

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Contribución a la determinación de la etiología de la
fibropapilomatosis de la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) que
anida en el Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional**

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Laura Sofía Brenes Chaves

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2006

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Jorge Quirós
Decano

Dr. Carlos Jiménez
Director y tutor

Dr. Carlos Mario Orrego
Cotutor

Dr. Alexis Berrocal
Lector

Dra. Ana Meneses
Lectora

Fecha: _____

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios por permitirme llegar hasta donde estoy y terminar mi carrera con éxito. A mi mamá que siempre ha estado conmigo y me ha apoyado en las buenas y en las malas a través de toda mi vida. A mi papá y tía por siempre inculcarme el deseo de ser la mejor en lo que hago. A mi hermano Max por el apoyo, confianza y protección que siempre me ha dado a pesar de la distancia. A mi hermano Federico porque a pesar de que la vida nos separó tan temprano y hoy no puede compartir conmigo este momento de alegría, siempre va a estar en mi corazón. Finalmente a mi novio Daniel por apoyarme en todo momento, gracias por estar allí cuando te necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres por toda la ayuda incondicional que me brindaron a través de la realización de este trabajo.

A mi tutor Carlos Jiménez por toda la ayuda, orientación y paciencia brindada a través de mi trabajo, gracias por la confianza que depositó en mí para llevar a cabo la investigación.

A mi cotutor Carlos Mario Orrego por su ayuda y confianza para la realización de esta investigación. Así mismo al Ministerio del Ambiente y Energía (MINAE), al Área de Conservación Tempisque (ACT), al SINAC y al Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional.

A mis lectores Alexis Berrocal y Ana Meneses por sus horas de entrega y dedicación en el análisis de las muestras y del trabajo.

A Laura Alvarado, Rocío Cortez, Jorge Prendas, Gabriela Azofeifa, Olman Mesén y Laura Bouza por su ayuda desinteresada en el procesamiento de las muestras. Además a Juan José Romero por su ayuda en el análisis estadístico.

A Wagner Quirós y la institución International Student Volunteer (ISV) por la ayuda brindada tanto económicamente como en la práctica de campo de recolección de las muestras. A todos los voluntarios de ISV porque sin ellos no hubiera podido recolectar todas las muestras de la investigación.

A Intervet de Holanda por la colaboración económica brindada para el procesamiento de muestras en los laboratorios.

A los doctores Larry Herbst y Alonso Aguirre por facilitarme artículos muy importantes para el desarrollo del presente trabajo.

A mi novio Daniel por su ayuda, apoyo, tiempo y comprensión en la realización de este trabajo.

A mis amigas por siempre estar allí cuando las necesitaba y apoyarme hasta el fin.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
2. METODOLOGIA: MATERIALES Y METODOS.....	5
2.1. Lugar y animales de estudio.....	5
2.2. Examen físico.....	5
2.3. Patología e histopatología.....	5
2.4. Detección del genoma viral.....	6
2.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	6
2.4.1.1. Extracción de ADN del tejido por medio del Kitt de PROMEGA.....	6
2.4.1.2. Protocolo de PCR para virus Herpes de tortuga verde.....	7
2.4.1.3. Protocolo de PCR para papilomavirus humano.....	8
2.4.1.4. Protocolo de PCR para retrovirus de tuatara.....	10
2.5. Análisis de Sangre.....	11
2.6. Marcaje.....	11
3. RESULTADOS.....	13
3.1. Animales y Examen físico.....	13
3.2. Patología.....	13
3.2.1. Apariencia macroscópica.....	13
3.2.2. Histopatología.....	16
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	18
3.4. Análisis de Sangre.....	19
4. DISCUSION.....	22
5. CONCLUSIONES.....	29
6. RECOMENDACIONES.....	31
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32
6. ANEXOS.....	35

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Preparación de la mezcla para el PCR del virus de la tortuga verde.....	8
Cuadro 2.	Preparación de la mezcla para el PCR de papilomavirus humano.....	9
Cuadro 3.	Preparación de la mezcla para el PCR de retrovirus de tuatara.....	10
Cuadro 4.	Distribución, número, promedio, desviación estándar y rango del diámetro de los tumores.....	14
Cuadro 5.	Cambios histopatológicos de la epidermis observados en 26 tortugas lora con Fibropapiloma anidando en Ostional, Costa Rica.....	17
Cuadro 6.	Cambios histopatológicos de la dermis y subcutis observado en 26 tortugas lora con Fibropapiloma anidando en Ostional, Costa Rica.....	18
Cuadro 7.	Determinación de los genomas virales presentes en ambos grupos de tortugas.....	18
Cuadro 8.	Valores y estadística descriptiva del hemograma de la tortuga lora con tumor.....	19
Cuadro 9.	Valores y estadística descriptiva del hemograma de la tortuga lora control.....	20
Cuadro 10.	Estadística inferencial (Prueba T de Student) en valores sanguíneos de ambos grupos de tortugas.....	21
Cuadro 11.	Determinación de los virus presentes en las tortugas con tumor.....	35
Cuadro 12.	Determinación de los virus presentes en las tortugas control.....	36
Cuadro 13.	Hemograma de las tortugas con tumor.....	37
Cuadro 14.	Química sanguínea de las tortugas con tumor.....	38
Cuadro 15.	Hemograma de las tortugas control.....	39
Cuadro 16.	Química sanguínea de las tortugas control.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fibropapiloma en cuello de tortuga lora.....	15
Figura 2. Fibropapiloma en región axilar izquierda de tortuga lora.....	16

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
Alb: albúmina
ALT: alamina amino transferasa
ARN: ácido ribonucleico
AST: aspartato amino transferasa
bp: pares de bases
C : grados centígrados
Ca: calcio
CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
CITES: Convención del Tratado Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna Silvestre
cm: centímetro
Comp leuc: cómputo de leucocitos
Cret: creatinina
DE: desviación estándar
DEPC:
Eos: eosinófilo
FAP59: primer de papilomavirus 59
FAP64: primer de papilomavirus 64
FHV: primer de herpes F
g/dl: gramos por decilitros
Glob: globulinas
Glu: glucosa
Hb: hemoglobina
HE: Hematoxilina y Eosina
Het: heterófilos
HPV: papilomavirus
Hto: hematocrito
HV: herpesvirus
ID: identificación
L1: gen de papilomavirus
Linf: linfocitos
Max: máximo
mg/dl: miligramos por decilitro
min: minutos
Min: mínimo
MINAE: Ministerio del Ambiente y Energía
ml: mililitros
mm: milímetros
Mon: monocitos

n: número
ND: no hay datos
Nit U: nitrógeno uréico
P: fósforo
PAS: reacción periódica ácido Shiff
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH:
Pt: proteínas totales
RA/G: relación albúmina globulina
RET: primer de retrovirus
RHV: primer de herpes R
seg: segundos
TE: (buffer)
U: urea
U/L: unidades por litro
ug: microgramos
ul: microlitros
uM: micromol
UNA: Universidad Nacional
V: voltios

RESUMEN

La fibropapilomatosis en la tortuga marina es una enfermedad caracterizada por múltiples papilomas, fibromas y fibropapilomas cutáneos, así como ocasionales fibromas viscerales. En el presente trabajo se realizó una investigación en 26 tortugas lora (*Lepidochelys olivacea*) con fibropapilomas cutáneos y 24 tortugas lora sanas que sirvieron de control, en el Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional. Se tomaron biopsias excisionales de los tumores cutáneos de las tortugas enfermas y biopsias de piel de las tortugas control, además se recolectó muestras de sangre a todas las tortugas. Las muestras tumorales y de piel se analizaron microscópicamente para diferenciar los factores histológicos que resultan de la patogénesis de la enfermedad. También se realizó PCR a las muestras para determinar la presencia de genoma viral de tres posibles virus: herpesvirus, papilomavirus y retrovirus, en los tumores como posibles agentes etiológicos. A las muestras de sangre se les hizo análisis hematológico y de química sanguínea para comparar los resultados entre tortugas sanas y enfermas. Entre los hallazgos histopatológicos se determinó que los fibropapilomas de la tortuga lora eran similares a los muy estudiados fibropapilomas de las tortugas verdes y a su vez a los de otras especies de reptiles, aves y mamíferos. Con el estudio de PCR se pudo determinar que el genoma viral de mayor presencia en los tumores era el del virus herpes por lo que es discutible su presencia como posible agente etiológico.

ABSTRACT

Sea turtle fibropapillomatosis is a disease characterized by proliferation of cutaneous fibropapillomas and occasional visceral fibromas. In the present work a research was conducted on 26 olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) with cutaneous fibropapillomas and in 24 healthy olive ridley turtles, which served as control in the Ostional National Wildlife Refuge. Biopsies of the cutaneous tumors were taken in sick sea turtles, and skin biopsies in control ones, besides a blood sample were collected on every single turtle. The tumoural samples were microscopically analyzed in order to differentiate the histological factors resulting in the disease pathogenesis. A PCR technique was also run to the samples in order to determine the viral presence in the tumours as a possible etiologic agent. Blood chemistry and haematological analysis were applied to all of the blood samples to compare the results between healthy and sick turtles. Among the histopathologic analysis it was determined that the fibropapillomas in olive ridley turtle were similar to those studied in the green sea turtle (*Chelonia mydas*), and also similar with other species of reptiles, birds and mammals. With PCR analysis it was determined that the herpes virus was the most common found in tumors as the possible etiologic agent

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La fibropapilomatosis es una enfermedad descrita principalmente en las tortugas verdes (*Chelonia mydas*), cuyos primeros reportes oficiales se dieron hace más de 50 años. Siendo descrita por primera vez por Smith y Coates en 1938 en el Acuario de Nueva York, en una tortuga verde, capturada cerca de Key West, Florida. Subsecuentemente Smith y Coates observaron la fibropapilomatosis en 3 de 200 tortugas verdes de vida libre, capturadas fuera de Key West (Smith y Coates, 1938). El mismo año, Lucke describió tumores similares en tortugas verdes capturadas en Cabo Sable, Florida (Lucke, 1938). En 1958 se dio el primer reporte oficial del tumor en tortugas verdes en Hawaii, en una tortuga juvenil capturada en Kaneohe Bay, Oahu (Jacobson et al., 1989). Un estudio local llevado a cabo por pescadores de la zona y el investigador G. Balasz sugirieron que la fibropapilomatosis en las tortugas verdes no existía previo a dicho reporte (Jacobson et al., 1989). Después de esto, dicha enfermedad se ha venido reportando con un incremento de frecuencia en Hawaii (Herbst, 1994). En 1980, ocurrió una epidemia de fibropapilomatosis en un grupo de tortugas verdes adultas en una Granja de Tortugas en Gran Caimán y las Indias Británicas del Este (Herbst, 1994). En 1982, Ehrhart, Sindler y Witherington documentaron el primer caso de fibropapilomatosis en el Lago de Río India, Florida (Herbst, 1994).

Lesiones similares a la fibropapilomatosis se han observado en trabajos de campo en la tortuga cabezona (*Caretta caretta*), de la Florida y Australia; en la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*), en la costa pacífica de Costa Rica y en la tortuga kikila (*Natator depressus*) en Australia (Herbst, 1994).

En Costa Rica el primer reporte confirmado de fibropapilomatosis se dio en una tortuga lora en el Refugio de Vida Silvestre de Ostional en 1987, donde la tortuga mostró signos de una avanzada enfermedad con tumores de 30 mm de diámetro (Orrego y Morales, 2002). Después de este reporte se ha dado un incremento en el número de observaciones de tortugas con tumores y un aumento en el tamaño de los tumores (Orrego y Morales, 2002; Orrego y Work, 2004). En 1992 el problema se hizo más evidente y se notó que tanto el número de tumores como el diámetro de los mismos han incrementado exponencialmente en las tortugas. Entre 1991 y 1993, el promedio de tamaño del tumor era de 10 mm de diámetro con un promedio de 3 lesiones por tortuga. En 1997, el tamaño promedio de los tumores era de 25 mm de diámetro, donde el más grande llegó a ser de 140 mm de diámetro y el número de tumores por tortuga fue superior a 20. Muchas de las lesiones observadas se encontraban en cuello y alrededor de los ojos y boca, pero también se ha dado un aumento en el número de tumores que aparecen en las márgenes del caparazón dorsal y entre los escudos (Chaves et al., 2000).

Un estudio exhaustivo en la tortuga lora fue realizado en Ostional entre julio y setiembre de 1997. Durante este tiempo se colectaron 50 biopsias tumorales de los 25 animales más afectados, además, el control se obtuvo de 6 biopsias obtenidas en 5 tortugas que no presentaban masas visibles. Las masas macroscópicamente eran de 25 mm de diámetro, con una coloración blanco-grisáceo, de suaves a verrugosas, que emergían de la piel del cuello y aletas. Histológicamente 42 de las 50 muestras, fueron clasificadas como fibropapilomas y 8 fueron clasificados como una dermatitis activa crónica y no tumores. Veinte de los 42 fibropapilomas estaban en estado de regresión y 9 de los 22 restantes tumores tenían cambios histológicos que sugerían una degeneración temprana dentro del tumor (Aguirre et al., 1999). De dichas observaciones se calculó que aproximadamente 10% de las tortugas que anidaban allí estaban afectadas, donde un 1% lo estaban severamente. Tomando en cuenta que el número de tortugas que anidan en Ostional durante los meses de la época lluviosa, entre mayo y octubre, era superior a las 300 000; se podría pensar que el número de tortugas afectadas en Ostional es de 30 000, por lo que es un número importante (Chaves et al., 2000).

La fibropapilomatosis actualmente es una enfermedad distribuida mundialmente, con un rango de prevalencia de 0% a 92% en algunas áreas. Las áreas de mayor prevalencia son las aguas poco profundas cerca de la orilla del mar y en muchos casos (pero no todos), los hábitats marinos están cerca de áreas de uso humano. Las edades más afectadas son las juveniles, subadultos y adultos, no se ha documentado en neonatos o infantes. Todavía permanece desconocida su etiología, aunque se ha identificado una estructura similar a un herpes virus en tortugas libres (Balasz y Jacobson, 1991) y en tortugas verdes de cautiverio (Herbst y Klein, 1995; Herbst et al., 1999). Entre los principales signos clínicos se encuentran; múltiples tumores fibroepiteliales cutáneos benignos, que se pueden encontrar en cualquier sitio que incluya partes de tejido blando y duro (Jacobson et al., 1989). También son comunes los tumores en las regiones orbitales y periorbitales (Brooks et al., 1994), los cuales pueden llegar a ocluir totalmente el ojo y llevar a la ceguera de la tortuga, lo cual dificulta su obtención de alimento. Además se han visto tumores en la cavidad oral de ciertas poblaciones de tortugas verdes en Hawaii, dichos tumores pueden dificultar la alimentación de la tortuga y hasta la respiración, dado el hecho de que pueden crecer tanto que obstruyan el paso de comida y aire. Las tortugas afectadas con el tumor van a presentar emaciación, debilidad, depresión y anemia. Dada la naturaleza de la patología se caracteriza por metástasis con múltiples tumores de consistencia fibrosa que se han observado en sitios como pulmón, hígado, riñón y tracto gastrointestinal, produciendo problemas de flotación, obstrucción intestinal, falla renal y necrosis por compresión de los tejidos afectados (Herbst, 1994; Herbst et al., 2001). Microscópicamente se observan múltiples áreas de ligera a leve hiperplasia epidérmica, soportada por una gran cantidad de tejido fibrovascular (Jacobson et al., 1989). Parece que hay una progresión de una forma proliferativa en los tumores tempranos a aquellos que son primariamente fibrosos que tienen una menor superficie verrugosa, con una mínima a moderada cantidad de pliegues y un mayor componente dérmico. En algunos casos se han observado pequeños huevos de tremátodos espiróquidos en la dermis de los fibropapilomas (Aguirre, 1998), los cuales por un tiempo se consideraron como posibles agentes etiológicos de la enfermedad, pero estudios realizados posteriormente no pudieron demostrarlo (Herbst et al., 1998). En lo que se interpreta son las lesiones tempranas, se han visto cambios vacuolares de las células epidérmicas en el estrato basal. En los tumores más avanzados se han

encontrado áreas focales de degeneración globosa de las células epidérmicas junto con las inclusiones intranucleares (Herbst, 1994; Coberly et al., 2002). En cuanto a la ruta exacta de transmisión en vida libre es desconocida, experimentalmente, se puede transmitir por escarificación de la piel o inyecciones cutáneas (Herbst et al., 1995). Se puede evitar la transmisión iatrogénica de tortuga a tortuga a través de manejo y uso adecuado de instrumentos contaminados como agujas o marcadores de tortugas, usar guantes individuales y desinfectar los instrumentos y equipo a utilizar entre cada tortuga. Cuando sea posible manejar primero las tortugas sanas antes de las enfermas. Además prohibir la liberación de tortugas afectadas en lugares declarados limpios de la enfermedad. El diagnóstico de la enfermedad se basa en realizar biopsias que se observan en microscopio de luz con la tinción de hematoxilina y eosina, demostrando las características principales del tumor. No hay una prueba diagnóstica que detecte la enfermedad subclínica o latente. Para el control, no hay un método de manejo de la enfermedad en las poblaciones de vida libre. Se pueden tratar las tortugas afectadas individualmente por medio de cirugía pero esto es poco práctico a manera de control de la enfermedad (Herbst, 1994).

1.2 Justificación

1.2.1 Importancia

La causa de la fibropapilomatosis todavía permanece desconocida, a pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado en busca de su etiología. Hay muchas razones para encontrar la o las posibles causas de la enfermedad. Entre ellas se pueden mencionar: procurar el bienestar y supervivencia de especies protegidas por la Convención del Tratado Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna Silvestre (CITES), como son la tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga cabezona (*Caretta caretta*) y tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). También importante es el análisis de posibles efectos negativos en la salud humana, ya que no se ha investigado en salud pública que efectos puede tener en el hombre el consumo de carne o huevos de una tortuga enferma. Por estos y otros motivos la naturaleza de la enfermedad y su origen deben determinarse para desarrollar un programa de manejo a corto y largo plazo, pues al establecerse medidas de control de la enfermedad, se puede disminuir la tasa de mortalidad y evitar su diseminación a otras tortugas marinas. En el presente estudio se determinó buscar la presencia de 3 genomas virales que son el herpesvirus, el papilomavirus y el retrovirus dado el hecho de que los 3 se relacionan con presencia de tumores tipo papiloma, fibromas y fibropapilomas en reptiles, aves y mamíferos (Jacobson et al., 1989; Herbst, 1994).

1.2.2 Hipótesis

Las lesiones descritas como fibropapilomatosis en la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) del Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional son de origen viral.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la etiología de la fibropapilomatosis de la Tortuga Lora que llega a anidar al Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la apariencia histopatológica del tumor.
2. Determinar la presencia del genoma de los siguientes virus: herpesvirus, papilomavirus y retrovirus, en el tumor por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
3. Determinar los parámetros hematológicos tanto de las tortugas sanas como de las tortugas enfermas.
4. Comparar los parámetros hematológicos de las tortugas lora del presente estudio con los parámetros de otra especie como lo es la tortuga verde.
5. Conformar una base de datos de la cantidad de animales que aparecieron con tumores, su diámetro, número y distribución por tortuga.

2. METODOLOGIA: METODOS Y MATERIALES

2.1. Lugar y animales de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó entre junio del 2004 y febrero del 2005, en el Refugio Nacional de Vida Silvestre de Ostional, perteneciente al Área de Conservación Tempisque, administrado por el Ministerio del Ambiente y Energía (MINAE) y ubicado en Santa Cruz, Guanacaste. La extensión de la playa es de 7 kilómetros 400 metros. Está dividida en tres zonas que a su vez se subdividen en 140 sectores delimitados con estacas de madera, cada 50 metros. El refugio se creó en 1983 como una categoría de Estatal por la Ley de Conservación de Vida Silvestre número 6919, por su importancia como hábitat de la tortuga lora. En este refugio la especie que llega a desovar en arribada a la playa y con la cual se trabajó es la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*), especie que está en peligro de extinción y cuyos sitios primordiales de arribada son algunas playas de México, Panamá, Nicaragua, India; Nancite y Ostional en Costa Rica. Ostional puede ser el sitio de mayor frecuencia y tamaño de arribadas en el mundo y además modelo de uso del recurso sostenible.

El trabajo de campo se realizó entre junio del 2004 y febrero del 2005. Para la identificación y escogencia de las tortugas enfermas y sanas se hicieron caminatas diurnas y nocturnas durante la época de arribada y caminatas solamente nocturnas durante la época de no arribada. Se recorrieron los 7 kilómetros de playa pero en los días de arribada el recorrido se realizó sólo en los 900 metros que constituyen la playa principal, pues la anidación mayor se da en esa extensión.

2.2. Exámen físico

Las tortugas incluidas en el estudio con y sin tumor, se les realizó primeramente un examen físico, el cual incluyó una serie de mediciones morfométricas-anatómicas (Eckert et al., 2000). Las medidas que se tomaron fueron las siguientes: largo curvo del caparazón (LCC), ancho curvo del caparazón (ACC), largo de la cola (LC) y ancho de la cabeza (AC) (Eckert et al., 2000; Wyneken, 2001). Además en las enfermas se determinó el número de tumores que presentaron, su distribución y el tamaño de los mismos para incluirlos en una base de datos que se confeccionó en el programa de Excel.

2.3. Patología e Histopatología

Para la colecta de los tumores se hicieron biopsias excisionales de uno o más tumores por tortuga dependiendo del caso y en las tortugas de control se tomó biopsias de piel de unos 2 cm de longitud del tejido y medio centímetro de grosor, en aletas, cuello o región axilar. Se utilizó como anestésico local (hidroclorato de lidocaina al 2%), desinfección quirúrgica con tres aplicaciones alternas de alcohol al 70% y yodo al 2% y se usó guantes y equipo quirúrgico estériles. Después de tomada la biopsia se procedió a colocar unos puntos en el área (Davidson et al., 1998). El tejido colectado se fijó en formalina al 10% (Eckert et al., 2000) y posteriormente las muestras se enviaron a analizar al laboratorio de Patología de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA). Los tejidos fueron embebidos en parafina por los métodos de rutina. Fueron seccionados en 5-6 micrómetros de grosor y teñidos con hematoxilina y eosina (HE), con azul de alciano (pH 2.5) y por la reacción periódica ácido Shiff (PAS).

2.4. Detección del genoma viral

El tejido colectado para la examinación viral se colocó en un vial estéril conteniendo medio de transporte de virus (medio de cultivo de células libres de suero con antibióticos y antifúngicos) (Eckert et al., 2000) y posteriormente fue enviado en hielo al laboratorio de Virología de la Escuela de Veterinaria de la UNA. Allí se mantuvo en un congelador a una temperatura de menos setenta grados centígrados, para preservar el o los posibles virus presentes en el tejido tumoral o en tejido de control.

2.4.1. Reacción en cadena de la Polimerasa

La Reacción en cadena de la Polimerasa se realizó para los siguientes virus: herpesvirus, papilomavirus y retrovirus.

2.4.1.1. Extracción de ADN del tejido por medio del kit PROMEGA (Wizard Genomic DNA Purification Kit)

Se tomó una muestra del tejido (ya sea del tumor o tejido de control) y se colocó en un mortero, agregando nitrógeno líquido y permitiendo que se evaporara. Seguido con el pistilo se trituró y maceró el tejido produciendo una destrucción mecánica. Se pesó un tubo de microcentrífuga (tubo eppendorf) y al mismo se le agregó de 100 a 200 mg del tejido macerado.

Posteriormente se agregó 600 microlitros de solución de lisis y se homogenizó por 10 segundos en el vortex. Se incubó a 65 grados centígrados por 30 minutos para producir la destrucción química. Seguidamente se adicionó 1.5 microlitros de solución ARNasa al lisado y se mezcló la muestra invirtiendo el tubo de 2-5 veces. Se incubó la mezcla por 15 minutos a

37 grados centígrados. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos antes de continuar.

A la muestra en temperatura ambiente, se le adicionó 200 microlitros de Solución de Precipitación de las Proteínas y se colocó en el vortex a una velocidad alta por 20 segundos. Después se enfrió en hielo por 10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 13000-16000 x g. El precipitado de proteína debía formar un pellet blancuzco. Cuidadosamente se removió el supernatante que contenía el ADN (dejando el pellet de proteína atrás) y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo que contenía 600 microlitros de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución gentilmente por inversión hasta observar unas especies de hebras blancas de ADN. Seguidamente se dejó el tubo toda la noche almacenado a menos 20 grados centígrados.

Al día siguiente se centrifugó por 10 minutos a 13000-16000 x g a temperatura ambiente. El ADN se observó como un pequeño pellet blanco. Cuidadosamente se decantó el supernatante. Se agregó 600 microlitros de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtió gentilmente el tubo varias veces para lavar el ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 13000-16000 x g a temperatura ambiente. Se aspiró cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no aspirar el ADN del pellet. Se invirtió el tubo en papel absorbente limpio y se dejó secar el pellet al aire por 30 minutos. Se agregó 100 microlitros de solución de rehidratación de ADN (Buffer TE) y se rehidrató el ADN incubándolo a 65 grados centígrados por una hora. Finalmente se almacenó el ADN a menos 20 grados centígrados, para posteriormente proceder a hacer el respectivo PCR.

2.4.1.2. Protocolo de PCR para virus Herpes de tortuga verde

2.4.1.2.1. Primers

Los primers fueron descritos por Lu et al., 2000 y correspondieron al marco de lectura de la polimerasa viral de herpesvirus de tortuga verde y el amplicón fue de 445 bp. La secuencia de los nucleótidos de los primers fue la siguiente:

Primer FHV (5' AGCATCATCCAGGCCCAATCT-3')

Primer RHV (5' CGGCCAGTCCGGCGCGTCGACCA-3')

2.4.1.2.2. PCR (Reactivos de Fermentas)

El protocolo del PCR fue adaptado del procedimiento descrito por Lu et al., 2000. Cada muestra (0.4 ug de ADN) fue tratada con 25 ul de mezcla de PCR preparada de la siguiente forma y empleando la 2X PCR Master Mix de Fermentas # K0179.

Cuadro 1. Preparación de la mezcla para el PCR de herpesvirus de tortuga verde.

COMPONENTE	VOLUMEN 25 UL
2X PCR Master Mix	12.5 ul
Primer FHV (0.1 uM)	1 ul
Primer RHV (0.1 uM)	1 ul
Templado de ADN	1.5 ul
Agua DEPC	9 ul

La amplificación se realizó en el termociclador bajo el programa también de Lu et al., 2000., que fue el siguiente:

94 °C	5 min	} 40 ciclos
94 °C	60 seg	
50 °C	60 seg	
72 °C	60 seg	
72 °C	7 min	} 1 ciclo (extensión final)
4 °C	hold	

2.4.1.2.3. Electroforesis

Se mezcló 5-10 ul de los amplicones con 2 ul de buffer de muestra y se aplicó a un gel de agarosa al 2% que contenía 0.5 ug/ml de bromuro de etidio en TBE buffer durante 30 min a 80 V. El producto del gen polimerasa HV (445 bp) se visualizó en un transiluminador ultravioleta junto a los marcadores (50-2000 bp, Sigma).

2.4.1.3. Protocolo de PCR para papilomavirus

2.4.1.3.1. Primers

Los primers fueron descritos por Forslund et al., 1999., y correspondieron al marco de lectura de L1 de papilomavirus humano y el amplicón fue de 478 bp. La secuencia de los nucleótidos de los primers fue la siguiente:

Primer FAP59 (5'TAACWGTIGGICAYCCWTATT3')

Primer FAP64 (5'CCWATATCWVHCATITCICCATC3')

2.4.1.3.2. PCR (Reactivos de Fermentas)

El protocolo del PCR fue adaptado del procedimiento descrito por Forslund et al., 1999. Cada muestra fue tratada con 25 ul de mezcla de PCR preparada de la siguiente forma y empleando la 2X PCR Master Mix de Fermentas #K0179.

Cuadro 2. Preparación de la mezcla para el PCR de papilomavirus humano.

COMPONENTE	VOLUMEN 25 UL
2xPCR Master-Mix	12.5
Primer FAP59 (0.75 uM)	1
Primer FAP64 (0.75 uM)	1
Templado de ADN	1.5
Agua DEPC	9

La amplificación se realizó en el termociclador bajo el programa también de Forslund et al., 1999., que fue el siguiente:

94 °C	5 min	} 40 ciclos
94 °C	60 seg	
50 °C	60 seg	
72 °C	60 seg	
72°C	5 minutos	} 1 ciclo (extensión final)
4 °C	hold	

2.4.1.3.3. Electroforesis

Se mezcló 5-10 ul de los amplicones con 2 ul de buffer de muestra y se aplicó a un gel de agarosa al 2% que contenía 0.5 ug/ml de bromuro de etidio en TBE buffer durante 30 min a 80 V. El producto del gen L1 de HPV (478 bp) se visualizó en un transluminador ultravioleta junto a los marcadores (50-2000bp, Sigma).

2.4.1.4 Protocolo de PCR para retrovirus

2.4.1.4.1. Primers

Los primers fueron descritos por Tristem et al., 1995 y correspondieron al marco de lectura de oligonucleótidos degenerados de tuatara, *Sphenodon sp*, los cuales fueron basados en los sitios activos de la proteasa retroviral y los genes de la transcriptasa reversa que produjeron un amplicón de 914 bp. La secuencia de nucleótidos de los primers fue la siguiente:

Primer RET-1 (5'CACCTATGCCCCCGGAGG3')

Primer RET-2 (5'GAGGATGTCTCGTCCGACGTA3')

2.4.1.4.2. PCR (Reactivos de Fermentas)

El protocolo del PCR fue adaptado del procedimiento descrito por Tristem et al., 1995. Cada muestra se trató con 25 ul de mezcla de PCR preparada de la siguiente forma y empleando la 2X PCR Master Mix de Fermentas #K0179.

Cuadro 3. Preparación de la mezcla para el PCR de retrovirus de tuatara.

COMPONENTE	VOLUMEN 25 UL
2xPCR Master-Mix	12.5
Primer RET-1	1
Primer RET-2	1
Templado de ADN	1.5
Agua DEPC	9

La amplificación se realizó en el termociclador bajo el programa también de Tristem et al., 1995., que fue el siguiente:

94 °C	5 min	} 35 ciclos
94 °C	30 seg	
45 °C	30 seg	
72 °C	60 seg	
72 °C	5 min	} 1 ciclo extensión final
4 °C	hold	

2.4.1.4.3. Electroforesis

Se mezcló 5-10 ul de los amplicones con 2 ul de buffer de muestra y se aplicó a un gel se agarosa al 2% que contenía 0.5 ug/ml de bromuro de etidio en TBE buffer durante 30 min a 80V. El producto del gen proteasa retroviral (914 bp) se visualizó en un transiluminador ultravioleta junto a los marcadores (50-2000 bp, Sigma).

2.5. Análisis de Sangre

Una muestra de sangre se tomó a todas las tortugas, la sangre fue obtenida del seno cervical dorsal. El seno se localiza a ambos lados de la línea media del cuello entre 1/3 y 1/2 de la distancia entre la parte posterior de la cabeza y el borde anterior del caparazón. Dependiendo del tamaño de la tortuga, el seno esta dentro de los 0.5 a 3 cm laterales de la línea media, se insertó la aguja verticalmente (90 grados con respecto al plano del cuello) en el cuello (Beynon y Cooper, 1999; Fudge, 2000). Se utilizaron jeringas de 5 ó 10 ml y la sangre entera se depositó en un tubo con heparina para análisis de hemograma completo y un tubo sin anticoagulante para la química sérica, en la cual se determinó: fósforo, calcio, Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), glucosa, urea, nitrógeno uréico, creatinina, proteínas totales, albúmina, globulina y relación albúmina-globulina (Eckert et al., 2000). Posteriormente la sangre fue enviada al laboratorio de Análisis Clínico de la Escuela de Veterinaria de la UNA a 4 °C.

2.6. Marcaje

Todas las tortugas del estudio fueron marcadas antes de liberarse al mar por dos razones, la primera para asegurarse de que no se le iba a volver a tomar una biopsia a una

misma tortuga y la segunda porque al estar dentro de una investigación científica si volvieran a aparecer se tendría un registro con los procedimientos realizados en la misma y podría determinarse la evolución o regresión de los tumores.

3. RESULTADOS

3.1. Animales y Examen físico

Se monitorearon 2054 tortugas lora de las cuales 26 tenían masas compatibles con el fibropapiloma y 24 tortugas sanas sirvieron como control. Las tortugas afectadas con los tumores presentaban una condición corporal que variaba de severamente delgada a ligeramente obesa. Todas eran hembras en etapa adulta que llegaron a anidar a la playa. Las medidas morfométricas anatómicas tuvieron el siguiente promedio: LCC, 68 ± 4.36 cm (rango, 57.5-78 cm); ACC, 72 ± 2.71 cm (rango, 67-77.5 cm); LC, 15 ± 1.76 cm (rango, 12-18 cm) y AC, 12 ± 1.16 cm (rango, 10-14 cm).

Las tortugas utilizadas como control eran de condición corporal entre ligeramente delgadas a ligeramente obesas, con aspecto saludable, sin cicatrices u otros defectos físicos como falta de aletas, anzuelos incrustados en boca o esófago u heridas de ningún tipo. Al igual que las tortugas con tumores todas las tortugas eran hembras, en etapa adulta que llegaron a anidar a la playa. Las medidas morfométricas anatómicas promedio fueron las siguientes: LCC, 66 ± 2.67 cm (rango, 61.5-72 cm); ACC, 70 ± 3.32 cm (rango, 61.5-76.5 cm); LC, 15 ± 2.06 cm (rango, 10-18 cm) y AC, 10 ± 1.12 cm (rango, 8-13 cm).

3.2. Patología

3.2.1. Apariencia macroscópica

De las 26 tortugas que presentaron el tumor, 6 tenían sólo un tumor en el cuerpo y 20 tortugas tuvieron más de 2 tumores hasta un máximo de 12 tumores en una misma tortuga.

Los sitios anatómicos en orden de mayor a menor frecuencia con tumores fueron: región axilar derecha (28 tumores), cuello (25 tumores), región axilar izquierda (22 tumores), margen dorsal del caparazón (7 tumores), cabeza (4 tumores), perioculares (3 tumores), aleta derecha (2 tumores) y margen lateral del plastrón (1 tumor).

Las medidas de los tumores oscilaron de 0.5 a 14 cm en la región axilar derecha, de 0.5 a 9.5 cm en el cuello, 1 a 18 cm en la región axilar izquierda, 1 a 7 cm en el margen dorsal del caparazón, 2 a 10 cm en la cabeza, 1 a 1.3 cm en el área periorcular, 1 a 2 cm en la aleta derecha y 2.5 cm en el margen lateral del plastrón. Los resultados anteriores se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Distribución, número, promedio, desviación estandar y rango del diámetro de los tumores.

DISTRIBUCIÓN DEL TUMOR POR REGIÓN ANATÓMICA	NÚMERO DE TUMORES	PROMEDIO DEL DIAMETRO DE LOS TUMORES (CM)	DESVIACION ESTANDAR (CM)	RANGO DEL DIÁMETRO DE LOS TUMORES (CM)
Región axilar derecha	28	3.5	3.26	0.5-14
Cuello	25	3.32	3.03	0.5-9.5
Región axilar izquierda	22	4.36	4.5	1-18
Margen dorsal del caparazón	7	3.43	1.86	1-7
Cabeza	4	5.87	3.32	2-10
Ojo	3	1.1	0.17	1-1.3
Aleta derecha	2	1.5	0.71	1-2
Margen lateral del plastrón	1	2.5		2.5
Total	92	3.20		

Los tumores extirpados fueron masas individuales o múltiples con diámetros que oscilaron de 0.5 a 18 cm de longitud. Algunas masas eran verrugosas y de consistencia blanda, con coloración blanco-rosada. Las masas grandes y con mayor estado de madurez eran de apariencia de coliflor, consistencia dura y una coloración verde-grisácea. Las masas podían ser sésiles o pedunculadas. Las lesiones mas grandes estaban frecuentemente ulceradas y necróticas. Ninguna de las tortugas examinadas presentó tumores en las aletas posteriores o en el área de la cola.

El tamaño de la biopsia de piel tomada en las tortugas de control era de unos 2 cm de longitud, con una coloración verde olivacea, dicha piel no tenia parásitos externos visibles y era de superficie lisa.



Figura 1. Fibropapiloma en cuello de tortuga lora



Figura 2. Fibropapiloma en región axilar izquierda de tortuga lora

3.2.2. Histopatología

Histológicamente la piel normal de las tortugas tiene dos capas: la epidermis y la dermis. La epidermis a diferencia de los mamíferos que tienen 5 capas, en las tortugas marinas está compuesta de dos estratos: córneo y espinoso. El estrato córneo está compuesto de unas 2 a 4 capas de queratina. El estrato espinoso está formado por epitelio estratificado escamoso y compuesto de unas 4 a 7 células de grosor. Al igual que en los mamíferos la epidermis está separada de la dermis por una membrana basal. Debajo está la dermis la cual tiene dos estratos: papilar y reticular, diferenciándose de otras especies como los caninos y felinos que no presentan esta división tan clara de capas (Hargis, 1995; Scott et al., 2001). El estrato papilar consiste de delgadas bandas de tejido colágeno, células mononucleares pequeñas que se ubican principalmente en el área perivascular, vasos sanguíneos y cromatóforos o pigmentos de melanina (melanocitos) que se extienden al estrato reticular adyacente. El estrato reticular consiste de grandes bandas de tejido colágeno, fibroblastos y vasos sanguíneos con células mononucleares perivasculares.

En la histopatología del tumor se observó que la epidermis presentó las siguientes características: crecimiento papiliforme (24 tortugas), formas parasitarias en la superficie de la epidermis (14 tortugas), queratinocitos con degeneración y necrosis (13), hiperqueratosis

ortoqueratótica (11 tortugas), degeneración vacuolar citoplásmica (4 tortugas), hiperplasia epitelial de ligera a moderada presentando de 7 a 15 capas de células de grosor (4 tortugas), bacterias en la superficie de la epidermis (3 tortugas), acantosis marcada (3 tortugas), microabscesos intracutáneos (2 tortugas), invaginaciones (2 tortugas), inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas (1 tortuga). Los resultados anteriores se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Cambios histopatológicos de la epidermis observados en 26 tortugas lora con Fibropapiloma anidando en Ostional, Costa Rica (2004-2005).

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS	NÚMERO DE TORTUGAS (%)
Crecimiento papiliforme (Sinónimo de fibropapiloma)	24 (92)
Formas parasitarias en la superficie de la epidermis	14 (54)
Queratinocitos con degeneración y necrosis (leve a severa)	13 (50)
Hiperqueratosis ortoqueratótica	11 (42)
Degeneración vacuolar citoplásmica	4 (15)
Hiperplasia epitelial (ligera a moderada)	4 (15)
Bacterias en la superficie de la epidermis	3 (11)
Acantosis	3 (11)
Microabscesos intracutáneos (pústulas)	2 (8)
Invaginaciones	2 (8)
Inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas	1 (4)

En la dermis se observaron las siguientes características: inflamación crónica mononuclear perivascular (14 tortugas), granulomas a cuerpo extraño (8 tortugas), quiste de retención queratínica (5 tortugas), e inflamación mixta con angiogénesis (1 tortuga). Los resultados anteriores se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Cambios histopatológicos de la dermis y subcutis observado en 26 tortugas lora con Fibropapiloma anidando en Ostional, Costa Rica (2004-2005).

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS	NÚMERO DE TORTUGAS (%)
Inflamación crónica mononuclear perivascular	14 (54)
Granuloma a cuerpo extraño	8 (31)
Quiste de retención queratínica	5 (19)
Inflamación mixta con angiogénesis	1 (4)

3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa

Se realizaron PCR's con los ADN extraídos de las muestras tumorales y de control. Los resultados se resumen en el cuadro 7, donde se pudo determinar que la mayor presencia de genomas virales en las tortugas con tumor fueron los de virus herpes en 18 tortugas, seguido de 4 con retrovirus y ninguna con papilomavirus. A diferencia de las tortugas con tumor, en las de control el genoma viral de mayor presencia fue el de retrovirus en 17 tortugas, seguido de 1 con herpes y ninguna con papilomavirus. En la sección de anexos los cuadros 11 y 12 muestran la determinación del genoma viral en cada una de las tortugas del estudio.

Cuadro 7. Determinación de los genomas virales presentes en ambos grupos de tortugas

TORTUGA	HERPESVIRUS	PAPILOMAVIRUS	RETROVIRUS
Con tumor	18	0	4
Sin tumor	1	0	17

3.4 Análisis de Sangre

Los resultados del hemograma y química sanguínea obtenidos de cada tortuga con tumor están en la sección de anexos en los cuadros 13 y 14. Igualmente los resultados del hemograma y química sanguínea obtenidos de las tortugas control se resumen en los cuadros 15 y 16 de la misma sección.

Los resultados de la estadística descriptiva se resumen en los siguientes cuadros:

Cuadro 8. Valores y estadísticas descriptivas del hemograma de la tortuga lora con tumor.

VARIABLE	UNIDAD	N	MEDIA	DE	MIN	MAX
Hto	%	17	30.47	2.90	27.00	36.00
Hb	g/dl	20	8.07	1.07	6.80	10.80
CHCM	g/dl	17	26,41	2.76	19.00	32.00
Cómputo de leucocitos	ul	20	1823.55	1257.63	274.00	5203.00
Heterófilos	ul	23	1273.70	407.55	675.00	1824.00
Eosinófilos	ul	23	15.90	22.90	0.00	91.00
Basófilos	ul	23	0.00	0.00	0.00	0.00
Linfocitos	ul	23	523.48	404.97	0.00	1149.00
Monocitos	ul	23	9.48	14.45	0.00	55.00
Fósforo	mg/dl	24	9.07	2.30	5.40	16.60
Calcio	mg/dl	23	5.91	2.63	1.00	10.00
AST	U/l	24	103.96	52.56	24.00	261.00
ALT	U/l	24	2.21	5.92	0.00	27.00
Glucosa	mg/dl	24	90.38	18.31	41.00	131.00
Urea	mg/dl	24	23.11	10.34	8.90	47.00
Nitrógeno ureico	mg/dl	24	10.75	4.83	4.10	21.90
Creatinina	mg/dl	24	0.65	0.29	0.30	1.90
Proteínas totales	g/dl	24	3.50	0.53	2.50	4.60
Albúmina	g/dl	24	1.37	0.47	0.30	2.10
Globulinas	g/dl	24	2.13	0.47	1.40	3.10
RA/G		24	0.68	0.30	0.10	1.20

Cuadro 9. Valores y estadísticas descriptivas del hemograma de la tortuga lora control.

VARIABLE	UNIDAD	N	MEDIA	D.E.	MÍN	MÁX
Hto	%	24	28.58	3.07	24.00	34.00
Hb	g/dl	24	8.26	0.97	6.90	10.60
CHCM	g/dl	24	29,04	1.55	26.00	33.00
Cómputo de leucocitos	ul	24	2537.38	1273.14	841.00	5177.00
Heterófilos	ul	24	1521.21	299.13	888.00	1928.00
Eosinófilos	ul	24	15.79	24.58	0.00	91.00
Basófilos	ul	24	0.00	0.00	0.00	0.00
Linfocitos	ul	24	960.88	284.32	558.00	1598.00
Monocitos	ul	24	39.04	35.94	0.00	152.00
Fósforo	mg/dl	24	9.57	2.23	5.20	13.70
Calcio	mg/dl	23	6.65	2.14	0.00	11.00
AST	U/l	24	73.29	51.01	11.00	188.00
ALT	U/l	24	0.38	1.06	0.00	5.00
Glucosa	mg/dl	24	86.21	17.24	40.00	129.00
Urea	mg/dl	24	24.88	14.19	5.60	54.00
Nitrógeno ureico	mg/dl	24	11.58	6.62	2.60	25.20
Creatinina	mg/dl	24	0.78	0.31	0.40	1.90
Proteínas totales	g/dl	24	2.95	0.37	2.40	3.70
Albúmina	g/dl	24	1.10	0.19	0.80	1.60
Globulinas	g/dl	24	1.86	0.34	1.20	2.60
RA/G		24	0.61	0.19	0.40	1.20

Finalmente los resultados de la Estadística inferencial (Prueba T de student) entre los dos grupos de tortugas se resumen en el cuadro 10:

Cuadro 10. Estadística inferencial (Prueba T de Student) en valores sanguíneos de ambos grupos de tortugas.

VARIABLE	UNIDAD	CONTROL	TUMOR	MEDIA CONTROL	MEDIA TUMOR	P (T DE SUDENT)
Hto	%	24	17	28.58	30.47	0.0545
Hb	g/dl	24	20	8.26	8.07	0.5241
CHCM	g/dl	24	17	29.04	26.41	0.0017
Cómputo de leucocitos	ul	24	20	2537.38	1823.55	0.0696
Heterófilos	ul	24	23	1521.21	1273.70	0.0216
Eosinófilos	ul	24	23	15.79	15.87	0.9911
Linfocitos	ul	24	23	960.88	523.48	0.0001
Monocitos	ul	24	23	39.04	9.48	0.0008
Fósforo	mg/dl	24	24	9.57	9.07	0.4478
Calcio	mg/dl	23	23	6.65	5.91	0.3016
AST	U/l	24	24	73.29	103.96	0.0460
ALT	U/l	24	24	0.38	2.21	0.1483
Glucosa	mg/dl	24	24	86.21	90.38	0.4212
Urea	mg/dl	24	24	24.88	23.11	0.6236
Nitrógeno uréico	mg/dl	24	24	11.58	10.75	0.6210
Creatinina	mg/dl	24	24	0.78	0.65	0.1189
Proteínas totales	g/dl	24	24	2.95	3.50	0.0002
Albumina	g/dl	24	24	1.10	1.37	0.0125
Globulina	g/dl	24	24	1.86	2.13	0.0286
RA/G		24	24	0.61	0.68	0.3374

4. DISCUSION

El presente estudio es el primero que se realiza en la especie *Lepidochelys olivacea* en Costa Rica uniendo tres áreas de investigación, como son la patología e histopatología, la detección viral y la hematología y química sanguínea, en tortugas lora con y sin fibropapiloma.

Se analizó la condición corporal entre las tortugas sanas y enfermas y se determinó que no hubo una gran diferencia entre ambos grupos, esto podría ser debido a que el tumor estuviese en una etapa temprana en la cual el estado de emaciación todavía no fuese severo.

Tampoco se encontró mayor diferencia en las medidas morfométricas-anatómicas de las tortugas debido posiblemente a que todas eran hembras adultas en etapa de anidación, las cuales habían llegado a su etapa de madurez máxima.

En un estudio anterior en Ostional realizado por Aguirre et al., 1999; las tortugas estudiadas reflejaron como sitio de mayor aparición del tumor las aletas frontales, seguido del cuello, márgenes del caparazón, ojos y escudos. En el presente estudio el área de aparición de los tumores es similar con un elemento adicional presente en el estudio actual que es la región de la cabeza.

Un dato relevante sobre las medidas de los tumores que reflejó el estudio actual es la disminución en el tamaño comparado con el estudio citado anteriormente en el cual la medida de los tumores oscilaba entre 1 a 34 cm y en la investigación presente osciló entre 0.5 y 18 cm.

En el área histopatológica los resultados obtenidos se pudieron comparar con resultados previos en otras especies como es la tortuga verde realizados en Estados Unidos y estudios en la misma tortuga lora realizados en Costa Rica. Las lesiones cutáneas proliferativas descritas aquí concuerdan con las reportadas previamente para fibropapiloma en tortuga verde y en tortuga lora (Aguirre et al., 1999; Brooks et al., 1994; Herbst, 1994; Herbst et al., 1995; Herbst et al., 1998; Herbst et al., 1999; Jacobson et al., 1989; Smith and Coates, 1938).

El término fibropapiloma viene del patrón papilar de las lesiones tempranas y la predominancia de tejido conectivo dérmico fibroso que varía a un patrón epitelial de superficie menos verrugosa y con un componente estromal fibrovascular más prominente. Estas diferencias pueden deberse al tiempo de presentación, estado de regresión del tumor, estatus inmunológico del huésped, presencia de una coinfección, o relacionado al sitio anatómico de origen del tumor. Los fibropapilomas cutáneos se han reportado en reptiles, aves y una amplia variedad de mamíferos (Brooks et al., 1994).

En la tortuga marina el fibropapiloma se desarrolla de forma similar al fibropapiloma de los mamíferos. El tumor empieza con una proliferación de fibroblastos en la dermis superficial, de seguido se produce la proliferación de la epidermis con acantosis y ortoqueratosis. Conforme los nódulos se agrandan, la epidermis se vuelve verrugosa. Posteriormente se desarrollan cambios degenerativos y líticos en el estrato espinoso y estrato basal, terminando con la separación de la dermis-epidermis y la formación de vesículas y posterior ulceración. La continua proliferación de fibroblastos ensancha la epidermis, resultando en una masa blanda y firme (Herbst et al., 1999).

En el presente estudio se dio una diferencia en comparación con el estudio realizado en tortuga lora en 1997 en Ostional, pues en aquella investigación se determinó que un 48% de los tumores de las tortugas loras tenían áreas extensas de inflamación linfocítica dentro del tejido tumoral fibroblástico y un 21% de los restantes tumores tenían cambios histológicos de inflamación con ligera degeneración dentro del tumor, cambios histológicos que sugerían regresión. En esta investigación la diferencia radicó en que ningún tumor presentaba cambios histológicos que sugirieran regresión.

En la tortuga verde de vida libre es común la infección con un tremátodo espiróquido llamado *Laeredius laeredei*, el cual se localiza en las cámaras del corazón y dentro del lumen de los grandes vasos. Desde que los huevos de tremátodo fueron vistos dentro de los vasos dérmicos del fibropapiloma, su papel en la patogénesis fue cuestionado (Brooks et al., 1994; Jacobson et al., 1989). En el presente estudio no se identificó de cual género eran los huevos de parásitos encontrados en la histología. Las lesiones patológicas por la deposición de los huevos en el tejido se caracterizaron microscópicamente por un infiltrado celular mononuclear e inflamación granulomatosa con células gigantes, vasculitis y perivasculitis (granuloma a cuerpo extraño). En las tortugas marinas, estas lesiones se encontraron tanto dentro de los tumores como en tejido normal. Dado su cuestionado papel en la patogénesis de la enfermedad, Herbst realizó un experimento en el cual inyectó alícuotas de huevos de tremátodos espiróquidos en varios sitios intradérmicos y subcutáneos en 3 tortugas, las cuales tras un año de observación no desarrollaron tumores, por lo que aquellos resultados sugirieron que dichos huevos no jugaban un papel directo en la etiología de las lesiones del fibropapiloma en la tortuga verde (Herbst, 1994). Posteriormente se realizó otro estudio de transmisión experimental de fibropapiloma en la tortuga verde, usando extractos tumorales filtrados libres de células, en donde el posible rol etiológico de los huevos de tremátodos también fue excluido por el paso de filtración (que además elimina la mayoría de las bacterias excepto *Mycoplasma sp* como agentes etiológicos) y por la ausencia de huevos de tremátodos en 33 fibropapilomas inducidos experimentalmente (Herbst et al., 1995). Por tanto la ausencia de huevos de espiróquidos y granulomas a cuerpos extraños asociados a estos huevos en fibropapilomas inducidos experimentalmente, sugirieron que eran hallazgos incidentales en los tumores espontáneos (Herbst et al., 1999).

Igual que en el presente estudio en la tortuga verde se han observado parásitos externos que infestaban los pliegues del fibropapiloma, sugiriendo que podían servir como vectores del

o los agentes causales de la enfermedad pero no como causantes directos de la enfermedad. Tanto los huevos de tremátodos como los parásitos externos pueden debilitar severamente al huésped, disminuyendo el sistema inmune, sin poder responder efectivamente al agente causal del tumor (Herbst, 1994).

La presencia de una inclusión eosinofílica citoplasmática en el tumor de una tortuga lora en este estudio, concuerda con la aparición de inclusiones eosinofílicas presentes en otros estudios (Herbst et al., 1995; Jacobson et al., 1989). Dichas inclusiones semejan superficialmente inclusiones intranucleares de la enfermedad “mancha gris” de la tortuga verde, que es una enfermedad de piel causada por un virus herpes (Jacobson et al., 1989). El bajo porcentaje de inclusiones eosinofílicas observados en tinción con Hematoxilina y Eosina en este estudio, concuerdan con la patogénesis de la infección por virus herpes en especies de vertebrados, en los cuales los viriones y sus antígenos no se presentan todo el tiempo durante el desarrollo tumoral. En un estudio de transmisión experimental realizado por Herbst, en donde se comparaban tumores inducidos experimentalmente con tumores espontáneos, los tumores inducidos experimentalmente, que fueron las muestras más jóvenes, tuvieron la frecuencia más alta de inclusiones. Si la producción de virus y su diseminación son eventos transitorios tempranos en la progresión de la enfermedad, entonces la evidencia de una infección activa disminuiría con la edad (Herbst et al., 1999). Tomando en cuenta que las tortugas de este estudio eran tortugas adultas, lo descrito anteriormente explicaría porque sólo una tortuga presentaba inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas.

Los resultados del PCR del presente trabajo determinaron que 18 (69%) de las tortugas con tumor fueron positivas a la presencia de un virus herpes. En contraste se determinó que sólo 1 de las tortugas control fue positiva a la presencia de un virus herpes. Estos datos concuerdan con un estudio realizado en Hawái con tortugas verdes en el cual las muestras de tumores cutáneos analizados por PCR primario mostraron la presencia de un virus herpes en un 87% de los tumores y la ausencia de virus en las muestras de control (Lu et al., 2000). De igual forma los datos concuerdan con los resultados de otro estudio realizado con tumores cutáneos de tortugas verdes de Hawái, la Florida y 4 tortuga loras de Costa Rica en el cual también se determinó por PCR anidado la presencia de un virus herpes en un 100% de los tumores (Quackenbush et al., 1998). El herpes tiene la tendencia a colonizar tumores y tejidos de animales debilitados, por tanto su presencia podría deberse a una infección secundaria sin relacionarse con el proceso primario de la enfermedad. Por otro lado el virus herpes está relacionado o causa neoplasias en diferentes especies como: papiloma cutáneo en lagartijas verdes y elefantes africanos, adenocarcinoma renal de Lucke en ranas, enfermedad de Marek en pollos y linfoma en primates del nuevo mundo entre otros. Por tanto no se puede concluir que el virus herpes es el agente etiológico del fibropapiloma hasta que se aisle y se pruebe que es oncogénico en experimentos de transmisión (Herbst et al., 1995). En un estudio de asociación serológica entre el fibropapiloma y la infección con virus herpes realizado por Herbst, se determinó una fuerte asociación entre la conversión de anticuerpos reactivos de herpesvirus y el desarrollo de tumores inducidos experimentalmente. Por otro lado se determinó que también era posible que el tumor dispusiera de un ambiente fisiológico

favorable para la reactivación de una infección por herpesvirus latente, acompañada con un resurgimiento en los títulos de anticuerpos anti-herpesvirus (Herbst et al., 1998).

En este estudio los resultados del PCR determinaron que ninguna de las tortugas con tumor ni las de control fueron positivas al Papilomavirus. En muchas especies de vertebrados los papilomavirus causan papilomas, fibromas y fibropapilomas, donde se pueden observar lesiones hiperplásicas en tortugas Bolivianas y al igual que el herpesvirus también se han encontrado en papilomas de la lagartija verde (Herbst et al., 1995). Se han hecho estudios preliminares para asociar antígenos de papilomavirus con fibropapiloma los cuales han sido negativos, pero los datos son insuficientes para hablar de su involucramiento. Primero, los papilomavirus son extremadamente diversos y un papilomavirus de reptil puede fallar en reaccionar con pruebas y antisuero de mamíferos y aves (Herbst, 1994; Jacobson et al., 1989). Segundo, la producción de viriones de papiloma sólo ocurre en la capa de células más superficial y diferenciada del huésped permisivo. Pero el papilomavirus también infecta tejidos no permisivos y especies no permisivas, causando lesiones hiperplásicas o neoplásicas en la ausencia de producción de viriones. Así los tumores pueden estar negativos a cuerpos de inclusión o partículas virales negativas y consecuentemente libres de antígenos estructurales. Finalmente, la producción de viriones ocurre sólo en el epitelio más superficial después de un período prepatente y la fase productiva es muy limitada. Así, los fibropapilomas pueden variar en estados de madurez y cuando producen las partículas virales, las células epiteliales queratinizadas más superficiales pueden haberse perdido por un trauma menor, por el manejo de la muestra o por su procesamiento (Herbst, 1994).

Por último en este estudio los resultados del PCR determinaron que 4 (16%) tortugas con tumor y 17 (70%) de las tortugas control fueron positivas al retrovirus. Los retrovirus se han asociado a fibromas y sarcomas en diferentes especies por ejemplo en primates no humanos (Herbst et al., 1995). En otros estudios el papel oncogénico del retrovirus no se ha investigado. Este puede causar neoplasias sin desarrollar un ciclo de vida patente en el hospedero. Sin la presencia en la microscopía electrónica de la evidencia de la producción del virus y su diseminación por el tumor, es muy difícil de implicar al retrovirus como agente etiológico (Herbst, 1994). Debe tomarse en cuenta que usando una tinción negativa en microscopía electrónica, no ha habido mucho éxito en la identificación de partículas virales en estudios anteriores, esto porque algunos virus oncogénicos, incluyendo papilomavirus y retrovirus, causan lesiones neoplásicas en tejidos que no permiten una replicación viral vegetativa. Así se desarrollan tumores donde se encuentran genomas virales intactos dentro de las células transformadas, pero los viriones no se producen (Herbst et al., 1995).

Se debe de tomar en cuenta que la expresión de enfermedades virales en poiquilotermos puede modularse por la temperatura y otros factores ambientales. Por ejemplo en el adenocarcinoma renal de Lucke en la rana leopardo, los cuerpos de inclusión viral son producidos en los tumores sólo a bajas temperaturas, pues el aumento en la temperatura hace que los virus entren a una fase celolítica, seguido por una fase en la cual la producción de viriones cesa y los tumores son no infecciosos (Herbst, 1994, Herbst et al., 1995).

Con respecto a las pruebas sanguíneas no se tienen datos previos de valores referenciales del hemograma, ni de la química sérica en dicha especie en el país, por eso la importancia de determinar dichas variables tanto en tortugas sanas como en tortugas que presentan el tumor. Las diferencias respecto a los valores entre las tortugas sanas y enfermas del estudio no se sabe si reflejan valores clínicamente significativos. Para analizar los resultados obtenidos se comparó primero los resultados de las tortugas sanas con las tortugas que presentaban el tumor, además se comparó con referencias de otras especies de tortugas como es la verde (*Chelonia mydas*).

El hematocrito promedio en el estudio para las tortugas sanas fue de 28.58% versus 30.47% en las tortugas con tumor, teniendo una diferencia estadísticamente significativa al 10% de significancia, por lo que es probable que si se incrementa en una pequeña proporción el número de sujetos por grupo, las diferencias lleguen a ser significativas. Los resultados difieren con otros estudios al ser el hematocrito de las tortugas sanas menor que el de las tortugas con fibropapiloma, ya que se esperaría un bajo hematocrito o anemia en animales con condiciones crónicas como es la condición causada por el tumor o por la presencia de parasitosis severas por tremátodos vasculares, común en tortugas con fibropapiloma (Aguirre et al., 1995 y Work et al., 1999). En otros estudios el hematocrito promedio para una tortuga verde sana es de 30% versus 21% en tortugas verdes con tumor, indicando que animales con tumor presentaban anemia no regenerativa y una condición crónica como es el fibropapiloma (Aguirre et al., 1995).

En la estadística descriptiva también se observó que hay diferencias significativas en los valores de CHCM (29.04 g/dl vs 26.41 g/dl), cómputo de leucocitos (2537/ul vs 1823/ul), heterófilos (1521.21/ul vs 1273.70/ul), linfocitos (960.88/ul vs 523.48/ul) y monocitos (39.04/ul vs 9.48/ul) entre tortugas de control y tortugas con tumor.

Con respecto al CHCM, se sabe que cuando éste está disminuido es por deficiencia de hierro (hipocromía), lo cual es común en enfermedades crónicas, concordando con los datos obtenidos en el estudio en el cual las tortugas enfermas presentaban un CHCM menor al de las tortugas sanas (Meneses et al., 1993)

En comparación con otros estudios en tortugas verdes el cómputo total de leucocitos fue de 9340/ul en tortugas sanas versus 6980/ul en tortugas enfermas. Así al igual que en las tortugas verdes, el cómputo total de leucocitos en la tortuga lora enferma fue menor en comparación con las sanas, esto causado probablemente por una respuesta inadecuada del organismo a una enfermedad crónica como el fibropapiloma (Aguirre et al., 1995; Work y Balazs, 1999).

La heteropenia en tortugas con fibropapiloma, difirió con otros estudios de tortugas verdes en las cuales más bien se encontró heterofilia. La heteropenia podría ser debido a

procesos inflamatorios crónicos por respuesta deficiente o secuestro (Aguirre et al., 1995; Work y Balazs, 1999).

De seguido, en el estudio se determinó una linfopenia en tortugas con tumor, hallazgo en común con otros estudios en tortugas verdes, la cual podría ser debida a una supresión o inhibición del sistema inmune; en el caso de tortugas parasitadas con tremátodos vasculares se da un secuestro de linfocitos en tejidos como resultado de la respuesta inflamatoria a los tremátodos, o bien estados iniciales de infecciones virales (Meneses et al., 1993; Aguirre et al., 1995; Work y Balazs, 1999).

Con respecto a los eosinófilos no se encontraron diferencias significativas entre los valores de tortugas sanas versus tortugas con tumor. Esto difiere con otros estudios en tortugas verdes, donde si se da una eosinopenia, especialmente en tortugas parasitadas con tremátodos vasculares, donde se da un secuestro de eosinófilos (al igual que con los linfocitos) a los tejidos como resultado de la respuesta inflamatoria a los parásitos (Aguirre et al., 1995; Work y Balazs, 1999).

En cuanto a los monocitos en el presente estudio se determinó una menor cantidad de ellos en las tortugas con tumor en comparación a las tortugas sanas, lo cual difiere con otros estudios en tortugas verdes donde se da una monocitosis como respuesta a un proceso infeccioso crónico u otra estimulación inmunogénica, además que la proliferación de monocitos se asocia a granulomas (los cuales aparecen en la histopatología tumoral) (Meneses et al., 1993, Work y Balazs, 1999). Cabe aclarar que en otros estudios en tortuga verde se dio la ausencia de monocitos, determinándolo como normal (Aguirre et al., 1995).

Por último en el presente estudio no se determinó la presencia de basófilos, esto por un lado similar a otros estudios en tortuga verde, donde no se observó basófilos (Work et al., 1998; Work y Balazs, 1999) y por otro lado diferente a otros estudios en tortuga verde, donde si se da la presencia de dichas células pero en un número muy bajo (Aguirre et al., 1995).

En lo que respecta a la química sanguínea, los cambios en los valores de la misma pueden estar relacionados con el estado fisiológico de las tortugas o pueden ser indicadores de condiciones crónicas o patológicas. En este estudio se observaron diferencias significativas para los valores de AST (73.29 U/L vs 103.96 U/L), proteínas totales (2.95 g/dl vs 3.50 g/dl), albúmina (1.10 g/dl vs 1.37 g/dl) y globulinas (1.86 g/dl vs 2.13 g/dl) entre las tortugas de control y las tortugas con tumor. Las demás variables de la química no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En otros estudios en tortugas verdes se encontró hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipoglobulinemia en tortugas con avanzado fibropapiloma, lo cual es un hallazgo común en

enfermedades crónicas y debilitantes (Aguirre et al., 1995; Aguirre y Balazs, 2000). Estos resultados difieren con el presente trabajo en el cual en lugar de disminuir los valores en sangre, más bien aumentaron ligeramente en las tortugas con tumor. El aumento en las proteínas totales está directamente relacionado con el incremento en las globulinas más que de la albúmina. A su vez el aumento de globulinas se puede dar por incremento de las proteínas totales de fase aguda, las cuales aumentan en procesos inflamatorios (Meneses et al., 1993).

Con respecto al fósforo y calcio en las tortugas con tumor se encontró ligera disminución con respecto a las tortugas control, lo cual también concuerda con los estudios en tortugas verdes, en las cuales se encontró hipofosfatemia en tortugas con tumor debido a una condición crónica y debilitante (Aguirre y Balazs, 2000). Cabe aclarar también que tanto la hipocalcemia como la hipofosfatemia son causadas por ayunos prolongados o deficiencia dietaria (Meneses et al., 1993), lo cual es muy típico en tortugas que van a anidar como las del presente estudio, las cuales sufren procesos prolongados de ayuno antes del anidamiento.

En este trabajo se determinó un aumento de la AST en tortugas con tumor comparadas con las tortugas control, lo cual coincide con los estudios en tortugas verdes en las cuales también hubo un aumento en la AST en las tortugas con fibropapiloma como indicativo de estrés crónico y de daño muscular (Aguirre et al., 1995; Aguirre y Balazs, 2000, Menes et al., 1993).

Se determinó también un aumento en el nitrógeno ureico en las tortugas con tumor, coincidiendo con los estudios de tortuga verde donde también se aumenta el BUN en tortugas con fibropapiloma debido al catabolismo proteico o destrucción tisular acelerada por causa del tumor (Meneses et al., 1993; Aguirre y Balazs, 2000).

Entre los factores que pueden alterar las diferencias en los valores obtenidos en este estudio y los anteriores estudios en tortuga verde están: en primer lugar la especie, que en el presente estudio se realizó en la tortuga lora y no en la tortuga verde, lo cual puede conllevar diferencias obvias entre especies. También el sexo y la edad son importantes porque en el presente estudio se utilizaron sólo hembras adultas que estaban anidando en la playa a diferencia de los otros estudios que eran tortugas juveniles que estaban nadando en el mar y de las cuales todavía no se conocía el sexo pues el dimorfismo sexual en esa etapa todavía no era claro. El número de individuos es importante porque en el presente estudio se utilizaron 26 tortugas con tumor y 24 de control versus otros estudios donde utilizaron más de 100 tortugas. Por último el tiempo que pasa entre la colecta de la sangre y la llegada de la misma al laboratorio, el cual osciló entre 1 a 4 días post colecta para algunas muestras, debido a la gran distancia entre la playa de Ostional y el laboratorio de Análisis Clínico de la UNA, versus en otros estudios que es solamente de horas, por lo que el procesamiento de las muestras no fue tan rápido como en los estudios anteriores en Estados Unidos (Aguirre et al., 1995; Aguirre y Balazs, 2000).

5. CONCLUSIONES

El estudio realizado sobre la fibropapilomatosis en la tortuga lora permite concluir lo siguiente:

Se determinó que la condición corporal entre las tortugas sanas y enfermas no presentó una mayor diferencia entre ambos grupos.

No se encontró diferencia significativa en las medidas morfométricas-anatómicas de las tortugas estudiadas.

Las zonas de aparición de los tumores se mantienen similares a las reportadas en estudios anteriores, en donde sí se encontró diferencia fue en el tamaño de los mismos los cuales presentaron un diámetro menor.

En el área histopatológica las lesiones cutáneas proliferativas descritas en la presente investigación concuerdan con las reportadas previamente para fibropapiloma en tortuga verde y en tortuga lora.

En la tortuga marina el fibropapiloma se desarrolla de forma similar al fibropapiloma de los mamíferos.

En el presente estudio se concluyó que ningún tumor presentaba cambios histológicos que sugirieran regresión.

Se observó la presencia de parásitos externos que infestaban los pliegues del fibropapiloma, pero el presente estudio no abarcaba el análisis de los mismos por lo que no se clasificaron.

En una de las biopsias tumorales se observó la presencia de una inclusión eosinofílica citoplasmática coincidiendo con la aparición de ésta mencionada en otros estudios.

En un análisis comparativo el cual no se había realizado en estudios previos entre los 3 virus: herpesvirus, retrovirus y papilomavirus, se determinó que el genoma viral de mayor presencia en los tumores fue el del herpesvirus.

La expresión de enfermedades virales en poiquiloterms puede modularse por la temperatura y otros factores ambientales.

Del estudio hematológico se observan diferencias entre ambos grupos pero al no haber valores referenciales previos no se puede concluir que dichos valores no estén dentro de los parámetros normales.

6. RECOMENDACIONES

Debido a que la determinación y el aislamiento del agente etiológico es importante en el desarrollo de métodos diagnósticos necesarios para el estudio de la epizootiología del fibropapiloma, se recomienda primeramente ampliar el número de agentes virales a estudiar. En el presente estudio sólo se buscaron los genomas virales de 3 virus pero hay una gran variedad de agentes que pueden provocar tumores cutáneos en reptiles, aves y mamíferos.

En el pasado se han desarrollado estudios de transmisión utilizando quistes parasitarios, los cuales después de un año postinoculación han sido negativos a la presencia de fibropapiloma. Dichos estudios podrían repetirse pero dejando un margen de estudio mayor dado el hecho de que hay tumores que dependiendo del agente causal pueden durar varios años en desarrollarse pues se encuentran latentes en el animal y hasta que se da un proceso de inmunosupresión se desencadena su crecimiento.

Se recomienda también hacer cultivos celulares y estudios de transmisión de fibropapiloma usando extractos tumorales que puedan llenar satisfactoriamente los postulados de Koch's para este agente.

Se recomienda hacer otros estudios para determinar valores referenciales del hemograma y la química sérica en la tortuga lora para Costa Rica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguirre, A.A. 1998. Fibropapilomas en Tortugas Marinas: Un Taller del XVIII Simposio Anual sobre la Biología y la Conservación de las Tortugas Marinas. In: Noticiero de Tortugas Marinas # 82.
- Aguirre, A.A.; T.R. Spraker; A. Chaves; L. Du Toit; W. Eure & G.H. Balzs. 1999. Pathology of fibropapillomatosis in Olive Ridley turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. *J. Aquat. Anim. Health.* 11: 283-289.
- Aguirre, A.A. & G.H. Balazs. 2000. Blood Biochemistry Values of Green Turtles, *Chelonia mydas*, with and without Fibropapillomatosis. *Comp. Haematol. Int.* 10:132-137.
- Aguirre, A.A.; G.H. Balazs; T.R. Spraker & T.S. Gross. 1995. Adrenal and Haematological Responses to Stress in Juvenile Green Turtles (*Chelonia mydas*) with and without Fibropapillomatosis. *Physiol. Zool.* 68: 831-854.
- Balazs, G.H. & E. Jacobson. 1991. Research plan for marine turtle fibropapilloma. Pages 113 in Results of a December 1990 Workshop. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Honolulu, Hawaii.
- Beynon, P.H. & J.E. Cooper. 1999. Reptiles. Páginas 258-260 en Manual de animales Exóticos. O.F. Jackson, ed. Harcourt Brace de España, S.A. Madrid, España.
- Brooks, D.E.; P.E. Ginn; T.R. Miller; L. Bramson & E.R. Jacobson. 1994. Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet. Pathol.* 31: 335-339.
- Casey, R.N., S.L. Quackenbush, T.M. Work, G.H. Balazs, P.A. Bowser & J.W. Casey. 1997. Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. *Dis Aquat Organ.* 31: 1-7.
- Chaves, A.; L. Du Toit; G. Marin & W. Eure. 2000. Fibropapilloma in the Ostional Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) population. Pages 114 in Proc. of Eighteenth Inter. Sea Turtle Symp. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Sinaloa, México.
- Coberly, S.S.; R.C. Condit; L.H. Herbst & P.A. Klein. 2002. Identification and Expression of Immunogenetic Proteins of a Disease-Associated marine Turtle Herpesvirus. *J. Virol.* 76: 10553-10558.
- Davidson, M.G.; R. Else & J.H. Lumsden. 1998. Collection and Handling of Samples for Diagnosis. Pages 11-16 in Manual of Small Animal Clinical Pathology. R.W. Else, ed. British Small Animal Veterinary Association, England.
- Eckert, K.L.; K.A. Bjorndal; F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly. 2000. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas, ed. Consolidated Graphic Communications, Pennsylvania USA.

- Forslund, O., A. Antonnsson, P. Nordin, B. Stenquist & B.G. Hansson. 1999. A broad range of human types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.* 80: 2437-2443.
- Fudge, A.M. 2000. Reptilian Blood Sampling and artifact Considerations. Pages 187-188 in *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. M.J. Murray, ed. W.B.Saunders, USA.
- Graat, E.A.M., K. Frankena & H. Bos. 1997. Principles and Methods of Sampling in animal disease surveys. Páginas 31-62 in *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Noordhuizen, J.P.T.M., K. Frankena, C.M. van der Hoofd y E.A.M. Graat, ed. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
- Hargis, A. 1995. Intergumentary system. pp. 461-462. *In* W. Carlton & M.D. Mc Gavin (eds). *Thompson's Special Veterinary Pathology*. Mosby, United States.
- Herbst, L.H. 1994. Fibropapillomatosis of Marine Turtles. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 4: 389-425.
- Herbst, L.H.; E.R. Jacobson; R. Moretti; T. Brown; J.P. Sundberg & P.A. Klein. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Dis. Aquat. Org.* 22: 1-12.
- Herbst, L.H.; E.R. Jacobson; P.A. Klein; G.H. Balazs; R. Moretti; T. Brown & J.P. Sundberg. 1999. Comparative Pathology and Pathogenesis of Spontaneous and Experimentally Induced Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Vet Pathol.* 36: 551-564.
- Herbst, L.H.; E.C. Greiner; L.M. Ehrhart; D.A. Bagley & P.A. Klein. 1998. Serological Association Between Spirochidiasis, Herpesvirus infection and Fibropapillomatosis in Green Turtles from Florida. *J. Wild Dis.* 34: 496-507.
- Herbst, L.H. & P.A. Klein. 1995. Green Turtle Fibropapillomatosis: Challenges to Assessing the Role of Environmental Cofactors. *Environ. Health Perspect.* 103: 27-30.
- Herbst, L.H.; R. Chakrabarti; P.A. Klein & M. Achary. 2001. Differential Gene Expression Associated with Tumorigenicity of Cultured Green Turtle Fibropapilloma-derived Fibroblasts. *Can. J. Genet. Cytol.* 129: 35-39.
- Jacobson. E.R.; J.L. Mansell, J.P. Sundberg, L. Hajjar, M.E. Reichmann, L.M. Ehrhart, M. Walsh & F. Murrus. 1989. Cutaneous Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). *J. Comp. Path.* 101: 39-52.
- Lu. Y., Y. Wang, Q. Yu, A.A. Aguirre, G.H. Balazs, V.R. Nerurkar & R. Yanagihara. 2000. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 145: 1885-1893.
- Lucke, B. 1938. Studies on tumors of cold-blooded vertebrates. *Annu. Rep. Tortugas Lab.* 39: 92-94.

- Meneses, A.I., J.E.Villalobos, & E.Sancho. 1993. Manual de Hematología y Química Clínica en Medicina Veterinaria. 1era edición. Editorial Fundación UNA, Heredia.
- Orrego, C. M. & J. A. Morales. 2002. Discoveries of Olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the Pacific coast of Costa Rica. In: 22th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Miami, Florida. USA., Page 276-277.
- Orrego, C. M. & Work T. 2004. Histopathological findings in Olive Ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) in Ostional and Nancite beaches in the Pacific Coast of Costa Rica In: 24th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. San José, Costa Rica.
- Quackenbush, S.L., T.M. Work, G.H. Balazs, R.N. Casey, J. Rovnak, A. Chaves, L. du Toit, J.D. Baines, C.R. Parrish, P.R. Bowser & J.W. Casey. 1998. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology*. 246: 392-399.
- Rainey, W.E. 1981. Equipment and supplies. Page 79 in Guide to Sea Turtle Visceral Anatomy. W.E. Raney, ed. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum, USA.
- Scott, D.W., W.H. Miller & G.E. Griffin. 2001. Structure and function of the skin. pp. 35-36. In Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. W.B. Saunders, United States.
- Smith, G.M. & G.W. Coates. 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas*. *Zoologica*. 23: 93-98.
- Tristem, M., T. Myles & F. Hill. 1995. A highly divergent retroviral sequence in the tuatara (*Sphenodon*). *Virology*. 210: 208-211.
- Work, T.M., R.E. Raskin, G.H. Balazs, & S.D. Whittaker. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *AJVR*. 59: 1252-1257.
- Work, T.M., & G.H. Balazs. 1999. Relating Tumor Score to Hematology in Green Turtles with Fibropapillomatosis in Hawaii. *J.Wild Dis*. 35: 804-807
- Wyneken, J. 2001. Standard Measurements. Pages 28-32 in The Anatomy of Sea Turtles. J. Wyneken, ed. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum, USA.

8. ANEXOS

Cuadro 11. Determinación de los virus presentes en las tortugas con tumor.

IDENTIFICACIÓN DE TORTUGAS CON TUMOR	HERPESVIRUS	PAPOVAVIRUS	RETROVIRUS
AA2618			
AA2619			
AA2620	X		
AA2621			
AA2622	X		
AA2623	X		
AA2624	X		
AA2625			
AA2626	X		
AA2627	X		
AA2628	X		
AA2629	X		
AA2630	X		
AA2631	X		
AA2632	X		
AA2633	X		
AA2634	X		X
AA2635	X		X
AA2636	X		
AA2637	X		X
AA2638			
AA2639			
AA2640			
AA2641			
AA2642	X		
AA2647	X		X

Cuadro 12. Determinación de los virus presentes en las tortugas control

IDENTIFICACIÓN TORTUGAS SIN TUMOR	HERPESVIRUS	PAPOVAVIRUS	RETROVIRUS
AA2643			X
AA2644			X
AA2645			
AA2646			X
AA2648	X		X
AA2649			X
AA2650			X
AA2651			
AA2652			X
AA2653			
AA2654			
AA2655			
AA2656			
AA2657			
AA2658			X
AA2659			X
AA2660			X
AA2661			X
AA2662			X
AA2663			X
AA2664			X
AA2665			X
AA2666			X
AA2667			X

Cuadro 13. Hemograma de las tortugas con tumor

ID	Hto	Hb	CHCM	Cómp Leuc	Het	Eos	Basof	Linf	Mon
	%	g/dl	g/dl	ul	Ul	ul	ul	ul	ul
AA2618	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
AA2619	ND	8.6	ND	1259	1696	55	0	73	0
AA2620	31	8	26	3288	967	0	0	803	55
AA2621	36	7	19	1724	1769	0	0	18	0
AA2622	33	8.9	27	1549	1186	91	0	529	18
AA2623	ND	7.5	ND	1173	1824	0	0	0	0
AA2624	ND	8.5	ND	1155	1769	0	0	55	0
AA2625	27	7	26	2467	857	37	0	930	0
AA2626	28	7.3	26	1921	1131	0	0	675	18
AA2627	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
AA2628	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
AA2629	27	6.8	25	333	876	0	0	948	0
AA2630	34	8.9	26	2213	821	0	0	985	18
AA2631	ND	ND	ND	ND	1806	18	0	0	0
AA2632	ND	ND	ND	ND	1788	18	0	18	0
AA2633	28	7.6	27	1718	1040	37	0	730	18
AA2634	ND	ND	ND	ND	1788	37	0	0	0
AA2635	29	7.7	27	529	675	0	0	114 9	0
AA2636	28	6.9	25	765	1824	0	0	0	0
AA2637	34	9.6	28	549	1240	0	0	584	0
AA2638	30	8.7	29	274	1167	18	0	638	0
AA2639	32	7.8	24	2709	748	18	0	104 0	18
AA2640	28	7.5	27	1270	1131	18	0	657	18
AA2641	31	9.3	30	3810	894	0	0	894	37
AA2642	34	10.8	32	5203	1222	18	0	584	0
AA2647	28	6.9	25	2562	1076	0	0	730	18
Promedio	30.5	8.1	26.4	1824	1273.7	15.9	0	523 .5	9.5

Cuadro 14. Química sanguínea de las tortugas con tumor

ID	P	Ca	AST	ALT	Glu	U	NitU	Cret	Pt	Alb	Glob	RA/G
	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	g/dl	g/dl	g/dl	
AA2618	16.6	1	261	27	86	18	8.4	0.8	3.7	1.7	2	0.8
AA2619	5.4	10	118	0	75	38	17.7	0.7	3.7	1.6	2.1	0.7
AA2620	8.8	6	91	13	81	30	14	0.5	3	1.2	1.8	0.6
AA2621	7.6	9	81	0	97	22	10.2	0.6	3.1	1.6	1.5	1.1
AA2622	7	7	125	0	102	47	21.9	0.6	3	1.5	1.5	1
AA2623	9.5	7	44	1	106	13	6	0.6	3.3	1.2	2.1	0.6
AA2624	11.9	8	24	0	105	39	18.2	0.6	3.1	1.7	1.4	1.2
AA2625	8.4	7	39	1	108	20	9.3	0.6	3.4	1.3	2.1	0.6
AA2626	8.9	10	45	1	121	25	11.6	0.5	3.4	1.8	1.6	1.1
AA2627	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AA2628	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AA2629	9.9	7	93	0	87	28	13	0.6	3.9	1.7	2.2	0.7
AA2630	8.7	4	86	0	77	18	8.4	0.6	4.1	1.5	2.6	0.6
AA2631	9.6	1	118	3	109	15	7	0.7	4	2	2	1
AA2632	9	2	96	0	89	17	7.9	0.6	3.6	1.4	2.2	0.6
AA2633	9.3	5	123	0	87	19	8.8	0.6	3.9	1.3	2.6	0.5
AA2634	8.1	7	131	0	87	19	8.8	0.3	4.6	1.6	3	0.5
AA2635	6.8	7	108	0	93	36	16.8	0.4	2.7	1.2	1.5	0.8
AA2636	8.8	2	162	2	73	18	8.4	0.6	3.7	1.5	2.2	0.7
AA2637	10.1	8	181	2	41	42	19.6	0.6	4	2.1	1.9	1.1
AA2638	6.4	8	133	1	90	16	7.4	0.5	4.2	1.6	2.6	0.6
AA2639	6.8	4	71	0	80	19	8.8	0.8	2.5	0.3	2.2	0.1
AA2640	8.2	5	105	0	76	18	8.4	0.7	3.4	0.3	3.1	0.1
AA2641	9.2	5	49	2	76	10	4.6	0.5	3.1	0.5	2.6	0.2
AA2642	9.9	ND	149	0	131	8.9	4.1	1.9	3.8	1.4	2.4	0.6
AA2647	12.8	6	62	0	92	18.7	8.7	0.6	2.7	0.9	1.8	0.5
Promedio	9.07	5.91	103.9	2.20	90.37	23.10	10.75	0.64	3.49	1.37	2.12	0.65

Cuadro 15. Hemograma de las tortugas control

ID	Hto	Hb	CHCM	Cómp Leuc	Het	Eos	Basof	Linf	Mon
	%	g/dl	g/dl	Ul	ul	Ul	ul	ul	ul
AA2643	25	7.7	31	3178	1674	0	0	863	0
AA2644	28	8.0	29	2591	888	0	0	1497	152
AA2645	26	7.2	28	981	1700	0	0	812	25
AA2646	27	7.7	29	1435	1446	0	0	1091	0
AA2648	27	7.5	28	2074	1218	0	0	1294	25
AA2649	25	7.2	29	1963	1903	51	0	558	25
AA2650	34	10.3	30	2090	1446	0	0	1015	76
AA2651	29.5	8.2	28	991	1751	25	0	761	0
AA2652	33	8.9	27	901	1852	51	0	584	51
AA2653	28	8.7	31	2094	1827	25	0	685	0
AA2654	25	7.6	30	3127	1472	0	0	989	76
AA2655	25	7.5	30	841	1319	76	0	1116	25
AA2656	32	9.6	30	1877	913	0	0	1598	25
AA2657	34	9.5	28	2559	1674	0	0	837	25
AA2658	32	8.3	26	2356	939	76	0	1471	51
AA2659	28	8.6	31	2622	1497	0	0	989	51
AA2660	29	8.5	29	1296	1472	25	0	1015	25
AA2661	27	7.6	28	5033	1649	0	0	837	51
AA2662	29	8.3	29	3928	1674	0	0	812	51
AA2663	32	10.6	33	5177	1751	0	0	761	25
AA2664	24	6.9	29	2909	1370	25	0	1116	25
AA2665	32	8.6	27	2606	1446	25	0	1015	51
AA2666	27.5	7.6	28	5030	1928	0	0	609	0
AA2667	27	7.7	29	3238	1700	0	0	736	102
Promedio	28.6	8.3	29.0	2537	1521.1	15.8	0	960.9	39.0

Cuadro 16. Química sanguínea de las tortugas control

ID	P	Ca	AST	ALT	Glu	U	NitU	Cret	Pt	Alb	Glob	RA/G
	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	g/dl	g/dl	g/dl	
AA2643	7.7	ND	130	1	79	5.6	2.6	1.5	3.0	1	2	0.5
AA2644	13	6	61	0	129	10.7	5	0.5	2.4	0.8	1.6	0.5
AA2645	6.3	0	120	0	96	11.2	5.2	0.7	3.2	1	2.2	0.5
AA2646	8.7	9	73	0	80	12.1	5.6	0.6	2.6	0.8	1.8	0.4
AA2648	5.2	7	135	0	71	9.8	4.5	0.4	2.7	0.9	1.8	0.5
AA2649	12.8	5	116	0	95	23.8	11.1	0.5	3	1.1	1.9	0.6
AA2650	9.3	7	100	1	106	10.7	5	0.8	3	1.4	1.6	0.8
AA2651	13.7	3	142	0	99	27	12.6	0.8	2.4	0.9	1.5	0.6
AA2652	10.8	8	107	0	83	21	9.8	0.6	3.3	1.2	2.1	0.6
AA2653	8.6	7	188	1	85	16.3	7.6	0.7	3.5	1.1	2.4	0.4
AA2654	10.3	11	19	0	62	27	12.6	0.7	3.3	1.1	2.2	0.5
AA2655	8.1	9	78	0	94	12.1	5.6	0.7	2.6	1.0	1.6	0.6
AA2656	5.9	6	140	5	79	9.8	4.5	0.8	2.7	0.9	1.8	0.5
AA2657	10.7	7	20	0	65	46	21.4	0.7	2.8	1.3	1.5	0.9
AA2658	8.7	7	21	0	84	53	24.7	0.9	3.1	1	2.1	0.5
AA2659	10	8	11	0	88	30	14	0.7	3.2	1.3	1.9	0.7
AA2660	9.3	7	39	0	85	25	11.6	0.7	2.4	1.2	1.2	1
AA2661	13	6	27	0	87	29	13.5	0.8	3.1	1.2	1.9	0.6
AA2662	9.4	7	17	1	82	27	12.6	0.8	3.7	1.1	2.6	0.4
AA2663	8.6	8	23	0	110	23	10.7	1.9	2.9	1.6	1.3	1.2
AA2664	11.8	6	64	0	86	54	25.2	0.8	3.3	1.1	2.2	0.5
AA2665	8.5	5	33	0	92	31	14.4	0.8	2.5	0.9	1.6	0.6
AA2666	10.3	7	49	0	92	34	15.8	0.7	3.4	1.3	2.1	0.6
AA2667	9.0	7	46	0	40	48	22.4	0.7	2.8	1.1	1.7	0.6
Promedio	9.57	6.65	73.29	0.37	86.2	24.87	11.58	0.74	2.95	1.09	1.86	0.58