limpiar con respecto al cráneo limpio.

Para la obtención de medidas de las piezas dentales se utilizó un calibre digital, ya referenciado en el apartado de material inventariable.

Se eligieron 8 piezas dentales por cráneo, repartidas en cuatro para la mitad izquierda y cuatro para la mitad derecha. Estos dientes fueron: canino superior derecho e izquierdo, canino inferior derecho e izquierdo, tercer incisivo superior derecho e izquierdo y cuarto premolar derecho e izquierdo. Las medidas tomadas fueron: longitud total y anchura de la base en los caninos superiores e inferiores y en el tercer incisivo superior.

En el caso del cuarto premolar superior ("muela carnicera"), se midió también la anchura de la base y la longitud de la cúspide mayor.

En todos los casos que el parámetro a medir incluía la longitud total del diente, se tomó como límite superior el borde gingival sano, y en el caso de retracción de la encía, el límite entre esmalte y cemento, al ser una superficie fácilmente identificable debido a la rugosidad del cemento en contraste con la suave superficie del esmalte. El límite inferior para la medida de la longitud total lo definía el borde libre del diente.

Para obtener la medida de la anchura de la base se apoyó el calibre en los extremos anteriores y posteriores de cada diente en la zona de contacto con la

encía. En caso de retracción gingival o ausencia de la misma por tratarse de un cráneo limpio, la medida se llevó a cabo en la zona de transición alvéolo – corona.

Así mismo, se eligieron empíricamente dos medidas del cráneo que involucran al grupo de dientes incisivos: el denominado BLOQUE INCISIVO, y el BLOQUE INCISIVO CANINO.

La medida del BLOQUE INCISIVO se realiza aplicando el calibre en forma perpendicular a los seis incisivos superiores con una abertura que incluye ambos extremos de este grupo de dientes. (Figura 11)

Para la medida del BLOQUE INCISIVO CANINO se amplía la abertura del calibre hasta incluir los bordes laterales (cara labial) de ambos colmillos. (Figura 12)

Figuras 11 y 12. La imagen superior corresponde al BLOQUE INCISIVO, y la inferior al BLOQUE INCISIVO CANINO.

Figuras 13 y 14. En la imagen superior se representa la longitud total del canino superior. En la imagen inferior se representa la anchura de la base.

.

Figuras 15 y 16. En la imagen superior se representa la anchura de la base del cuarto premolar superior. En la imagen inferior se representa la longitud de la cúspide mayor del cuarto premolar superior.

.

Todas las medidas fueron recogidas en una ficha individual (Figura 17) para cada ejemplar en estudio, donde se apuntaban todas los datos mencionados con anterioridad, más la identificación individual, color, marcas, fecha, sexo y peso.

Posteriormente todos los datos fueron volcados a una hoja de Excel, donde fue posible realizar una primera valoración estadística descriptiva.

En todos los casos la toma de medidas fue una sola por ejemplar y realizada siempre por la misma persona. Este criterio fue adoptado desde un principio con el fin de evitar en la medida de lo posible una gran variación atribuida a la toma de muestra.

ESPECIE	SEXO	PESO	FECHA	IDENTIFICACION
Canis lupus signatus				

LADO IZQUIERDO	LONGITUD TOTAL	ANCHO BASE	CUSPIDE > 4º Pm	COLOR	MARCAS
Cs					
Ci					
Pm					
III inc.sup					

LADO DERECHO	LONGITUD TOTAL	ANCHO BASE	CUSPIDE > 4º Pm	COLOR	MARCAS
Cs					
Ci					
Pm					
III inc.sup					

FRENTE	INCISIVOS SUPERIORES	INCIS. SUP + COLM. SUP
LONGITUD		

Figura 17. Modelo de ficha usada en el estudio para la biometría dental.

4.2.7 DATACIÓN POR VALORACIÓN DE LA CAVIDAD PULPAR

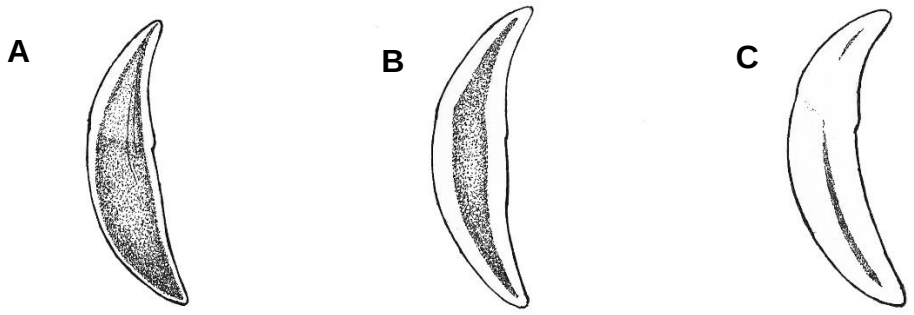


Figura 18. Corte longitudinal de las piezas dentarias (caninos). Cavidad pulpar amplia (A), cavidad pulpar en retroceso (B) y cavidad pulpar mínima (C).

Siempre que fue posible, como se dijo, se utilizó el canino inferior para la obtención de la imagen radiográfica sobre la que se había de medir la cavidad pulpar (Figura 18).

Una vez obtenida la pieza dentaria, se procedió a realizar la radiografía, colimando en todos los casos una superficie suficiente para el encuadre de dos caninos, para proceder a continuación a su revelado automático y, ya revelada la radiografía, hacer una fotografía con cámara digital con el fin de poder editarla, identificarla y medirla.

Una vez digitalizada, se procesó la imagen en Adobe Photoshop, utilizando herramientas de medición del propio programa, cuya unidad de distancia medida es el píxel. Los resultados así obtenidos se expresan en porcentaje con el fin de

estandarizar una medida y hacerla fácilmente comprensible y extrapolable (Figura 19).

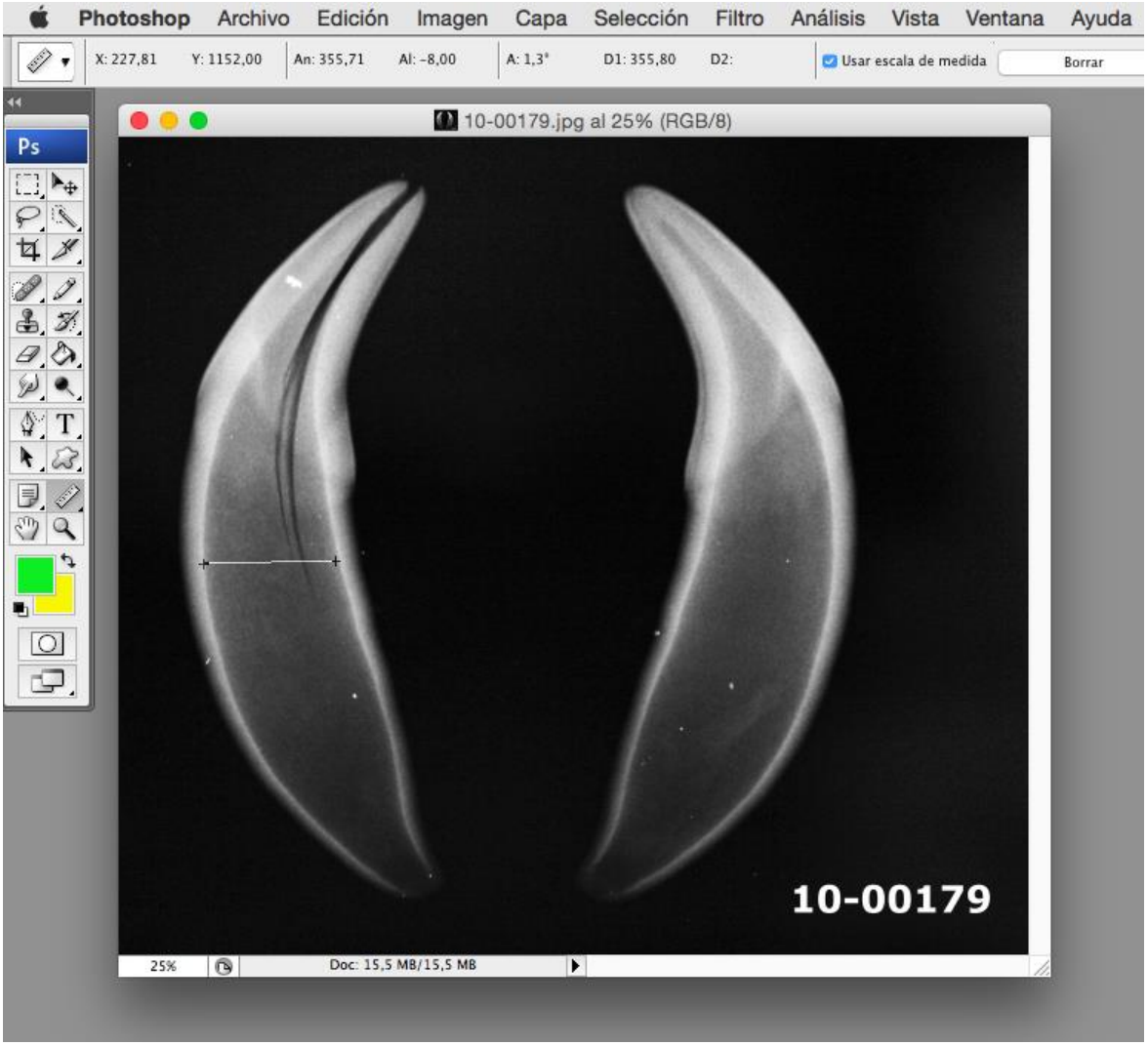
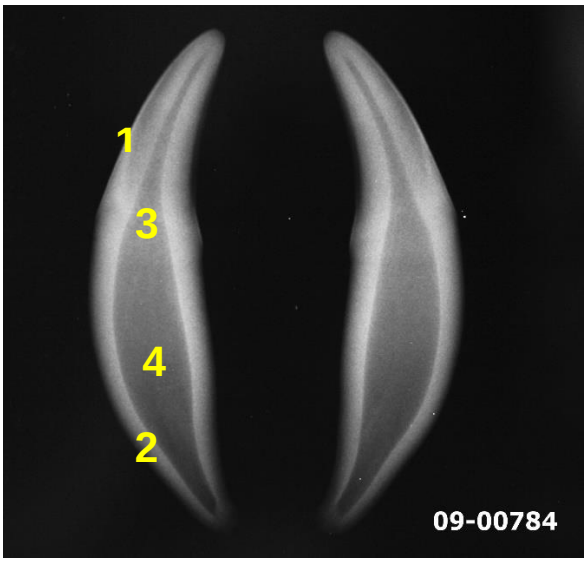


Figura 19. Captura de pantalla donde es posible apreciar la herramienta de medida del programa de dibujo Photoshop para medir estructuras con unidades en pixeles.

- DESCRIPCIÓN DE A TÉCNICA DE MEDICIÓN

En primer lugar, se describen las estructuras que componen la imagen radiográfica del colmillo: Esmalte (**1**), Cemento (**2**), Dentina (**3**), Cavidad pulpar (**4**) y (**5**) Extensión total (Figura 20 y 21).

Extensión total : *Es la distancia entre la superficie anterior y la posterior de la zona más ancha de la imagen radiográfica del colmillo*.



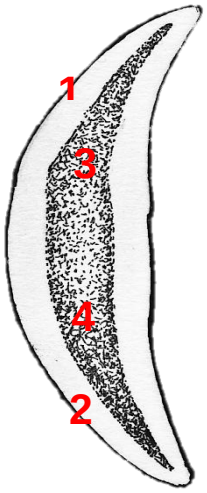


Figura 20 y 21. Radiografía e ilustración de dos piezas dentales (caninos) en las que se representan las partes destacadas, esmalte (**1**), cemento (**2**), dentina (**3**), cavidad pulpar (**4**),

4.2.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Vs-18. La normalidad de la distribución de las variables se evaluó con los *tests* de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro Wilk.

La homogeneidad de varianzas se analizó con el *test* de Levene. Las variables normales cuantitativas se describieron como media (intervalo de confianza al 95%, -95% IC-; o desviación estándar -DS-) y las no paramétricas como mediana (percentil 5–percentil 95). Las variables cualitativas y los recuentos se describieron como frecuencia absoluta y relativa (n, %).

Las comparaciones de las variables cuantitativas de 2 muestras independientes en función del sexo se realizaron con los *tests* T-Student, para variables con distribución normal, y U de Mann-Whitney, en el caso de las variables no paramétricas. La concordancia entre la técnica *Gold Standard* y la datación mediante apreciación visual se evaluó cuantitativamente mediante el coeficiente de correlación intraclase y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%), utilizando los criterios de Fleiss (mala concordancia para un valor de CCI entre 0 y 0,35; concordancia mediocre entre 0,35 y 0,7; y buena concordancia para valores de CCI mayores de 0,7).

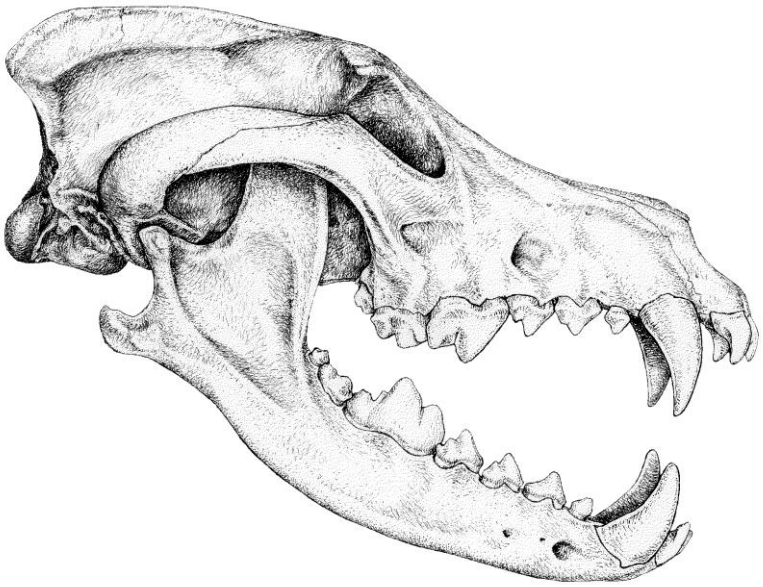
Se estudiaron además los datos obtenidos de forma cualitativa a través del análisis de Bland-Altman.

El estudio de la concordancia entre el *Gold Standard* y la datación mediante la valoración de la cavidad pulpar se evaluó categóricamente mediante el análisis Kappa de Cohen y su intervalo de confianza al 95% (IC95%).

En el estudio de la variabilidad de la edad medida mediante corte histológico y la variación de las variables obtenidas mediante técnicas de medición con calibre se analizó recurriendo a la regresión lineal.

El nuevo modelo predictivo para la estimación de la edad a partir de técnicas de medición con calibre se obtuvo mediante regresión lineal múltiple.

El nivel de significación estadística se estableció siempre en $p<0,05$ para todos los análisis efectuados.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El estudio estuvo formado por una muestra total de 40 sujetos (n = 40). Como se indicó en el apartado de material y métodos, la muestra total varía dependiendo de las técnicas empleadas cuando se estratifican los datos por sexo (Apéndice I.I). Considerado como la técnica de datación más objetiva y precisa, el corte histológico se establece como método de referencia (*Gold Standard*). Los valores obtenidos se comparan con los calculados para los otros métodos.

Mediante el uso de la técnica de corte histológico se determinó la edad en el 100% (n = 40) de los individuos analizados (Apéndice I.I, Figura 22). En la técnica de apreciación visual se pudo asignar un valor estimado de la edad en el 82.5% (n = 33) de los sujetos de la muestra total (Apéndice I.I, Figura 23). En la técnica de medición de la cavidad pulpar se estimó la edad (joven o adulto) del sujeto en el 44.2% (n = 31) de la muestra total (Apéndice I.I, Figura 24).

5.2 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DEL CORTE HISTOLÓGICO

El total de muestra para la técnica de corte histológico fue de n = 40.

La muestra en estudio no sigue una distribución normal. La mediana en la muestra total estudiada por corte histológico es de 2 años, con una distribución entre un valor mínimo de 1 año y un valor máximo de 7 años. Cuando estos valores son estratificados por sexo, la edad máxima desciende a valores de 5,8

años en los machos, manteniendo el valor de la muestra total en el caso de las hembras.

En el momento de categorizar las muestras por edad, el 77.5 % de los casos (n = 31) se engloba dentro del grupo de edad entre 0 y 3 años. El 12.5 % (n = 5) se incluye dentro del grupo de edad comprendido entre 3 y 5 años. El 10% de los casos (n = 4) pertenece al grupo de edad mayor de 5 años (Apéndice I.II).

De la muestra total (n = 40) se pudo estratificar por sexo el 82.5% (n = 33), siendo machos (n = 15) y hembras (n = 18).

En el subgrupo de los machos, el 86.7% (n = 13) pertenece al grupo de edad de 0a 3 años, el 6.7% (n = 1) al grupo de edad entre 3 y 5 años y el 6.7% (n = 1) al grupo de edad mayor de 5 años. En hembras, el 72.2% (n = 13) pertenece al grupo de edad comprendido entre 0 y 3 años, el 16.7% (n = 3) al grupo de 3 a 5 años y el 11.1% (n = 2) a mayores de 5 años (Apéndice I.II, Figura 22).

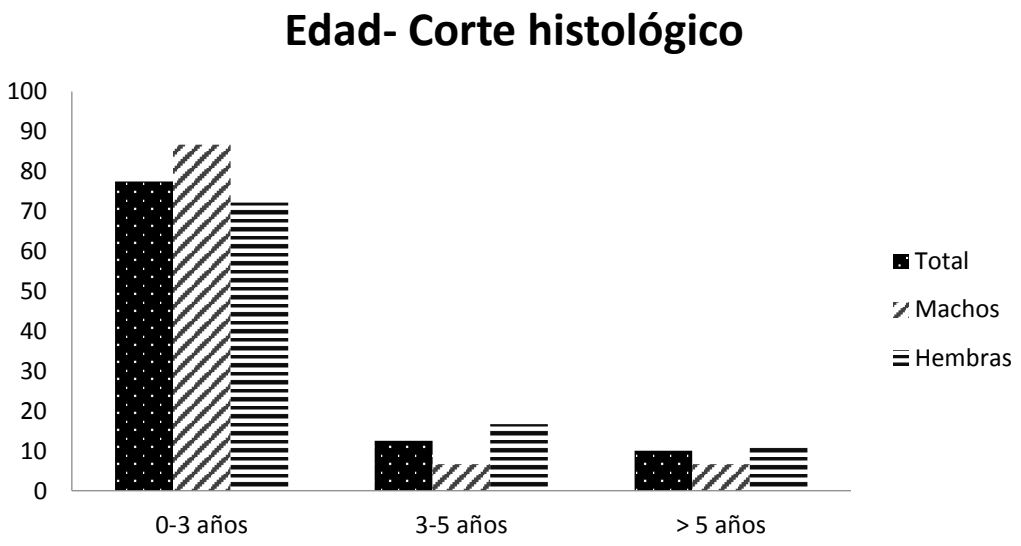


Figura 22. Gráfico de barras en el que se representa la distribución de edades en base a la técnica de corte histológico en los tres rangos de edad con relación al sexo.

5.3 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA APRECIACIÓN VISUAL

El total de muestra para la técnica denominada de apreciación visual fue de n = 33. El conjunto de datos no sigue una distribución normal. La mediana de la muestra total es de 3 años, con valores entre 1 y 7,3 años. La diferenciación por sexos arroja valores mínimos (p5) de 1 año y un extremo superior (p95) de 7,6 años para los machos y 7 años para las hembras.

Cuando se establecen categorías por edad, el 57.6 % de los casos (n = 19) se engloba dentro del grupo de edad categorizada entre 0 y 3 años. El 6.1 % (n = 2) se incluye dentro del grupo de edad comprendido entre 3 y 5 años. El 36.4% de los casos (n = 12) pertenece al grupo de edad mayor de 5 años (Apéndice I.II).

De la muestra total (n = 33) se pudo estratificar por sexo el 90.9% (n = 30), siendo machos (n = 13) y hembras (n = 17). Entre los machos, el 64.5% (n = 8) pertenece al grupo de edad de 0 a 3 años, el 7.7% (n = 1) al grupo de edad entre 3 y 5 años y el 30.8% (n = 4) al grupo de edad mayor de 5 años. En hembras, el 52.9% (n = 9) pertenece al grupo de edad comprendido entre 0 y3 años, ningún sujeto (n = 0) en el grupo de 3 a 5 años y el 47.1% (n = 8) a mayores de 5 años (Apéndice I.II. Figura 23).

.

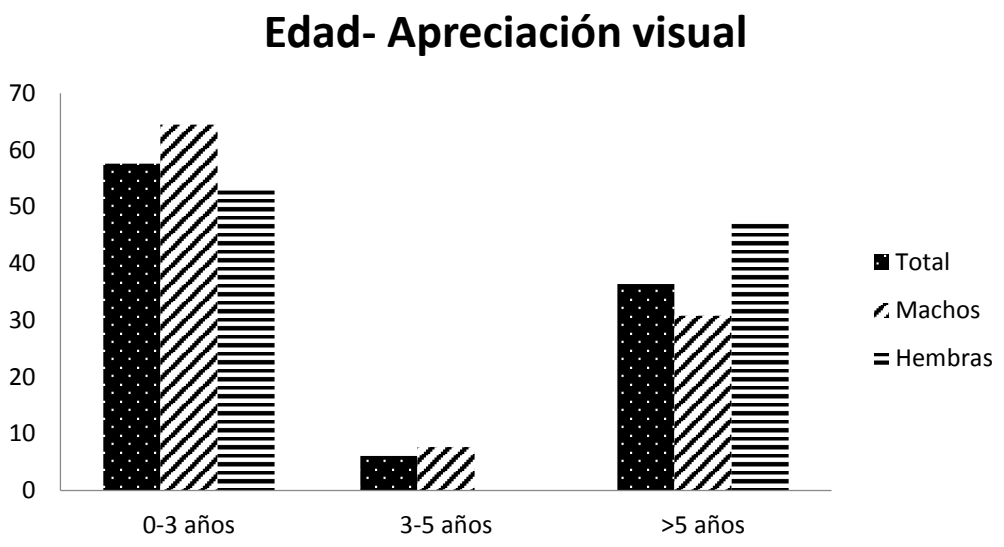


Figura 23. Gráfico de barras en el que se representa la distribución de edades en base a la técnica de apreciación visual en los tres rangos de edad con relación al sexo.

5.4 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA CAVIDAD PULPAR

El total de muestra para la técnica de medición de cavidad pulpar fue de n = 31. El 32.3% de los casos (n = 10) se engloba dentro del grupo de edad categorizada entre 0 y 3 años; el 19.4 % (n = 6) se incluye dentro del grupo de edad comprendido entre 3 y 5 años, y el 48.4% de los casos (n = 15) pertenece al grupo de edad mayor de 5 años (Apéndice I.II).

De la muestra total (n = 31) se pudo estratificar por sexo el 83.8% (n = 26), siendo machos (n = 12) y hembras (n = 14).

En machos, el 33.3% (n = 4) pertenece al grupo de edad de 0 a 3 años, el 8.3% (n = 1) al grupo de edad entre 3 y 5 años y el 58.3% (n = 7) al grupo de edad mayor de 5 años. En hembras, el 28.6% (n = 4) pertenece al grupo de edad comprendido entre 0 y 3 años, el 28.6% (n = 4) en el grupo de 3 a 5 años y el 42.9% (n = 6) a mayores de 5 años (Apéndice I.II, Figura 24).

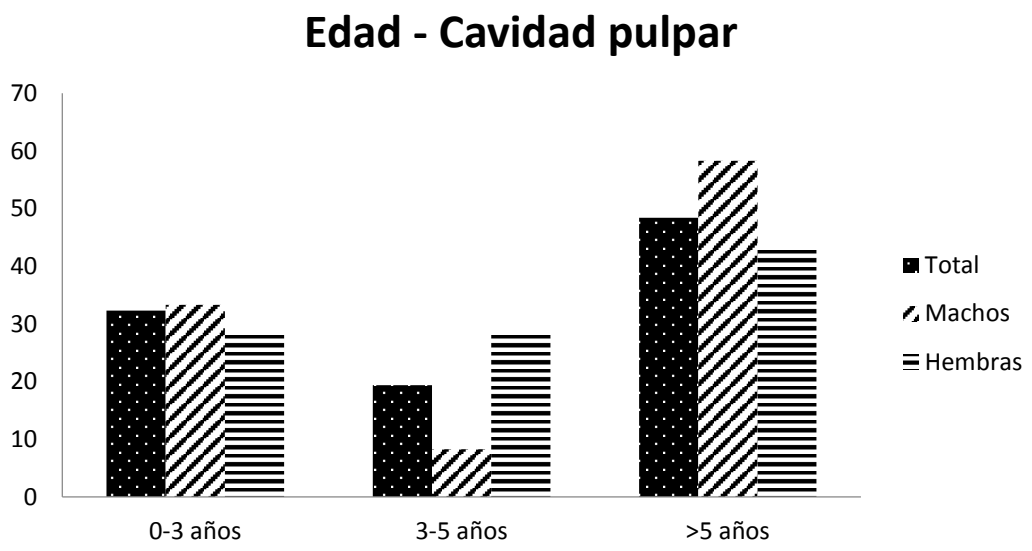


Figura 24. Gráfico de barras en el que se representa la distribución de edades en base a la técnica de medición de la cavidad pulpar en los tres rangos de edad con relación al sexo

5.5 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA BIOMETRÍA DENTAL

El total de muestra para la técnica de biometría dental fue de n = 30, salvo por la ausencia de alguna pieza dental específica donde no fue posible obtener una magnitud (longitud del tercer incisivo superior izquierdo, ancho base del tercer incisivo izquierdo y bloque incisivo), en cuyo caso n = 29 (Apéndice I.I).

Los valores máximos de longitud total del colmillo superior izquierdo y derecho (CSI, CSD) son de 34.25 mm y 33.30 mm, respectivamente, para el total de la muestra. Los valores mínimos (CSI, CSD) son de 18.80 mm y 19.91 mm, respectivamente. El valor medio (media ± SD) del conjunto de datos para CS es de (27.02 ± 3.08 mm) (Apéndice I.I y I.III).

En el caso de los colmillos inferiores (CI), los valores máximos del colmillo inferior izquierdo y derecho (CII, CID) son 28.97 mm y 30.51 mm, respectivamente. Los valores mínimos son 20.37 mm y 21.14 mm para el CII y

CID, respectivamente. El valor medio (media ± SD) del conjunto de datos para CI es (24.59 ± 1.98 mm) (Apéndice I.I y I.III).

La anchura de la base del colmillo superior izquierdo (CSI:ab) para el total de la muestra es, en promedio, de (13.55 ± 1.24 mm). Diferenciando entre sexos, el canino superior izquierdo (CSI:ab) se sitúa en valores medios de (13.86 ± 1.16 mm) para los machos y (13.12 ± 1.41 mm) para las hembras.

El valor medio de la anchura de la base del canino superior derecho (CSD:ab) para el total de la muestra es (13.64 ± 1.46 mm). Para los machos, los valores medios encontrados fueron de (14.21±1.33 mm) y para hembras (13.25±1.25 mm) (Apéndice I.III).

La anchura de la base del colmillo inferior izquierdo (CII:ab) para el total de la muestra alcanza una media de (13.35 ± 1.10 mm). Diferenciando entre sexos, el canino superior izquierdo (CSI:ab) se sitúa en valores medios de (13.97 ± 0.70 mm) para los machos y (12.80 ± 0.98 mm) para las hembras. El valor medio de la anchura de la base del canino inferior derecho (CID:ab) para el total de la muestra es (12.95 ± 1.23 mm).

Para los machos, los valores medios obtenidos fueron (14.83±1.39 mm) y para hembras (13.77± 1.47 mm) (Apéndice I.I).

La anchura de la base de ambos colmillos inferiores, la longitud total de ambos colmillos superiores, las medidas asociadas al cuarto premolar y los índices BI y BIC permitieron establecer diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para los valores de machos y hembras en los ejemplares en estudio (Apéndice I.I).

En las gráficas que se exponen a continuación (Figuras 25 - 33) se destacan los resultados (Apéndice I.III) obtenidos a través de la comparación entre el índice BIC (bloque incisivo canino) propuesto para esta tesis y otras medidas obtenidas por medición con calibre, como son la anchura de la base de ambos caninos superiores (CSD y CSI), cúspide del 4º PMD, cúspide del 4º PMI y la anchura de la base de ambos premolares; así mismo, se enfrentan en un gráfico el porcentaje de cavidad pulpar (% CP) y la anchura de la base de ambos colmillos superiores (CSD) y (CSI), y finalmente los valores del porcentaje de cavidad pulpar (% CP) *vs* los valores del bloque incisivo canino (BIC).

En todas las relaciones citadas que incluyen al BIC (BIC *vs* CSD, BIC *vs* CSI, BIC *vs* cúspide del 4º PMD, BIC *vs* cúspide del 4º PMI, BIC *vs* ancho de la base de ambos premolares) encontramos una tendencia directamente proporcional, salvo cuando los valores son comparados con el porcentaje de cavidad pulpar (% CP *vs* CSD, % CP *vs* CSI, % CP *vs* BIC), en cuyo caso la relación se hace inversamente proporcional.

El incremento de los valores del bloque incisivo se corresponde con un aumento del tamaño de la base de ambos colmillos, así como con el desarrollo de la cúspide mayor y a anchura de la base de la muela carnicera (4º PM superior).

<u>Bloque incisivo (BI)</u>

Los datos para el bloque incisivo están expresados en milímetros. La muestra para la valoración del bloque incisivo estuvo compuesta por 29 ejemplares. Dos de los ejemplares no permitieron apreciar la variable sexo, arrojando un

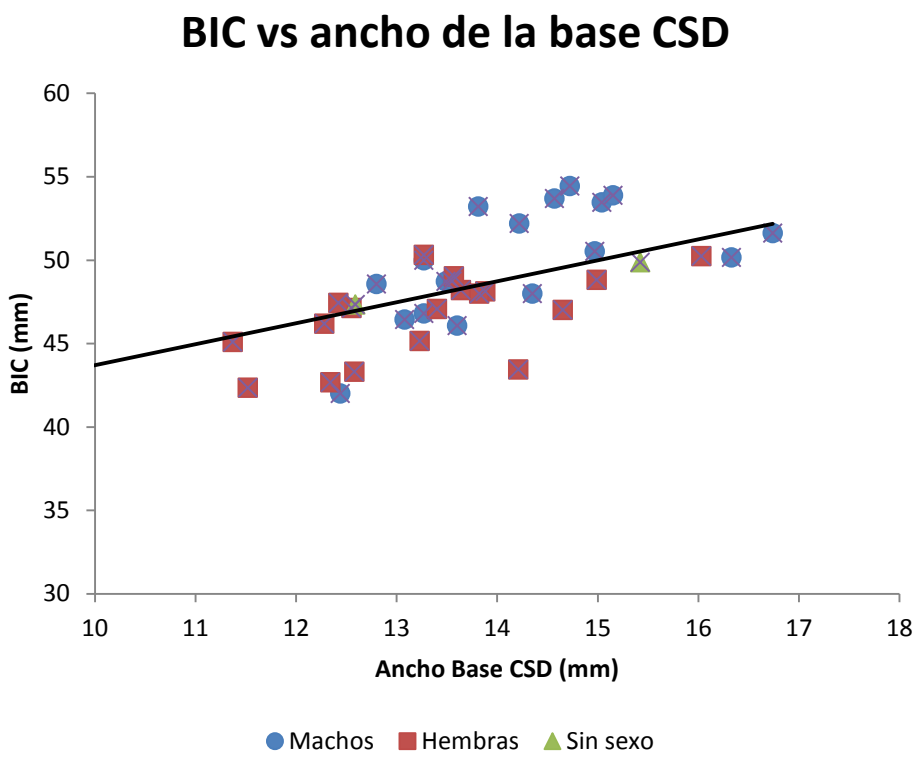
resultado final al separar la muestra por sexo, de 12 machos y 15 hembras (Apéndice I.I).

El valor medio (media ± SD) del conjunto de datos para el bloque incisivo es de (33,93 ± 2,38 mm). Para el grupo de los machos (n = 12), el valor medio obtenido fue de (35,05 ± 2,50 mm), con diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) con respecto a los valores obtenidos para las hembras (32,87 ± 1,67 mm).

Bloque incisivo más caninos (BIC)

La muestra para esta variable estuvo compuesta por 30 ejemplares, en dos de los cuales no se pudo asignar el sexo, correspondiendo a los machos un n = 12 y a las hembras un n = 16.

El valor medio del total de los datos para el bloque incisivo más caninos (BIC) fue de (48,05 ± 3,33 mm), siendo (49,76 ± 3,87 mm) para los machos y (46,70 ± 2,43 mm) para las hembras, distribución de los datos que resultó en una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre sexos para esta medida(Apéndice I.I).



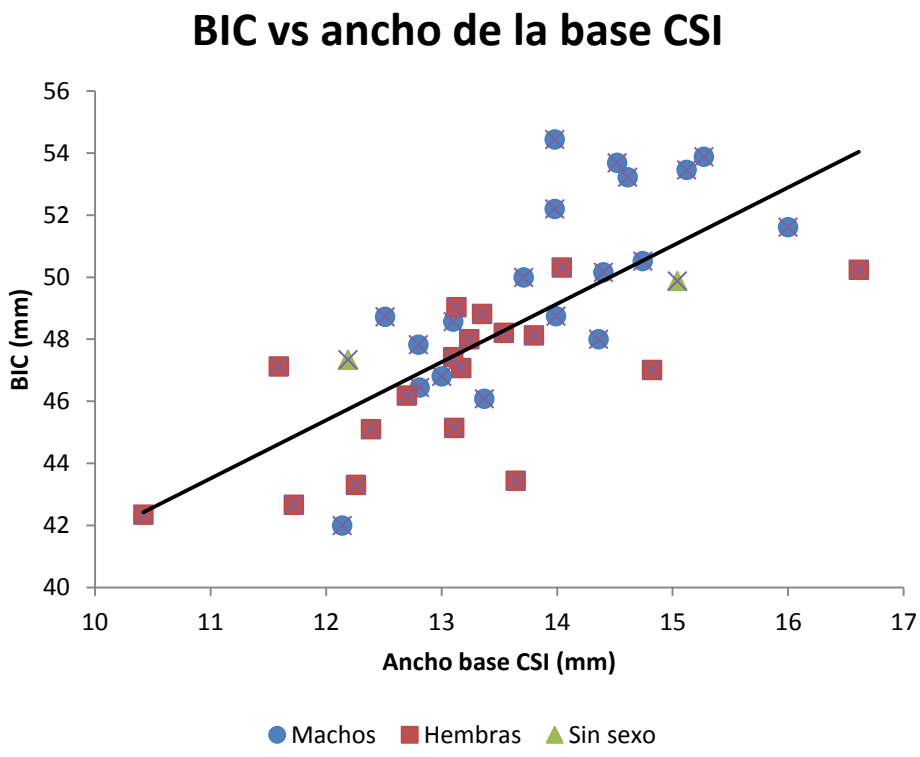
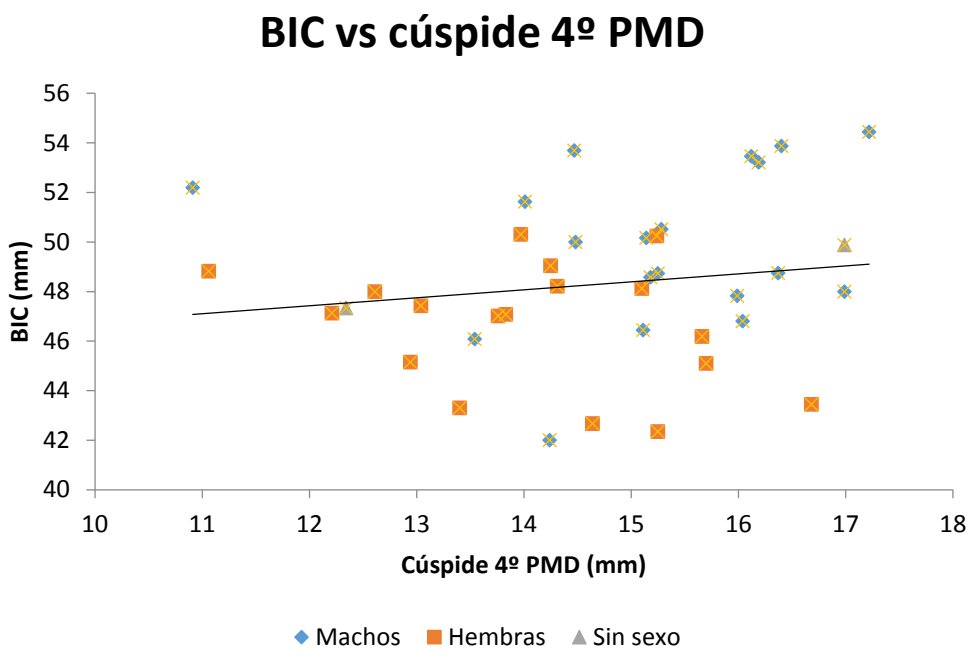


Figura 25 y 26. Gráfico de dispersión en el que se representa el Bloque incisivo canino (BIC) en relación al ancho de la base del canino superior derecho (CSD) y ancho de la base del canino superior izquierdo(CSI) en milímetrods (mm).



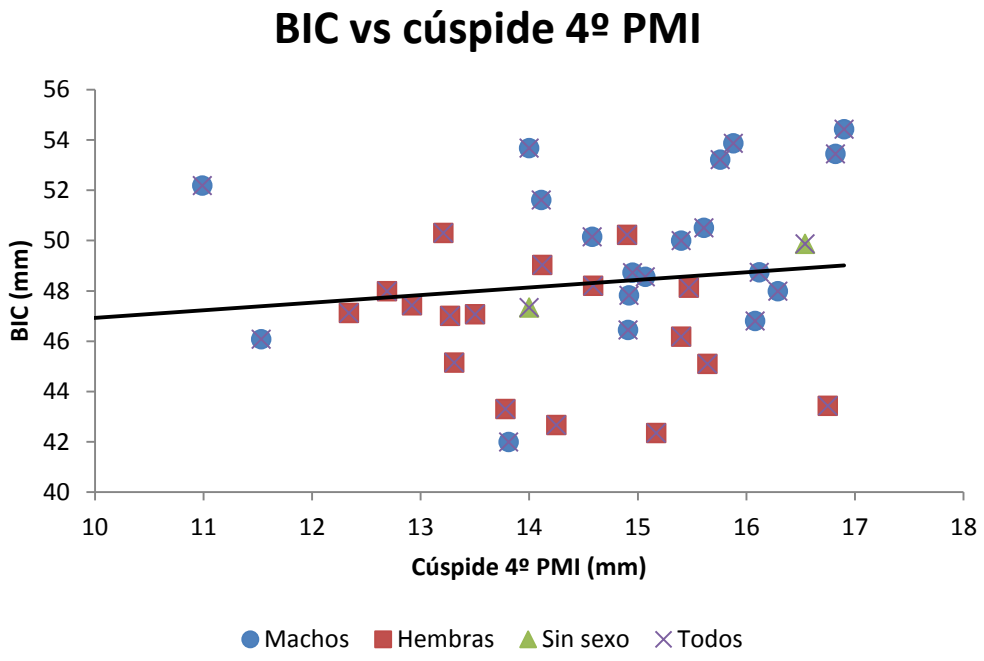
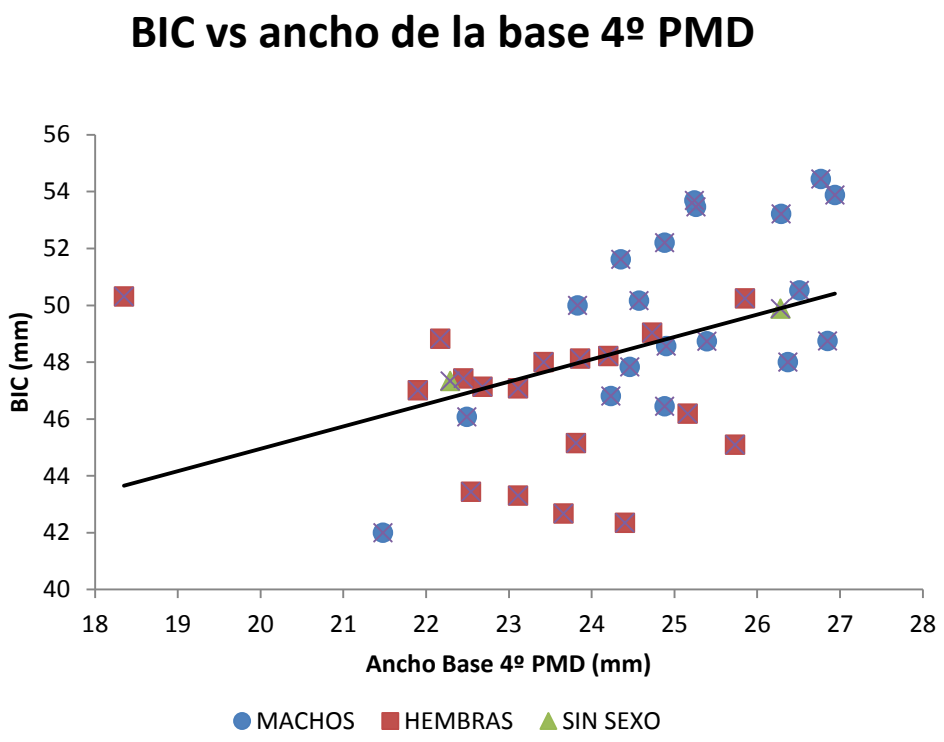


Figura 27 y 28. Gráfico de dispersión en el que se representa el Bloque incisivo canino (BIC) en relación a la cúspide del 4º premolar derecho (CSD) y cúspide del 4º premolar izquierdo(CSI) en milímetrods (mm).



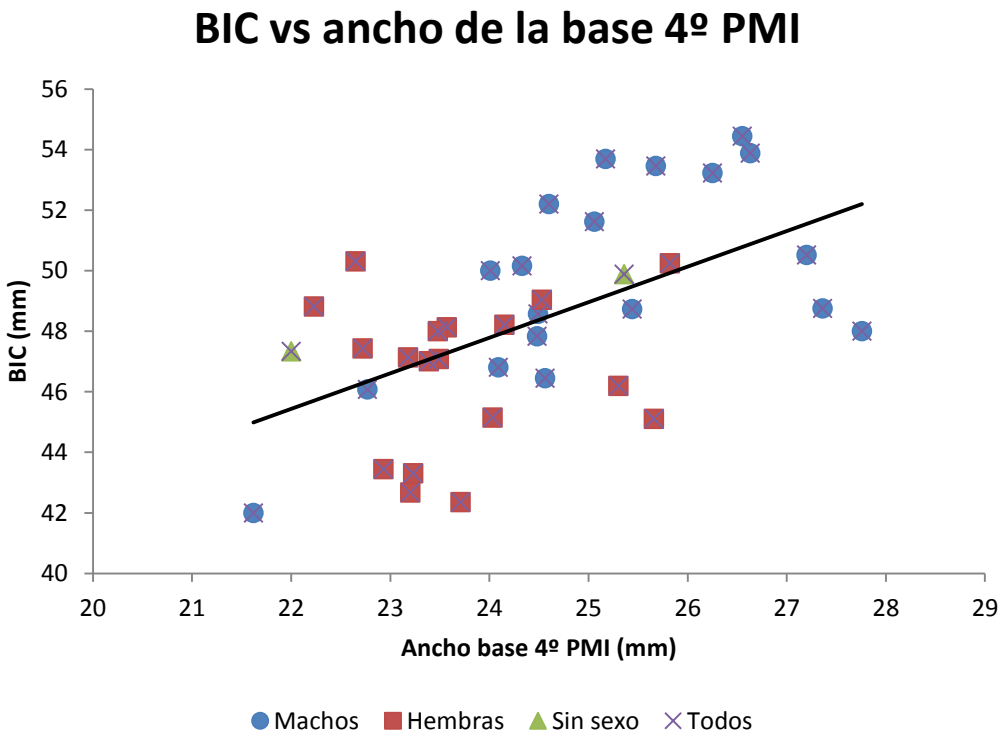
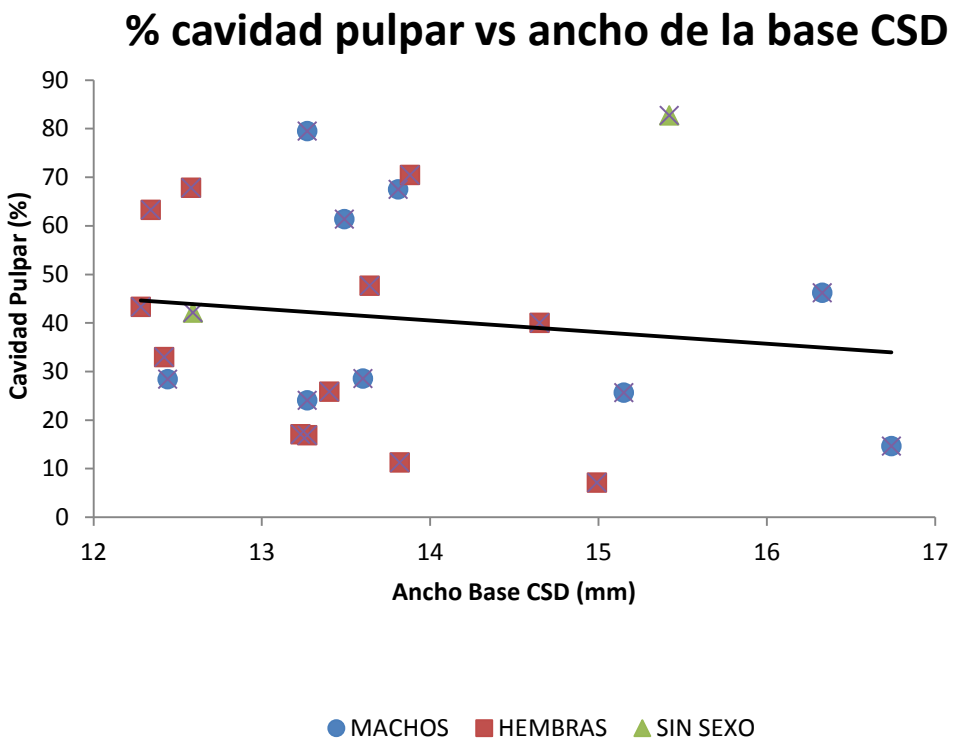


Figura 29 y 30. Gráfico de dispersión en el que se representa el Bloque incisivo canino (BIC) en relación al ancho de la base 4º premolar derecho (CSD) y ancho de la base del 4º premolar izquierdo(CSI) en milímetros (mm).



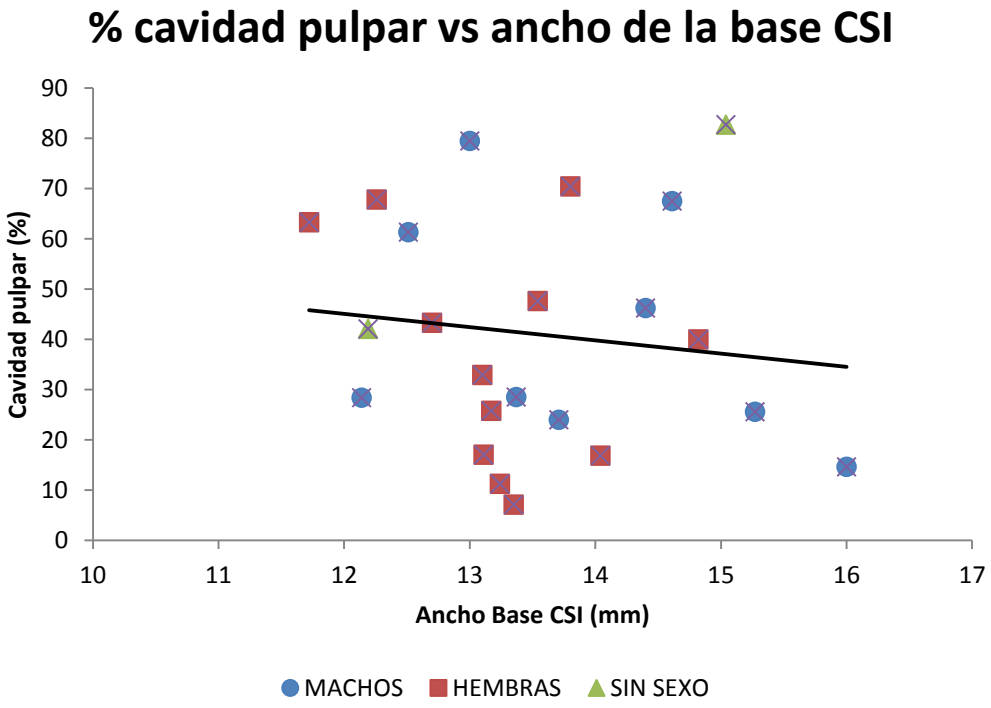


Figura 31 y 32. Gráfico de dispersión en el que se representa la cavidad pulpar (%) en relación al ancho de la base del canino superior derecho (CSD) y ancho de la base del canino superior izquierdo(CSI) en milímetros (mm).

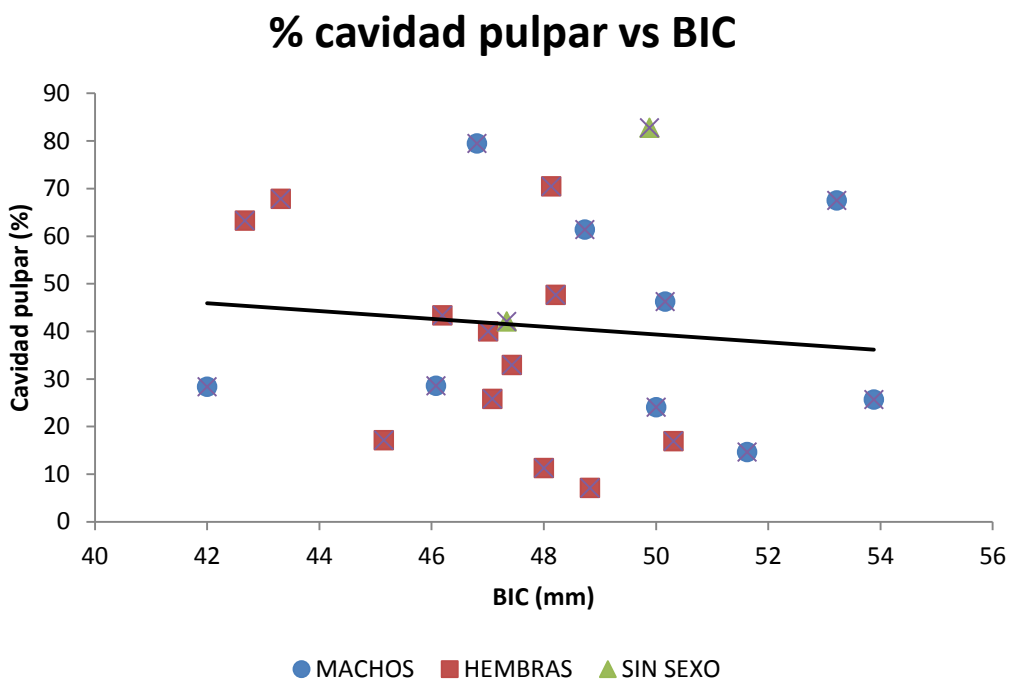


Figura 33. Gráfico de dispersión en el que se representa la cavidad pulpar (%) en relación al bloque incisivo canino (BIC).

5.6 CONCORDANCIA ENTRE MÉTODOS DE DATACIÓN

5.6.1 CORTE HISTOLÓGICO vs APRECIACIÓN VISUAL

En relación a los valores estadísticos obtenidos entre el método de corte histológico o *Gold Standard* se aprecia una muy leve concordancia (R^2 = 0.14, $p<0.05$) cuando se compara con el método de apreciación visual (Tabla 6), existiendo una infravaloración de la edad de 1.6 años cuando se comparan las técnicas de apreciación visual *vs* corte histológico (Tabla 6).

Tabla 6. Estadísticos descriptivos obtenidos entre la técnica de corte histológico *vs* apreciación visual.

	Media	Desviación típica	N
DifHistVisual	-1,6364	1,78217	33
PromHistVisual	3,1212	2,04645	33

R^2	F	B	Sig	A	Sig	CCI	IC 95%
0.146	6.46	-0.362	0.016	-0.508	0.344	0.702	(0.066 –0.883)

Tabla 7. Estadísticos sobre los residuos[a]

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	N
Valor pronosticado	-3,2196	-,8694	-1,6364	,73992	33
Residual	-4,04590	3,03878	,00000	1,62131	33
Valor pronosticado tip.	-2,140	1,037	,000	1,000	33
Residuo típ.	-2,456	1,845	,000	,984	33

a. Variable dependiente: DifHistVisual

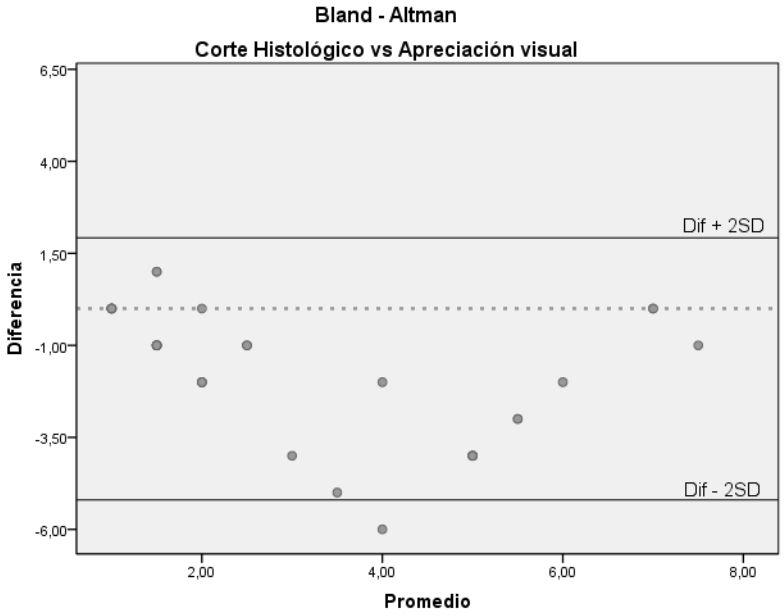


Figura 34. Distribución de los residuos resultantes del corte histológico *vs* apreciación visual.

5.6.2 CORTE HISTOLÓGICO *vs* CAVIDAD PULPAR

En el grupo de estudio correspondiente al porcentaje de cavidad pulpar los resultados se expresan en porcentaje y el tamaño de la muestra fue de n = 31 (Apéndice I.I y I.III).

Los valores se distribuyeron entre un límite inferior de obliteración de la cavidad pulpar del 7.14 % para los animales de mayor edad y un límite máximo de 95.34 % para los animales muy jóvenes, cuya cavidad pulpar permanecía prácticamente vacía (Apéndice I.III) La estratificación por sexo para este grupo solo fue posible en 26 de los 31 ejemplares estudiados, de los que 12 eran machos, y 14 hembras (Apéndice I.I)

Los valores obtenidos no permitieron establecer diferencias estadísticamente significativas para el valor cavidad pulpar en función del sexo (Apéndice I.I). Los ejemplares de los que no fue posble identificar el sexo corresponden a valores que no cumplen los criterios de inclusión por no tener todas las variables en estudio del grupo, así como a cráneos aislados o cadáveres procedentes de atropellos donde no fue recogido el animal complet

Tabla 8. Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Edad - Corte histológico (años - categorías) * Edad - Cavidad pulpar (años - categorías)	31	77,5%	9	22,5%	40	100,0%

Por el método de datación basado en la valoración de la cavidad pulpar, se incluyen 10 ejemplares en el rango de 0 – 3 años, lo que representa un 32,3 % del total, de los cuales 9 de son incluidos en el mismo rango por el método del corte histológico, mientras que este último método, considerado *Gold Standard*, incluye al ejemplar restante en el grupo de 3 – 5 años (Apéndice I.II)

En cuanto al grupo de 3 a 5 años de edad, el método de cavidad pulpar sitúa en él a 6 ejemplares (un porcentaje del 19,4 % del total), que el método de corte histológico valora en su totalidad como correspondientes al grupo de 0 – 3 años (Apéndice I.II).

Por último, el método de cavidad pulpar valora 15 ejemplares dentro del grupo de > 5 años (48,4% del total), mientras que el corte histológico valora 9 de esos 15 en el primer grupo (0 – 3 años), 3 en el grupo de 3 – 5 años y 3 ejemplares en el grupo de > 5 años (Apéndice I.II).

Para método del corte histológico, el grupo de 0 – 3 años representa el 77,4 % (n = 24),frente al 32,3 % que valora en este rango de edad el método de la

cavidad pulpar. En el caso del grupo de 3 – 5 años, la datación por corte histológico incluye a un 12,9 % (n = 4),frente a un 19,4 %, y el grupo de los > 5 años, un 9,7 % (n = 3) contra un 48,4 % por el método de cavidad pulpar (Apéndice I.II).

Tabla 9. Tabla de contingencia Edad - Corte histológico (años - categorías)

* Edad - Cavidad pulpar (años - categorías)

		Edad - Cavidad pulpar (años - categorías)			
		0 a 3 años	3 a 5 años	> de 5 años	Total
Edad - Corte histológico (años - categorías)	De 0 a 3 años	9	6	9	**24 (77,4%)**
	De 3 a 5 años	1	0	3	**4 (12,9%)**
	> de 5 años	0	0	3	**3 (9,7%)**
Total		**10 (32,3%)**	**6 (19,4%)**	**15 (48,4%)**	31 100%

Tabla 10. Medidas simétricas

	Valor	Error típ. asint.[a]	T aproximada[b]	Sig. aproximada	IC 95%
Medida de acuerdo Kappa	,097	,079	1,073	,283	-0,059 - 0,2519
N de casos válidos	31				

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

5.7 DESARROLLO DE UNA FÓRMULA DE DATACIÓN EN BASE A TÉCNICAS BIOMÉTRICAS

MODELO DE REGRESIÓN 1

En base a una sola variable**,** como es AC (anchura de la base del canino superior izquierdo).

FÓRMULA RESULTANTE

AC = Anchura de la base del canino superior izquierdo (mm).	y = -10.26 + 0.92**AC** *(R^2: 0,48; p* <0,001)

MODELO DE REGRESIÓN 2

En base a dos variables, como son AC (anchura de la de base del canino superior izquierdo) y LC (longitud total del canino superior derecho).

FÓRMULA RESULTANTE

AC = Anchura de la base del canino superior izquierdo (mm) **LC** = Longitud total del canino superior derecho (mm)	y = -8.67 + 1.40**AC** – 0.30**LC** *(R^2: 0,62; p* <0,001)

- DIAGNÓSTICO DEL MODELO DE REGRESIÓN

Para la detección de valores alejados, se analizó la distancia de Cook, detectándose un caso alejado con una distancia de Cook de 2.375 (mayor de 1). Por otra parte, el modelo cumplió el criterio de normalidad de los residuales (Figura 35). No se observó ninguna vulneración de la linealidad ni de la homogeneidad de variancias (Figuras 36 a 39).

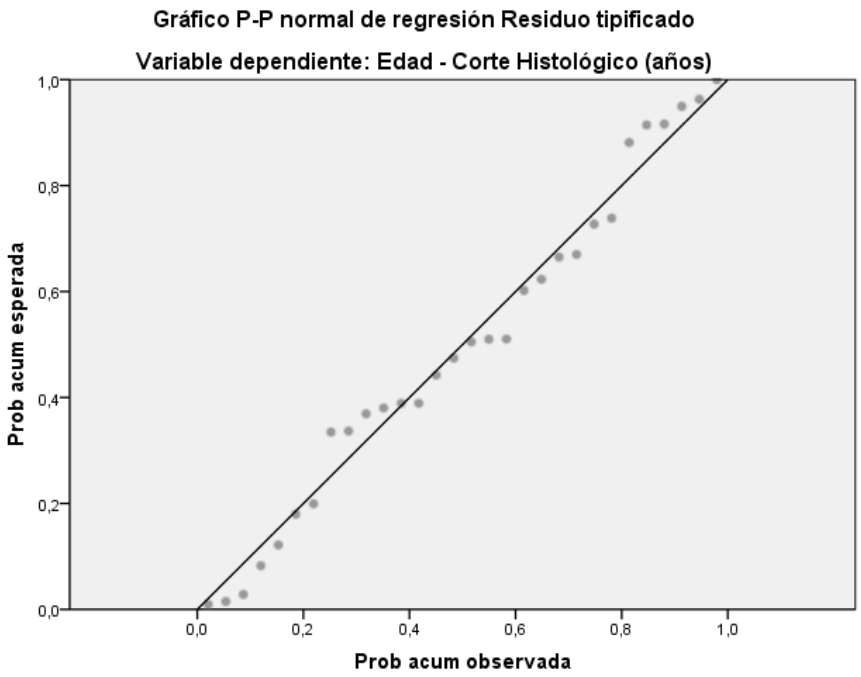
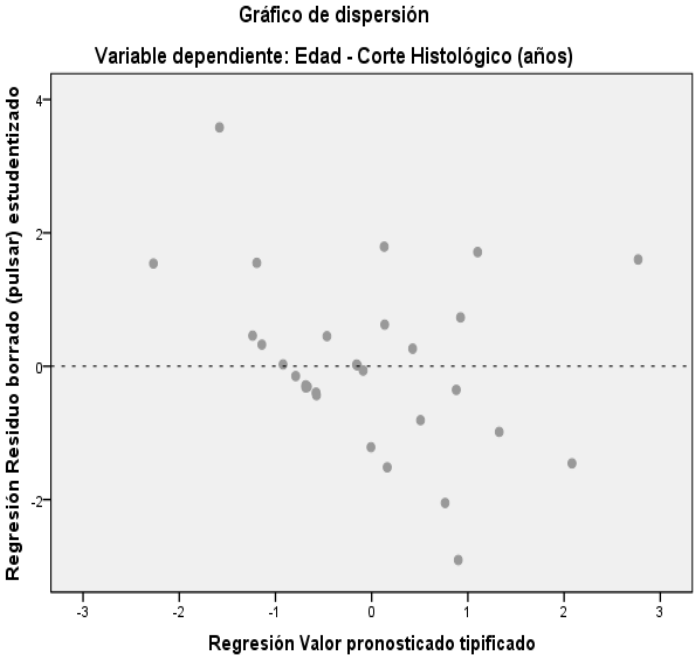
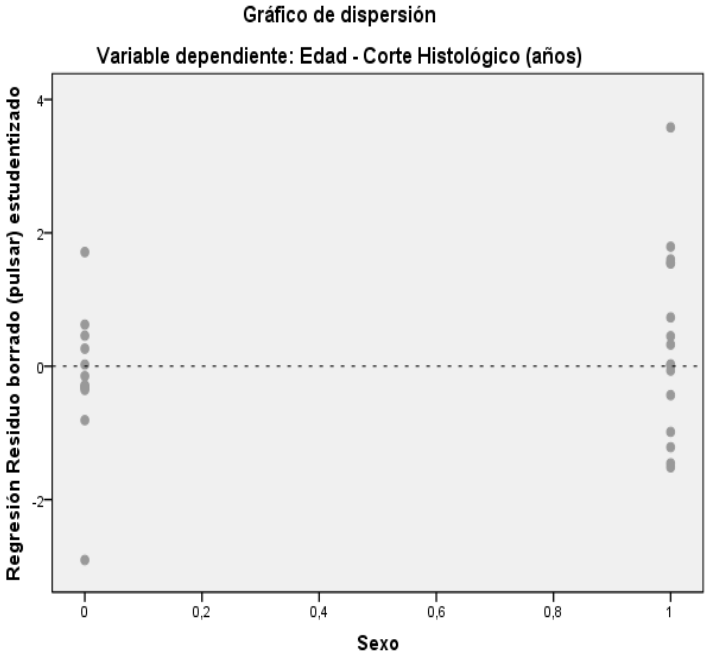
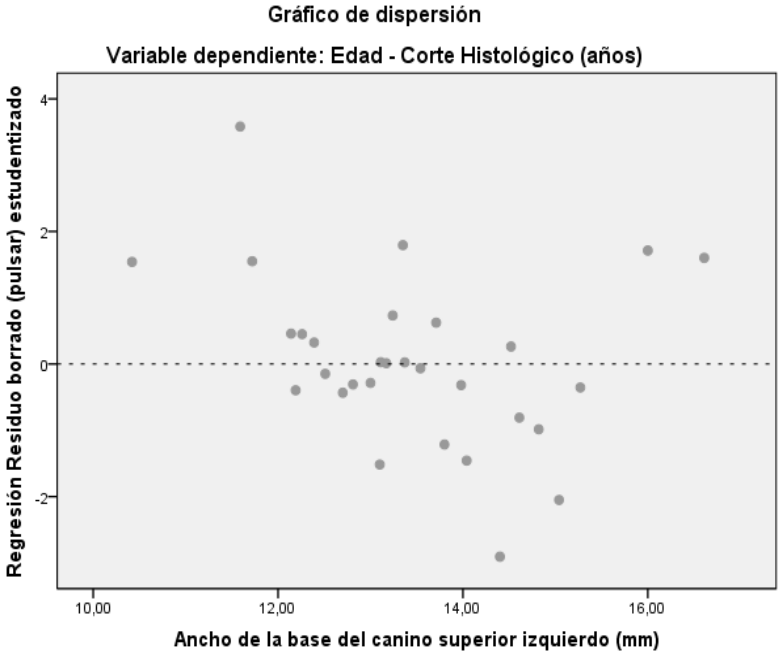


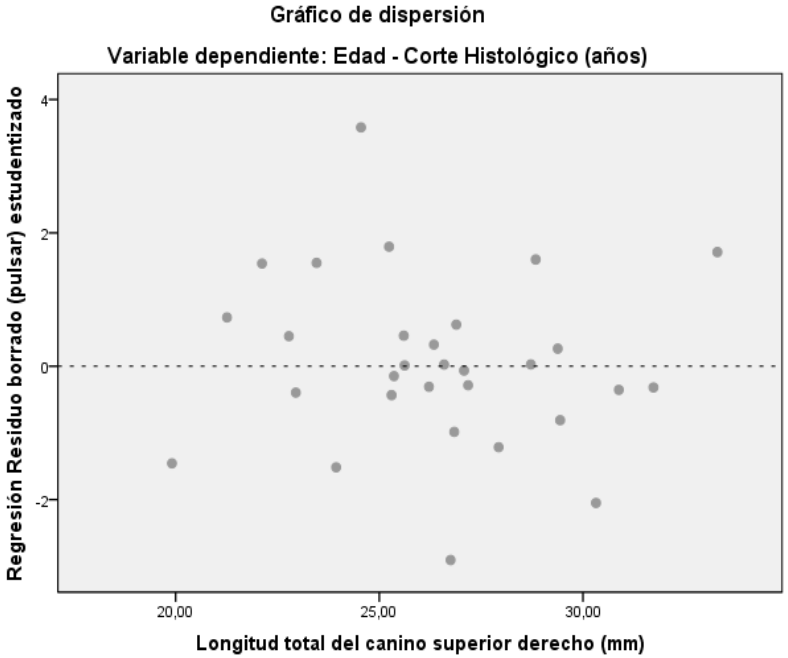
Figura 35: Prueba de normalidad de los residuos tipificados.





Figuras 36 y 37: Gráficos de dispersión en los que se representa la distribución de los residuales y de la variable sexo.





Figuras 38 y 39: Gráficos de dispersión en los que se representa la distribución de las variables (AC) ancho del canino superior izquierdo y (LC) longitud total del canino superior derecho.

No se ha observado colinealidad entre las variables del modelo. Se rechaza, por tanto, la posibilidad de que las estimaciones de los coeficientes de regresión sean inestables. En resumen, los resultados de las técnicas de exploración de los problemas que pueden afectar al análisis de la regresión y determinar si los supuestos del modelo parecen razonables se consideran positivos, por lo que se acepta que **el modelo de regresión múltiple estimado cumple adecuadamente las condiciones de aplicación.**

Desde el punto de vista de los objetivos de este trabajo, las fórmulas obtenidas por medio del análisis de regresión permitirían, previa validación en un número de muestras mayor, una estimación de la edad en base a las variables anchura de la base del canino superior izquierdo y longitud total del canino superior derecho.

La selección de estas variables responde a que el análisis estadístico en nuestra muestra en base al R^2 (0,48 para CSI Ab y 0,62 para CSD Lt) las sitúa con una mayor posibilidad de representar los cambios producidos por la edad.

Las fórmulas representan una opción a la baja correlación y concordancia entre los métodos comparados con nuestra metodología y con el tamaño de muestra en estudio.

5.8 OTRAS VARIABLES

5.8.1 PESO

Los resultados para la variable peso se expresan en kilogramos (Kg).

n = 33	media 31.67* (5.29)	
machos n = 11	34.77 (4.41)	
hembras n = 13	28.42 (4.83)	

En la muestra en estudio se dispone del peso de 24 ejemplares, de los cuales 11 son machos y 13 son hembras. La media de pesos (media ± SD) es de (31.33 ± 5.58). Cuando se estratifica la muestra por sexos, los valores medios identifican diferencias estadísticamente significativas (P<.05) con valores (34.77 ± 4.41) para los machos y de (28.42 ± 4.83) para las hembras (Apéndice I.I).

No es una variable que se considere fundamental para el objetivo del trabajo, pero se asume como un dato importante a tener en cuenta, asumiendo las diferencias estadísticamente significativas que se pueden establecer entre ambos sexos.

5.8.2 ANOMALIAS DENTARIAS

En el total de la muestra en estudio (n = 42) se encontraron distintas anomalías dentarias (n = 5) que se detallan en forma gráfica en este apartado y se valora su posible etiología así como sus consecuencias sobre el animal en el apartado de discusión.

Anomalías encontradas: hipoplasia del esmalte y malformación de un molar (Figura 40 y 41) en un mismo cráneo (n = 1), osteolísis del alvéolo dentario (Figura 42 y 43, n = 1), poliodoncia (incisivos supernumerarios) (Figura 44 y 45, n = 1), oligodoncia con resorción del alvéolo (Figura 47, n = 1) y un caso de abrasión del esmalte (Figura 46, n = 1).

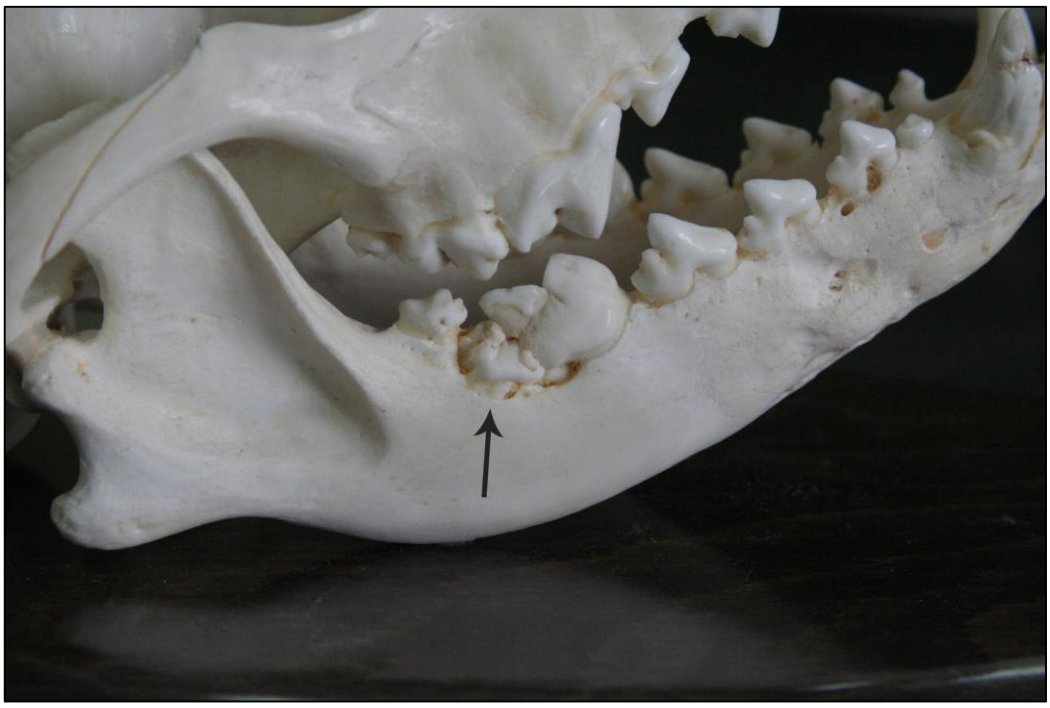


Figura 40. Malformación del segundo molar inferior asociado a lesiones compatibles con hipoplasia del esmalte.

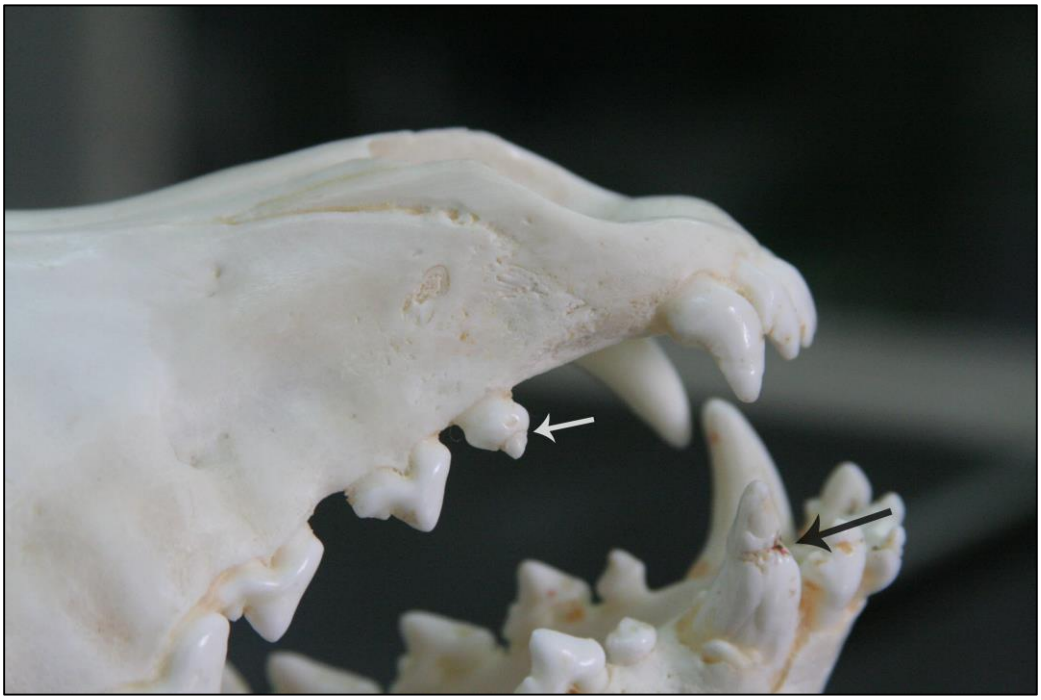


Figura 41. Lesiones en el esmalte de varios dientes. Señaladas con flecha blanca y negra las alteraciones más evidentes.

Figura 42. Osteolísis de los alvéolos correspondientes al cuarto premolar superior.

Figura 43. Osteolísis de las raíces del segundo molar superior.

Figura 44. Poliodoncia que afecta a los incisivos superiores, alterando la fórmula dental en + 2 incisivos**.**

Figura 45. Poliodoncia que afecta a los incisivos superiores, alterando la fórmula dental en + 2 incisivos**.**

Figura 46. Lesión en el esmalte producida por abrasión constante por rascado. Las flechas indican la zona más afectada.

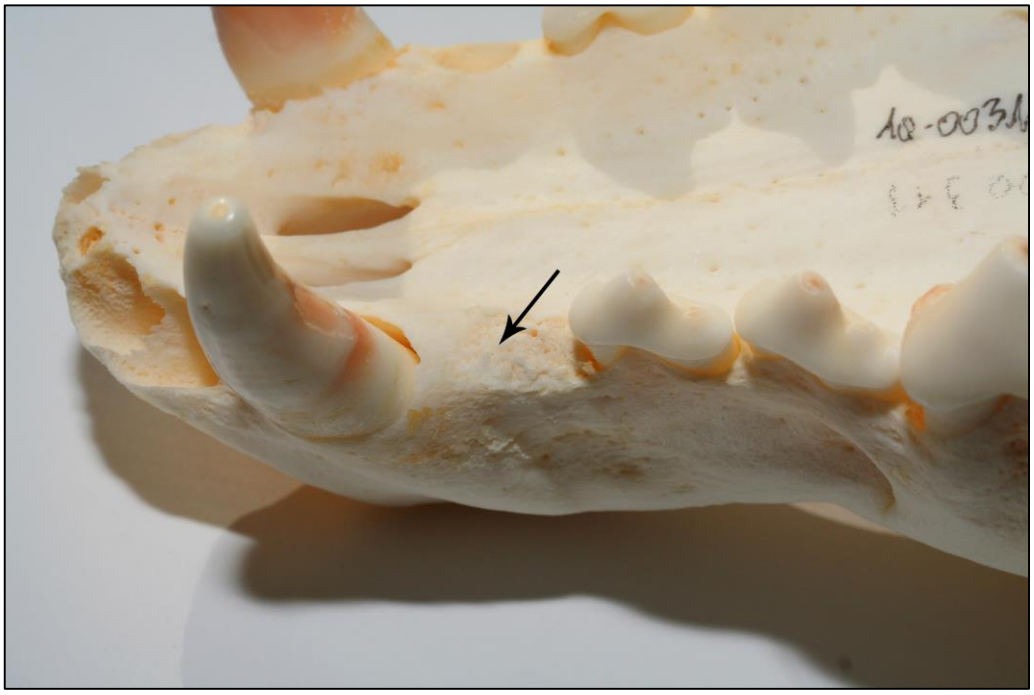
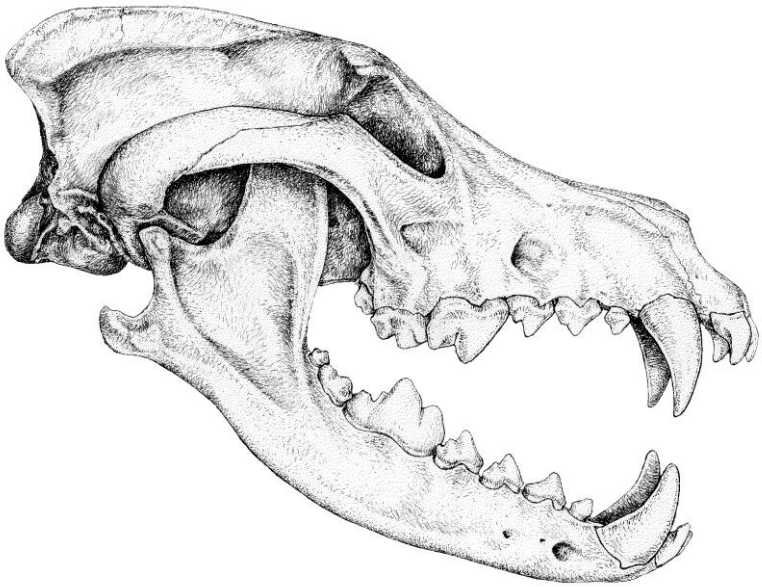


Figura 47. Oligodoncia con cierre del alvéolo correspondiente al primer premolar con tejido óseo de reparación. La fórmula dental se vio afectada en una pieza dental menos.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las piezas dentales fueron preparadas mediante cocción en agua, sin otros aditivos. En los inicios del trabajo, se hicieron pruebas, agregando disolución acuosa de hidróxido de sodio al 25 % (NaOH o sosa cáustica) al agua de cocción, pero se descartó el método por considerarlo demasiado agresivo para las estructuras óseas laminares (cornetes, alvéolos dentarios de animales viejos, etc), llegando a perder cráneos de pequeños mamíferos por dejar la cocción más tiempo que el que rutinariamente se utilizaba con agua sola, inclusive en algunos casos, reduciendo la cantidad del NaOH y el tiempo de cocción, también se producían efectos degradantes en las estructuras óseas laminares.

Si bien es cierto que existen museos y conservadores de colecciones que utilizan hidróxido de sodio y bórax con excelentes resultados en grandes cráneos y esqueletos, sin duda la experiencia juega un papel importante en la utilización de este tipo de aceleradores y blanqueadores a la hora de preparar las muestras. Desde nuestra experiencia, no se aconseja otra forma de cocción para la preparación y limpieza de cráneos de lobo ibérico y sus partes que la realizada exclusivamente con agua, porque, salvo la grasa que se acumula en la superficie del cráneo o la pieza en preparación, no existe otro tipo de alteración para la muestra.

Low y Cowan (1963) sugirieron que la extracción de los dientes por acción del agua en ebullición (hervido) podía alterar las características tintoriales del diente; sin embargo, Turner (1977) pudo demostrar que la diferencia de color e

intensidad de los anillos de cemento no sufría grandes variaciones por este procedimiento de extracción. Finalizada la cocción, la grasa se elimina fácilmente con un lavado continuado con agua caliente y una posterior inmersión en acetona industrial.

6.2 SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE DATACIÓN

El análisis individual de cada uno de los métodos descritos a lo largo del presente trabajo confirma la decisiva influencia del factor individual/observador en los datos obtenidos merced a la valoración de cada muestra: de la experiencia del observador, e incluso una clara dependencia de la cantidad de las observaciones realizadas sobre una misma muestra por un mismo observador. Coincidimos por ello con Morris (1978) en la necesidad de contar con la confluencia de una muestra representativa de especímenes a valorar, así como de varios métodos de datación, que sumados entre sí, y complementándose unos a otros, puedan otorgar un valor predictivo idóneo, minimizando no sólo los errores asociados a diferencias entre observadores, sino también los atribuidos a la variación individual de cada observación realizada, incluso por un mismo observador.

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de contar con tablas de datación de la dentadura en función de diferentes métodos elaboradas con un ***n*** elevado, de modo que permitan diluir tanto los errores atribuidos al observador como los vinculados en cada una de las técnicas a factores ambientales, como los numerosos aspectos que condicionan el excesivo desgaste o la creación de anillos de cemento en una pieza dental, la época del año en que se obtiene la

muestra, o la existencia de denticiones que no representan valores de apreciación visual que sigan una distribución normal.

6.3 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DEL CORTE HISTOLÓGICO

De acuerdo con las numerosas publicaciones que se encuentran en la bibliografía sobre la precisión de la estimación de la edad a través de los anillos de cemento, sería acertado afirmar que el recuento de dichos anillos en los cortes histológicos de las piezas dentales constituye el método que otorga mayor fiabilidad (Thomas, 1977) y precisión al cálculo de la edad; no obstante, aunque los valores obtenidos sean muy aproximados, existe la posibilidad de incurrir en errores cuando no se contemplan variables como la especie, la época del año de la captura o muerte del ejemplar y la experiencia del laboratorio que realiza la datación. La bibliografía revisada destaca y establece diferencias entre las líneas de la época estival y las que se originan en invierno, sobre todo en base a los trabajos de Grue y Jensen (1976). En nuestro trabajo , aunque se tuvo en cuenta la época de la muerte del ejemplar, no se pudo establecer una diferencia destacable que permitiera asignar características específicas a una u otra época del año, atribuyendo esta imposibilidad en una primera valoración no tanto a la inexistencia de dichas diferencias como al número de muestras de las que se pudo disponer y tal vez, en menor medida, a la experiencia del observador, por lo que consideramos prioritario desarrollar este apartado en futuros trabajos de datación en *Canis lupus signatus*, habida cuenta de la importancia que la adecuada datación de nuestras poblaciones de lobo tiene sobre el éxito real de cualquier programa de conservación que se desee implementar, pues, como es sobradamente conocido, no se puede hacer una estimación de la dinámica de una población, la fecundidad de la misma, y

otros aspectos de obligada consideración en la conservación de una especie, sin una adecuada valoración de la distribución de la edad en el grupo de lobos en estudio (Myrick *et al.,* 1983; Hohn, 2002).

Al establecer estas categorías (grupos de edad) en nuestro trabajo, hemos podido comprobar que por el método del corte histológico, la edad más representada es el grupo de animales jóvenes (de 0 a 3 años), coincidiendo con González Machado (2004) en las posibles causas de este hecho (dispersión juvenil, formación de parejas, etc), que aumentan la mortalidad y con ello la representación en los animales que ingresan en los centros de recuperación y que posteriormente son utilizados en estudios de edad. En el citado trabajo de González Machado, realizado en 2004 con lobos ibéricos procedentes mayoritariamente, como los nuestros, del Norte del Duero, la conformación de los grupos de edad fue diferente a la del presente trabajo, por lo que estamos convencidos de que, de haber sido idénticos los grupos etarios, las similitudes en nuestros resultados habrían sido todavía mayores en cuanto al porcentaje de animales considerados cachorros y jóvenes en nuestros respectivos estudios.

El valor en tiempo que se asigna a cada anillo de cemento es motivo de controversia entre autores de reconocido prestigio en la datación de mamíferos, como Matson (1981), que indica que el primer anillo corresponde al segundo año de vida en el lobo (*Canis lupus*), y Godwin y Ballard (1985), quienes otorgan al primer anillo una validez de 20 a 22 meses.

Matson (1981) situó la aparición del primer anillo oscuro de cemento en el segundo año de vida del lobo, mientras que Goodwin y Ballard (1985)

reportaron que el primer anillo aparecía entre los 20 y los 22 meses de edad, es decir, entre el primer y segundo año de vida. En esta etapa, el lobo presenta una cierta indefinición en la apreciación visual (a campo) de su edad, debido a una cierta coincidencia entre el aspecto (peso y forma) del adulto y del ejemplar juvenil ("ejemplares indefinidos"), que se suma al hecho de que el foramen apical se encuentra cerrado y no es clara la definición del primer anillo de cemento.

Ante la inexistencia de una referencia directa a *Canis lupus signatus* en la bibliografía revisada, en el presente trabajo se propone un valor de "un anillo = un año" en forma absoluta. Como se verá en las consideraciones finales, según avanzaba el trabajo, se fue consolidando la convicción de que la secuencia de formación de los anillos no responde exclusivamente al paso del tiempo, sino que existen factores que permiten suponer una influencia importante del estado metabólico del animal, la estación del año y el aporte de nutrientes en calidad y cantidad. Klevezal y Kleinenberg (1969) sugieren, como mencionábamos con anterioridad a esta cita, que las características de los anillos de cemento responden a cambios metabólicos como la escasez de alimentos, disminución de las proteínas séricas, disminución de la fosfatasa alcalina alterando el índice de calcificación, cambios hormonales, así como alteraciones inducidas directamente por el fotoperíodo como las variaciones en los ritmos biológicos asociados a la melatonina.

El comienzo de la aptitud reproductiva, junto al incremento de peso de la fase anabólica de la juventud, así como la abundancia de presas característica de la salida del invierno, otorgan a cada individuo un parámetro diferencial entre su etapa subadulta y adulta. Para un estudio de dinámica poblacional este

concepto es imprescindible, mientras que la coincidencia con el tercer, cuarto o quinto año se podría considerar irrelevante.

Estos aspectos que determinan el aspecto y la cronología de la formación de los anillos de cemento refuerzan nuestra convicción de que el hecho de considerar, como en nuestro caso, “un anillo = un año”, situar la aparición del primer anillo en el segundo año de vida, de acuerdo con Matson (1981), o hacerlo en torno al año y medio de edad, conforme a los estudios de Goodwin y Ballard (1985), no desmerece la validez de los estudios de datación que se realicen, ni altera sustancialmente la aplicabilidad de sus resultados al conocimiento de nuestras poblaciones de lobo.

6.4 ESTIMACIÓN DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA APRECIACIÓN VISUAL

En los inicios de este trabajo y antes de categorizar las muestras para el estudio estadístico, se establecieron distintos grupos de edad que fundamentan el método de valoración visual utilizado en virtud de las características macroscópicas de la dentadura del lobo y su modificación a lo largo de la vida del animal, permitiéndonos asignar a cada ejemplar una edad, antes de agrupar los ejemplares, en función de las edades asignadas, en los tres lotes o grupos que permitieron el estudio estadístico de los valores proporcionados por la muestra de la que dispusimos. Los valores usados para asignar una edad por apreciación visual basada en el desgaste, marcas de atrición y coloración en este estudio de tesis doctoral, son de base empírica y basados en la observación.

Los grupos citados y los mencionados cambios en la dentadura, que fundamentan la valoración visual a través de eventos relacionados con la erupción y el desgaste dental, permitiéndonos establecer en forma empírica distintos grupos de edad, son los siguientes:

Grupo de edad: < 6 meses a 1 año. Cachorro: dentición de cachorro ("dientes de leche") sin cambiar, inicio del cambio (coexistencia de primeros dientes permanentes), dentición permanente nueva ("boca completa") de color blanco nacarado, aspecto nuevo y extremos libres de los dientes afilados. Sin desgaste o rasamiento evidente en la superficie de los incisivos superiores. Flor de lis completa.

Grupo de edad: de 1 año hasta 3 años. Subadulto: ejemplares de aspecto general similar a un adulto, pero que en el rango inferior presentan un pelaje

más intenso de color, de una gama más oscura y sin grandes predominios del color blanco en la máscara facial. En general, ausencia de caracteres sexuales externos indicativos de madurez sexual. Boca completa con inicio de rasamiento en los incisivos superiores, cambio de coloración que se hace más evidente hacia el extremo superior del rango. El color predominante es el blanco con pérdida muy lenta pero progresiva del brillo hacia una tonalidad más amarillenta y opaca.

Grupo de edad: de 3 años hasta 7 años. Adulto: ejemplares cuyo aspecto general corresponde a un animal maduro por constitución física, coloración y características estacionales del aparato genital si las hubiera. El aspecto del desgaste dental comienza a ser manifiesto tanto en la parte anterior (incisivos superiores e inferiores), como en la aparición progresiva de las líneas de atrición. Comienza a perder longitud la cúspide mayor de la muela carnicera. El color predominante es el amarillo con inicio de coloración cobriza en las líneas de atrición en el extremo superior del rango.

Grupo de edad: > de 7 años. Añoso, o animal viejo: ejemplar fácil de clasificar por las características externas, desgaste generalizado de los incisivos, pérdida de piezas dentales, líneas de atrición muy marcadas, desgaste pronunciado de ambas cúspides de la muela carnicera.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten concluir que el desgaste de la dentadura posee un valor predictivo limitado al uso práctico, sobre todo cuando se lo utiliza como único método de datación. Coincidimos así con Gipson *et al*. (2000) al afirmar que la apreciación del desgaste es una alternativa sencilla,

económica y directa, pero no reemplaza a la información obtenida por el corte histológico.

Al igual que en el trabajo de Mech (2006), en nuestro estudio, en las muestras que fueron sometidas a datación por apreciación visual, se aprecia una infravaloración de 1,6 años con una desviación de ± 1,7 años con respecto al método de referencia, pudiendo afirmar que, desde un punto de vista práctico, no existe posibilidad de homologación o equiparación entre ambas formas de valorar la edad (corte histológico *vs* apreciación visual), ya que en algunos casos podría llegar a infravalorar en 3,3 años (- 1,6 años - 1,7 años) un ejemplar datado por apreciación visual, aunque en la previsión más optimista, aplicando la desviación positiva de 1,7 años a la edad asignada por este método, dicha infravaloración se transformaría en un error más asumible (0,10 años), llegando a la conclusión errónea, por este último supuesto, de que el dato obtenido por corte histológico sería similar al obtenido por apreciación visual.

La expresión cualitativa de la concordancia a través del gráfico de Bland – Altman confirma que el método de datación a través de la apreciación visual no se comporta como el modelo teórico considerado como de referencia o *Gold Standard* (corte histológico), ya que la mayoría de los datos se distribuyen (± 2, SD) muy alejados del valor 0 de diferencia entre ambos métodos (valor 0 = sin diferencias).

Así, nuestros resultados nos permiten afirmar que establecer la edad de un lobo únicamente en base al desgaste de la dentadura puede arrojar resultados erróneos; esto se debe, en nuestra opinión, al elevado componente de

subjetividad que implica la valoración tanto de la existencia como de la magnitud del desgaste de una superficie de forma no lineal ni unidireccional como es la de un diente, que se agrava más, si cabe, cuando se pretende establecer una gradación de dicho desgaste.

Frente a la infravaloración que se destaca en el estudio de nuestros resultados en todos los grupos etarios, Mech, por el contrario, en su estudio realizado en 2006 en el Superior National Forest de Minnesota (USA) sobre ejemplares de lobo capturados en trampas, cita la sobrevaloración de una cohorte de edad que había sido datada mediante la valoración visual del desgaste dental. Este estudio no hace sino confirmar nuestra convicción de que es necesario desestimar la apreciación subjetiva del desgaste como método de valoración de la edad, cuando el ejemplar en estudio supera una determinada edad. Landon *et al.* (1998) y Van Horn *et al*. (2003) cifran este límite en los cuatro años de edad para *Canis lupus*, y para los animales estudiados en el marco de este trabajo, se podría concluir que el grupo comprendido entre los 3 y los 5 años, sería el límite de edad máximo para obtener datos fiables con una precisión aceptable mediante la apreciación visual del desgaste dental.

6.5 ESTIMACION DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA CAVIDAD PULPAR

Cuando se compara la correlación entre el corte histológico (*Gold Standard*) y el porcentaje de ocupación de la cavidad pulpar, es posible apreciar que el establecimiento de los grupos de edad podría variar sustancialmente en función del método utilizado para su estudio, según demuestran los valores mencionados en la tabla de contingencia (Tabla 6).

El grupo de animales jóvenes (0 – 3 años), si se establece a través del porcentaje de cavidad pulpar, estaría compuesto por 10 individuos (32,3 % del total), mientras que si lo hacemos a través del corte histológico, este grupo etario pasaría a tener 24 ejemplares (77,4 % del total). Con estos resultados, es posible concluir que ambos métodos no se comportan en forma parecida cuando datan ejemplares jóvenes. Esto es debido, en nuestra opinión, a que los cambios introducidos en la morfología dental por la aposición de dentina no se reflejan en forma tan evidente en esta primera etapa, en contraste con la aparición de los primeros anillos de cemento que permiten, a través del corte histológico, una asignación de edad más fiable.

En el grupo intermedio (3 – 5 años), los resultados tienden a igualarse, ya que solo habría dos ejemplares de diferencia en función del método utilizado para su establecimiento, situación que permite suponer que tanto los depósitos de dentina como los anillos de cemento se establecen de forma más homogénea y tienen mayor validez para discriminar la edad.

En el grupo de los animales adultos (> 5 años), el método de datación en virtud de la ocupación de la cavidad pulpar tiende a sobrevalorar la edad estimada con respecto al método de referencia (15 individuos -48,4 %- contra 3 ejemplares -9,7 %- valorados mediante corte histológico), corroborando así la falta de concordancia entre la aposición de dentina y la edad cronológica a partir de la mitad de la vida útil de *Canis lupus signatus*; dicho en otras palabras, que la velocidad de obliteración de la cavidad pulpar supera a la de formación de los anillos de cemento, coincidiendo con Knowlton *et al.* (2001), en asumir la distinta velocidad del proceso de obliteración de la cavidad pulpar

dependiendo de la edad del animal (la velocidad de deposición de la dentina resulta inversamente proporcional a la edad).

La evidencia de una falta de correlación entre el método del estudio de la cavidad pulpar y el método de referencia (corte histológico) en este trabajo, nos lleva a coincidir con autores como Knowlton *et al.* (2001), Tumlinson (1984), y Poole *et al.* (1994) en limitar la utilidad del estudio de la cavidad pulpar como método para discriminar animales jóvenes de adultos con el fin de abaratar costes en estudios mas caros e invasivos, como el corte histológico que permite asignar edad con mayor precisión y fiabilidad.

Los hallazgos radiológicos del estudio de la cavidad pulpar de un diente como el canino superior o inferior en el lobo, se extienden entre dos límites bien diferentes entre sí, encontrando en los animales jóvenes una cavidad pulpar prácticamente vacía (radiolúcida al paso de los Rx) hasta una cavidad pulpar completamente obliterada (radiopaca al paso de la radiación) en los animales más viejos.

Conociendo estos dos extremos, es factible establecer grupos de edades muy diferentes entre sí, accediendo a una primera segmentación en conjuntos de animales jóvenes (animales nacidos en el año), animales adultos y animales viejos o añosos (Knowlton y Whittmore, 2001; Poole *et al.* 1994).

Esta primera clasificación en grupos de edades, permite evitar tiempo y costos innecesarios en estudios sobre grandes cantidades de muestras, en las que es necesario realizar estudios más específicos, como por ejemplo, el corte histológico para la valoración de los anillos de cemento, ya que desde un principio permite seleccionar el grupo de animales a estudiar.

Cuando estos datos son analizados estadísticamente, aumenta la posibilidad de distinguir entre sí las grupos más difíciles de datar, como son los de mayor edad (Jenkis *et al*. 1984; Dix y Strickland, 1986; Nagorsen, 1988).

El estudio de la cavidad pulpar no establece parámetros de dimorfismo sexual. Según los datos aportados por estudios antropológicos (Murray, 2002; Camariere, 2007), la aposición de dentina secundaria no depende del sexo en el ser humano. Es de esperar idéntico resultado en otras especies, ya que no existen indicios hasta el momento, que pudieran corroborar lo contrario.

6.6 ESTIMACION DE LA EDAD A TRAVÉS DE LA BIOMETRÍA DENTAL

A la luz de los resultados obtenidos, es posible asegurar que la biometría dental, por sí sola, no es un método preciso para la determinación de la edad, aunque sí posee un valor discriminatorio importante con respecto al sexo y en el ámbito del análisis estadístico, formando parte de una fórmula de regresión lineal que represente un valor fiable de edad.

En lo referente a su idoneidad para una discriminación sencilla de los individuos en función del sexo, nuestros resultados confirman que los valores absolutos referidos a la longitud total del canino, la medida de la base de inserción, o la base del 4º premolar, como los índices BI y BIC, ofrecen diferencias estadísticamente significativas para poder estratificar por sexo los ejemplares de *Canis lupus signatus*, inclusive, como describen Moreno *et al*. (2006), otros valores de biometría aplicados al cráneo del lobo ibérico podrían ser útiles para establecer dimorfismo sexual y diferencias entre cráneos de lobo y de perro.

En la revisión bibliográfica realizada a lo largo de nuestro estudio, encontramos que González Machado (2004) difiere de la afirmación de Valverde e Hidalgo (1979) de establecer dimorfismo sexual en base a las medidas de la base del colmillo superior, porque éstos consideraban como machos a todos aquellos ejemplares que poseían valores por encima de los 13 mm; ya que en los estudios realizados en su tesis doctoral, la citada autora encontró valores medios de 14,3 mm para los machos y 12,8 mm para las hembras, aunque al estratificar dichos valores por grupos de edad, obtuvo resultados que clasificarían a machos jóvenes como hembras y algunas hembras de gran desarrollo corporal podrían aparecer clasificadas como machos.

Por el contrario y dentro del ámbito de los valores de nuestro estudio, es posible comprobar que existe diferencia significativa entre sexos para los valores mencionados, aunque cabe esperar, coincidiendo con Guitián *et al*. (1979), un solapamiento de datos en ejemplares muy similares entre sí, o que no cumplan estrictamente los criterios morfológicos del sexo o la edad. La longitud total de los caninos y la anchura de la base de los mismos (Foresman, 2012), son los valores que sometidos a prueba de validación parecen ser los más constantes en sufrir cambios ligados a la edad y también constitucionales de acuerdo al sexo.

En el planteamiento inicial de nuestra hipótesis de trabajo, las medidas correspondientes al 4º premolar superior (anchura de la base y cúspide mayor) se postularon como posibles elementos diferenciales en grupos de edad, pero el análisis estadístico descartó toda posibilidad concreta de asignación de edad al comparar los resultados con los obtenidos mediante el método de referencia,

confirmando la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas para separar las muestras por sexo.

Las dos fórmulas de regresión lineal que se proponen en este trabajo, incluyen variables de biometría dental, como la anchura de la base del canino superior izquierdo y la longitud total del canino superior derecho, por ser los valores que el programa de análisis estadístico consideró como más representativos de las variaciones relacionadas con la edad. Esta propuesta de datación a través de sendas fórmulas de regresión lineal, debe ser validada en el contexto de un trabajo que incluya un tamaño de muestra mayor y con cráneos de edad conocida o previamente datados por otros métodos ya validados.

6.7 CONCORDANCIA DE LOS MÉTODOS DE DATACIÓN

Estimar la edad a través de métodos no invasivos como la apreciación visual del desgaste puede tener un valor limitado, pero representa un recurso simple, práctico, económico y muy aproximado para establecer la edad en el lobo ibérico. Landon *et al*. (1998) y Van Horn *et al*. (2003) consideran al desgaste dental como un método preciso en lobos (*Canis lupus*) hasta los 4 años de edad, y lo extienden a casi toda la vida en el caso de las hienas manchadas (*Crocuta crocuta*).

6.8 MODELOS DE REGRESIÓN

La propuesta de establecimiento de modelos de regresión puede ser una alternativa integradora para el caso de no contar con un tamaño de muestra importante, o cuando sea necesario validar los datos obtenidos por otros métodos de datación, ya que, como hemos podido comprobar en este estudio,

no todos se comportan de igual manera con respecto a un método teórico establecido como referencia.

La utilización de más de una variable dentro de la fórmula de regresión aumenta la precisión en el establecimiento de la edad, pero también hace a la fórmula más compleja, aumentando de esa manera el trabajo en la toma de muestras y con ello el coste del procedimiento.

El aspecto más importante en el establecimiento de la fórmula de regresión que nos permita una óptima datación es la determinación de la variable que mejor representa los cambios que se producen con los años en la dentadura del lobo ibérico, es decir, de la variable a emplear en dicha fórmula.

El valor predictivo de esta fórmula para *Canis lupus signatus,* tiene que pasar necesariamente por un proceso de validación que incluya un tamaño de muestra mayor al empleado en este trabajo, como decíamos en apartados anteriores, así como el concurso de más de un observador que disminuya el error atribuido a la experiencia y subjetividad propia de la variación individual en la toma y estimación de la muestra.

6.9 OTRAS VARIABLES

6.9.1 PESO

Dentro de los métodos no invasivos que pueden ser utilizados para la datación en *Canis lupus signatus*, el peso y la masa corporal se han valorado en estudios como los realizados por Olifiers *et al.* (2010), expresando como en esta tesis el convencimiento que todas las variables que se puedan sumar a los

datos obtenidos por otros métodos pueden resultar de suma utilidad para el objetivo buscado.

Coincidiendo con las referencias citadas en la bibliografía, los resultados de peso obtenidos en este trabajo mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de los machos y las hembras, aunque la determinación precisa del peso con capacidad de discriminación o “corte” entre ambos sería muy arriesgado, ya que en la mayoría de las poblaciones animales es posible encontrar machos de bajo peso y hembras que superen la media para su sexo.

Entre otras cosas, en una especie como *Canis lupus signatus*, utilizar el peso para establecer dimorfismo sexual sería un procedimiento poco práctico y carente de una finalidad lógica, ya que un peso considerado como valor preciso debe contemplar un cuerpo completo que podría ser sexado en forma visual sin ningún inconveniente ni formación específica para hacerlo.

6.9.2 ANOMALÍAS DENTARIAS

En el transcurso del trabajo se encontraron distintas anomalías dentarias que, sin ser el motivo principal de investigación, consideramos que deben ser mencionadas, tanto por la relevancia propia de la lesión (etiopatogenia) como por los posibles aspectos epidemiológicos que pudieran afectar a las poblaciones de *Canis lupus signatus*.

Así, por ejemplo, consideramos que la abrasión del esmalte que se ilustra en el apartado de resultados podría estar relacionada con enfermedades pruriginosas de elevada prevalencia en nuestras poblaciones de mamíferos silvestres, como la sarna, pues, en nuestra experiencia, esta alteración dental

se ha observado en animales aquejados de esta dermatopatía parasitaria, probablemente debido al modo de rascarse típico de la familia Canidae, mordiendo la zona pruriginosa con los dientes incisivos, precisamente los que hemos encontrado afectados por la mencionada abrasión del esmalte. Así mismo, la hipoplasia del esmalte descrita en el presente trabajo podría estar vinculada a las mismas lesiones que produce el *Morbillivirus* responsable del moquillo canino. Ambas enfermedades están directamente relacionadas con el estado inmunitario del individuo, y podrían ser etiología y consecuencia de igual manera la una de la otra (Romairone, 1998).

Las anomalías dentarias descriptas en este trabajo coinciden con la mayoría de las descriptas por Gisburne (2004) y Vilá (1992), en sendos trabajos sobre el zorro rojo y zorro gris y el lobo ibérico, respectivamente.

La pérdida de piezas dentales produce una resorción característica en el alvéolo dental fundamentalmente de premolares y molares. Vilá et al (1993) describen la mayor parte de las anomalías dentales estudiadas en 500 cráneos de lobo en la Unión Soviética, destacando a los premolares como los más afectados (más del 3,5 % en su trabajo), y concluyendo a raíz de esta afirmación: que esta pérdida no afecta a la supervivencia del lobo, que la presión de selección sobre estos dientes no es muy alta, que afecta en mayor medida a machos que a hembras y que afecta al menos con una resorción alveolar al 50 % de los animales mayores de 8 años.

Por último, hay lesiones como la poliodoncia, oligodoncia y malformaciones dentales que podrían estar relacionadas con factores nutricionales, fisiológicos, genéticos y ambientales (Miles *et al.,* 1990; Grobler *et al.,* 1999) lo que

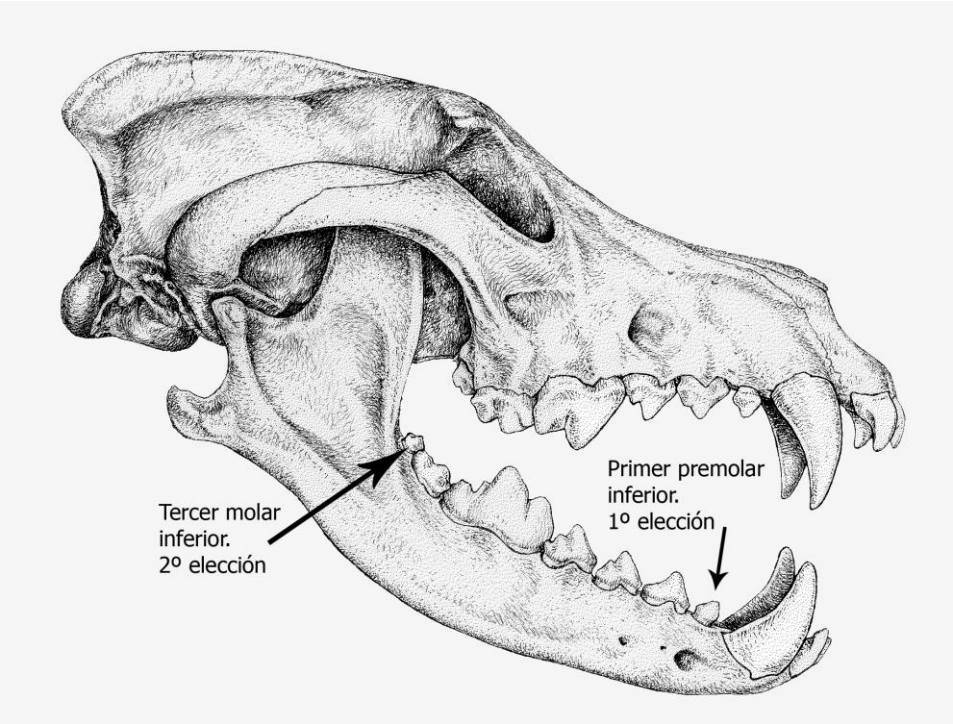
transforma a dichas lesiones en posibles indicadores o centinelas de enfermedades subyacentes en el nicho ecológico de donde proceden.

6.10 RESUMEN DE RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE DIENTES DE CARA A LA DATACIÓN DE ESPECÍMENES

Elección del diente a estudiar.

En la mayoría de los carnívoros, el diente más seleccionado por los distintos autores es el primer premolar, tanto superior como inferior, debido a su condición de poseer una raíz única y a su pequeño tamaño, ya que en algunas especies suele llegar a ser vestigial. En el puma (*Puma concolor*) el diente de elección es el segundo premolar superior, mientras que en varias especies de linces se elige el incisivo lateral (tercer incisivo), ya que estas especies no poseen primer y segundo premolar en su fórmula dentaria. Si la elección del diente ha de hacerse en un cadáver, se selecciona uno de los caninos, preferentemente el inferior (Foresman, 2004)

En este trabajo la primera elección fue el primer premolar inferior, por su condición de unirradicular, orientación rectilínea para el corte y bajo impacto visual de su extracción en cráneos de colección. Es importante apuntar que, en el caso de cráneos de exposiciones, se puede separar la corona de la raíz, utilizando esta última para el corte histológico, mientras que la corona se puede pegar en el alvéolo original, conservando la apariencia normal del diente. La segunda elección sería el tercer molar inferior.



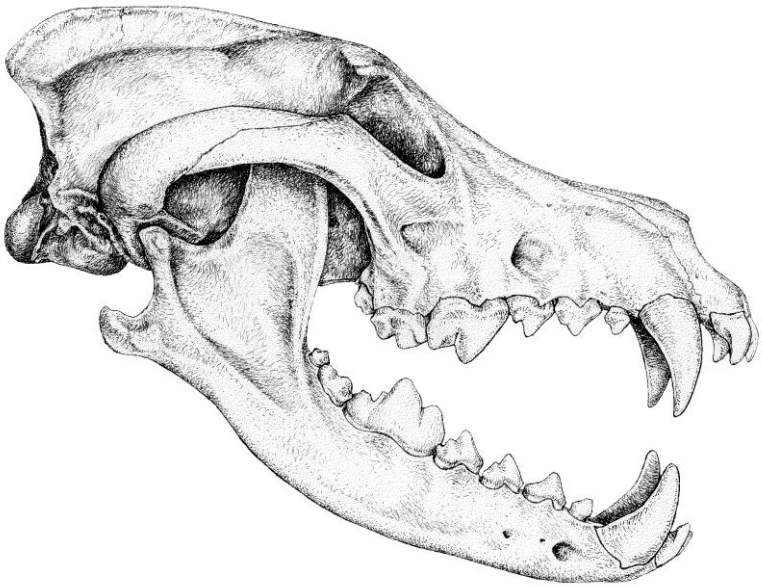
Método de extracción. Cocción. El hervido controlado del cráneo asegura una extracción segura del premolar para el corte histológico, preservando la estructura del cemento y parte del ligamento periodontal. El proceso de hervido no debe sobrepasar el tiempo necesario para la extracción con un leve esfuerzo, es decir, con una resistencia mínima por parte del ligamento periodontal, sin llegar a caerse el diente por sí solo, porque en esta última situación, se habría sometido al diente a un tiempo de hervido que podría conducir a la desaparición de la transición cemento – ligamento periodontal y a cambios irreversibles en la estructura del cemento.

Envasado y rotulado de los dientes. Se sugiere guardar los dientes individualmente y debidamente rotulados, tanto la muestra en estudio como la muestra de reposición o muestra *backup*. El diente debe estar completamente seco, y en caso de utilizar un recipiente plástico, se recomienda incluir un trozo de papel secante que absorba la humedad residual que pudiera tener la

muestra. Para esta investigación, se asignó un número de orden a cada muestra que se relacionaba directamente con la identificación correspondiente al individuo, de esta manera, se evitaba un número demasiado extenso para rotular en el envase y las posibilidades de error que se pudieran derivar de esta circunstancia.

Fecha de extracción o de muerte del ejemplar. Es muy importante, para una correcta datación de la edad, que se tome nota de la fecha de la extracción o muerte del ejemplar con el fin de poder situar la estación del año y su relación con la última banda o anillo de cemento que se identifique en la muestra.

Conservación de la muestra: para períodos cortos de tiempo, se puede conservar la muestra refrigerada en nevera, o en un sitio fresco, seco y al abrigo de la luz. Para períodos más largos se puede recurrir a la congelación para evitar la alteración de las estructuras orgánicas susceptibles de putrefacción bacteriana.



PROYECTOS DE FUTURO

7. PROYECTOS DE FUTURO

El presente trabajo de investigación nació, en su día, de la combinación de un sueño y una pasión. Un sueño, el de lograr un título académico, adquirido por amor al conocimiento, y una pasión, la que despierta en mí ese compañero insigne del hombre desde el albor de su historia: el lobo.

En el marco de esta afortunada conjunción, nos propusimos dar respuesta a una cuestión primordial que condicionaba el éxito de algunos de los esfuerzos que se desarrollan en el ámbito de la conservación de nuestro lobo ibérico: la datación precisa de los individuos o de los restos que llegan a las manos de veterinarios, biólogos o naturalistas comprometidos con esta empresa. Sin embargo, conforme nos adentramos en el estudio del problema y la búsqueda de sus posibles soluciones, encontramos que, parafraseando al genial Mario Benedetti, *cuando creíamos* que teníamos todas las *respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas*. Y fue así como llegamos, empujados por las exigencias perentorias de los plazos administrativos, que nada entienden de dudas ni de pasiones, a tener que cerrar este trabajo antes de haber resuelto esas nuevas preguntas que se nos planteaban.

Pero esas preguntas que quedan por responder, lejos de desmerecer el fruto de tantos años de esfuerzo, no representan más que una oportunidad para seguir trabajando en este campo o, quien sabe, para acompañar a otros investigadores, más jóvenes, en este empeño por recorrer el camino que queda por delante en la defensa de nuestras especies más emblemáticas.

Así, la discrepancia en el valor que se otorga a cada anillo de cemento en los dientes del lobo ibérico, que no indican intervalos de tiempo en el sentido

calendario que nos gustaría, es decir "*un anillo, un año"* o similar, sino intervalos caracterizados por distintos fotoperiodos o rangos de temperatura, eventos fisiológicos como la gestación en las hembras o la búsqueda de apareamientos en los machos, u otras circunstancias, nos anima a valorar la necesidad de seguir estudiando en profundidad estos parámetros y la huella que su contabilidad deja impresa en los anillos de cemento de los dientes de los lobos, y transformar este dato en valores numéricos que se pudieran ajustar a nuestras exigencias cronológicas.

No menos importante nos parece la validación de un método predictivo mediante la utilización de variables basadas en la técnica de biometría dental, medición de cavidad pulpar, desgaste de los principales dientes de la especie, poniendo especial atención en las líneas o marcas de atrición que puedan caracterizar a un grupo de edad, y la elaboración de un estándar específico para la especie, así como el establecimiento de criterios de uniformidad en base a un patrón objetivo como el recuento de los anillos de cemento.

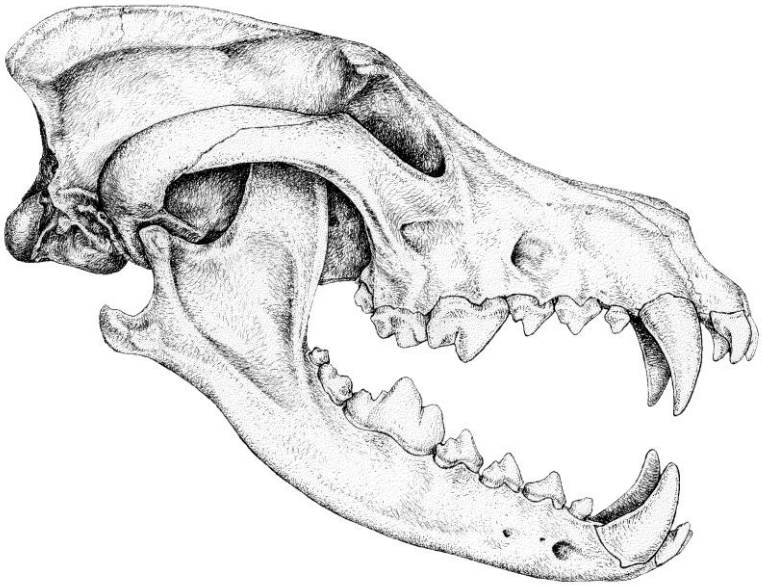
Para ello, sería vital aunar esfuerzos entre diferentes equipos e instituciones para iniciar la creación de una colección de referencia o patrón, que relacione distintos parámetros entre sí, a partir de ejemplares de los que se puedan acreditar aspectos tan variados como el sexo, la edad, el origen geográfico, la época del año de la muerte del ejemplar y cualquier otro factor que se pueda considerar relacionado con cambios en las características de la dentición a lo largo de la vida del animal (Matson, 1985).

Una buena colección de especímenes permitiría aumentar la cantidad de datos y confeccionar tablas que pudieran aproximar el cálculo de la edad a un valor

numérico real basado en la confluencia estadística de los resultados obtenidos a través de los métodos de obliteración de la cavidad pulpar y corte histológico, estableciendo una uniformidad de criterios y pudiendo así elaborar un estándar específico para la especie y, en última instancia, un método fiable de datación en *C. lupus signatus*. Por otra parte, una muestra suficientemente amplia de especímenes de los que se disponga de información fiable acerca de su edad real, permitirá ajustar fórmulas fiables de datación basadas en técnicas biométricas, ofreciendo así un método sencillo y económico de datación en campo.

Esta colección de referencia podría enriquecerse además con moldes dentales realizados en varios momentos de la vida de un animal, que pueden aportar valiosa información con respecto a la secuencia del desgaste (Anderson, 1986; Young y Marty, 1986; Malcom, 1992; Rasmussen *et al*., 2005), de gran utilidad para la confección de tablas de rasamiento que permitan caracterizar las distintas etapas de la vida de un animal.

Por último, aunque evidentemente todos los resultados obtenidos para una especie no pueden ser extrapolados a otra, por mucha cercanía taxonómica que pudieran tener, sí se pueden utilizar los caminos críticos de una investigación que condujeron a dichos resultados, adaptando el diseño de la metodología y los datos, así como el análisis estadístico, para la otra especie en estudio. En este sentido, esperamos que este trabajo pueda resultar de utilidad a quienes quieran realizar similares investigaciones en otros animales.



CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

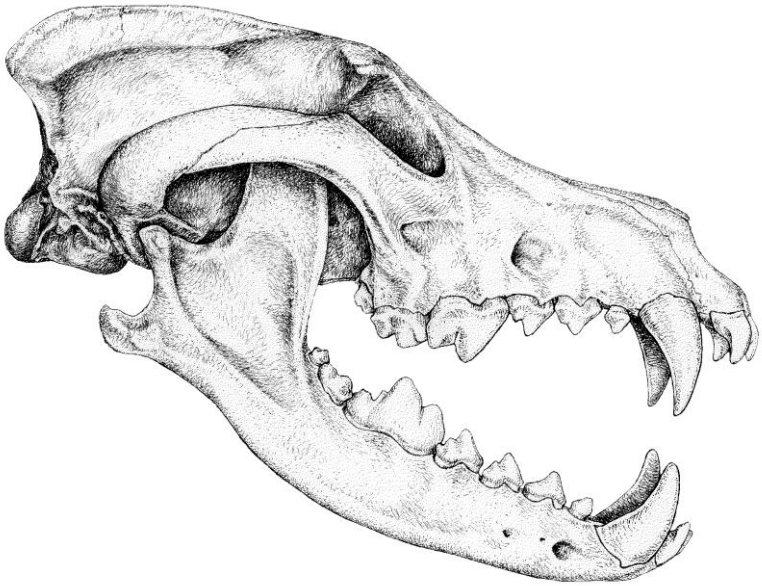
PRIMERA. De los cuatro métodos de datación analizados (recuento de los anillos de cemento en un corte histológico, apreciación visual, biometría dental y valoración de la cavidad pulpar) únicamente el corte histológico es válido por sí solo para determinar la edad de *Canis lupus signatus* con un alto grado de precisión.

SEGUNDA. El corte histológico (recuento de los anillos de cemento) es el método más preciso, pero requiere entrenamiento y patrones específicos basados en cortes histológicos de animales de edad conocida para poder ser considerado el método de elección cuando se necesitan valores precisos de datación.

TERCERA. Las medidas obtenidas por calibre (biometría dental) poseen valor discriminatorio para diferenciar machos de hembras, pero no para establecer valores de edad absolutos. Estas medidas pueden jugar un papel muy importante en fórmulas de regresión lineal debidamente validadas y elaboradas con tamaños de muestra estadísticamente representativos, para eliminar elementos de subjetividad.

CUARTA. Para determinar la validez de un método y su potencia para medir la edad, es imprescindible tener en cuenta los objetivos que se buscan con el estudio, ya que el corte histológico es preciso y fiable pero caro e invasivo, mientras que el estudio de la cavidad pulpar es poco invasivo y económico, pero no discrimina por edades absolutas, sino por grupos de edades.

QUINTA. El método ideal para la datación del lobo ibérico, *Canis lupus signatus*, es aquel que surge de la integración de los datos obtenidos por apreciación visual de la dentadura, biometría y valoración radiológica de la cavidad pulpar, comparados con una tabla validada por el recuento de los anillos de cemento en cortes histológicos.



BIOSEGURIDAD

9. BIOSEGURIDAD

La exposición a agentes biológicos debe ser seriamente valorada en el ámbito laboral del veterinario, por esta razón, se incluye este apartado con el fin de recordar las medidas mínimas que se deben tener en cuenta cuando se programa un trabajo, en cuyo desarrollo se incluye la manipulación de cadáveres o sus restos. Las medidas de autoprotección en el trabajo realizado con elementos orgánicos potencialmente peligrosos y/o compuestos químicos, deben contemplar medidas de bioseguridad durante la manipulación, el almacenamiento y la eliminación de los residuos resultantes del procedimiento llevado a cabo.

El Real Decreto 664/97 de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, establece como ámbito de aplicación del mismo, dos categorías de exposición:

a) **Exposición derivada de la manipulación intencionada de los agentes biológicos que son el propósito principal del trabajo** (cultivo en laboratorios de microbiología, trabajos de bioterio o animalario, industrias de biotecnología, producción de antibióticos, vacunas, producción de materias primas y fabricación de productos químicos).

b) **Exposición que surge de la actividad laboral, pero dicha actividad no implica la manipulación o el uso deliberado del agente biológico** (actividades en las que existe contacto con animales y/o productos de origen animal entre otras).

Los trabajos realizados durante la elaboración de esta tesis, fueron enmarcados dentro del apartado b y valorados en cada momento de acuerdo al tipo de actividad o trabajo realizado. Las medidas a tomar deben contemplar al menos:

1. Identificación de los pasos del procedimiento y los puntos críticos que implican riesgos para el operario principal y su equipo de trabajo.

2. Planificación explícita de la forma de prevenir los posibles riesgos y la manera más rápida e idónea de solucionarlos si su prevención ha fallado. Comunicación de los errores y/o fallos con el fin de llevar a cabo un análisis de los mismos que permitan evitarlos en el futuro.

3. Eliminación responsable y ajustada a los procedimientos legales vigentes de todos los residuos que pudieran originarse debido a la utilización de sustancias químicas potencialmente irritantes o residuos orgánicos que pudieran contener o promover el contagio de enfermedades.

En el ámbito de la prevención de riesgos laborales, el veterinario responsable de un trabajo de investigación o en el desarrollo habitual de una actividad laboral de riesgo, debe evaluar todas las posibilidades de incidencias o accidentes, contagio o exposición, y establecer las medidas de autoprotección obligatorias para todos los componentes del grupo de trabajo. En el marco específico de esta tesis, dichos riesgos se valoraron para tres ámbitos distintos, a saber: agentes biológicos, radiaciones ionizantes y dermatosis laborales a raíz del contacto con productos químicos (Protocolos de Vigilancia Sanitaria Específica de la Junta de Castilla y León, 2003).

- **Legislación aplicable. Bioseguridad**

Ley 31/1995 de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales. BOE número 269.

Real Decreto 39/1997 de 17 de enero, Reglamento de los Servicios de Prevención. BOE número 27.

Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo, Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. BOE número 124.

Real Decreto 665/1997 de 12 de mayo, Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. BOE número 124.

Real Decreto 773/1997 de 30 de mayo, Disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización de los trabajadores en el trabajo de equipos de protección individual. BOE número 140.

NORMAS SANITARIAS Y LEGISLACIÓN SOBRE ELIMINACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE ANIMALES MUERTOS Y RESTOS DE ORIGEN ANIMAL

El Reglamento (CE) Nº 1069/2009, del Parlamento Europeo y del Consejo, y el Reglamento (UE) Nº 142/2011, de la Comisión, constituyen desde el 4 de marzo de 2011 el marco legal comunitario aplicable a los Subproductos Animales No Destinados al Consumo Humano y los Productos Derivados de los mismos (SANDACH), quedando derogado desde esa fecha el Reglamento (CE) 1774/2002. En concreto el Reglamento (UE) Nº 142/2011 establece las

disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) Nº 1069/2009 y de la Directiva 97/78/CE del Consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en las fronteras.

La norma regula la gestión de los subproductos de origen animal desde el momento en que se generan hasta su uso final, y su destrucción para garantizar que durante la misma no se ocasionen riesgos para la salud humana, la sanidad animal o el medio ambiente. El objetivo final de esta regulación es garantizar la seguridad de la cadena alimentaria humana y animal.

Mediante el *Real Decreto 1528/2012*, de 8 de noviembre, se establecen las normas aplicables a los SANDACH y se decretan disposiciones específicas de aplicación en España de dichos reglamentos.

10. RESUMEN

El objetivo de este trabajo es la comparación de tres métodos de estimación de la edad en *Canis lupus signatus* con un cuarto método, considerado de referencia (recuento de anillos de cemento en el corte histológico de una pieza dental): valoración de una serie de medidas tomadas sobre diferentes piezas dentales (biometría dental), estudio radiológico de la cavidad pulpar y apreciación visual directa de la dentadura.

Se trabajó con una muestra de 40 cortes histológicos de piezas dentales, 39 ejemplares para el método biometría dental, 33 que fueron sometidos a estudio radiológico para la determinación de los valores de la cavidad pulpar y 42 cadáveres para la estimación de la edad por apreciación visual.

Los resultados indican que, de los cuatro métodos de datación analizados, únicamente el recuento de los anillos de cemento en un corte histológico es válido por sí mismo para determinar la edad en *C. lupus signatus* con un alto grado de precisión y fiabilidad, si bien resulta caro e invasivo y requiere entrenamiento y patrones específicos basados en cortes histológicos de animales de edad conocida para poder ser considerado el método de elección.

Las medidas obtenidas por calibre (biometría dental) han demostrado poseer valor discriminatorio para diferenciar machos de hembras, pero no para establecer la edad absoluta de los individuos. También demostraron su utilidad en fórmulas de regresión lineal que habrán de ser debidamente validadas, para constituir un método sencillo y fiable de datación de especímenes a campo.

En cuanto al estudio radiológico de la cavidad pulpar, poco invasivo y económico, no resultó eficaz en la discriminación de individuos por edades absolutas, sino únicamente por grupos de edades.

Finalmente, el método ideal para la datación del lobo ibérico, *Canis lupus signatus*, es aquel que surge de la integración de los datos obtenidos por apreciación visual de la dentadura, biometría y valoración radiológica de la cavidad pulpar, comparados con una tabla validada por el recuento de los anillos de cemento en cortes histológicos.

11. SUMMARY

The aim of this study is to compare three methods with the porpouse of estimating the Iberian wolf age (*Canis lupus signatus*) with the use of a fourth method, considered as standard or reference (to count the amount of cement rings within histological section of a tooth), even more the evaluation of several measures taken on different teeth (dental biometrics), pulp cavity radiological study and the direct visual assessment of the teeth.

The study was carry out with a sample size: (40) histological sections of teeth, (39) individuals used for dental biometrics measures, (33) individuals were used in order to determine the values of the pulp cavity (radiological study) and (42) skulls in order to estimate the age by visual appreciation .

The results showed that, of the four aging methods analyzed, just the counting of cement rings in a histological section applies itself to determine the age in the Iberian wolf (*C. lupus signatus*) with a high degree of accuracy and reliability, although it is expensive and invasive and requires specific training and patterns based on histological sections from animals known to be considered the method of choice age.

The measurements obtained by calliper (dental biometrics) have shown discriminatory value to distinguish males from females, but not to establish absolute age of individuals. They also demonstrated the usefulness in linear regression formulas which must be properly validated to constitute a simple and reliable method of aging individuals coming from the wild.

Regarding the radiological study of the pulp cavity, minimally invasive and inexpensive, it was not effective discriminating individuals for absolute ages, but only by age groups. Finally, the ideal aging method for Iberian wolf is one that arises from the integration of the data obtained by visual appreciation of the teeth, biometrics and radiological assessment of the pulp cavity, compared with a table validated by the counting of cement rings in histological sections.

12. BIBLIOGRAFÍA

Andersone, Z., and Ozolins, J., 2000. Craniometrical characteristics and dental anomalies in wolves Canis lupus from Latvia. Acta Theriologica 45(4):549-558

Ash, M., Nelson, S J, 2003. Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion (8th ed.). ISBN 0-7216-9382-2.

Ballard, W.B., Matson, G.M. & Krausman, P.R. 1995. Comparison of two methods to age gray wolf teeth. - In: Carbyn, L.N., Fritts, S.H. & Seip, D.R. (Eds.); Ecology and conservation of wolves in a changing world. Canadian Circumpolar Institute Occasional Publication No. 35: 455-459.

Barriga Salazar, C., Rivera Martinez, C., Suazo Galdamez, I., 2012. Racemización del ácido aspártico. Medicina Legal de Costa Rica. Vol 29 (1). ISSN 1409-0015

Bingham, J and G K Purchase 2002. Age determination in jackals Canis adustus Sundevall, 1846 and Canis mesomelas Schreber, 1778 (Carnivora: Canidae) 76 with reference to the age structure and breeding patterns of jackal populations in Zimbabwe. African Zoology 38(1): 153 – 160.

Boitani, L., Powell, R., 2012. Carnivore ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press. ISBN 978-019955853-7

Boitani, L., Powell, R., 2012. Chapter 1. Research and conservation of carnivores. Carnivore ecology and conservation. A handbook of techniques. Oxford University press. ISBN 978-0-19-955853-7.

Bodecker C.F., 1925. A consideration of some of the changes in the teeth from young to old age. Dental Cosmos 67: 543-549

Bowen, W.D. 1982: Determining age of coyotes, Canis latrans, by tooth sections and tooth wear patterns. - Canadian Field-Naturalist 96(3): 339-341

Bubenik G. A., Smith P. S. and Schams D., 1986. The effect of orally administered melatonin on the seasonality of deer pelage exchange, antler development, LH, FSH, prolactin, testosterone, T, T, cortisol and alkaline phosphatase. J. Pineal Res. 3, 331-349.

Calvert, W., Ramsay, M.A., 1998. Evaluation of age determination of polar bears by counts of cementum growth layer groups. Ursus, 10: 449-453.

Camariere R, Ferrante L, Belcastro MG, Bonfiglioli B, Rastelli E, Cingolani M., 2007. Age estimation by pulp/tooth ratio in canines by peri-apical X-rays. J Forensic Sci. Jan;52(1):166-70.

Camariere, R., De Luca, S., Alemán, I., Ferrante, L., Cingolani, M., 2011. Age estimation by pulp/tooth ratio in lower premolars by orthopantomography. Forensic Science International. Elsevier Ireland Ltd.

Cate, A.R., 1998. Oral Histology: development, structure, and function (5ª ed.).Ed. Mosby.

Costello C. M., Inman K. H., Jones D. E., Inman R. M., Thompson B. C., Quigley H. B.. 2004. Reliability of cementum annuli technique for estimating age of black bears in New Mexico. Wildlife Society Bulletin 32:169–176

Crowe, D.M., 1972. The presence of annuli in bobcat tooth cementum layers. J. wild. Management 36:1330-1332

Crusafont, M., Truyols, J., 1956. Un estudio de la evolución de los Carnivoros por métodos numéricos. Estudios Geológicos, 33: 177-202. Madrid

Cunha, E., Baccino, E., Martrille, L., Ramsthaler, F., Prieto, J., Schuliar, Y., Lynnerup, N.,Cattaneo, C., 2009. The problem of ageing human remains and living individuals: a review. Forensic Science International 193, 1-13.

Dimmick, R.W, Pelton, M.R., 1994. Criteria of sex and age. Pages 169-214 in T.A. bookhout editor, Research and management techniques for wildlife and habitat. Fifth ed. The Wildlife Society. Bethesda, Maryland, USA

Delibes, M., 1974. Sobre alimentación y biología de la gineta (*Genetta genetta* L.) en España. Doñana, Acta Vertebrata, 1: 143-199

De Luca, S.; Alemán, I; Bertoldi, F; Ferrante, L; Mastrangelo, P; Cingolani, M; Cameriere, R. 2011. Age estimation by tooth/pulp ratio in canines by peri-apical X-rays: reliability in age determination of Spanish and Italian medieval skeletal remains. Journal of Archaeological Science 37, 3048-3058.

Drusini, A.G., 2008. The coronal pulp cavity index: a forensic tool for age determination in human adults. Cuad. Med. Forense, 14: 53-54.

Drusini, A.G., Toso, O., Ranzato, C., 1997. The coronal pulp cavity index: a biomarker for age determination in human adults. American Journal of Physical Anthropology, 103, 353 - 363.

Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J., 2007. Anatomía veterinaria. Manual Moderno. 3º edición. ISBN 978-970-729-253-6

Derr, M., 2011. How the dog became the dog. Overlook Duckworth. ISBN 978-0-7156-4301-3.

Dix, L.M., Strickland, M.A. 1986: The use of radiographs to classify marten by sex and age. - Wildlife Society Bulletin 14: 275-279.

Debowes, L., Mosier, D., Logan, E., Harvey, C.E., Lowry, S., Richardson, D.C., 1996. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. Journal of Veterinary Dentistry, Vol.13, pp.57-60.

Erickson W.P., Sliger W.G., 1969. Efficient sectioning of incisors for estimating ages of mule deer. Journal of Wildlife Management, 33: 384-388.

Fajardo Tolosa, L.F. (2008) “El zorro ibérico (*Vulpes vulpes*): correlaciones y diferencias entre sus parámetros cefálicos, valorados directamente y mediante diagnóstico por imagen. determinación futura de trofeos cinegéticos”. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Fancy, S.G., 1980. Preparation of mammalian teeth for age determination by cementum layers: a review. Wildlife Society Bulletin. 8 (3): 242-248

Fernández Salvador, R., 1996. Definición de las familias del orden Carnivora. Evolución y ecología de la conservación. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. MNCN. SECEM. ISBN 84-00-076

Foresman, K.R., 2012. Carnivores in hand. Chapter 6. Carnivore ecology and conservation. A handbook of techniques. (Boitani, L; Powell, R.) Oxford University press. ISBN 978-0-19-955853-7.

Flynn W.T, Saif L.J, Moorhead P.D., 1988. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-pld gnotobiotic pigs. American Journal of Veterinary Research 49, 819–825.

Flynn, J., Finarelli, J., Spaulding, M., 2010. Phylogeny of the Carnivoramorpha, and the use of the fossil record to enhance understanding of evolutionary transformations. Chapter 2. Carnivoran evolution. New views on phylogeny, form and function. Cambridge University Press. ISBN 978-0-511-72693-4.

Fiero, B.C., Verts, B.J. 1986. Comparison of Techniques for Estimating Age in Raccoons. – Journal of Mammalogy 67/2: 392–395

Friend LA, Glenwright HD., 1968. An experimental investigation into the localization of pain from the dental pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 25:765-774

Fritts, S. H., L. D. Mech. 1981. Dynamics, movements, and feeding ecology of a newly protected wolf population in northwestern Minnesota. Wildlife Monographs, 80:1-79

Fuller, T. K., L. B. Keith. 1980. Wolf population dynamics and prey relationships in northeastern Alberta. The Journal of Wildlife Management, 44:583-602.

Gasaway, W. C., R. O. Stephenson, J. L. Davis, P. E. K. Shepherd, and O. E. Burris. 1983. Interrelationships of wolves, prey, and man in interior Alaska. Wildlife Monographs. 84:1–50.

Gandal C.P., 1954. Age determination in mammals. New York Academic. Sci. Trans. (Ser.2) 16:312 – 314.

Galera, V., Ubelaker, D.H., Hayek, L.C., 1998. Comparison of macroscopic cranial methods of age estimation applied to skeletons from the Terry collection. Journal of Forensic Sciences 43, 933-939

García-Perea, R., 1996. Evolución y filogenia de los carnívoros. Evolución. Carnívoros. Evolución y ecología de la conservación. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. MNCN. SECEM. ISBN 84-00-076

Garshelis, D.L, Johnson A.M, Garshelis J.A., 1984. Social organization of sea otters in Prince William Sound. Can. J. Zoo. 62. 2648-2658

Garshelis, D.L, Noyce, K., Coy, P., 1998. Calculating average age of first reproduction free of the biases prevalent in bear studies. Ursus 10: 437-447.

Garzón, J., 1979. La apasionada geografía del lobo. Trofeo, 104: 26-28

Grande del Brío, R., 1985. El lobo ibérico. Biología y mitología. Editorial Blume. Madrid. 398 pp.

Gisburne, T., 2004. Dental anomalies in two species of canids: red fox (Vulpes vulpes) and gray fox (Urocyon cinereoargenteus). Southern Illinois University Carbondale. Open SIUC.

Gipson, P.S., Ballard, W.B., Nowak R.M, Mech, L.D., 2000. Accuracy and precision of estimating age of gray wolves by tooth wear. Journal of Wildlife Management 64(3):752-758

Getty, R., 2003. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5º edición. Editorial Masson. ISBN 84-458-0722-6

Godwin, E. A., and W. B. Ballard. 1985. Use of tooth cementum for age determination of gray wolves. Journal of Wildlife Management 49: 313-316.

Goddard, H.N., Reynolds, J.C., 1993. Age determination in the red fox (*Vulpes vulpes*) from tooth cementum lines. Gibier Faune Sauvage. 10: 173-187. ISSN 0761-9243

Gorrel, C., 2010. Odontología de pequeños animales. Editorial Elsevier Saunders. 37: 193 – 196. ISBN 978-84-8086-500-5

González Machado, M.A., 2004. Cánidos ibéricos: Evaluación de la morfología cefálica con métodos clásicos y actuales de diagnóstico por imagen del lobo ibérico, Canis lupus signatus. Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral

Goswani, A., Friscia, A., 2010. Carnivoran evolution. New views on phylogeny, form and function. Cambridge University Press. ISBN 978-0-511-72693-4.

Grau, G. A., G. C. Sanderson, & J. P. Rogers. 1970. Age determination of raccoons. Journal of Wildlife Management 34 (2):364-372.

Greaves W.S., 1983. A functional analysis of carnassial biting. Biol J Linn Soc. 20:353-63.

Grobler, P. J, Taylor, P. J, Pretorius, M.D. & Anderson, C.P., 1999. Fluctuating asymmetry and allozyme variability in the isolated springbok *Antidorcas marsupialis* population from the Chelmsford Nature Reserve. Acta Theriologica 44: 183-193

Grue, H., 1976. Non-seasonal incremental lines in tooth cementum of domestic dog (*Canis familiaris* L.) Dan.ReV.Game.Biol 10(2): 2-8

Grue, H., Jensen, B., 1973. Annual structures in canine tooth cementum in Red Foxes (*Vulpes vulpes* L.) of known age. Danish review of Game Biology. 8 (7): 1-12

Grue, H., Jensen, B., 1976. Annual cementum structures in canine teeth in Arctic Foxes (*Alopex lagopus* (L.)) from Greenland and Denmark. Danish review of Game Biology. 10 (3): 1-12

Grue, H., Jensen, B., 1979. Review of the formation of incremental lines in tooth cementum of terrestrial mammals. Danish review of Game Biology. 11(3): 1-48

Guitián-Rivera, J., Sánchez-Canals, J.L., de Castro, A., Bas López, S., 1979. Nota sobre dimorfismo sexual en algunos cráneos de lobo (*Canis lupus*, L.) de Galicia. Trabajos compostelanos de Biología. 8: 87-94.

Gustafson G., 1950. Age determination on teeth. J Am Dent Assoc.;41(1):45-54

Guitián, J., Sánchez, J. L., De Castro, A., Bas, S., 1979. Nota sobre el dimorfismo sexual en algunos cráneos del lobo (*Canis lupus* L.) en Galicia. Trabajos Compostelanos de Biología, 8: 87-94.

Hannum, G; Guinney, J; Zhao, L; Zhang, L; Hughes, G; Sadda, S; Klotzle, B; Bibikova, M; Fan, J; Gao, Y; Deconde, R; Chen, M; Rajapakse, I; Friend, S; Ideker, T; Zhang, K., 2013. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates, Molecular Cell

Harvey, C., Emily, P., 1993. Small Animal Dentistry. Mosby – year book inc, St. Louis.

Harshyne, W.A., Diefenbach, D.R., Alt, G.L. & Matson, G.M. 1998: Analysis of error from cementum annuli age estimates of known-age Pennsylvania black bears. - Journal of Wildlife Management 62(4): 1281-1291.

Hawkins, J.B., 2003. Enfermedad dental y atención odontológica. Pediatría veterinaria. Perros y gatos desde el nacimiento hasta los seis meses. 3º edición. Editorial Intermedica. ISBN 950-555-262-9

Holmstrom, S.E., Frost, P., Gammon, R L., 1994. Técnicas dentales de pequeños animales. Interamericana McGraw-Hill. MCV Manuales Clínicos Veterinarios. ISBN 968-25-2086-X.

Hohn, A.A. 2002. Age estimation. In Encyclopedia of marine mammals. Edited by W.F. Perrin, B. Würsig, and J.G.M. Thewissen. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 6–13

Hoffmeister,D. F., Zimmermann E.G. 1967. Growth of the skull in the cottontail (*Sylvilagus floridanus*) and its application to age determination. American Midland Naturalist 78: 198-206.

Holyan, J., Boyd, D., Mack, C., Pletscher, D., 2005. Longevity and productivity of three wolves, *Canis lupus*, in the wild. The Canadian field-naturalist, vol 119.

Harris S., 1978. Age determination in the Red fox (Vulpes vulpes) – an evaluation f technique efficiency as applied to a sample of suburban foxes. J.Zool (London) 184, 91-117

Jenks J. A., Bowyer R. T. and Clark A. G. 1984. Sex and age-class determination for fisher using radiographs of canine teeth. J. Wildl. Manage. 48: 626-628.

Johnston, D., Joachim, D.G., Bachmann, P., Kardong, K.V et al., 1999. Aging furbearers using tooth structure and biomarkers. Wild furbearer management and conservation in North America. Section III.

Johnston, D., Watt, I.D., 1981. A rapid method for sectioning undecalcified carnivore teeth for aging. 407-422 in J.A Chapman and D. Pursley eds, Proccedings of the worldwide furbearer conference, Frostburg, MD.

Johnson, A.S. 1970. Biology of the raccoon (*Procyon lotor varius* Nelson and Goldman) in Alabama. - Auburn University Agricultural Experiment Station Bulletin 402: 1-148.

Johnson, M.K., D.R. Aldred, E. W. Clinite, & M. J. Kutilek. 1981. Biochemical Identification of bobcat scats. In: Proc. Bobcat Res. Conf. Nat. Wildl. Fed. Sci. &Tech. Ser. 6: 92 -96.

Junge, R., Hoffmeister, D.F. 1980. Age determination in raccoons from cranial suture obliteration. - Journal of Wildlife Management 44(3): 725-729.

Klatsky M, Fisher R.L., 1953. The human masticatory apparatus: An introduction to dental anthropology. Brooklyn: dental ítems of interest. Publishing Co.

Klein, H. D., Keita, I. ; Mesnil, J. G., 1981. Three years of grassland research in the Republic of Nigeria from 1977 to 1980. Production and evaluation of Sahelien pastures (Ekrafane ranch) and irrigated forages (Kirkissoye Station): 290 pp.

Klevezal G.A, Kleinenberg S.E., 1967. Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones. Academy of Sciences of the USSR. Severtsov Institute of

Animal Morphology. Moskva. English translation from Russian: Translated by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1969, pp.128.

Klevezal G. A. & Mina M. W., 1973: Factors determining the pattern of annual layers in the dental tissue and bones of mammals. 2. ob§ö. Biol., 34: 594—605 [In Russian with English summ.].

Kershaw, K., Allen, L., Lisle, A., Withers, K., 2005. Determining the age of adult wild dogs (Canis lupus dingo, C. l. domesticus and their hybrids): I. Pulp cavity/tooth width ratios. Wildlife Research, 32 (6). 581-585. ISSN 1035-3712

Keay, J.A., AND M.G. WEBB. 1995. Black bear reproductive rates in Yosemite National Park. California Fish and Game 81:122–131.

Knowlton, F., Whittemore, S.L., 2001. Pulp cavity-tooth width ratios from known-age and wild-caught coyotes determined by radiography. Wildlife Society Bulletin M01, 29(1):236-244.

Kuehn DW, Berg WE. 1983. Use of radiographs to age otters. Wildlife Society Bulletin 11: 68–70

Kvam, T (1984). Age determination in European lynx Lynx l. lynx by incremental lines in tooth cementum. Acta Zool. Fennica 171:221-223.

Landon, D.B., Waite, C.A., Peterson, R.O., Mech, D., 1998. Evaluation of age determination techniques for gray wolves. Journal of wildlife management. 62: 674 – 682

Laws R.M., 1952. A new method of age determination for mammals. Nature 169(4310):972-973.

Larson, J. S., and R. D. Taber. 1980. Criteria of sex and age. Pages 143–202 in S. D. Schemnitz, editor. Wildlife management techniques manual. The Wildlife Society, Washington, D.C., USA.

Linhart, S.B., Knowlton, F.F. 1967: Determining age of coyotes by tooth cementum layers. - Journal of Wildlife Management 31(2): 362-365.

Linhart, S.B., 1968. Dentition and pelage of juvenile red fox (Vulpes vulpes). Journal of Mammalogy 49:526-528

Lovejoy, C.O., 1985. Dental wear in the Libben population: its functional pattern and role in the determination of adult skeletal age at death. American Journal of Physical Anthropology 68 (10), 47-56.

Lovejoy, C.O., Meindl, R.S., Pryzbeck, T.R., Mensforth, R.P., 1985. Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium. A new method for the determination of adult skeletal age at death. American Journal of Physical Anthropology 68 (1), 15-28.

Low, W. A., and I. McT. McCowan. 1963. Age determination of deer by annular structure of dental cementum. Journal of Wildlife Management 27: 466–471.

Lowe, V. P. W., 1967. Teeth as indicators of age with special reference to Red deer (Cervus elaphus) of known age from Rhum. J. Zoo/., Lond. 152: 137-153.

Luque, P.L., Learmonth, J.A., Santos, M.B., Ieno, E., Pierce, G.J., 2009. Comparison of two histological techniques for age determination in small cetaceans.

Matson, G., L. Van Daele, E. Goodwin, L. Aumillier, H. Reynolds, AH. Hristienko. 1993. A laboratory manual for cementum age determination of Alaska brown bear first premolar teeth. Matson's Laboratory, Milltown, Montana, USA.

Matson, G.M., 1981. Workbook for cementum analysis. Miltown, Montana 59851.

Matson, G., Casquilho – Gray, H., Paynich, J. et al., 1999. Cementum annuli are unreliable reproductive indicators in female brown bears. Ursus 11: 275-280.

Martin, D., Goodman, A., Armelagos, G., 1981. On the use of microstructural bone for age determination. Current Anthropology, vol 22, nº 4, 437 – 438. University of Chicago press.

Marshall L.G., Webb S.D., Sepkoski J.J., Raup D.M, 1982. Mammalian Evolution and the Great American Interchange. Science. Vol. 215 no. 4538 pp. 1351-1357

MacNulty, D.R; Smith, D,W; Vucetich, J, A; Mech, D,L; Packer, C. 2009. Predatory senescence in ageing wolves. Ecology letters, 12: 1 – 10. Blackwell Publishing Ltd/CNRS

McLaughlin C.R, George J. Matula, Jr., Randal A. Cross, William H. Halteman, Mark A. Caron and Karen I. Morris, 1990. Precision and Accuracy of Estimating Age of Maine Black Bears by Cementum Annuli. Vol. 8, A Selection of Papers from the Eighth International Conference on Bear Research and Management, Victoria, British Columbia, Canada, February 1989, pp. 415-419

Medill, S., Derocher, A., Stirling, I., Lunn, N., 2009. Reconstructing the reproductive history of female polar bears using cementum patterns of premolar teeth.Polar biol. Springer – Verlag.

Mech, L. D. 1970. The Wolf: The Ecology and Behavior of an Endangered Species. Natural History Press (Doubleday Publishing Co., N.Y.) 389 pp. (Reprinted in paperback by University of Minnesota Press, May 1981).

Mech, L.D., Boitani P., 2003. Intrdocution. Pages 15-18 in D.L. Mech and Boitani, editors. Wolves: behaviour, ecology and conservation. The University of Chicago Press, Chicago and London.

Mech, D.L., 2006. Estimated age structure of wolves in Northeastern Minnesota. Wildlife damage management, Internet center for USGS Northern Prairie Wildlife Research Center. University of Nebraska – Lincoln.

Mech, L.D., 1988. Longevity in wild wolves. Journal of Mammalogy 69(1):197-198.

Miles, A. E. W & Grigson, C. 1990. Colyer´s variations and diseases of the teeth of animals. Cambridge University Press, New York.

Myrick, A.C., Hohn, A.A., Barlow J., Sloan P.A., 1983. Reproductive biology of female spotted dolphins, *Stenella attenuate*, from the eastern tropical pacific. Fishery Bulletin: Vol. 84: No. 2

Morales, J., 1996. El registro fósil de los carnívoros ibéricos. Evolución. Evolución y ecología de la conservación. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. MNCN. SECEM. ISBN 84-00-076

Moreno-García, M; Pimenta, C; Ruas, J (2006). Osteometric characterization of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) A first database. 10 º ICAZ International Conference 2006. México.

Morris, P., 1972. A review of mammalian age determination methods. Mammalian Review 2 (3): 69-104.

Morris, P., 1978. The use of teeth for estimating the age of wild mammals. Development, function and evolution of teeth. 483-494.

Mitchell, B., 1967. Growth layers in dental cement for determining the age of Red deer (Cervus elaphus L.). J. Anim. Ecol. 36:279-293.

Murray W. 2002. On Deconstructing Patriotism. Paper presented at the 2002 annual meeting of the American Antropological Association. New Orleans.

Nagorsen, D. W., J. Forsberg, G. R. Giannico 1988. An evaluation of canine radiographs for sexing and aging pacific coast cal analyses, and R. M. Engeman,W. M.Tzilkowski, L. ma,ens. Wildlife Society Bulletin 16:421-426,

Nelson, B., Chapman, J., 1982. Age determination and population characteristics of red foxes from Maryland. Verlag Paul Parey. ISSN 0044-3468

Nilsen, E., Christianson, D., 2012. Chapter 11.2. Ecological inferences from diet data. Carnivore ecology and conservation. A handbook of techniques. (Boitani, L; Powell, R.) Oxford University Press. ISBN 978-0-19-955853-7.

Olifiers N, Bianchi RC, Andrea PS, Mourão G, Gompper ME., 2010. Estimating age of carnivores from the Pantanal region of Brazil. Wildl Biol 16:389– 399

Okarma H. & Koteja P., 1987: Basal metabolic rate in the gray wolf in Poland. J. Wildl. Manage., 51: 800—801

Poole, K.G., Lee, J., Gunn, A., 1994. Use of canine pulp cavity size in separating juvenile and adult wolverines (*Gulo gulo*). Ann. Zool. Fennici 31: 329-333.

Pavlović, D., Gomerčić, G. Gužvica, J. Kusak, D. Huber. 2007. Prevalence of dental pathology in wolves (*Canis lupus* L.) in Croatia. Vet. archiv 77, 291-297

Parker, G.R., Maxwell, J.W., 1986. Identification of pups and yearlings wolves by dentine width in the canine. Artic, vol 39, nº 2, 180:181.

Peterson, R.O. 1977. Wolf ecology and prey relationships on Isle Royale. U.S. Natl. Park Serv. Sci. Monogr. Ser., 11:1-210.

Peterson, R. O., J. D. Woolington, T. N. Bailay. 1984. Wolves of the Kenai Peninsula, Alaska. Wildlife Monographs, 88:1-52.

Peterson, R.O., Ciucci, P., 2003. The Wolf as a carnivore. Pages 104-130 in D.L. Mech and L. Boitani, editors. Wolves: behaviour, ecology and conservation. The University of Chicago Press. Chicago and London.

Raush, R.L., 1969. Morphogenesis and age-related structures of permanent canine teeth in the Brown bear, *Ursus arctos L,* in the arctic Alaska. Zeitschrift für Morphologie derTiere 66:167-188.

Rogers, L. L. 1975. The use of dental annuli as an index to reproductive success. P. 62. In: Abstracts of technical papers presented at 55th annual meeting of the American Society of Mammalogists. Univ. of Montana, Missoula. 121pp.

Romairone, A., 1998. I Congreso Internacional de Veterinaria y Medio Ambiente. Comunicación Distemper canino. Cambios de hospedador y enfermedades emergentes. Congreso Globalización medioambiental, perspectivas agrosanitarias y urbanas. Conservación y sanidad de fauna Silvestre. Ministerio de Medio Ambiente

Root D.A., Payne N.F., 1984. Evaluation of techniques for aging gray fox. Journal of Wildlife Management 48: 926-933

Saunders J.K., 1964. Physical characteristics of the Newfoundland lynx. Journal of Mammalogy 45:36-47.

Sanderson G.C., 1961. The lens as an indicator of age in the raccoon. Am. Midland. Naturalist. 65:481-485

Schneider, K.B, 1973. Age determination of sea otters. Federal Aid in Wildlife Restoration project Nos. W-17-4 and W-17-5. Alaska Dep.Fish Game. Anchorage, Alaska.

Simon, D.E., Frydendall, M.J., 1981. Age study of Minnesota red fox using cementum annulae counts and tooth x-rays Journal of the Minnesota Academy of Science 46: 2-5

Silver, H., and W. T. Silver. 1969. Growth and behavior of the coyote-like canid of northern New England with observations on canid hybrids. Wildlife Monographs 17: 1–41.

Solheim T., 1992. Amounts of secondary dentin as an indicator of age. Scand J Dent Res; 100: 193-99.

Scott G.R, Turner C.G., 1988. Dental anthropology. Annual review of Anthtropology. 17: 99-126.

Spinage, C.A, 1973. A review of the age determination of mammals by means of teeth, with special reference to Africa. E. Afr. Wildl. J. 11, 165-187.

Suchey, J.M., Katz, D., 1998. Application of pubic age determination in a forensic setting. In: Reichs, K.J. (Ed.), Forensic Osteology. Advances in identification of human remains. C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, pp. 204-236

Stander, P. E. 1997. Field age determination of leopards by tooth wear. African Journal of Ecology 35:156-161.

Steele TE. 2005. Comparing methods for analyzing mortality profiles in zooarchaeological and paleontological samples. International Journal of Osteoarchaeology 15:404-420

Steele TE and TD Weaver. 2012. Refining the Quadratic Crown Height Method of age estimation: do elk teeth wear quadratically with age? *Journal of Archaeological Science* 39:2329-2334

Stoneberg, R. P. Jonkel, C. J. 1966. Age determination of black bears by cementum layers. J. Wildl. Mgmt. 30:411-414.

Sullivan E.G., Haugen, A.O., 1956. Age determination of foxes by x-ray of forefeet. J.Wildl. Manage. 20: 210.212

Sherman P.W., Morton M.L., Hoops L.M., Bochantin J., Watt J.M., 1985. The use of tail collagen strength to estimate age in Beldings ground squirrel. Journal of wildlife Management 49: 874-879

Taber, R.D., 1969. Criteria of sex and age. Pages 325-401 in R.G Giles Jr. Editor. Wildlife management techniques. Third Edition. The Wildlife Society. Washington DC

Todd, T.W., 1921. Age changes in the pubic bone. American Journal of physical Anthropology; 4:1-70

Todd, T.W., 1998. Age changes in the pubic bone. American Journal of Physical Anthropology 4, 1-70.

Thomas D.C., 1977. Metachromatic staining of dental cementum for mammalian age determination. Journal of Wildlife Management 41(2): 207-210.

Tumlison, R., McDaniel R.V., 1983. A reliable celloidin technique for dental cementum analysis: a reply. Journal of wildlife management. 47: 1244-1245.

Turner C, and Scott G., 1977. Dentition of Easter Islanders. In A Dahlberg and T Graber (eds.): Orofacial Growth and Development. The Hague: Mouton Publishers, pp. 229-249

Valverde, J. A., 1972. El lobo español. Montes, 159: 229-241

Valverde, J. A., Hidalgo, A., 1979. El lobo y su intimidad. Trofeo, 104: 18-21.

Van Bree, P.J., Soest, R., Stroman L., 1974. Tooth wear as an indicator of age in badger (Meles meles) and red foxes (Vulpes vulpes) Z. Säugertierkunde 39, 243-248

Van Valkenburgh, B., 1988. Incidence of tooth breakage among large predatory mammals. American Naturalist 131(2):291-302.

VanBallenberghe, V., and L. D. Mech. 1975. Weights, growth, and survival of timber wolf pups in Minnesota. Journal of Mammalogy 56:44-63

Van Horn, R.C.,McElhinny, T.L. & Holekamp, K.E. 2003: Age estimation and dispersal in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). - Journal of Mammalogy 84(3): 1019-1030.

Vilà, C., Urios, V., Castroviejo, J., 1993. Tooth losses and anomalies in the wolf (*Canis lupus*). Canadian Journal of Zoology 71(5):968-971

Vilà, C., 1993. Aspectos morfológicos y ecológicos del lobo ibérico. Tesis doctoral inédita. 299 pp.

Wang, X., Tedford R.H., 2008. Dogs: Their Fossil Relatives and Evolutionary History. Columbia University Press, New York, New York, 219 pp.

Whyte, A., Sopena, J., Whyte, J., López-San Roman, J., 1995. Embriología, anatomía y desarrollo dentario. Canis et felis. 16: 11-21. ISSN 1133-2751.Wight H.M., Conaway C.H., 1962. A comparison of methods for determining age of cottontails. Journal of Wildlife Management 26-160-163

Wesley - Hunt, G. D., Flynn, J. J. 2005. Phylogeny of the Carnivora: basal relationships among the carnivoramorphans and assessment of the position of 'Miacoidea' relative to crown-clade Carnivora. Journal of Systematic Palaeontology, 3, 1–28

Wiggs R.B., Lobprise H.B., 1997. Veterinary Dentistry: Principles and Practice. Lippincott- Raven, New York.

Wyss, A. R., Flynn, J. J. 1993. A phylogenetic analysis and definition of the Carnivora. 32–52. In Szalay, F. S. Novacek, M. J. and MC Kenna , M. C. (eds). Mammal phylogeny: placentals. Springer Verlag, New York, 321 pp.

Wroe, S., 2010. Cranial mechanics of mammalian carnivores. Finite element approach (FEA). Chapter 15. Carnivoran evolution. New views on phylogeny, form and function. Cambridge University Press. (2010). ISBN 978-0-511-72693-4.

Young S.P., Goldman E.A., 1944. The wolves of North America. Part I. Their history, life habits, economic status and control, by Stanley P. Young. Part II. Classification of wolves, by Edward A. Gold. Amer. Wildlife Inst. Washington D.C. pp. Xxi + 636. 15 figs. 131 pls.

Zapata, S.C., Funes, M.C., Novaro, A.J., 1997. Estimación de la edad en el zorro colorado patagónico (*Pseudalopex culpaeus*). Mastozoología Neotropical; 4(2):145-150 ISSN 0327-9383. SAREM

13. APÉNDICES

Apéndice I. TABLA DATOS EN BRUTO.

Apéndice I.I Descripción de las variables cuantitativas utilizadas en el estudio.

VARIABLES CUANTITATIVAS						
Variables	**Muestra total**		**Machos**		**Hembras**	
	n	Media (SD)	n	Media(SD)	n	Media (SD)
Peso	**24**	31.33* (5.58)	**11**	34.77(4.41)	**13**	28.42 (4.83)
Corte histológico	**40**	2.0 (1.0 –7.0)†	**15**	2.0 (1.0 - 5.8)†	**18**	2.0 (1.0 – 7.0)†
Apreciación visual (años)	**33**	3.00 (1.0 – 7.3)†	**13**	3.0 (1.0 -7.6)†	**17**	3.0 (1.0 – 7.0)†
Cavidad pulpar (%)	**31**	32.94 (9.52 -80.79)†	**12**	40.94 (24.81)	**14**	36.75(21.90)
Longitud total del canino superior izquierdo	**30**	26.93* (3.34)	**12**	28.70 (2.94)	**16**	25.48 (3.07)
Ancho de la base del canino superior izquierdo	**30**	13.45 (1.34)	**12**	13.86 (1.16)	**16**	13.12 (1.41)
Longitud total del canino superior derecho	**30**	26.42* (3.11)	**12**	28.28 (2.61)	**16**	25.00 (2.63)
Ancho de la base del canino superior derecho	**30**	13.68 (1.36)	**12**	14.21 (1.33)	**16**	13.25 (1.25)
Longitud total del canino inferior izquierdo	**30**	24.39 (2.00)	**12**	25.10 (2.33)	**16**	23.86 (1.72)

Ancho de base del canino inferior izquierdo	**30**	13.35* (1.10)	**12**	13.97 (0.70)	**16**	12.80 (0.98)
Longitud total canino inferior derecho	**30**	24.47 (2.12)	**12**	24.71(1.50)	**16**	23.74(1.04)
Ancho de base del canino inferior derecho	**30**	12.95* (1.23)	**12**	14.83(1.39)	**16**	13.77(1.47)
Ancho de base del cuarto premolar izquierdo	**30**	24.12* (1.36)	**12**	24.71(1.62)	**16**	23.37(1.78)
Cúspide mayor del cuarto premolar izquierdo	**30**	14.30 (1.52)	**12**	14.83(1.39)	**16**	13.77(1.47)
Ancho de base del cuarto premolar derecho	**30**	23.96* (1.83)	**12**	24.71(1.62)	**16**	23.37(1.78)
Cúspide mayor del cuarto premolar derecho	**30**	14.47* (1.46)	**12**	15.17(1.10)	**16**	13.92(1.33)
Longitud total 3º incisivo superior izquierdo	**29**	13.48 (1.31)	**12**	13.95(0.86)	**15**	12.89(1.19)
Ancho de base del 3º incisivo superior izquierdo	**29**	8.88* (0.88)	**12**	9.18(0.52)	**15**	8.57(6.10 – 9.53)†
Longitud total 3º incisivo superior derecho	**30**	13.72 (1.74)	**12**	14.21(1.02)	**16**	13.17(1.89)
Ancho de base del 3º incisivo superior derecho	**30**	8.90 (7.60 11.08)†	**12**	9.13(0.82)	**16**	8.65(0.56)
Bloque incisivo (mm)	**29**	33.93* (2.38)	**12**	35.05(2.50)	**15**	32.87(1.67)
Bloque incisivo + caninos	**30**	48.05* (3.33)	**12**	49.76(3.87)	**16**	46.70(2.43)

Resultados expresados como media (SD). †Mediana (p5–p95).

*p<0.05 machos vs hembras.

Apéndice I.II Tabla en la que se representa las edades categorizadas resultantes de los distintos métodos de datación: corte histológico, apreciación visual y cavidad pulpar.

EDADES - CATEGORIZADAS							
		De 0 a 3 años		**De 3 a 5 años**		**> de 5 años**	
		n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Corte histológico	Total	31	77.5	5	12.5	4	10.0
	Machos	13	86.7	1	6.7	1	6.7
	Hembras	13	72.22	3	16.7	2	11.1
Apreciación visual	Total	19	57.6	2	6.1	12	36.4
	Machos	8	64.5	1	7.7	4	30.8
	Hembras	9	52.9	0	0	8	47.1
Cavidad pulpar	Total	10	32.3	6	19.4	15	48.4
	Machos	4	33.3	1	8.3	7	58.3
	Hembras	4	28.6	4	28.6	6	42.9

Apéndice I.III. Tabla original con los datos en bruto del total de individuos utilizados en el análisis estadístico.

ID	CSI Lt	CSI Ab	CSD Lt	CSD Ab	CII Lt	CII Ab	CID Lt	CID Ab	4º PM Ab	4º PMI Cusp	4º PMD Ab	4º PMD Cusp	3º ISI Lt	3º ISI Ab	3º ISD Lt	3º ISD Ab	BI	BIC	CP	P	E V	E CH	SEXO	ID
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	%	Kg	Años	Años		
14692	30,64	14,61	29,44	13,81	25,41	13,77	25,17	13,39	26,25	15,76	26,29	16,19	14,16	9,85	14,42	10,35	36,00	53,22	67,50			2	M	14692
14934	24,90	13,71	26,89	13,27	23,52	13,16	22,97	13,41	24,01	15,40	23,83	14,48	13,25	8,93	13,90	8,60	34,50	50,00	24,05	34		4	M	14934
15595	24,24	11,59	24,55	12,55	25,08	12,55	24,94	12,17	23,18	12,34	22,68	12,21	11,18	8,69	12,53	9,01	32,15	47,13				4	H	15595
15746																			16,00			2	0	15746
09-00040																			15,23		7	7	H	09-00040
09-00041	24,90	14,04	19,91	13,27	24,71	13,28	25,64	12,27	22,65	13,21	18,35	13,97	11,72	6,10	12,25	7,40	32,31	50,31	16,90		7	2	H	09-00041
09-00044																			95,34		0,67		M	09-00044
09-00060																			11,11		8	7	M	09-00060
09-00117																			79,26		3	1	M	09-00117
09-00118																			55,55		2	1	H	09-00118
09-00432																			21,42			4	0	09-00432
09-00784																			58,02			4	0	09-00784
09-01264	30,37	15,12	28,64	15,04	27,18	15,46	28,29	15,69	25,68	16,82	25,26	16,12	13,97	9,48	14,29	9,36	35,74	53,46		39,5	2,5		M	09-01264
09-01441A	24,40	14,36	25,90	14,35	23,32	14,30	23,08	13,83	27,76	16,29	26,37	16,99	13,59	10,20	13,60	10,74	34,35	48,00		31,7			M	09-01441A
09-01441B	26,19	14,74	27,60	14,97	23,68	15,02	22,79	15,42	27,20	15,61	26,51	15,28	12,95	10,11	13,51	10,14	34,69	50,52		33			M	09-

																								101441B
09-01490																			25,00		7	4	M	09-01490
09-01514	26,29	13,54	27,08	13,64	24,15	13,38	23,47	13,23	24,15	14,59	24,20	14,31	14,21	9,04	14,38	9,43	35,09	48,21	47,67	29	3	1	H	09-01514
09-01515	27,01	13,17	25,62	13,40	23,49	13,32	24,14	12,86	23,49	13,50	23,11	13,83	13,41	8,48	12,46	8,19	32,19	47,08	25,82		3	3	H	09-01515
10-00128	24,94	12,81	26,22	13,08	24,47	13,01	24,24	13,05	24,56	14,91	24,88	15,11	14,61	9,03	14,07	9,00	33,01	46,45		31	0,83	1	M	10-00128
10-00179	26,60	13,00	27,18	13,27	26,05	13,60	26,07	13,01	24,09	16,08	24,23	16,04	14,46	8,84	14,95	8,81	33,61	46,81	79,48	31	0,92	1	M	10-00179
10-00182	25,24	12,19	22,95	12,59	23,80	12,43	22,90	12,34	22,00	14,00	22,29	12,34	13,06	8,53	12,92	8,92	32,42	47,34	42,10		2	1	0	10-00182
10-00205	26,91	12,14	25,60	12,44	23,55	13,42	23,64	12,44	21,62	13,81	21,48	14,24	13,67	8,31	13,70	8,05	29,96	42,00	28,39	29	2	4	M	10-00205
10-00221	32,30	16,00	33,30	16,74	28,97	14,90	27,75	15,29	25,06	14,11	24,35	14,01	12,94	9,26	12,93	10,78	37,45	51,62	14,66	37	7	5	M	10-00221
10-00311	28,05	13,11	28,72	13,23	25,58	12,22	25,20	12,07	24,03	13,31	23,81	12,94	13,25	8,09	15,68	9,03	30,55	45,15	17,10	22,5	7	3	H	10-00311
10-00313	27,51	14,82	26,84	14,65	25,71	13,08	25,41	12,75	23,39	13,27	21,90	13,76	10,91	9,22	9,60	8,19	30,12	47,01	40,00	31	7	3	H	10-00313
10-00388	31,64	16,61	28,84	16,03	27,02	15,05	30,51	14,72	25,82	14,90	25,85	15,24	13,80	10,00	16,62	8,87	33,51	50,24		30	7	7	H	10-00388
10-00392	27,29	13,80	27,93	13,88	25,20	13,92	24,54	13,86	23,57	15,47	23,86	15,10	14,01	8,94	14,29	9,30	34,65	48,13	70,45	30	2	1	H	10-00392
10-00414	30,64	15,04	30,32	15,42	25,00	15,55	26,72	15,33	25,36	16,54	26,28	16,99	16,94	11,23	17,48	11,44	38,04	49,88	82,75		5	1	0	10-00414
10-00449	23,99	13,10	23,94	12,42	23,05	12,40	22,16	10,98	22,72	12,92	22,45	13,04	12,52	7,72	12,39	7,76	33,53	47,43	32,94	36	6	1	H	10-00449
ID	CSI Lt	CSI Ab	CSD Lt	CSD Ab	CII Lt	CII Ab	CID Lt	CID Ab	4º PM Ab	4º PMI Cusp	4º PMD Ab	4º PMD Cusp	3º ISI Lt	3º ISI Ab	3º ISD Lt	3º ISD Ab	**BI**	**BIC**	**CP**	**P**	**E V**	**E CH**	**SEXO**	**ID**
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	**%**	**Kg**	**Años**	**Años**		
10-00636	28,47	13,37	26,59	13,60	24,07	13,74	22,92	12,90	22,77	11,53	22,49	13,54	13,68	8,60	13,90	8,15	32,62	46,08	28,57	29	2	2	M	10-00636

10-00829	18,80	13,35	25,24	14,99	22,20	12,75	24,47	12,97	22,23	9,95	22,17	11,06	10,86	8,50	9,14	8,23	30,23	48,82	7,14	36,5	7	4	H	**10-00829**
10-00830	27,09	12,51	25,36	13,49	23,89	14,12	22,42	13,16	25,44	14,95	25,39	15,25	14,34	9,00	13,56	9,00	36,28	48,73	61,36	40	2	2	M	**10-00830**
10-00831	23,66	11,72	23,46	12,34	21,57	12,14	21,23	11,57	23,20	14,25	23,66	14,64	13,56	8,36	13,14	8,61	32,68	42,67	63,29	29	1	1	H	**10-00831**
10-00832	23,00	12,26	22,78	12,58	21,39	12,89	21,14	11,74	23,23	13,78	23,11	13,40	13,68	8,57	14,11	8,75	32,82	43,31	67,81	27	1	1	H	**10-00832**
10-00833	27,60	13,24	21,26	13,82	24,34	12,39	23,69	12,25	23,48	12,69	23,42	12,61	12,63	8,31	13,33	8,83	33,50	48,00	11,26	30,5	7	4	H	**10-00833**
10-01039	29,48	13,10	28,72	12,80	25,14	12,62	25,11	13,42	24,49	15,07	24,90	15,18	13,80	9,38	13,26	9,99	34,18	48,57		37	2		M	**10-01039**
11-00002	27,83	14,40	26,75	16,33	20,37	14,15	25,28	15,08	24,33	14,58	24,57	15,14	13,06	9,57	13,28	9,49	35,58	50,16	46,23	39,5	2	1	M	**11-00002**
11-00027	26,85	12,80	26,70	8,91	24,71	13,02	25,35	12,72	24,48	14,92	24,46	15,99	14,03	8,87	13,33	8,74	34,05	47,83		33,5	2		M	**11-00027**
11-00034	31,46	13,98	31,73	14,72	27,40	15,00	26,83	14,00	26,55	16,90	26,77	17,22	15,93	9,94	16,16	9,67	38,99	54,44		37	3	1	M	**11-00034**
11-00046	34,25	15,27	30,88	15,15	28,00	15,05	27,86	14,19	26,63	15,88	26,94	16,40	14,24	9,82	16,03	8,58	37,51	53,88	25,64	41	7	1	M	**11-00046**
11-00047	26,65	12,70	25,30	12,28	23,00	12,36	23,00	12,03	25,30	15,40	25,16	15,66	13,58	8,75	13,50	9,00	35,47	46,19	43,33	24	3	1	H	**11-00047**
11-00048	26,30	12,39	26,34	11,37	24,20	12,68	23,58	11,75	25,66	15,64	25,73	15,70	14,10	8,97	13,70	8,70	34,20	45,10		23	1	1	H	**11-00048**
11-00075	20,80	10,42	22,12	11,52	21,06	10,39	21,24	10,05	23,71	15,17	24,40	15,25			13,53	9,15		42,35		21	1	1	H	**11-00075**
11-00084	29,71	13,64	30,37	14,21	27,85	14,10	27,80	13,69	22,93	16,75	22,54	16,68	13,10	8,67	14,25	9,19	32,18	43,44		23	3		H	**11-00084**
11-00127	28,99	14,52	29,38	14,57	25,41	13,73	25,05	13,50	25,17	14,00	25,24	14,47	13,07	8,98	13,58	9,04	35,09	53,69		34	5	1	M	**11-00127**
11-00129																					1	1	0	**11-00129**
11-00765																			43,75		5		M	**11-00765**
11-01042	26,07	13,13	25,17	13,57	22,36	13,03	24,87	12,97	24,53	14,12	24,73	14,25	14,12	8,42	13,66	8,69	34,29	49,04		30,5	5		H	**11-01042**

11-01043	25,51	13,98	26,73	14,22	27,07	14,47	28,00	14,12	24,60	10,99	24,88	10,91	10,33	5,49	10,15	6,23	32,92	52,20		30,5	7		M	**11-01043**
11-01143	27,35	13,99	27,82	13,55	25,90	14,56	25,87	13,62	27,36	16,12	26,85	16,37	15,16	10,31	14,70	10,19	35,00	48,75		34,5	3		M	**11-01143**
Promedio	**27,02**	**13,55**	**26,67**	**13,64**	**24,59**	**13,51**	**24,75**	**13,18**	**24,43**	**14,50**	**24,24**	**14,66**	**13,47**	**8,91**	**13,65**	**9,02**	**33,99**	**48,29**	**41,37**	**31,67**	**3,81**	**2,46**		**Promedio**
Máximo	**34,25**	**16,61**	**33,30**	**16,74**	**28,97**	**15,55**	**30,51**	**15,69**	**27,76**	**16,90**	**26,94**	**17,22**	**16,94**	**11,23**	**17,48**	**11,44**	**38,99**	**54,44**	**95,34**	**41,00**	**8,00**	**7,00**		**Máximo**
Mínimo	**18,80**	**10,42**	**19,91**	**8,91**	**20,37**	**10,39**	**21,14**	**10,05**	**21,62**	**9,95**	**18,35**	**10,91**	**10,33**	**5,49**	**9,14**	**6,23**	**29,96**	**42,00**	**7,14**	**21,00**	**0,67**	**1,00**		**Mínimo**
DESV	3,08	1,24	2,85	1,46	1,98	1,10	2,14	1,25	1,52	1,61	1,78	1,57	1,30	1,03	1,64	0,96	2,13	3,22	24,53	5,30	2,43	1,85		**DESV**
MEDIANA	26,91	13,37	26,73	13,57	24,47	13,38	24,87	13,05	24,33	14,90	24,40	15,10	13,63	8,94	13,60	9,00	34,12	48,13	40,00	31,00	3,00	2,00		**MEDIANA**

Apéndice I.IV. Tabla en la que se representa el porcentaje de cavidad pulpar (CVP) expresado en % resultante de la medida de extensión total (ET) y cavidad pulpar (CVP) ambos expresados en píxeles.

ID	ET (px)	CVP (px)	*% CVP*
11-00765	480	210	***43,75 %***
10-00832	522	354	***67,81 %***
14692	480	324	***67,50 %***
15746	462	78	***16 %***
10-00833	426	48	***11,26 %***
11-00047	180	78	***43,33 %***
11-00046	234	60	***25,64 %***
10-00831	474	300	***63,29 %***
11-00002	558	258	***46,23 %***
10-00830	528	324	***61,36 %***
10-00449	510	168	***32,94 %***
10-00179	468	372	***79,48 %***
10-00221	450	66	***14,66 %***

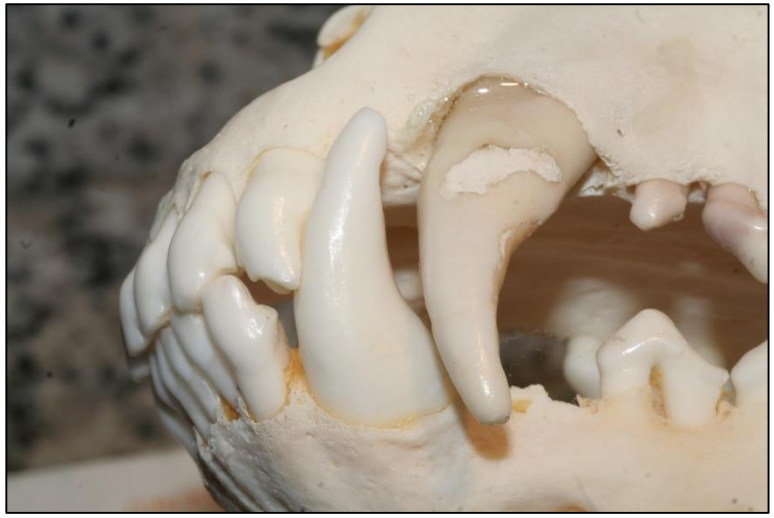
10-00205	486	138	***28,39 %***
10-00829	420	30	***7,14 %***
09-01490	264	66	***25 %***
09-01515	426	110	***25,82 %***
10-00636	504	144	***28,57 %***
09-00432	252	54	***21,42 %***
10-00311	456	78	***17,10 %***
09-01514	516	246	***47,67 %***
09-00044	516	492	***95,34 %***
09-00041	426	72	***16,90 %***
10-00182	456	192	***42,10 %***
14934	474	114	***24,05 %***
09-00060	378	42	***11,11 %***
10-00414	522	432	***82,75 %***
09-00040	630	96	***15,23 %***
09-00118	540	300	***53,55 %***
10-00313	420	168	***40,00 %***

09-00784	486	282	**58,02 %**
10-00392	528	372	**70,45 %**
09-00117	482	390	**79,26 %**

Apéndice II. ESTUDIO FOTOGRÁFICO

Apéndice II. I Fotografías en plano frontal y lateral de los ejemplares del estudio. Técnica de apreciación visual.

Ejemplar : 09 – 00117	**Ejemplar : 09 – 00118**
Sexo: macho	**Sexo: hembra**
Peso: 34.5 Kg	**Peso: 34.5 Kg**
Apreciación visual: < 3 años	**Apreciación visual: 3 años**



Ejemplar : 09 – 00432	**Sexo: N/A**	**Peso: N/A**	**Apreciación visual: N/A**

Ejemplar : 10 – 00128	**Sexo: macho**	**Peso: 31 Kg**	**Apreciación visual: 10 meses**

Ejemplar : 10 – 00182	**Sexo: N/A**	**Peso: N/A**	**Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 10 – 00205	**Sexo: hembra**	**Peso: 29 Kg**	**Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 10 – 00221	**Sexo: macho**	**Peso: 37.5 Kg**	**Apreciación visual: 7 años**

Ejemplar : 10 – 00311	**Sexo: hembra**	**Peso: 22.5 Kg**	**Apreciación visual: 5 años**

Ejemplar : 10 – 00388	**Sexo: hembra**	**Peso: 30 Kg**	**Apreciación visual: 7 años**

Ejemplar : 10 – 00392	**Sexo: hembra**	**Peso: 32 Kg**	**Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 10 – 00414	**Sexo: N/A**	**Peso: N/A**	**Apreciación visual: 5 años**

Ejemplar : 10 – 00449	**Sexo: hembra**	**Peso: 36 Kg**	**Apreciación visual: 4 años**

Ejemplar : 10 – 00636 **Sexo: hembra** **Peso: 29 Kg** **Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 10 – 00829 **Sexo: hembra** **Peso: 36.5 Kg** **Apreciación visual: 5 años**

Ejemplar : 10 – 00830	**Sexo: macho**	**Peso: 40 Kg**	**Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 10 – 00831	**Sexo: hembra**	**Peso: 29 Kg**	**Apreciación visual: 1 año**

Ejemplar : 10 – 00832	**Sexo: hembra**	**Peso: 27 Kg**	**Apreciación visual: 1 año**

Ejemplar : 10 – 00833	**Sexo: hembra**	**Peso: 30.5 Kg**	**Apreciación visual: 5 años**

Ejemplar : 11 – 00002	**Sexo: macho**	**Peso: 39.5 Kg**	**Apreciación visual: 2 años**

Ejemplar : 11 – 00034	**Sexo: macho**	**Peso: 37 Kg**	**Apreciación visual: 3 años**

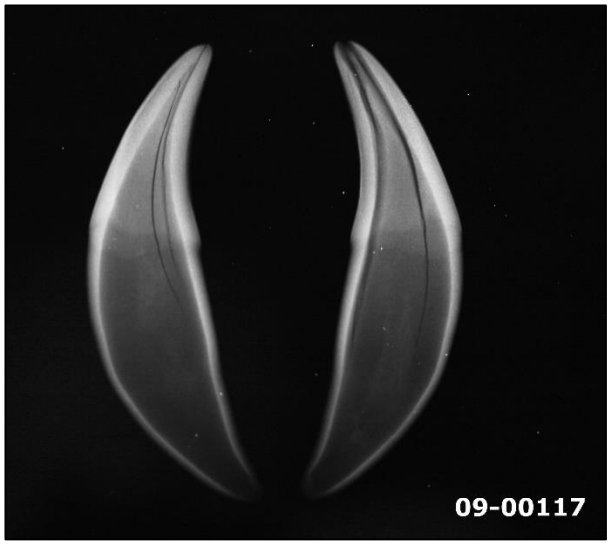
Ejemplar : 11 – 00046	**Sexo: macho**	**Peso: 41 Kg**	**Apreciación visual: 5 años**

Ejemplar : 11 – 00047	**Sexo: hembra**	**Peso: 24 Kg**	**Apreciación visual: 3 años**

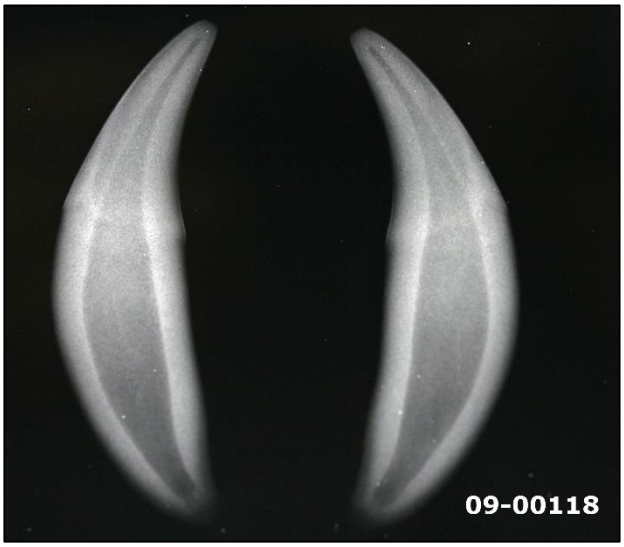
Ejemplar : 11 – 00075	**Sexo: hembra**	**Peso: 21 Kg**	**Apreciación visual: 1 año**

Ejemplar : 11 – 00127	**Sexo: macho**	**Peso: 34 Kg**	**Apreciación visual: 3 años**

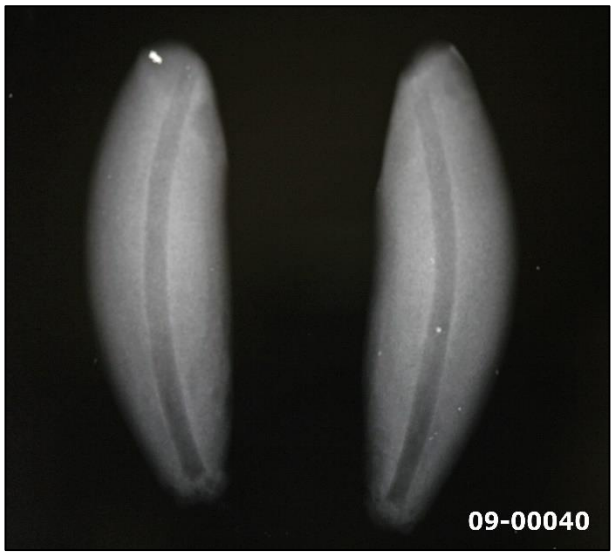
Apéndice II.II Radiografías en plano longitudinal de las distintas piezas dentales usadas en el estudio. Técnica de rayos x.



Ejemplar : 09 – 00117
Sexo: macho
Peso: 34.5 Kg
Cavidad pulpar: 79.26%

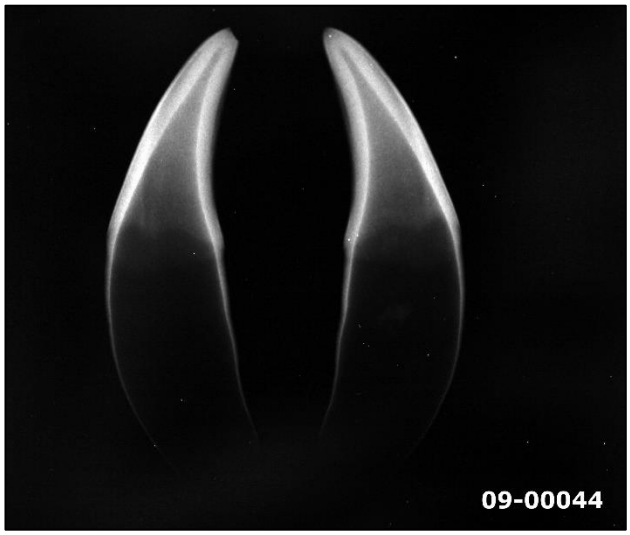


Ejemplar : 09 – 00118
Sexo: hembra
Peso: 34.5 Kg
Cavidad pulpar: 53.55%



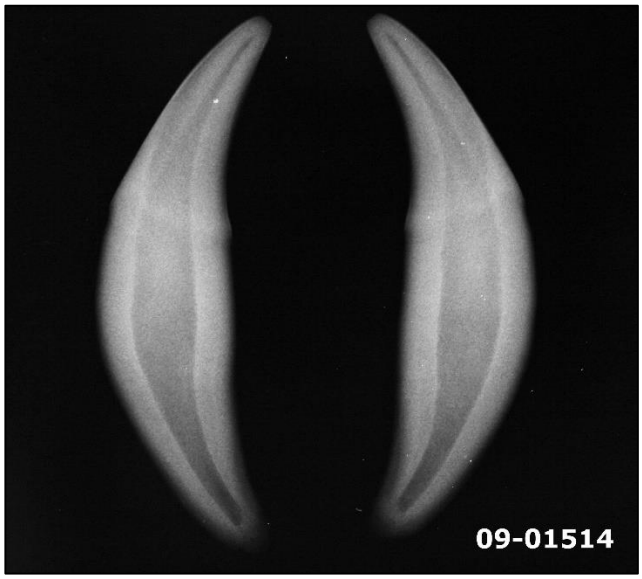
Ejemplar : 09 – 00040
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 15.23%

Ejemplar : 09 – 00041
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 16.90%

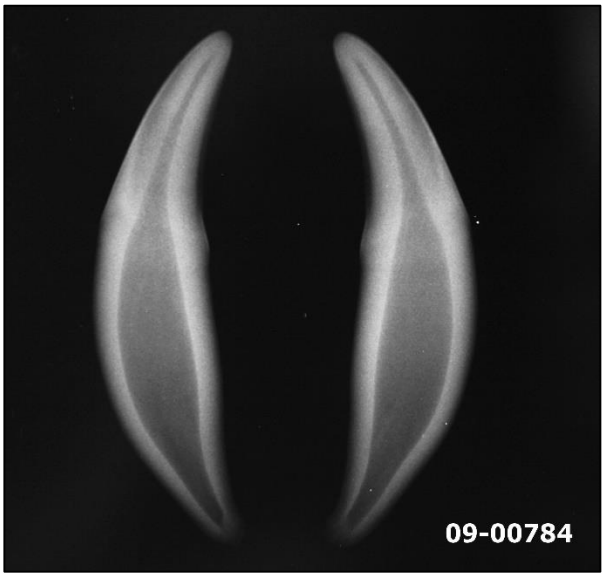


Ejemplar : 09 – 00044
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 95.34%

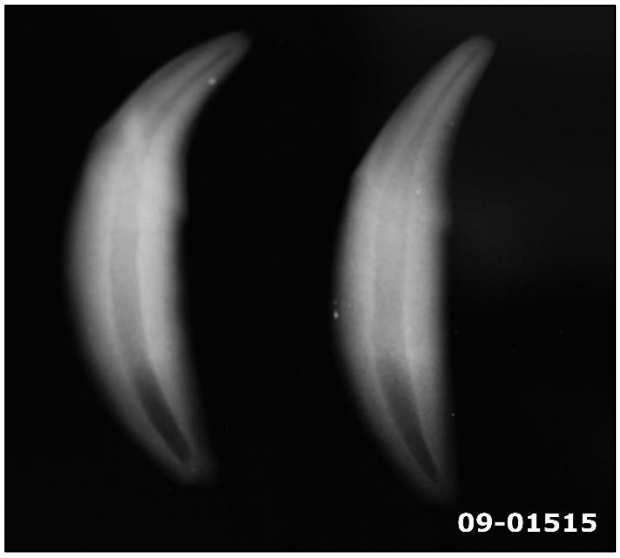
Ejemplar : 09 – 00060
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 11.11%



Ejemplar : 09 – 01514
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 47.67%

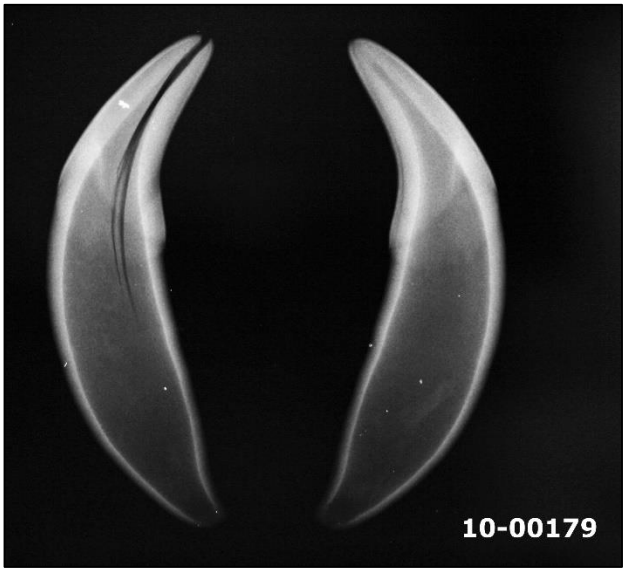


Ejemplar : 09 – 00784
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 58.02%



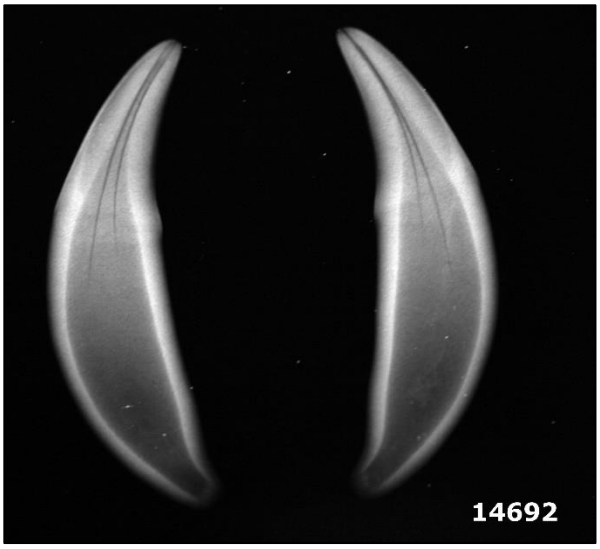
Ejemplar : 09 – 01515
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 25.82%

Ejemplar : 10 – 00182
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 42.10%

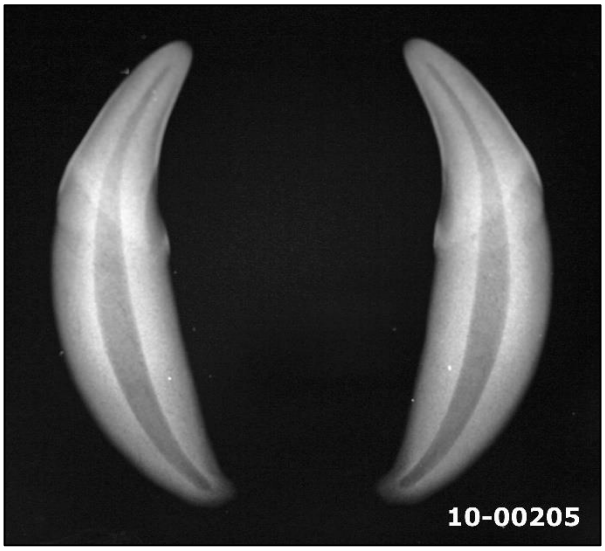


Ejemplar : 10-00179
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 79.48%

Ejemplar : 15476
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 16%



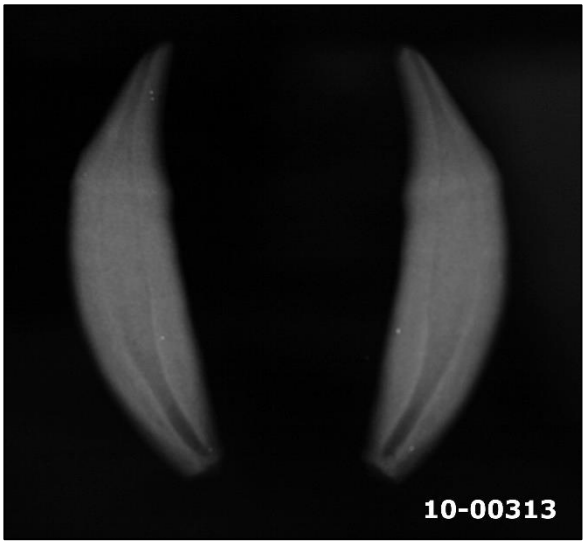
Ejemplar : 14692
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 67.50%

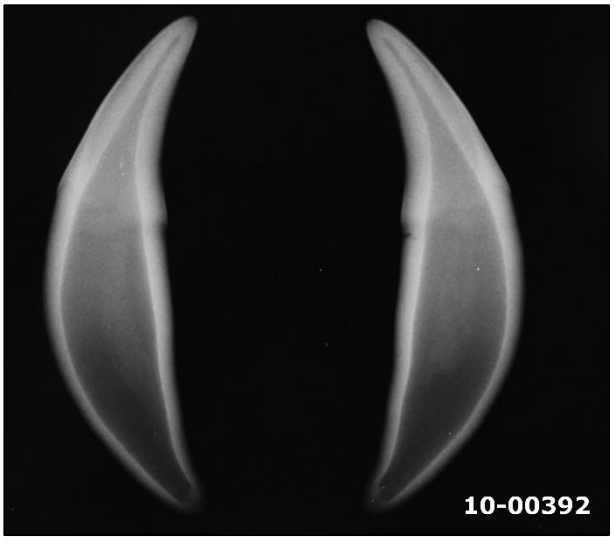


Ejemplar : 10 – 00205
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Cavidad pulpar: 28.39%

Ejemplar : 10-00311
Sexo: hembra
Peso: 22.5 Kg
Cavidad pulpar: 17.10%

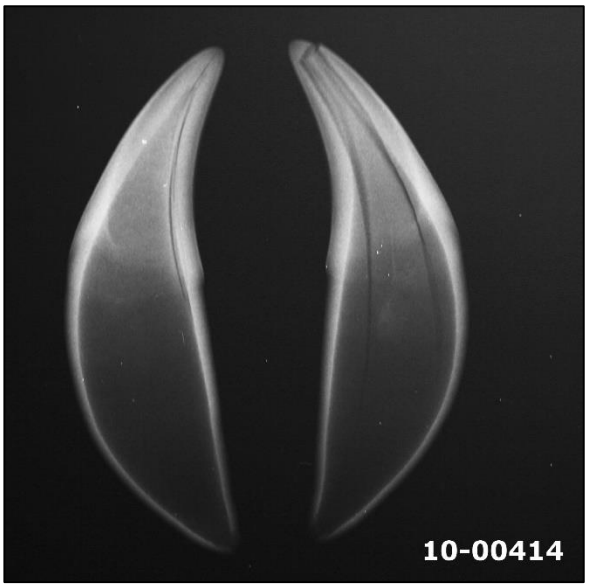
Ejemplar : 10-00221
Sexo: macho
Peso: 37.5 Kg
Cavidad pulpar: 14.66%

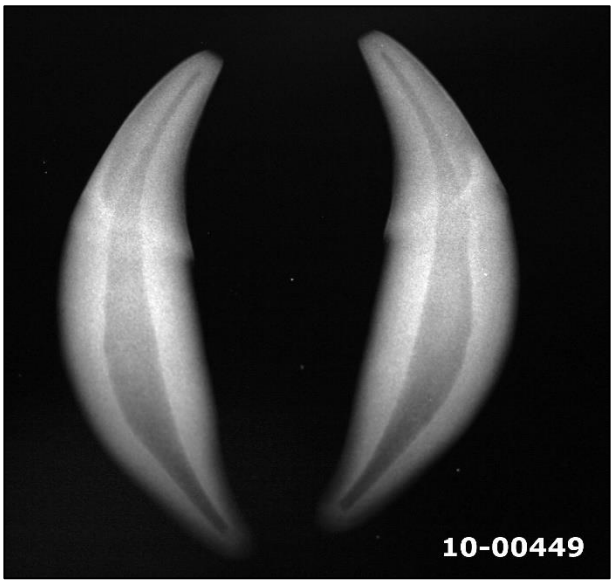




Ejemplar : 10-00313
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 40%

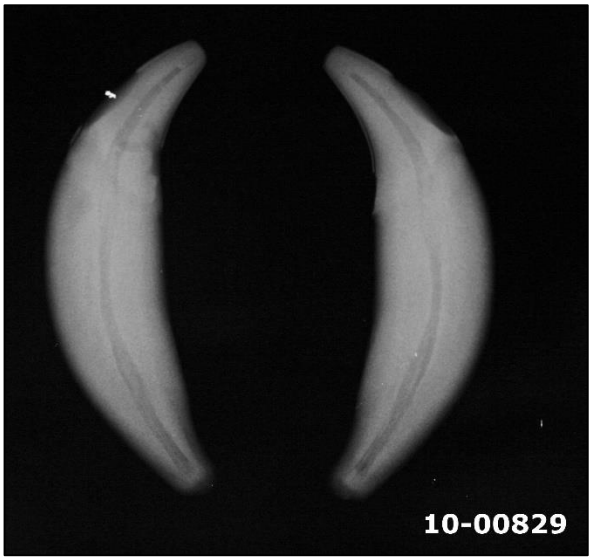
Ejemplar : 10 – 00392
Sexo: hembra
Peso: 32 Kg
Cavidad pulpar: 70.45%

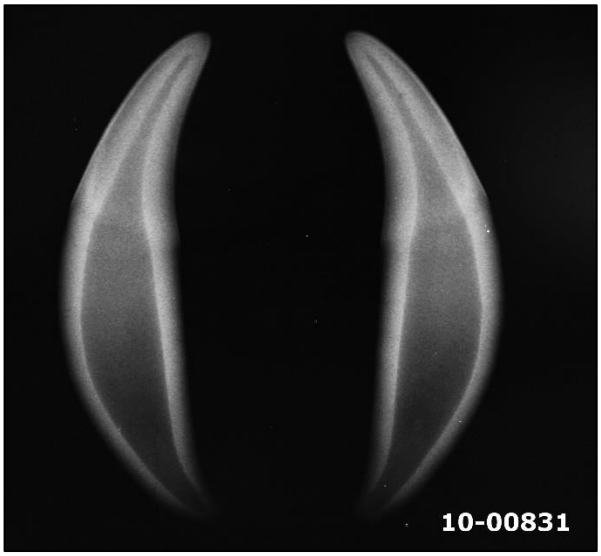




Ejemplar : 10-00414
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 82.75%

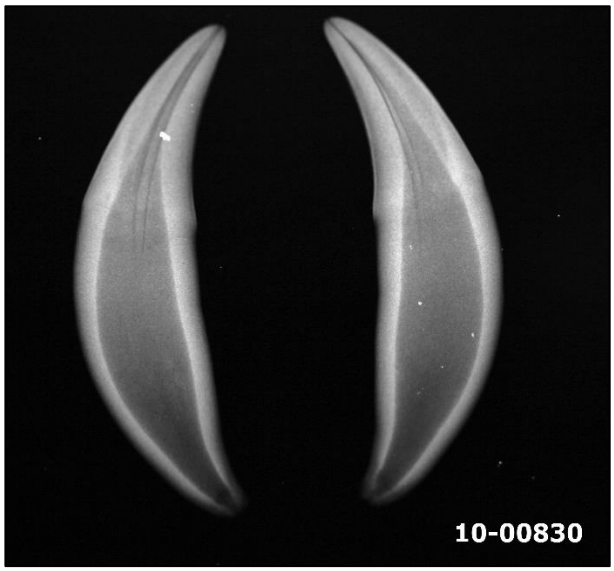
Ejemplar : 10-00449
Sexo: hembra
Peso: 36 Kg
Cavidad pulpar: 32.94%

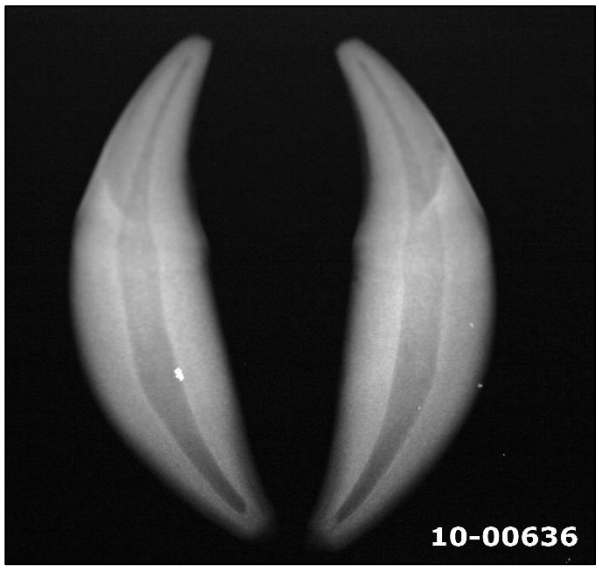




Ejemplar : 10-00829
Sexo: hembra
Peso: 36.5 Kg
Cavidad pulpar: 7.14%

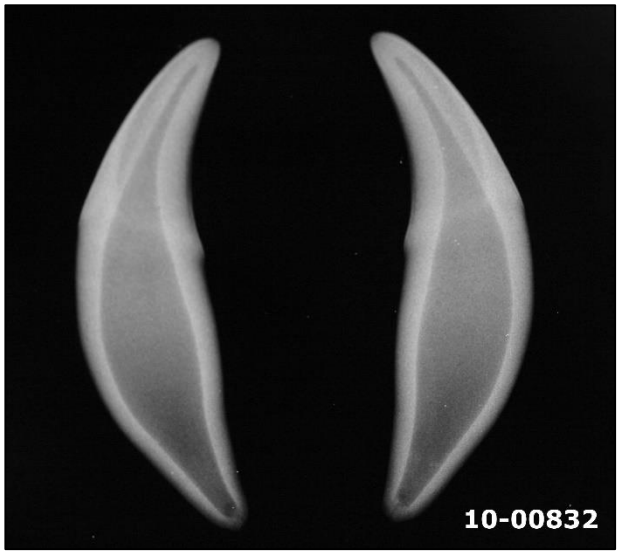
Ejemplar : 10-00831
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Cavidad pulpar: 28.57%

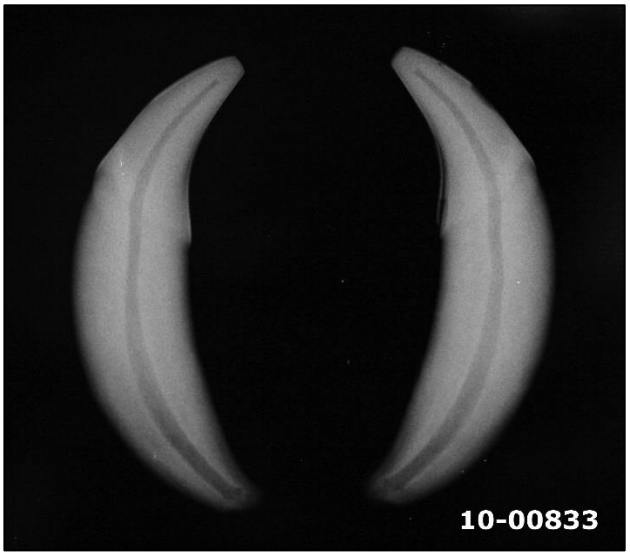




Ejemplar : 10-00830
Sexo: macho
Peso: 40 Kg
Cavidad pulpar: 61.36%

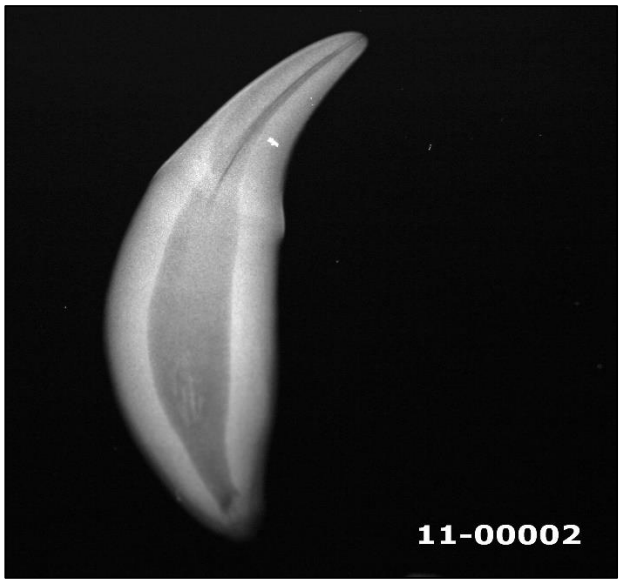
Ejemplar : 10-00636
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Cavidad pulpar: 28.57%





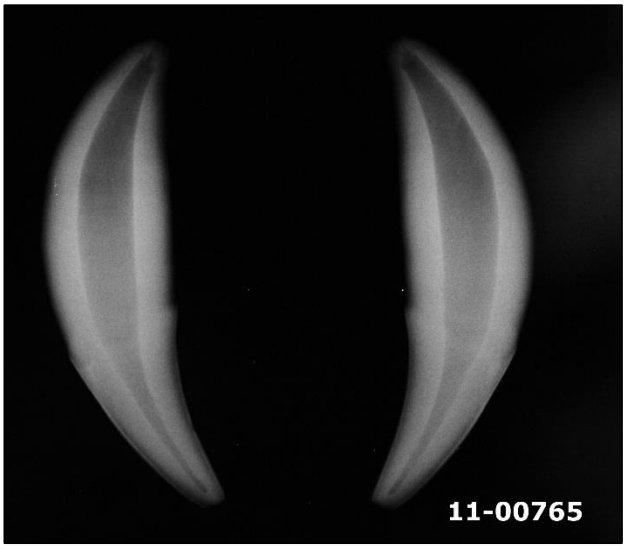
Ejemplar : 10-00832
Sexo: hembra
Peso: 27 Kg
Cavidad pulpar: 67.81%

Ejemplar : 10-00833
Sexo: hembra
Peso: 30.5 Kg
Cavidad pulpar: 11.26%



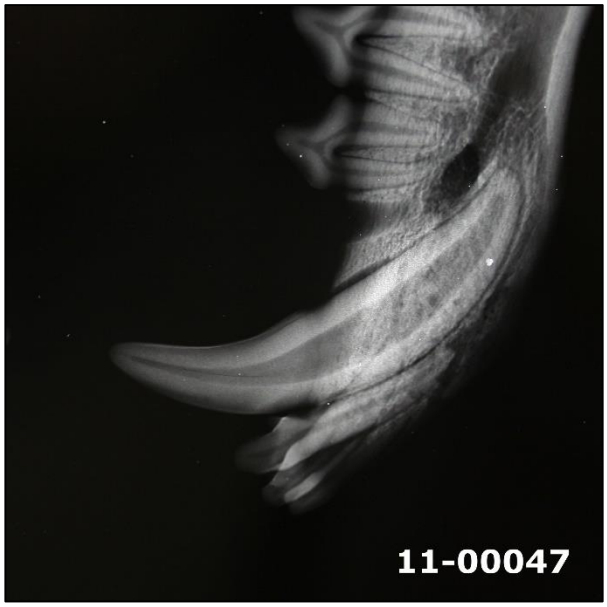
Ejemplar : 11-00002
Sexo: macho
Peso: 39.5 Kg
Cavidad pulpar: 46.23%

Ejemplar : 14934
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 24.05%



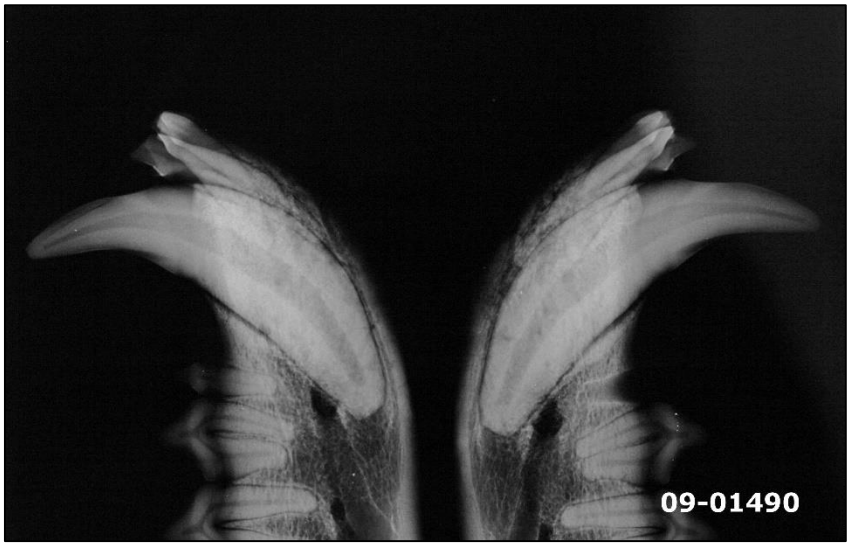
Ejemplar : 11-00765
Sexo: N/A
Peso:N/A
Cavidad pulpar: 43.75%

Ejemplar : 11-00046
Sexo: macho
Peso: 41 Kg
Cavidad pulpar: 25.64%



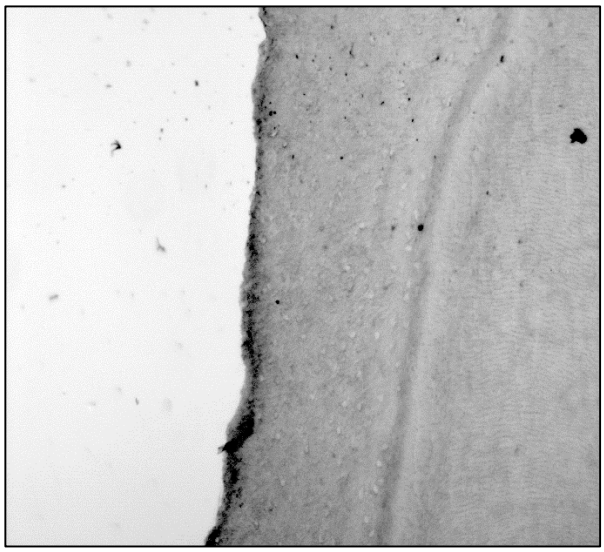
Ejemplar : 11-00047
Sexo: hembra
Peso: 24 Kg
Cavidad pulpar: 43.33%

Ejemplar : 09-00432
Sexo: N/A
Peso: N/A
Cavidad pulpar: 21.42%

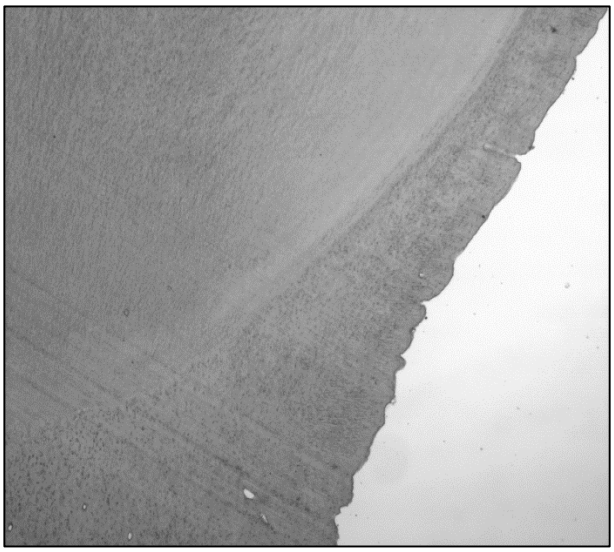


Ejemplar : 09-01490
Sexo: N/A
Peso:N/A
Cavidad pulpar: 25%

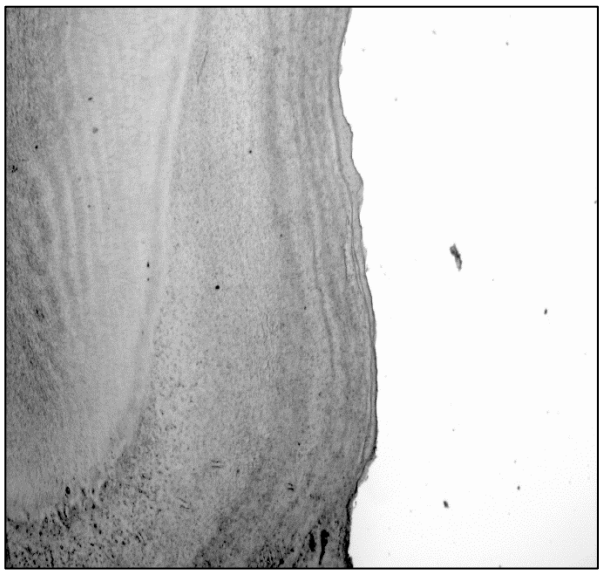
Apéndice II.III Fotografías de los cortes longitudinales de las piezas dentales de los ejemplares usados en el estudio. Técnica de corte histológico.



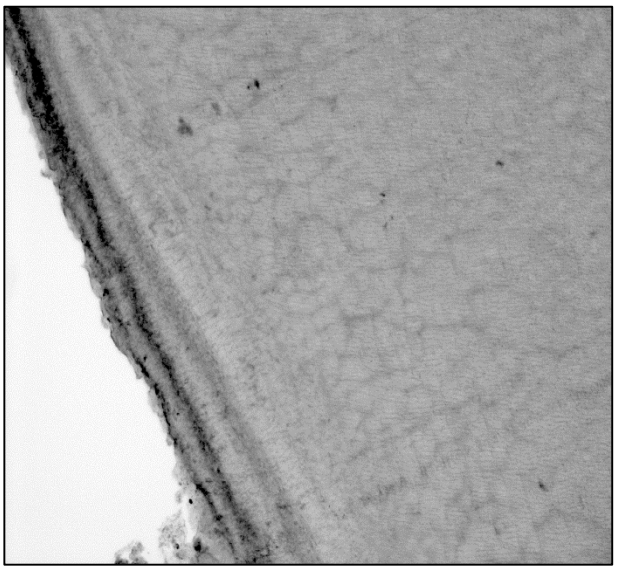
Ejemplar : 09 – 00117
Sexo: macho
Peso: 34.5 Kg
Corte histológico: 1 año



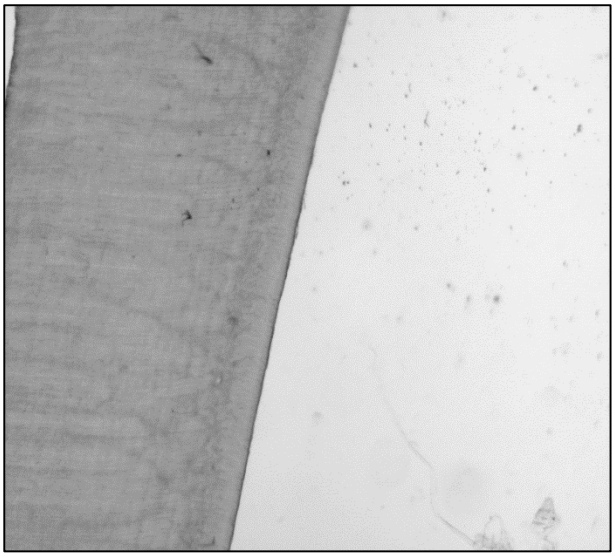
Ejemplar : 09 – 00118
Sexo: hembra
Peso: 34.5 Kg
Corte histológico: 1 año



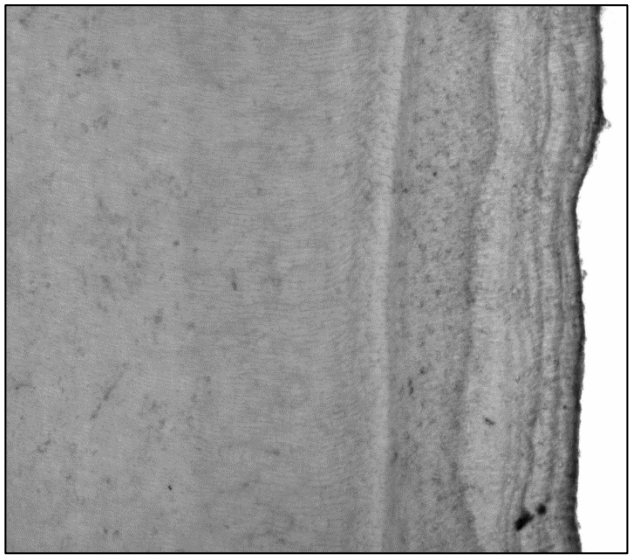
Ejemplar : 09 – 00040
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 7 años



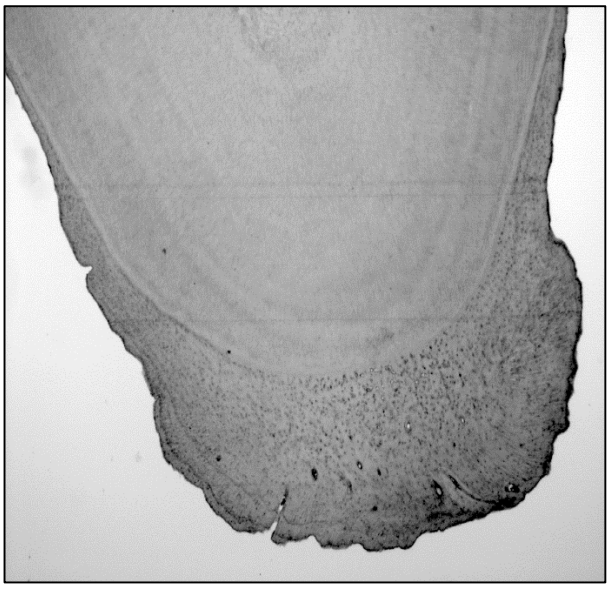
Ejemplar : 09 – 00041
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 2 años



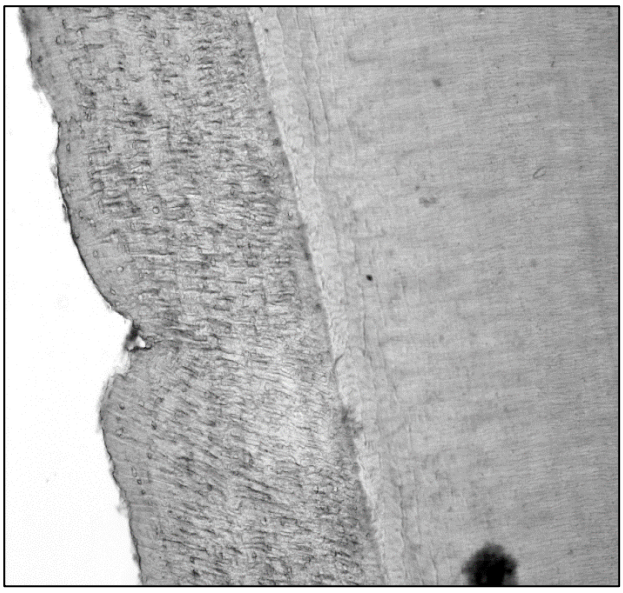
Ejemplar : 09 – 00044
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: -



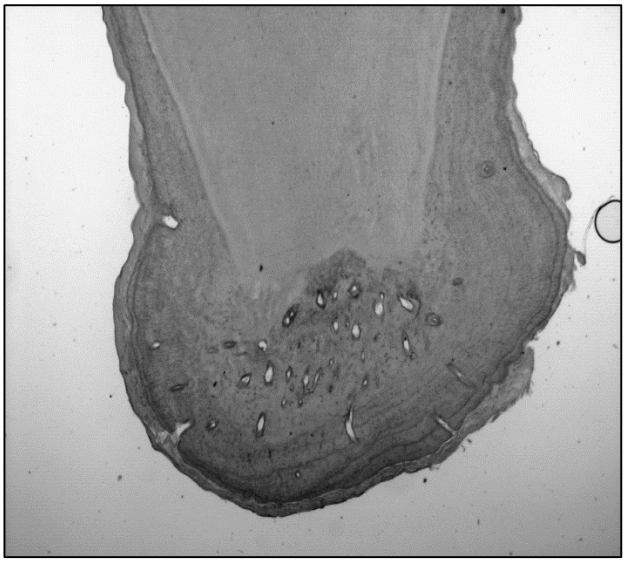
Ejemplar : 09 – 00060
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 7 años



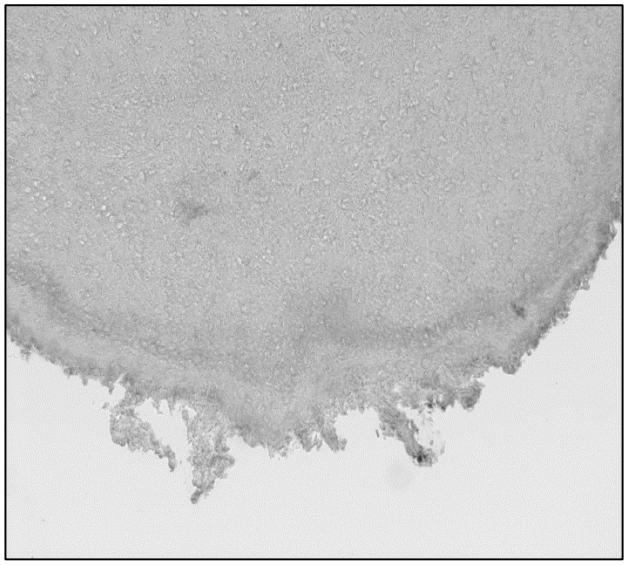
Ejemplar : 09 – 01514
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 1 año



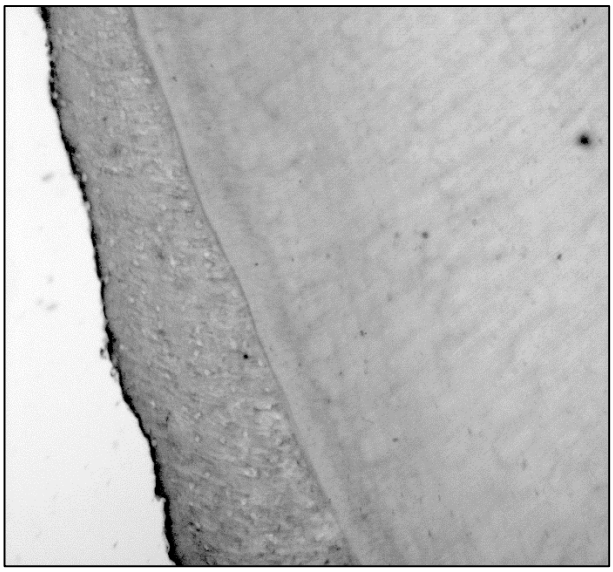
Ejemplar : 09 – 00784
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 4 años



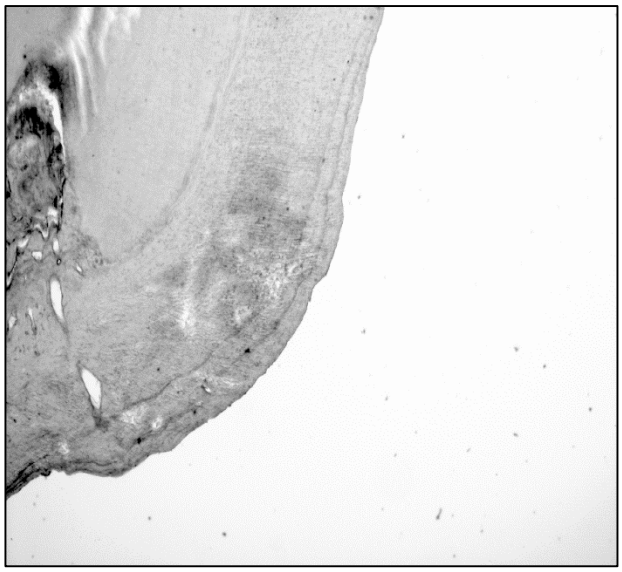
Ejemplar : 09 – 01515
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 3 años



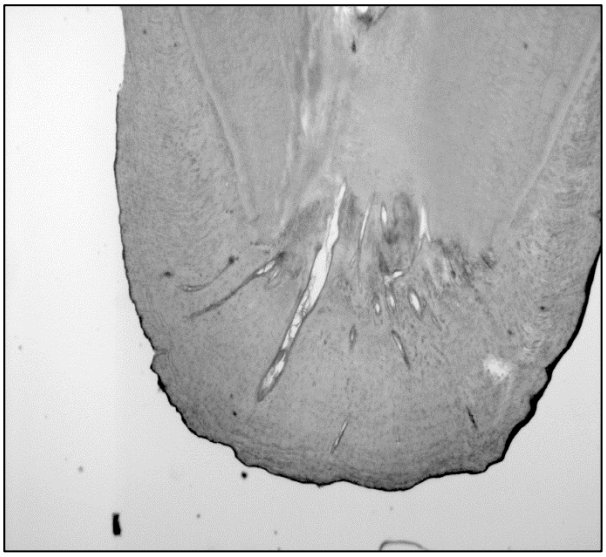
Ejemplar : 10 – 00182
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 1 año



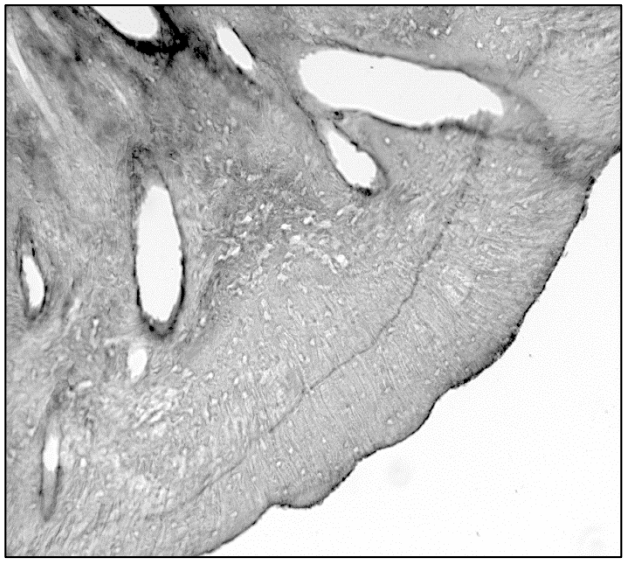
Ejemplar : 10-00179
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 1 año



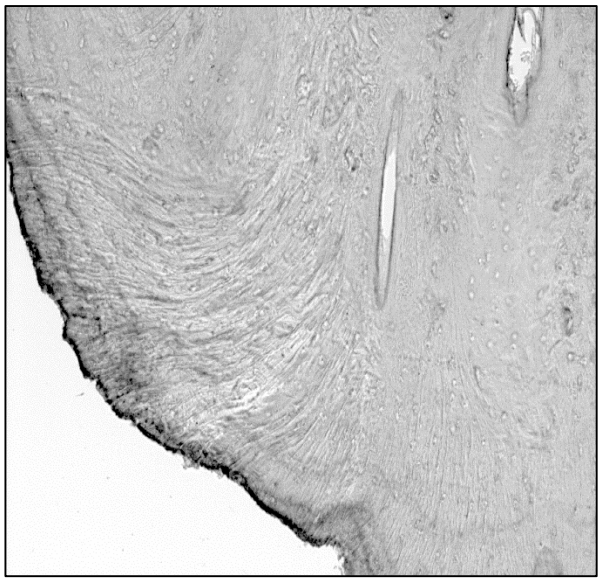
Ejemplar : 15476
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 2 años



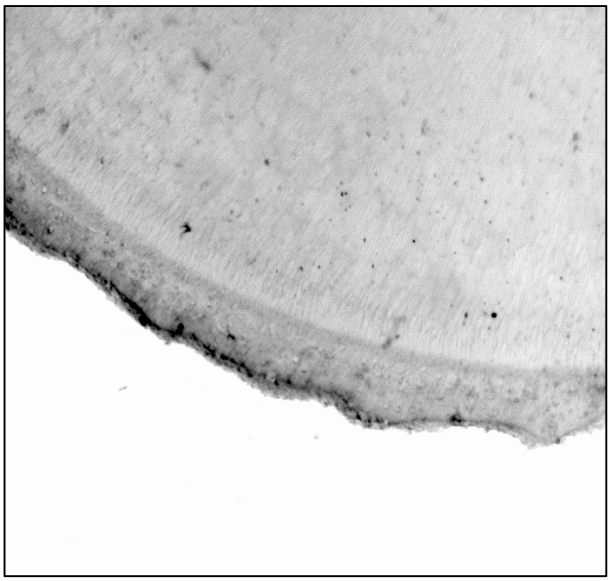
Ejemplar : 14692
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 2 años



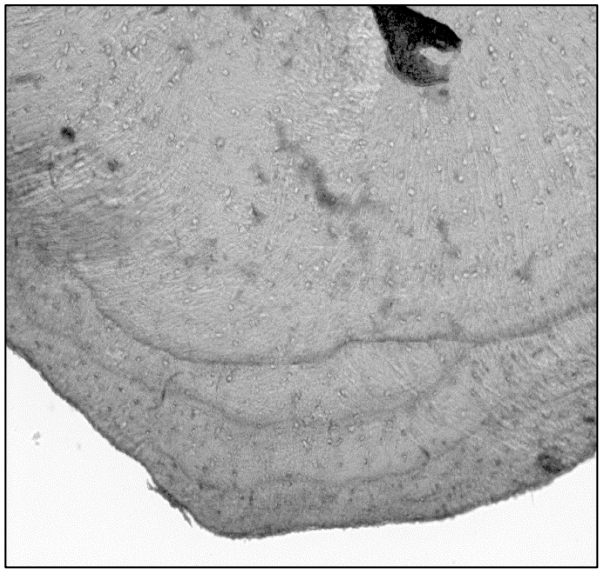
Ejemplar : 10 – 00205
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Corte histológico: 4 años



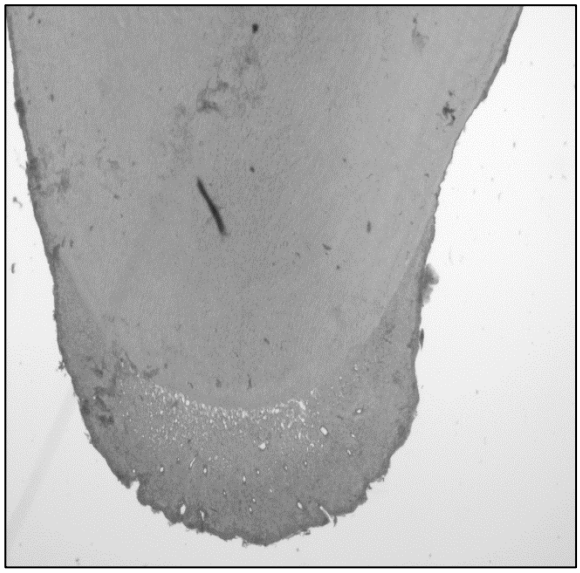
Ejemplar : 10-00311
Sexo: hembra
Peso: 22.5 Kg
Corte histológico: 3 años



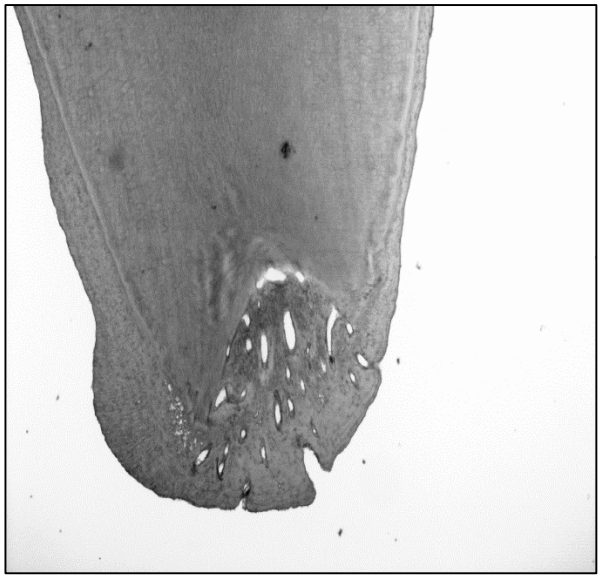
Ejemplar : 10-00221
Sexo: macho
Peso: 37.5 Kg
Corte histológico: 5 años



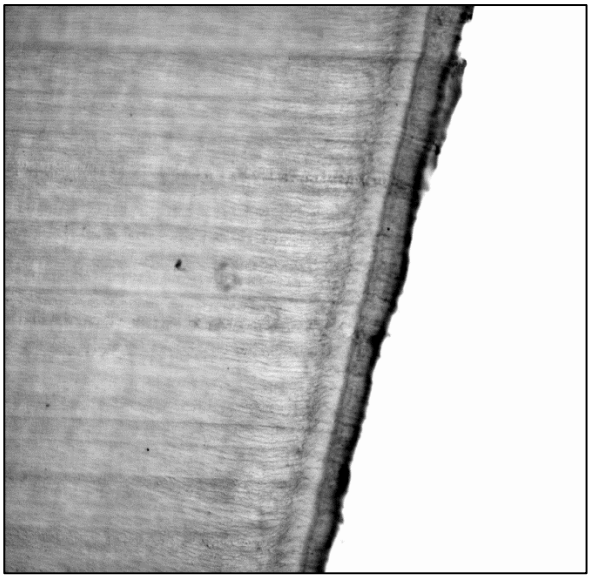
Ejemplar : 10-00313
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 3 años



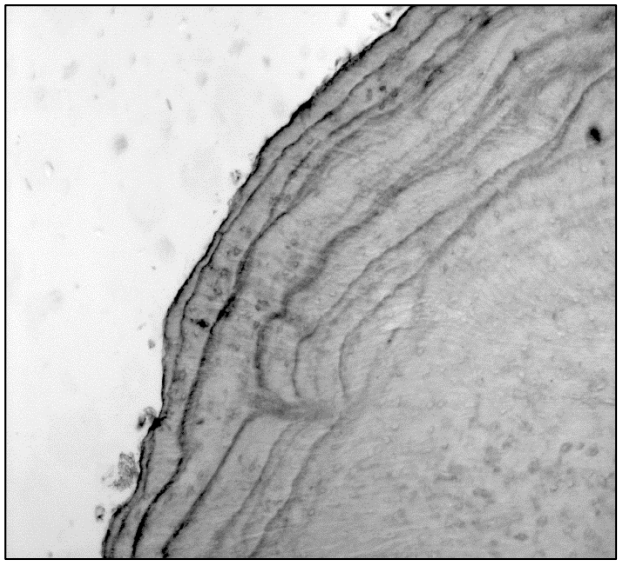
Ejemplar : 10 – 00392
Sexo: hembra
Peso: 32 Kg
Corte histológico: 1 año



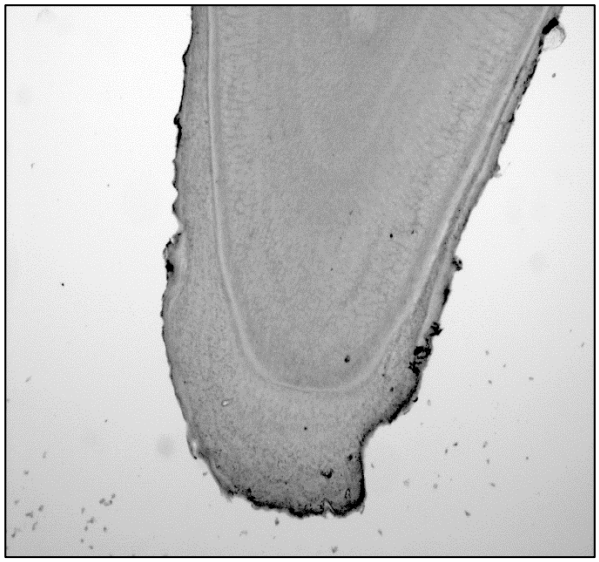
Ejemplar : 10-00414
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 1 año



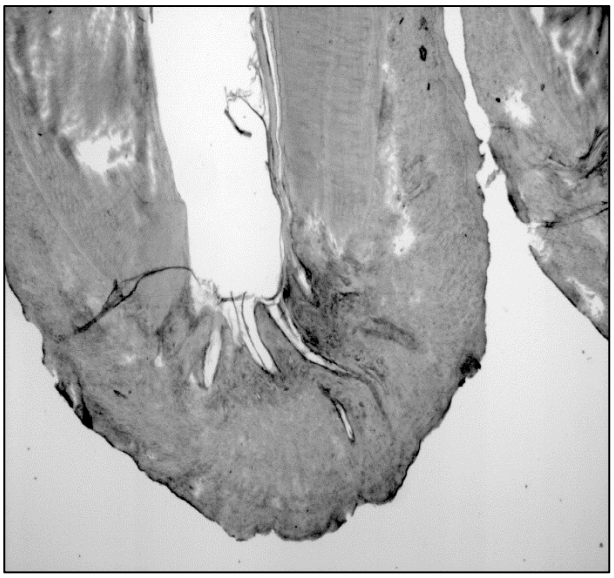
Ejemplar : 10-00449
Sexo: hembra
Peso: 36 Kg
Corte histológico: 1 año



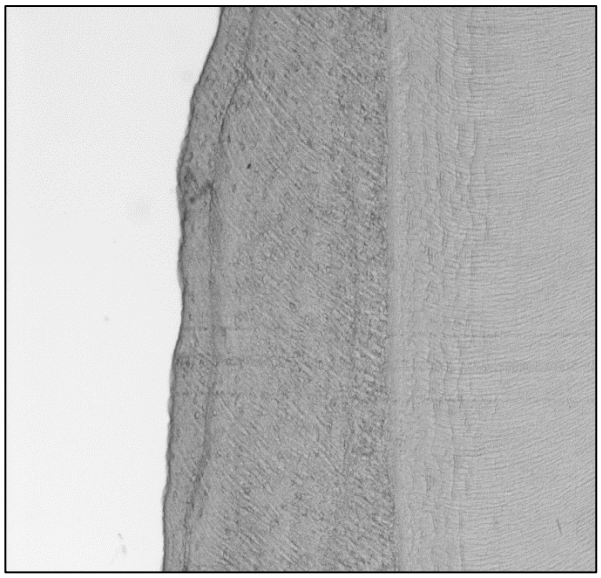
Ejemplar : 10-00829
Sexo: hembra
Peso: 36.5 Kg
Corte histológico: 4 años



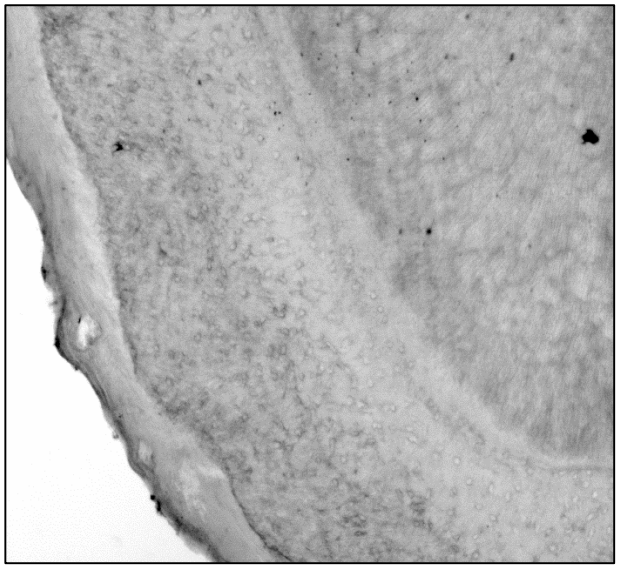
Ejemplar : 10-00831
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Corte histológico: 1 año



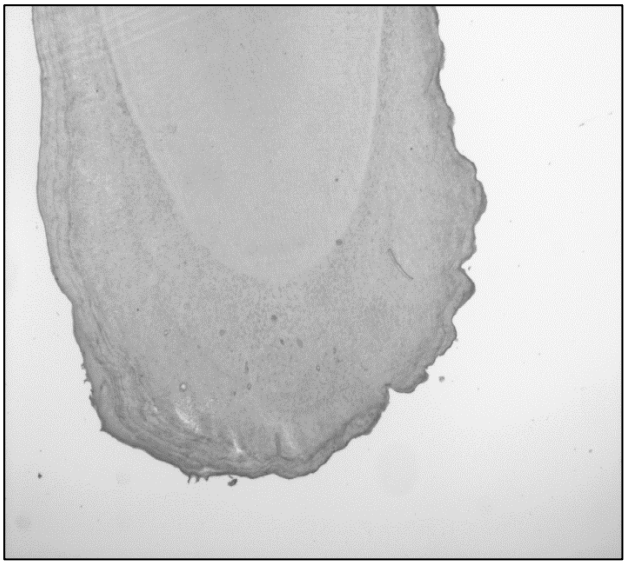
Ejemplar : 10-00830
Sexo: macho
Peso: 40 Kg
Corte histológico: 2 años



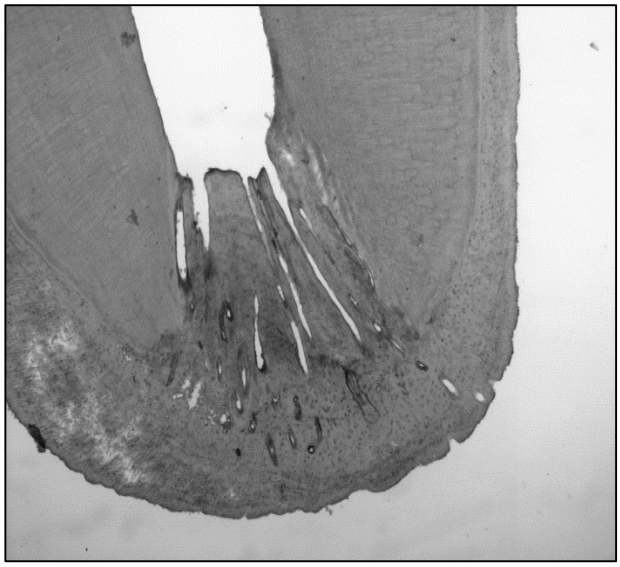
Ejemplar : 10-00636
Sexo: hembra
Peso: 29 Kg
Corte histológico: 2 años



Ejemplar : 10-00832
Sexo: hembra
Peso: 27 Kg
Corte histológico: 1 año

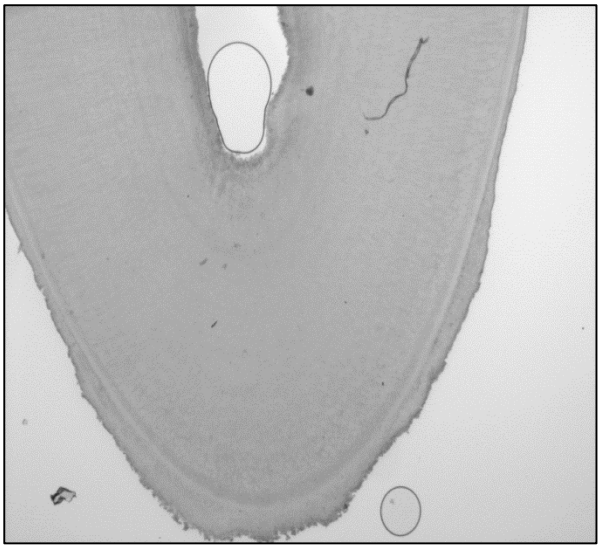


Ejemplar : 10-00833
Sexo: hembra
Peso: 30.5 Kg
Corte histológico: 4 años

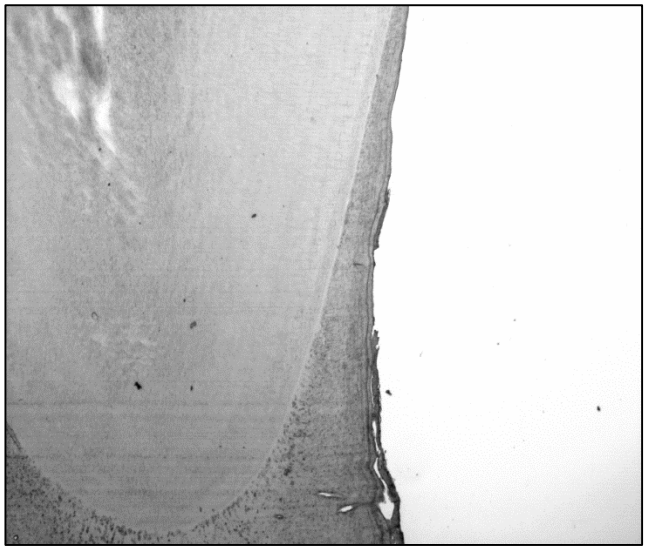


Ejemplar : 11-00002
Sexo: macho
Peso: 39.5 Kg
Corte histológico: 1 años

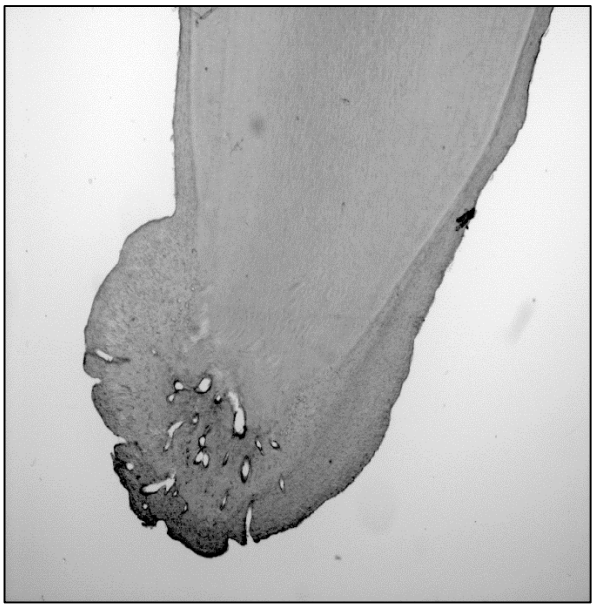
Ejemplar : 14934
Sexo: N/A
Peso: N/A
Corte histológico: 4 años



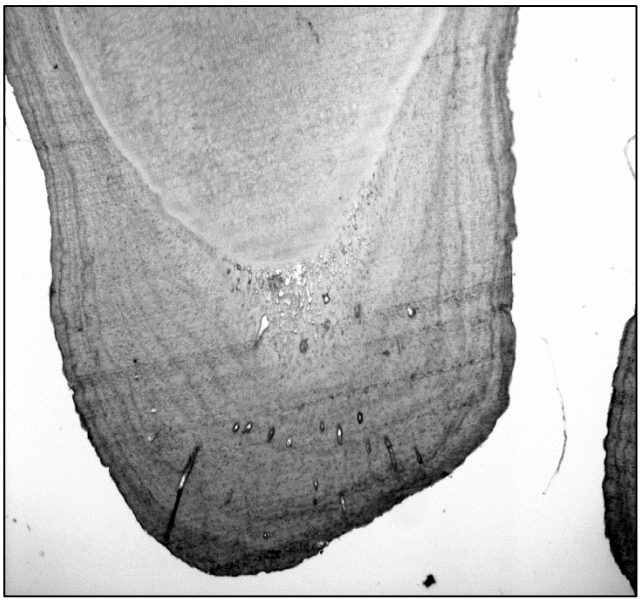
Ejemplar : 11-00129
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 1 año



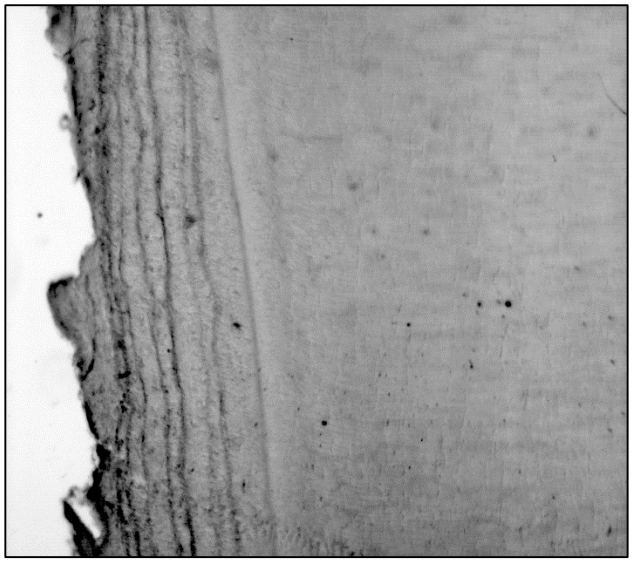
Ejemplar : 11-00046
Sexo: macho
Peso: 41 Kg
Corte histológico: 1 año



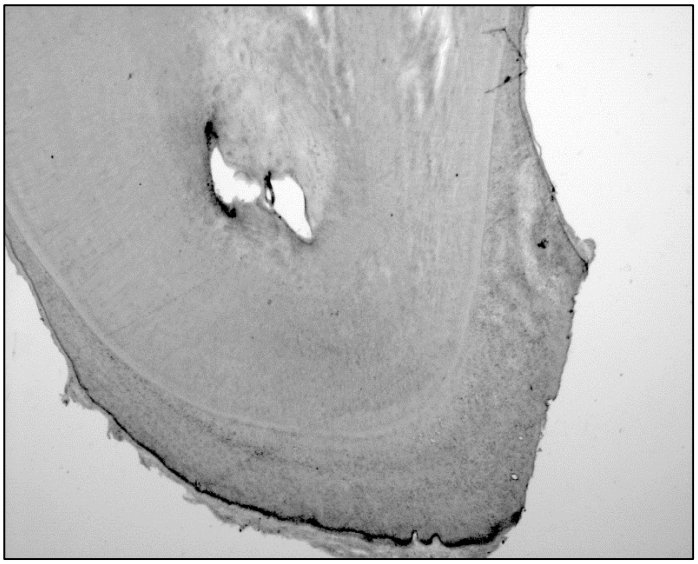
Ejemplar : 11-00047
Sexo: hembra
Peso: 24 Kg
Corte histológico: 1 año



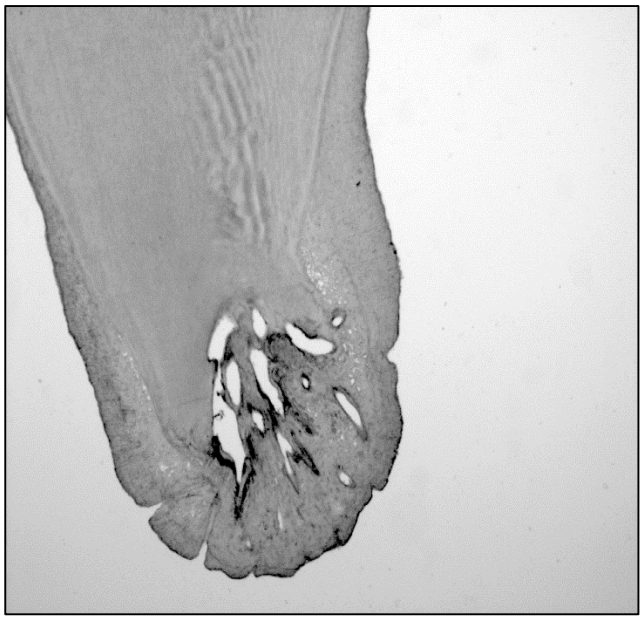
Ejemplar : 09-00432
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 4 años



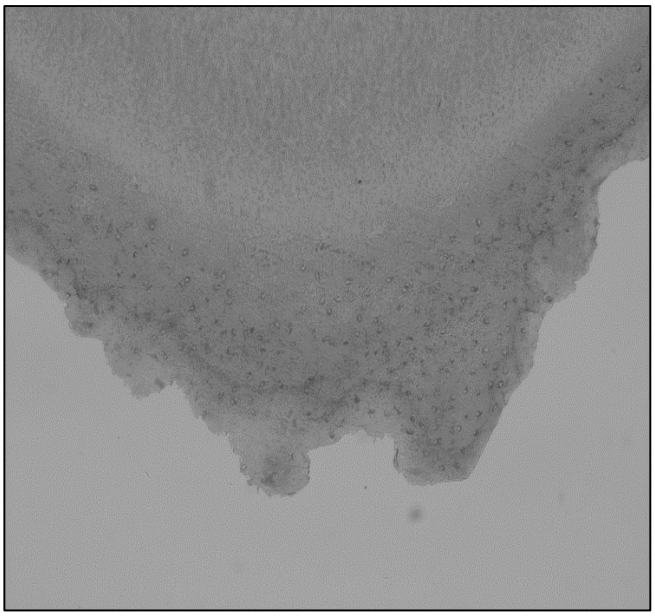
Ejemplar : 10-00378
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 7 años



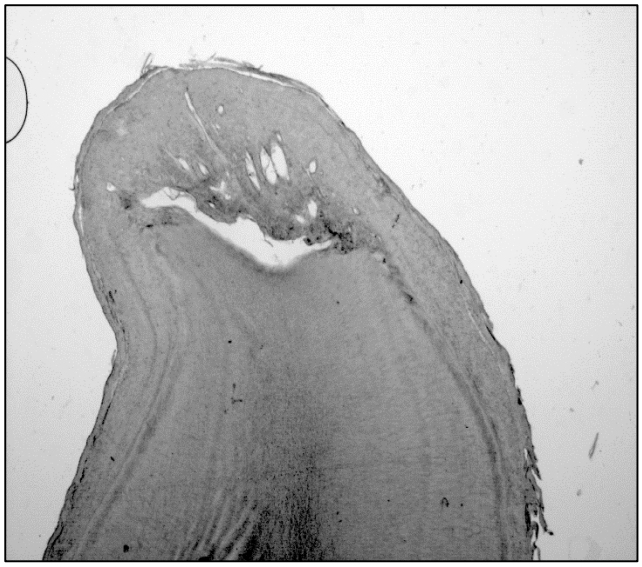
Ejemplar : 11-00127
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 1 año



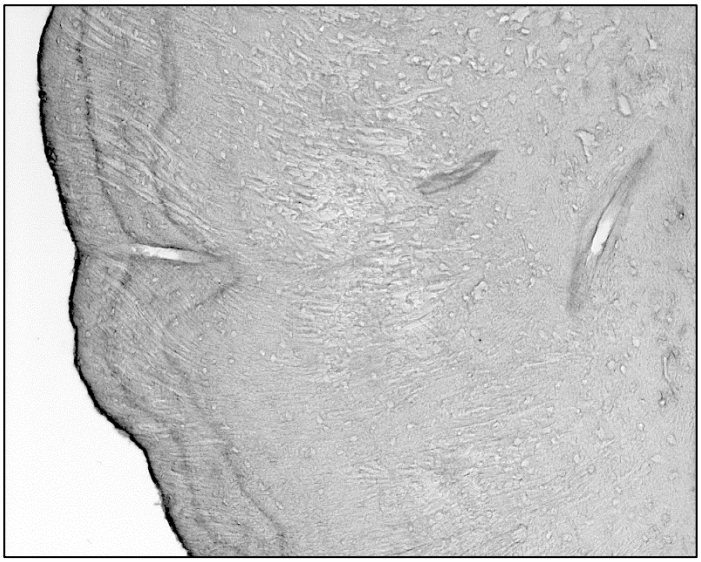
Ejemplar : 11-00048
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 1 año



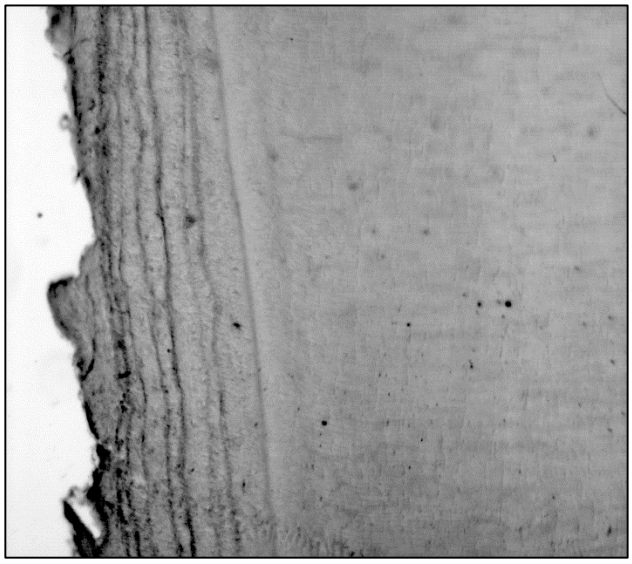
Ejemplar : 11-00034
Sexo: -
Peso: -
Corte histológico: 1 año



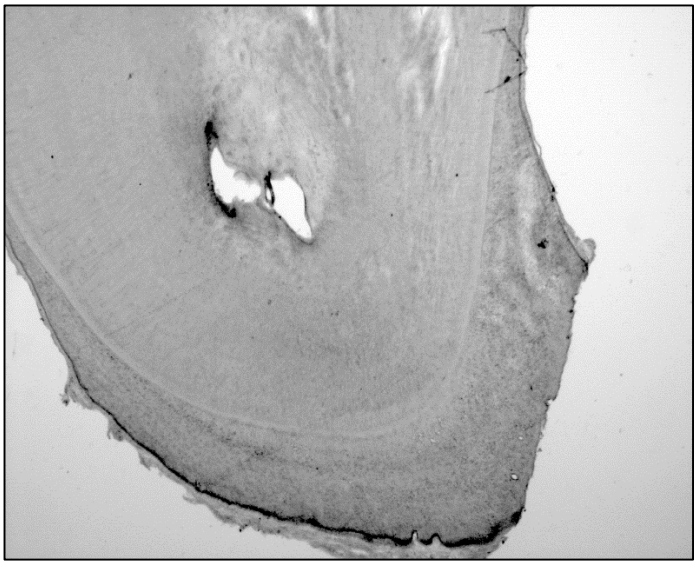
Ejemplar : 11-00075
Sexo: N/A
Peso:N/A
Corte histológico: 1 año



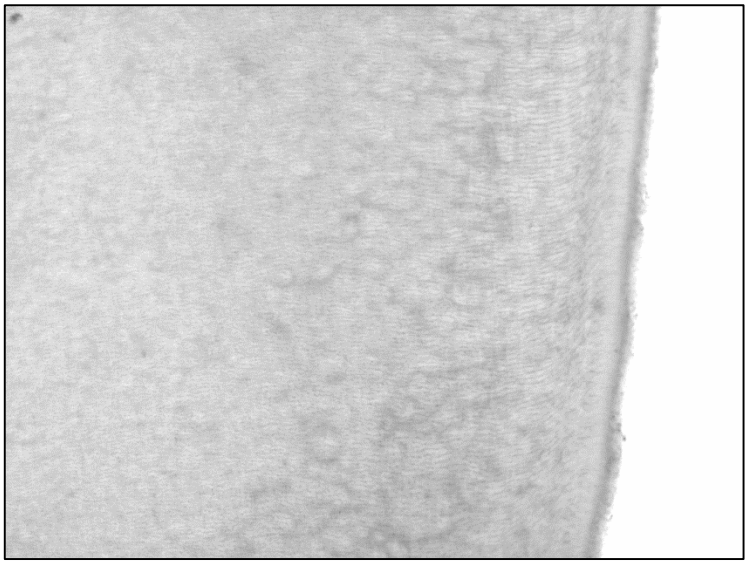
Ejemplar : 09-01490
Sexo: N/A
Peso:N/A
Corte histológico: 4 años



Ejemplar : 10-00378
Sexo: N/A
Peso:N/A
Corte histológico: 7 años

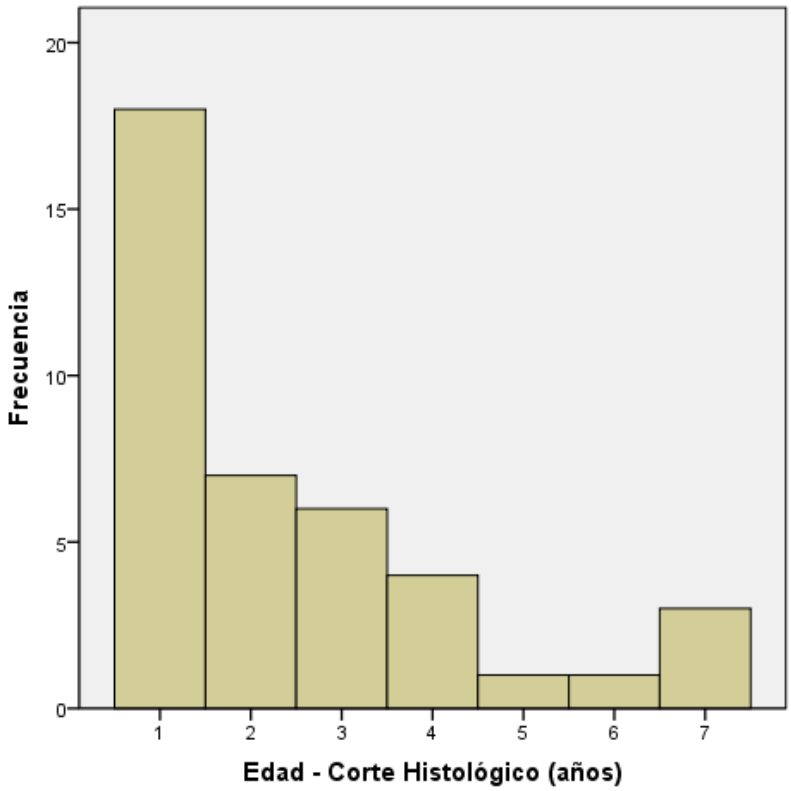


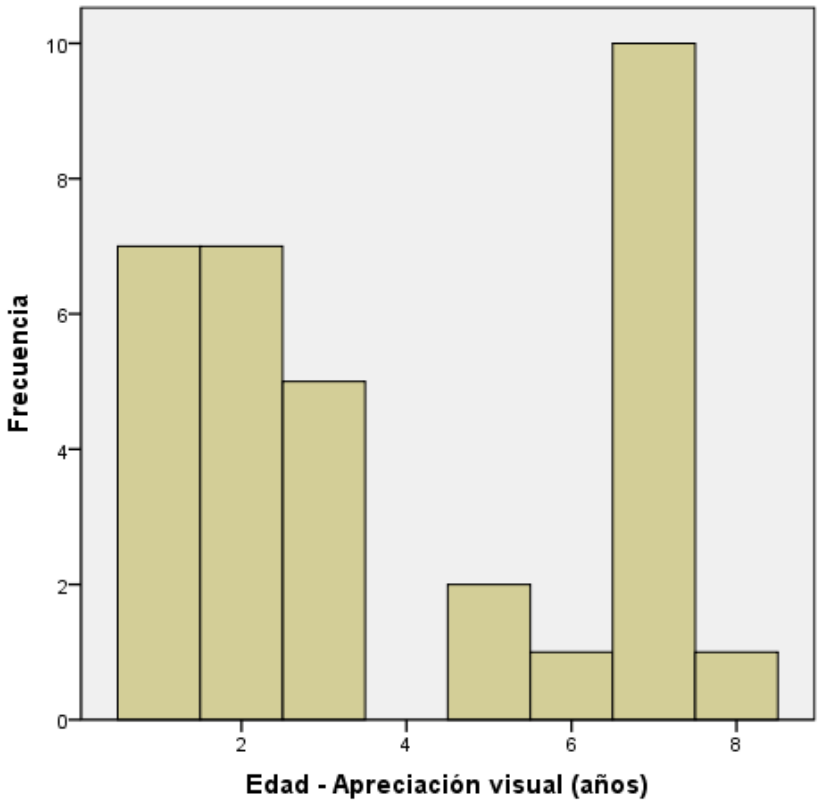
Ejemplar : 11-00127
Sexo:
Peso:
Corte histológico: 1 año



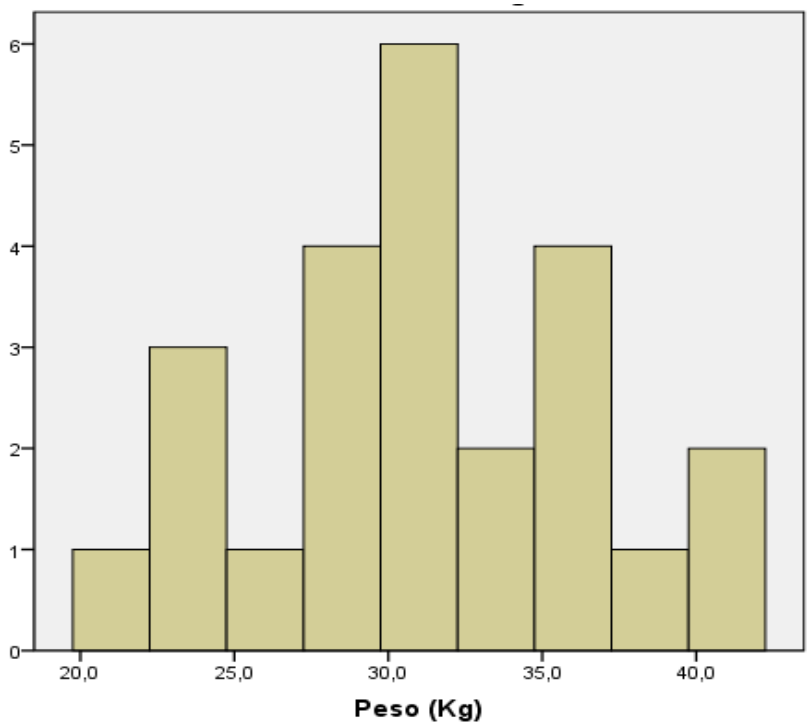
Ejemplar : 14395
Sexo:
Peso:
Corte histológico: 1 año

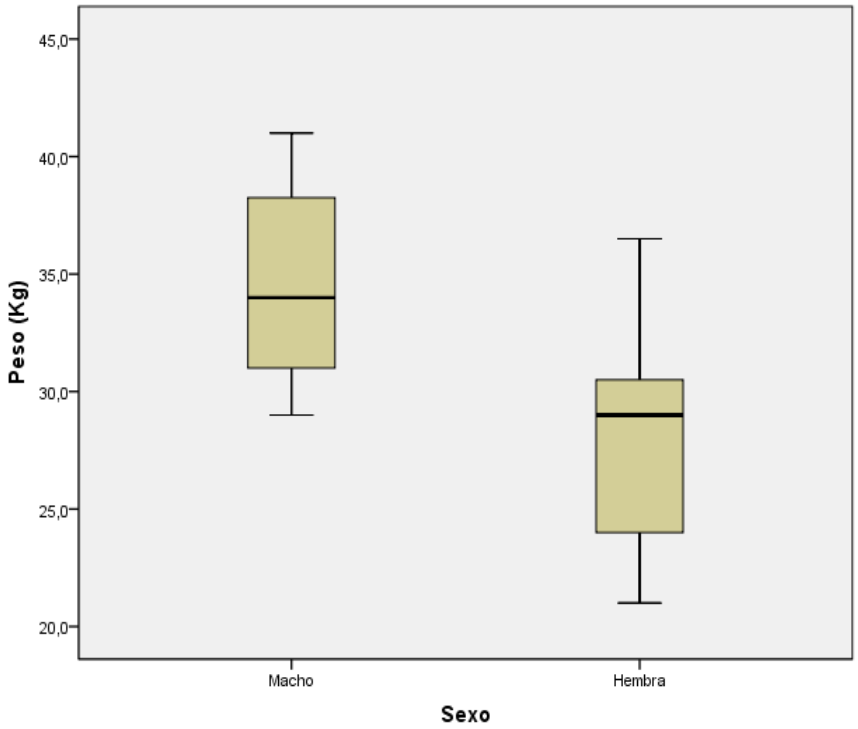
Apéndice III. GRÁFICAS ESTUDIO ESTADÍSTICO



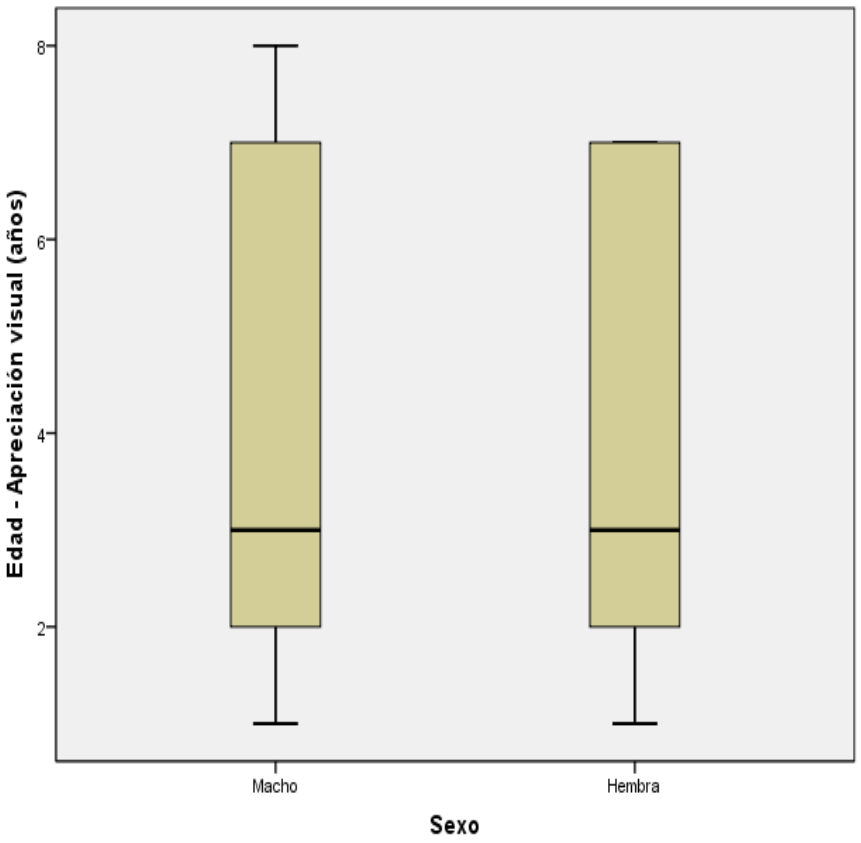


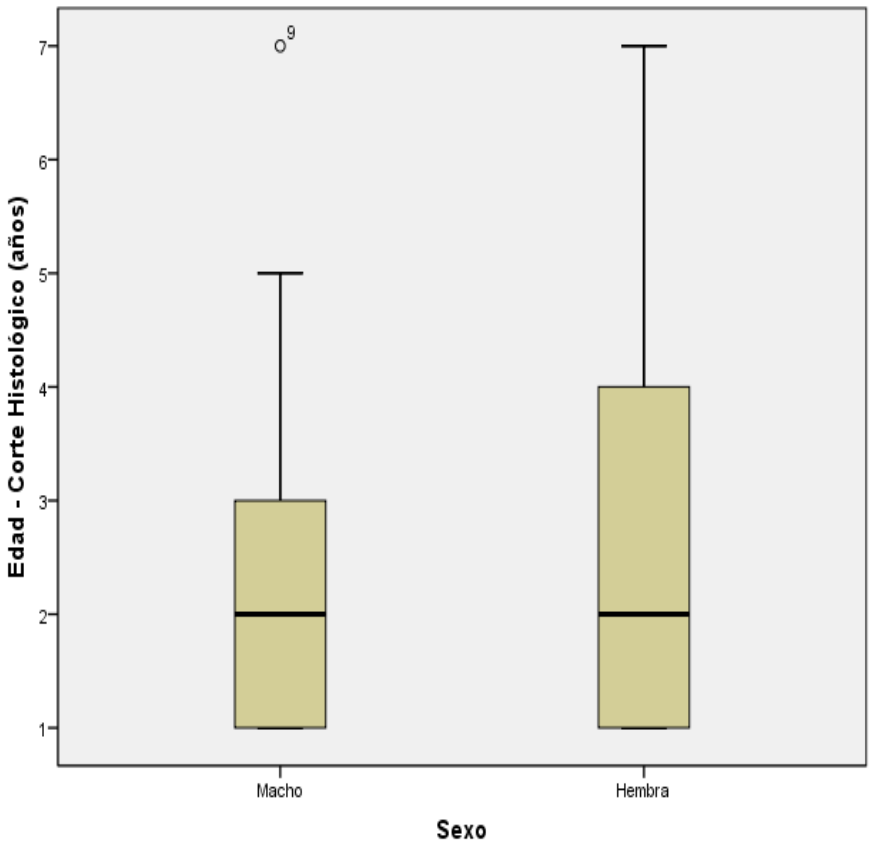
Apéndice III.I. Diagrama de barras en el que se representa la distribución de los ejemplares (años) datados mediante corte histológico (Izquierda), y mediante la técnica de apreciación visual (derecha).



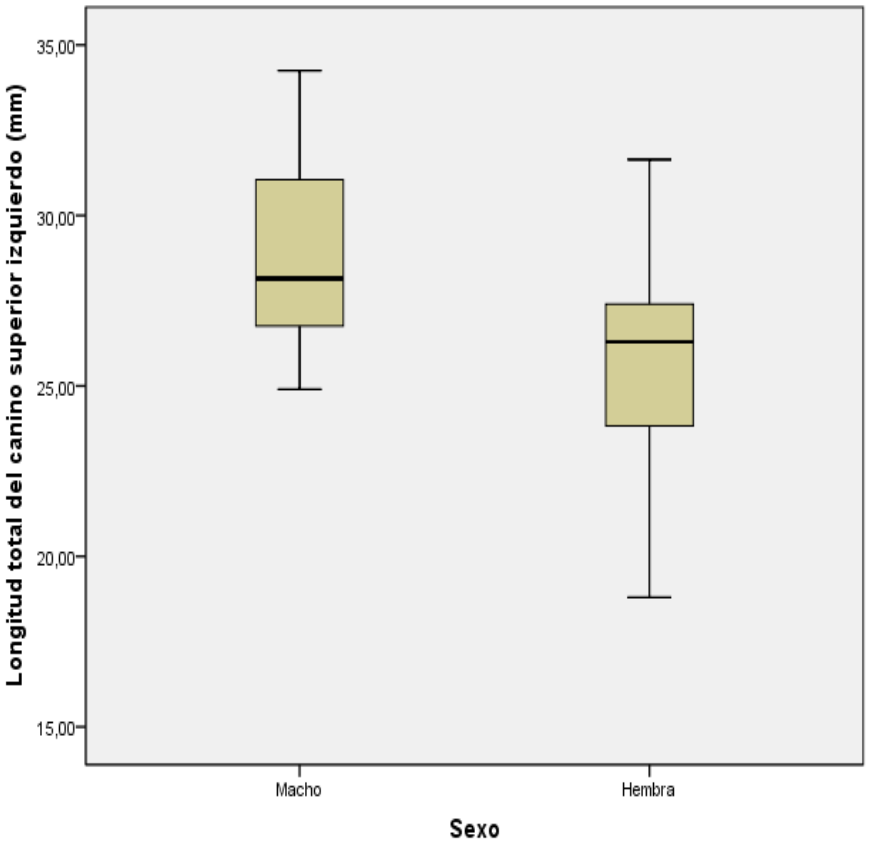


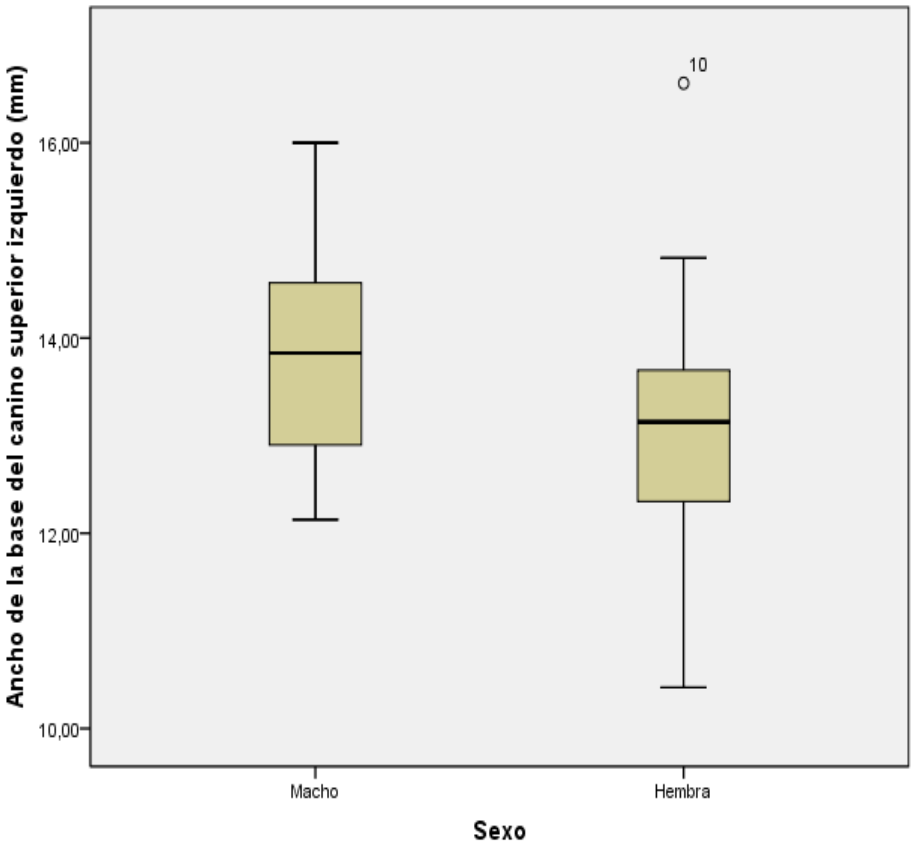
Apéndice III.II. Diagrama de barras en el que se representa la distribución de los ejemplares en base a su peso (Kg). Diagrama de cajas en el que se representa la relación entre el peso y el sexo.



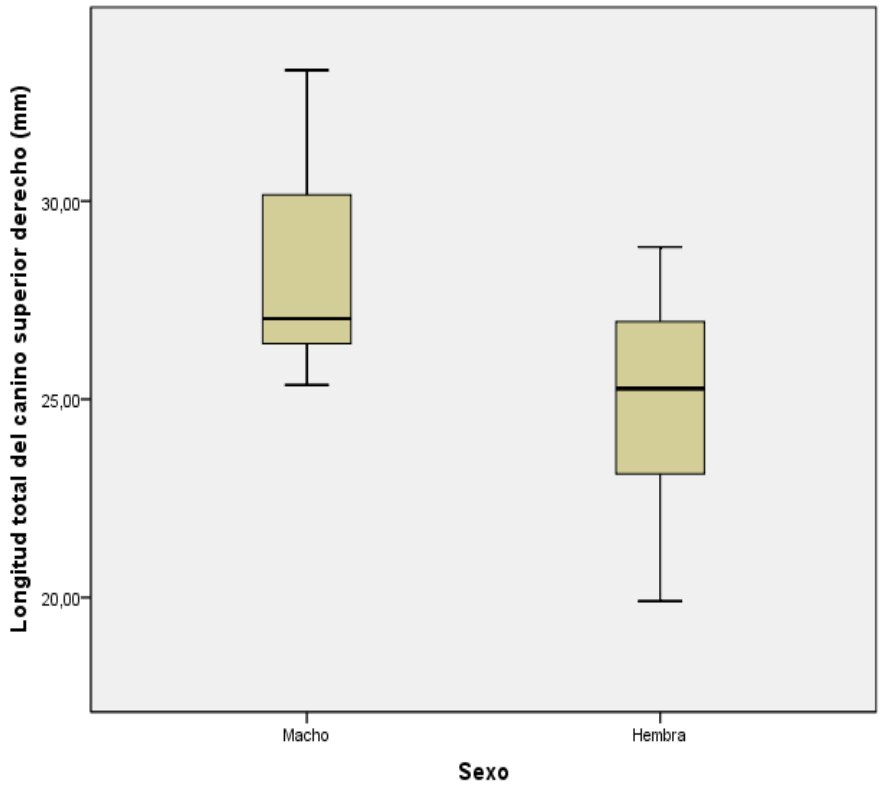


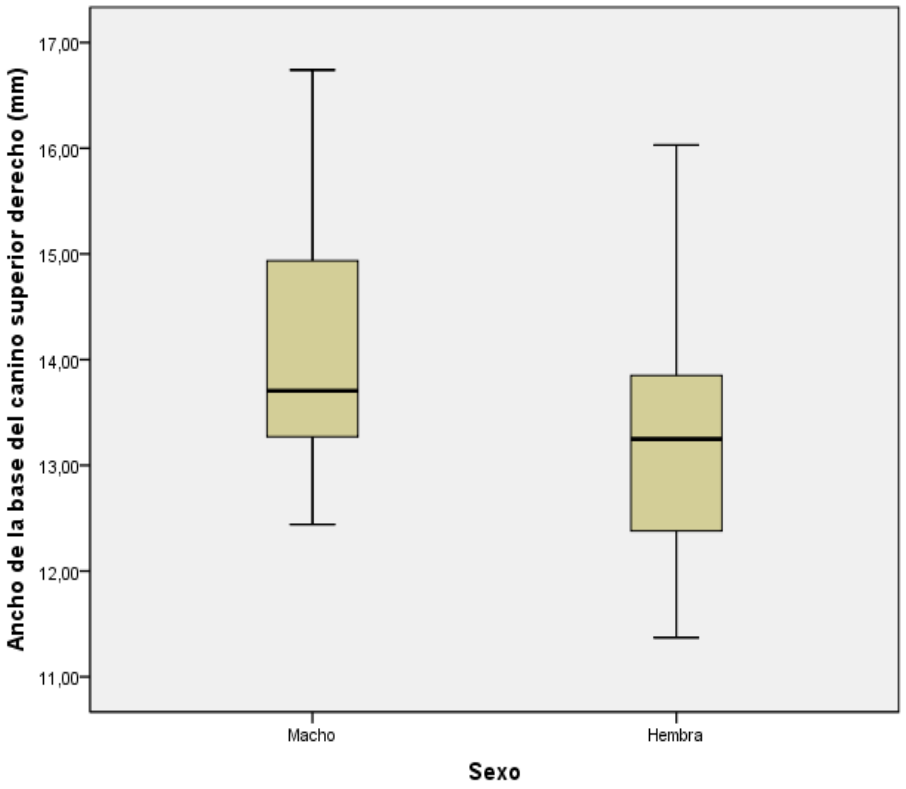
Apéndice III.III Diagrama de cajas en el que se representa la distribución (edad) de los ejemplares en base a la técnica de apreciación visual en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa la relación entre la distribución de los ejemplares (edad) en base al corte histológico y el sexo.



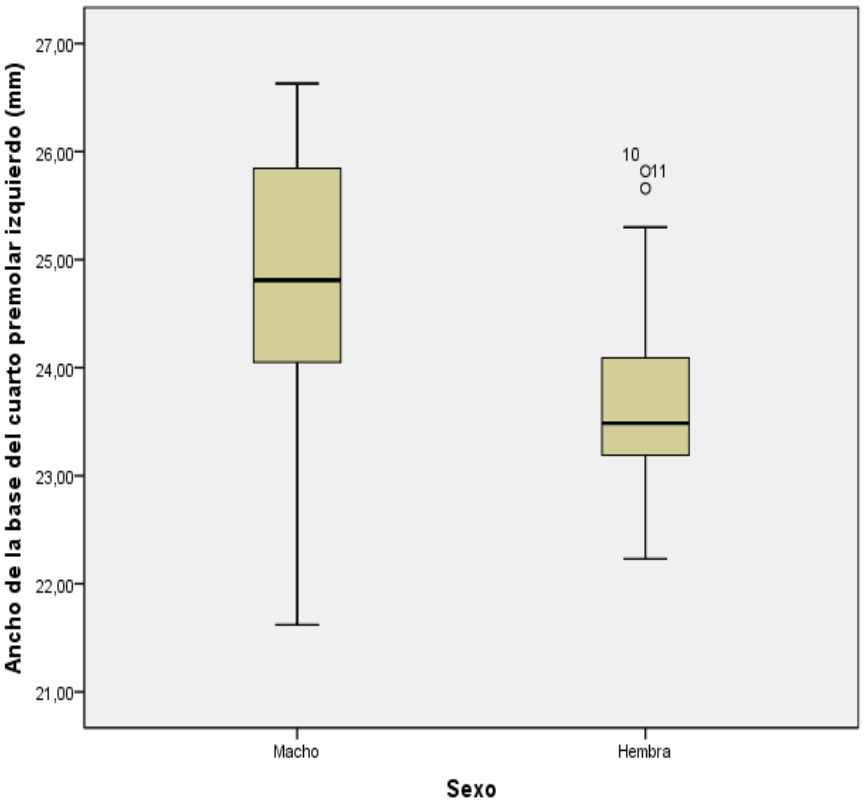


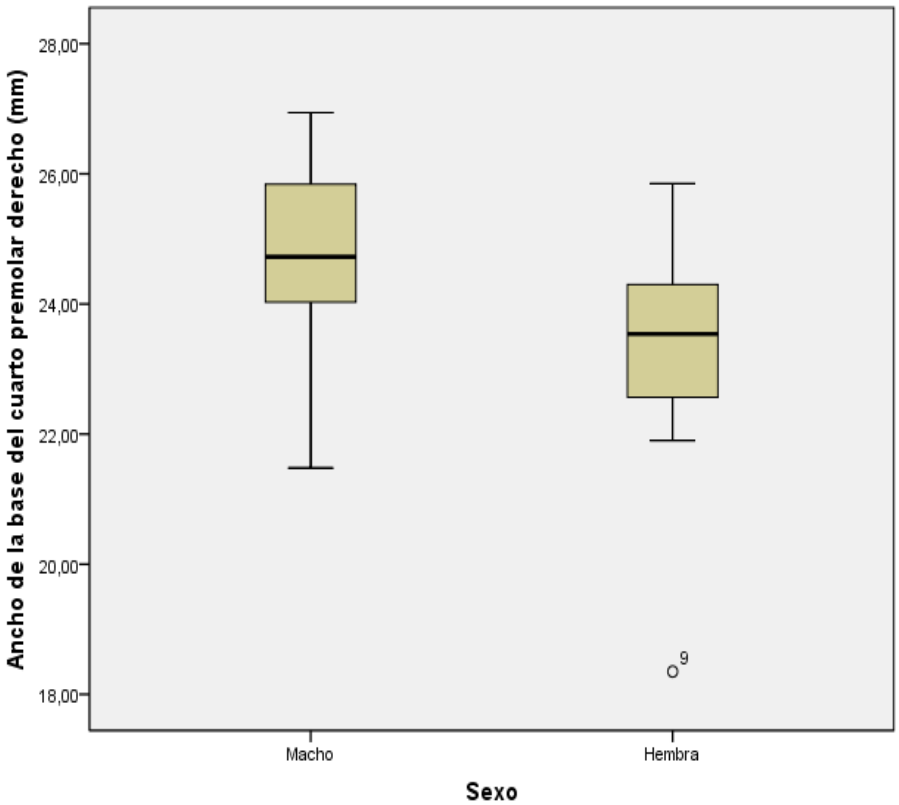
Apéndice III.IV. Diagrama de cajas en el que se representa la longitud total del canino superior izqierdo (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del canino superior izquierdo (mm) en relación al sexo de los ejemplares.



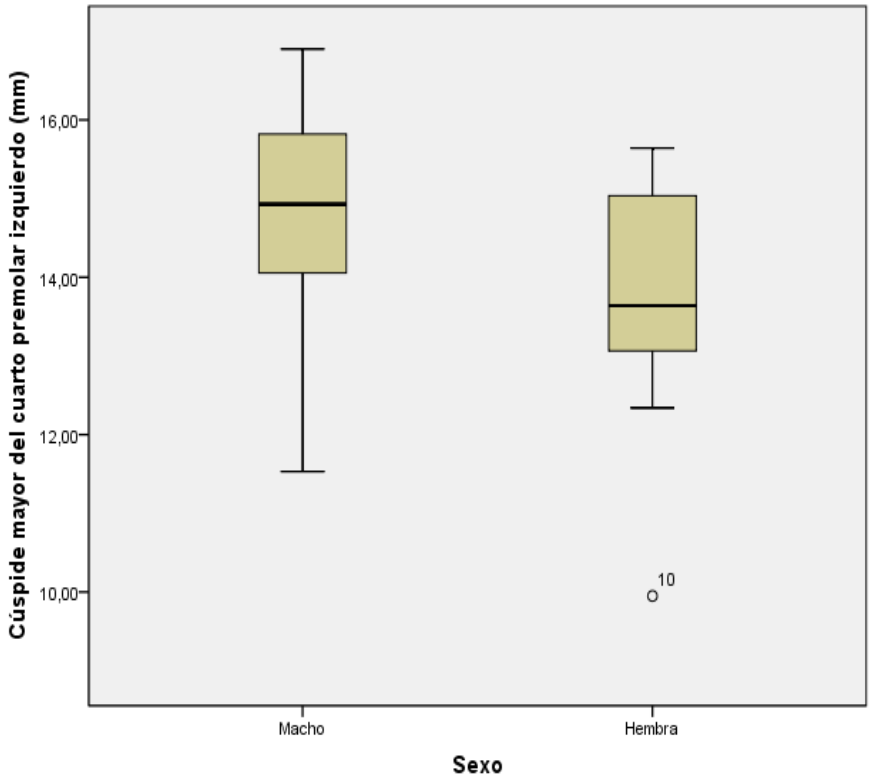


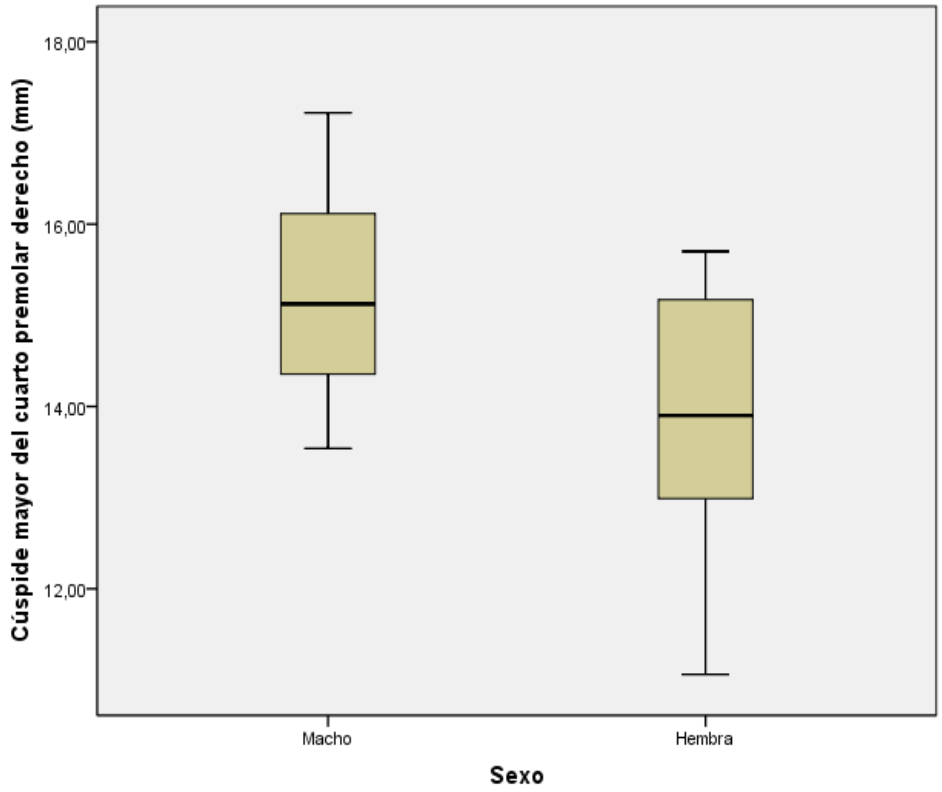
Apéndice III.V. Diagrama de cajas en el que se representa la longitud total del canino superior derecho (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del canino superior derecho (mm) en relación al sexo de los ejemplares.



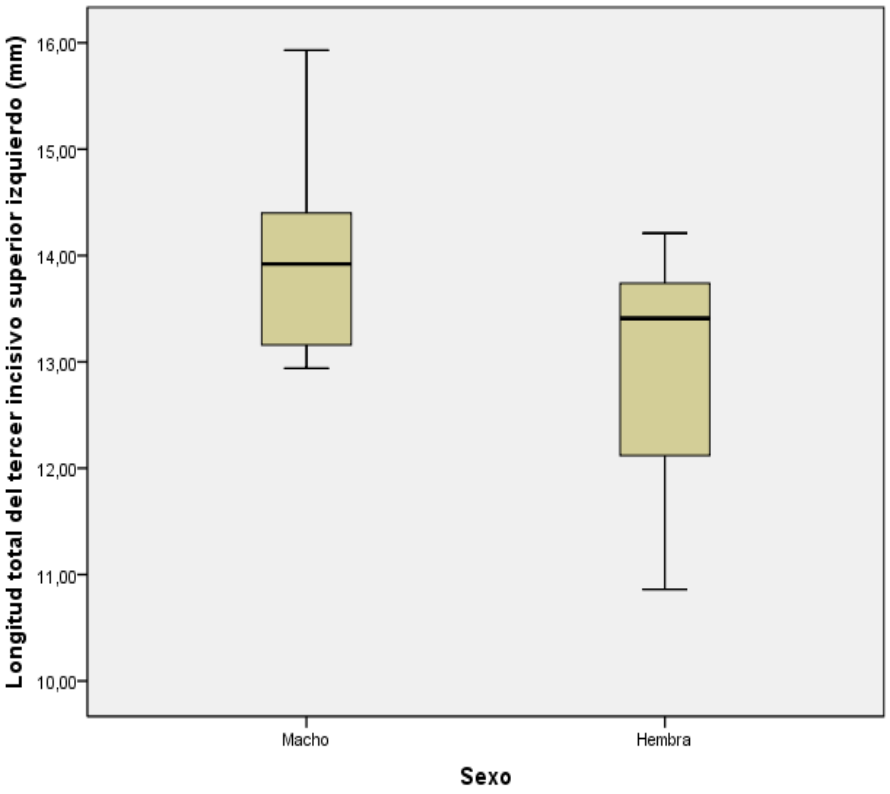


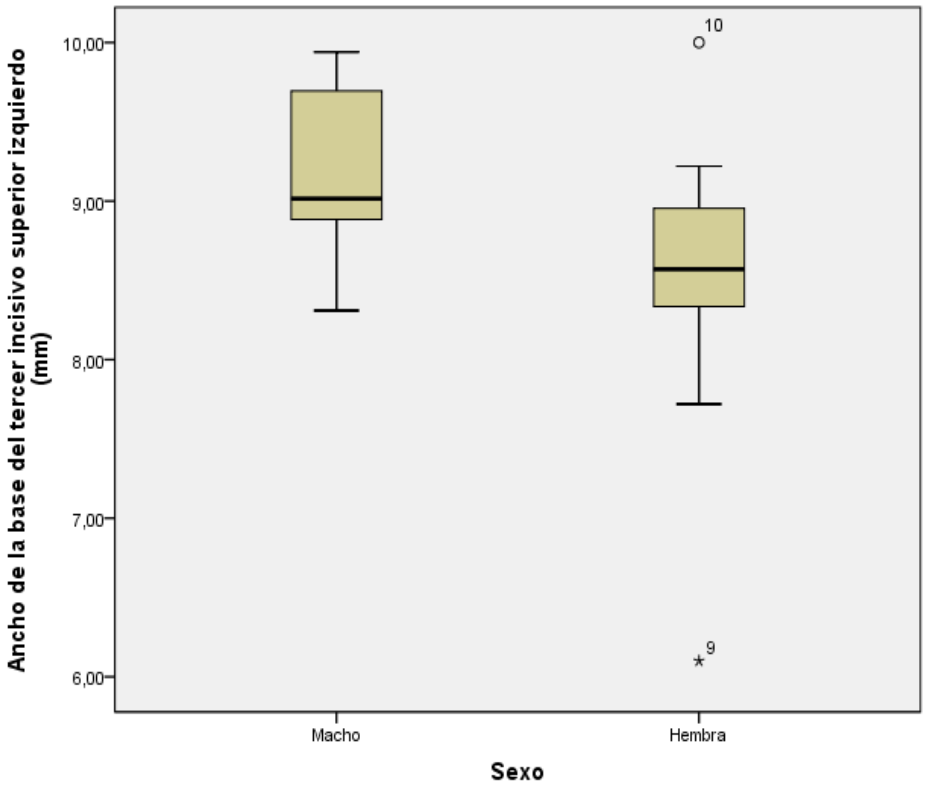
Apéndice III.VI. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del cuarto premolar izquierdo (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del cuarto premolar derecho (mm) en relación al sexo de los ejemplares.



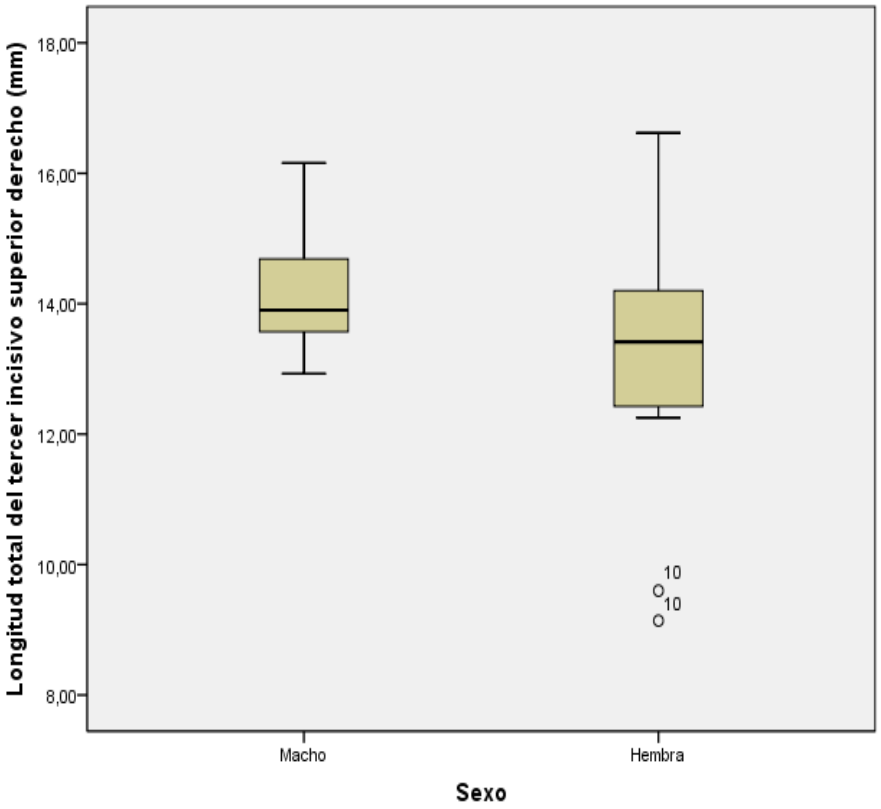


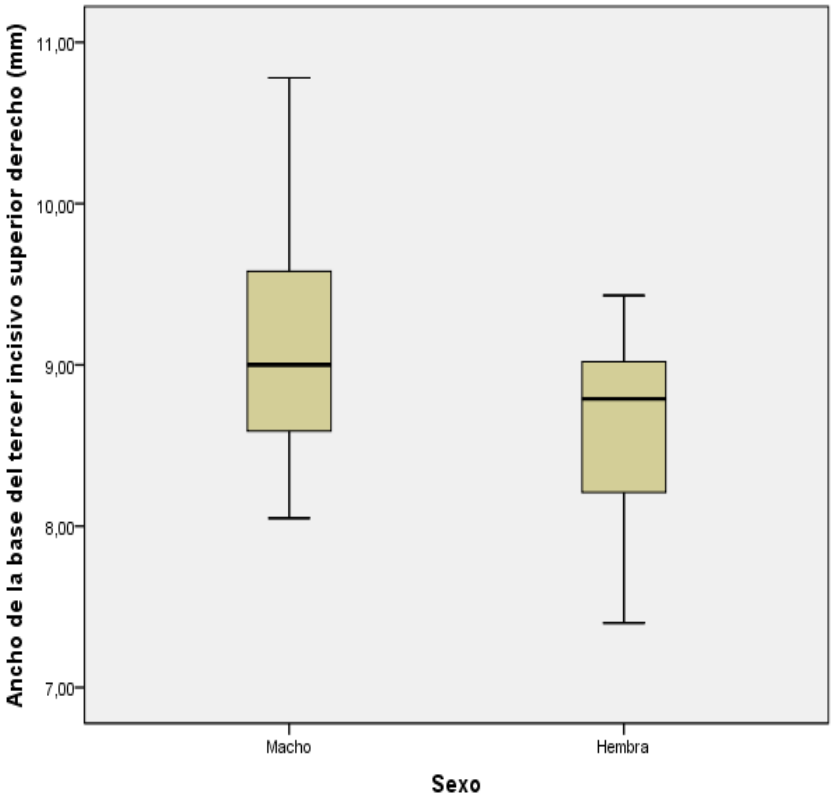
Apéndice III.VII. Diagrama de cajas en el que se representa la cúspide mayor del cuarto premolar izquierdo (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa la cúspide mayor del cuarto premolar derecho (mm) en relación al sexo de los ejemplares.



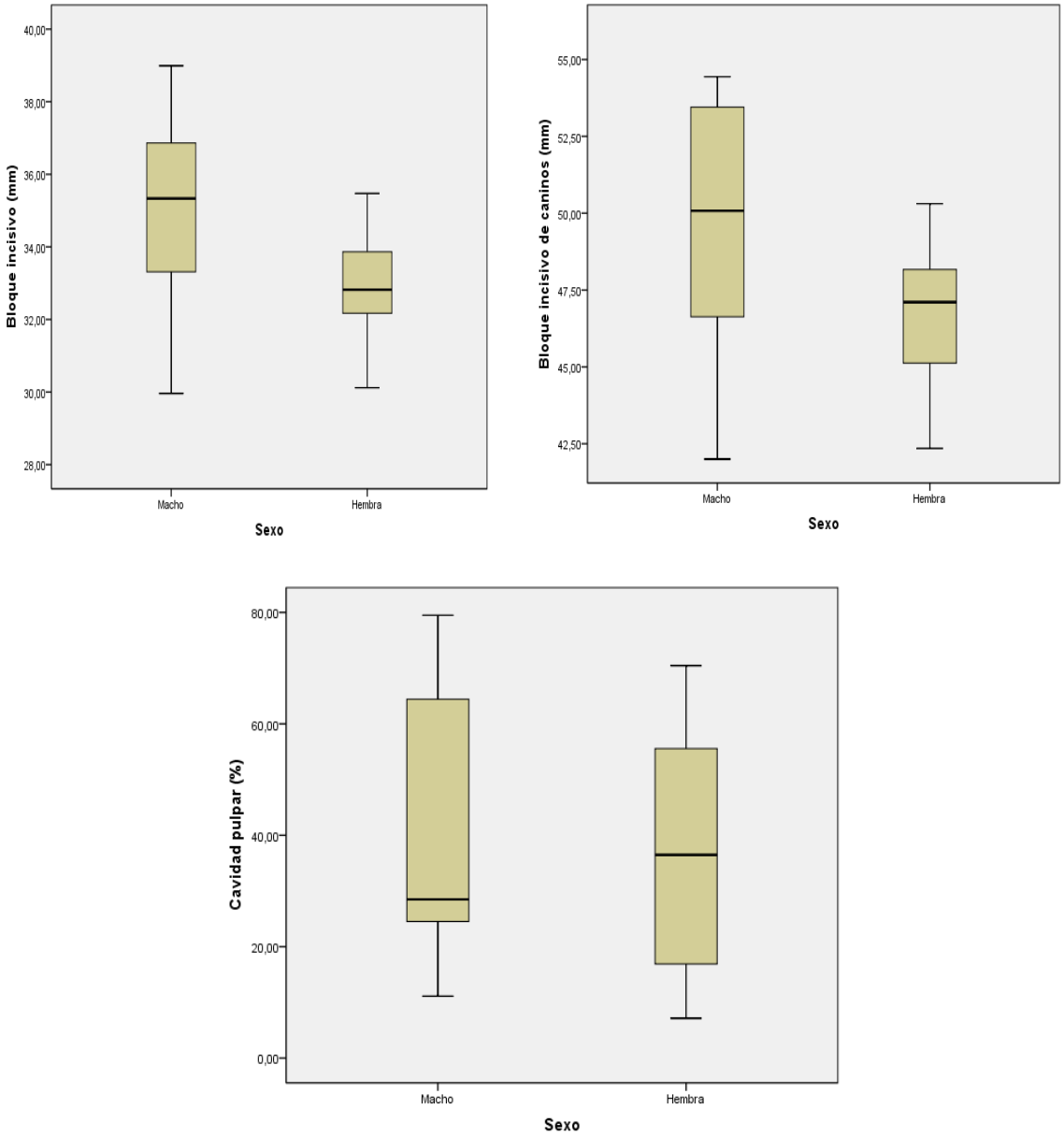


Apéndice III.VIII. Diagrama de cajas en el que se representa la longitud total del tercer incisivo superior izquierdo (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del tercer incisivo superior izquierdo (mm) en relación al sexo de los ejemplares.

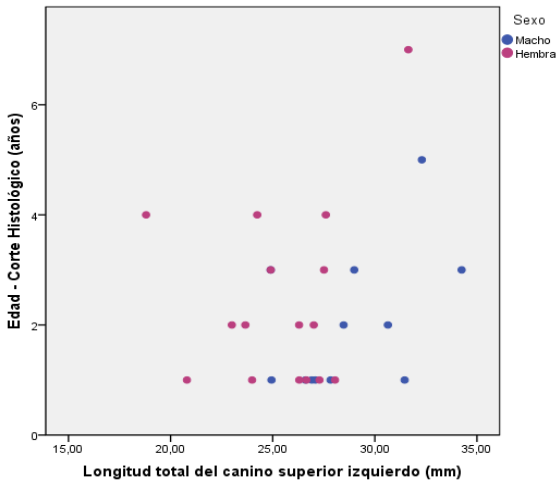


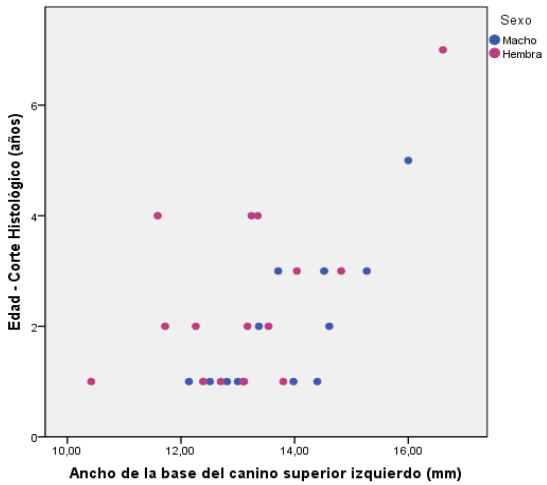


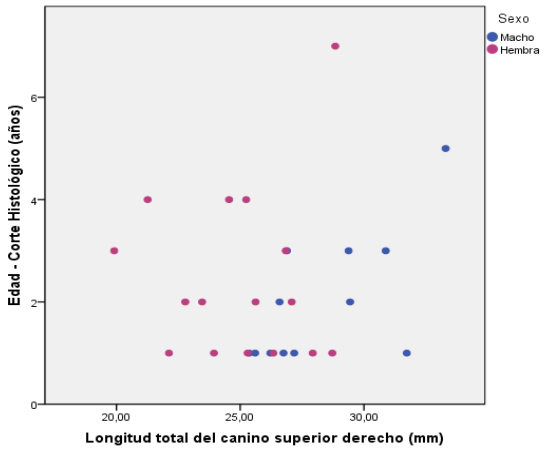
Apéndice III.IX. Diagrama de cajas en el que se representa la longitud total del tercer incisivo superior derecho (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el ancho de la base del tercer incisivo superior derecho (mm) en relación al sexo de los ejemplares.

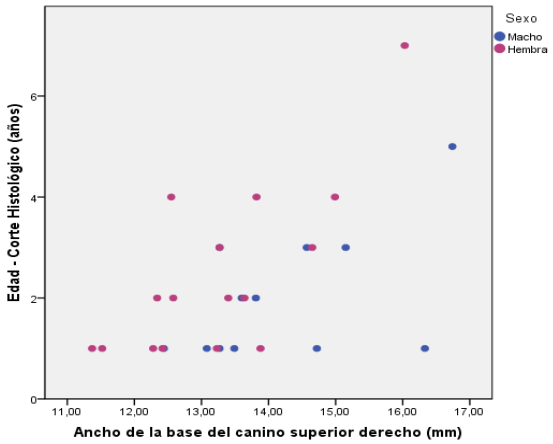


Apéndice III.X. Diagrama de cajas en el que se representa el bloque incisivo (mm) en relación al sexo. Diagrama de cajas en el que se representa el bloque incisivo de caninos (mm) en relación al sexo de los ejemplares. Diagrama de cajas en el que se representa la cavidad pulpar (%) en relación al sexo de los ejemplares

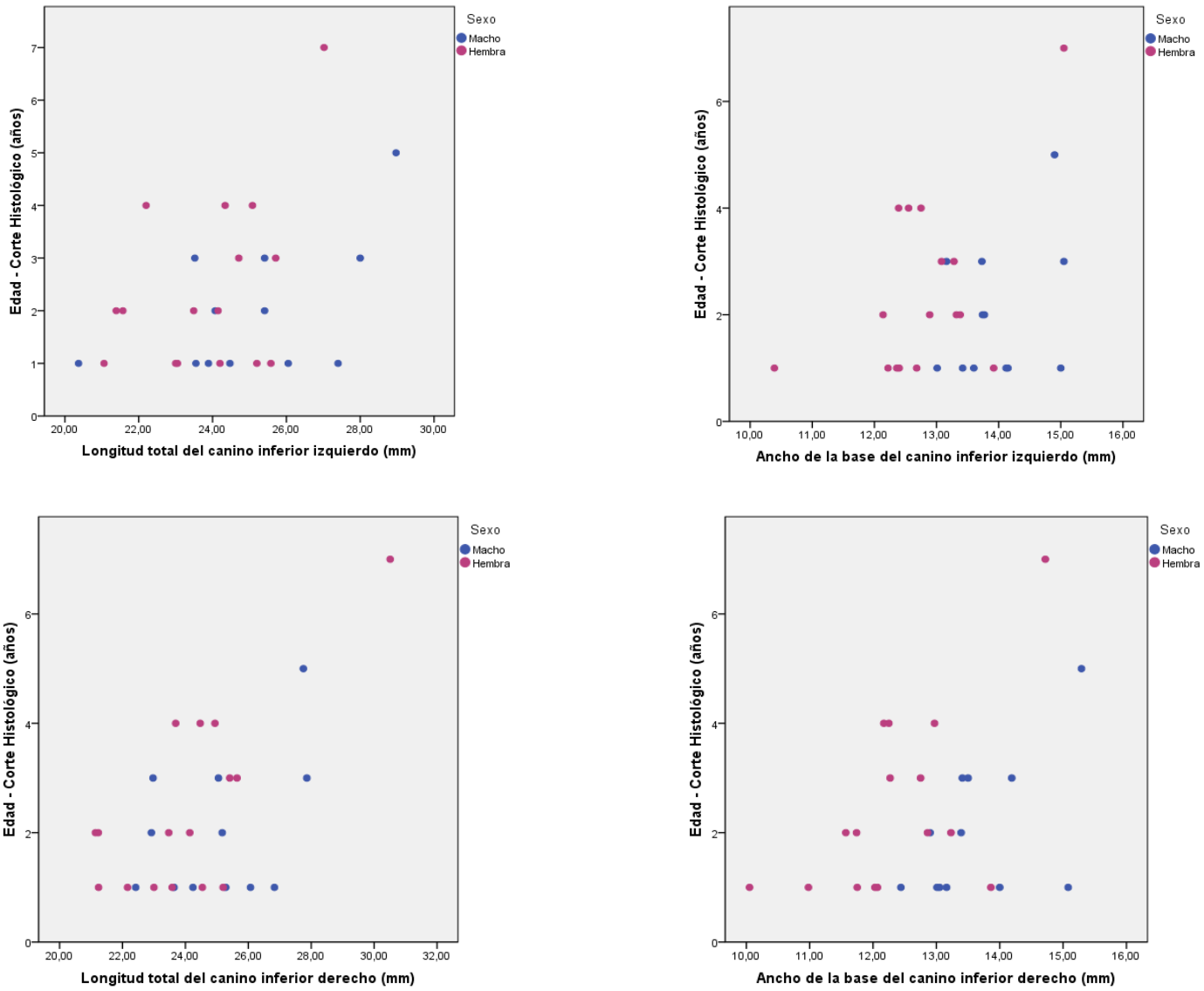




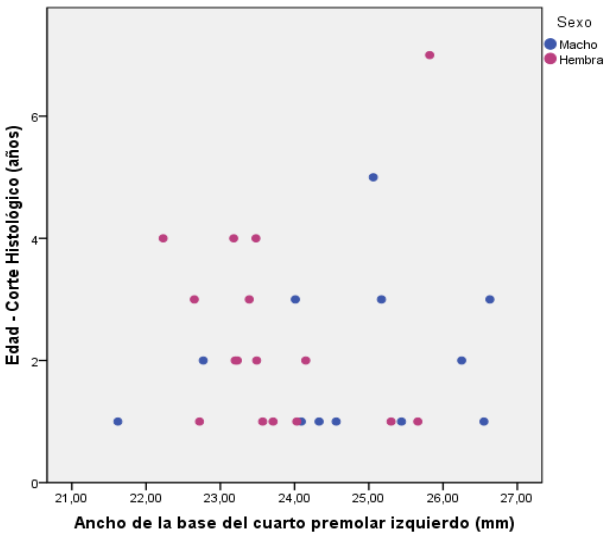


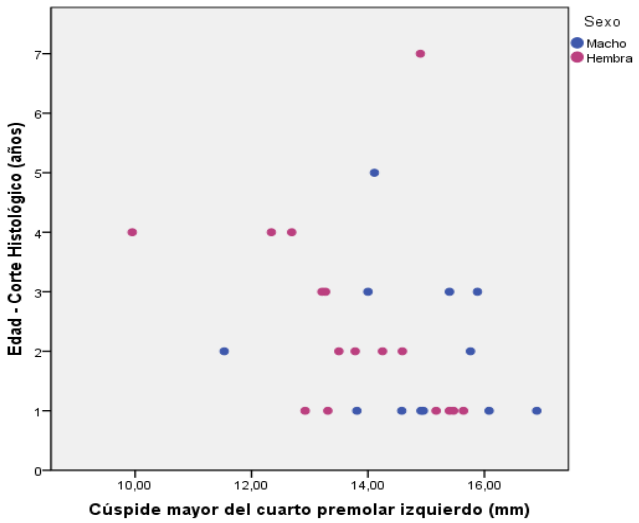


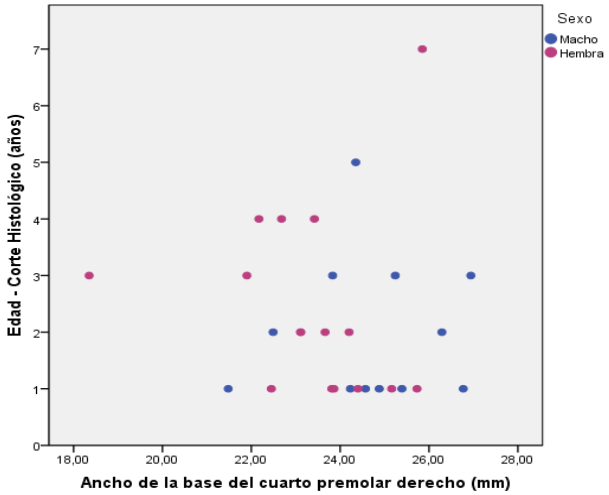
Apéndice III.XII. Correlación corte histológico vs variables derivadas de técnicas de medición con calibre.

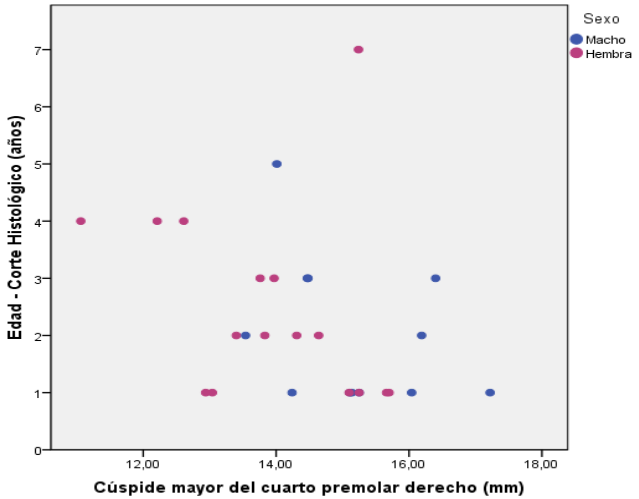


Apéndice III.XII. Correlación corte histológico vs variables derivadas de técnicas de medición con calibre.

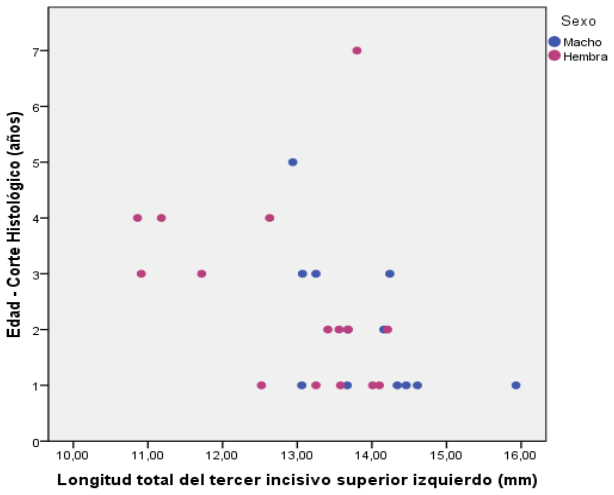


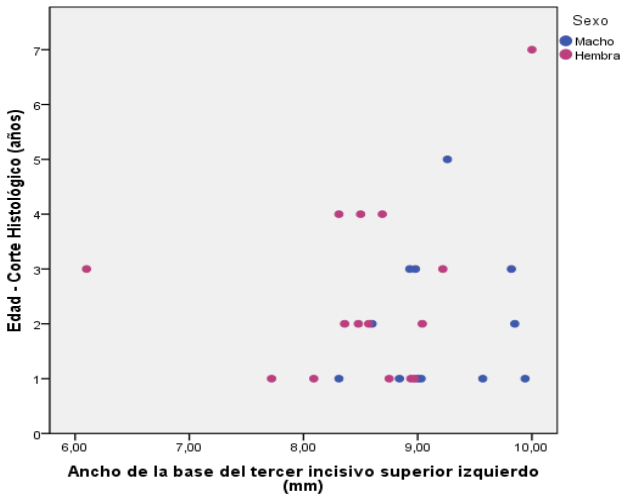


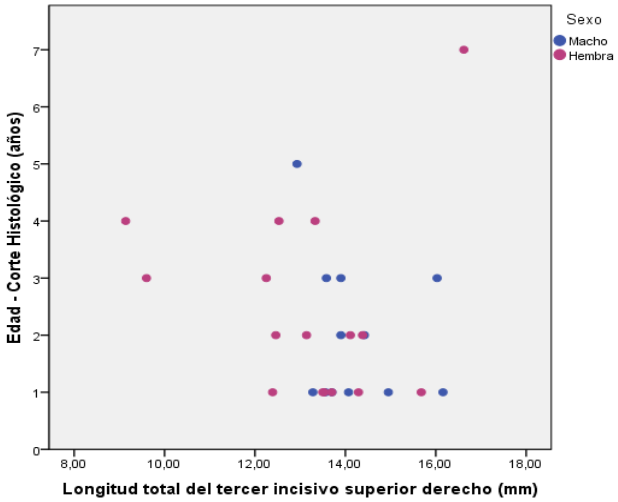


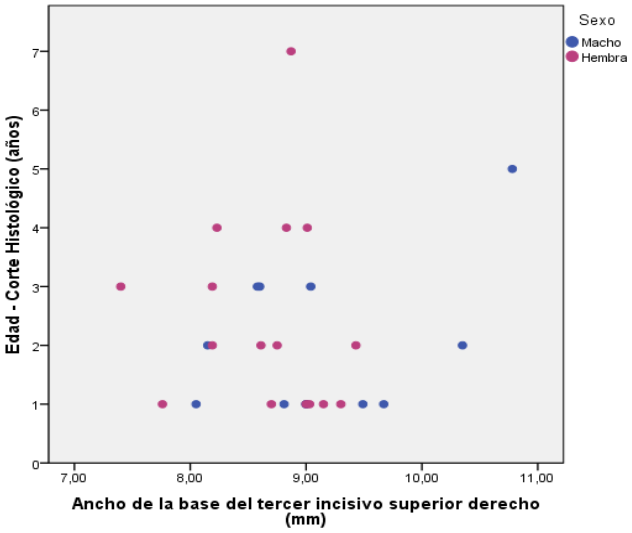


Apéndice III.XIII. Correlación corte histológico vs variables derivadas de técnicas de medición con calibre.









Apéndice III.XIV. Correlación corte histológico vs variables derivadas de técnicas de medición con calibre.