



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACION HISTOPATOLOGICA DE LAS ETIOLOGIAS
COMUNES Y ASOCIADAS A FIBROPAPILOMA EN LA
TORTUGA PRIETA (*Chelonia mydas agassizii*) DE BAHIA
MAGDALENA, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO.

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

AMAURY CORDERO TAPIA

La Paz, BCS, enero de 2005.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 17 del Mes de DIEMBRE del 2004, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EVALUACION HISTOPATOLOGICA DE LAS ETIOLOGÍAS COMUNES Y ASOCIADAS A FIBROPAPILOMA EN LA TORTUGA PRIETA (Chelonia mydas agassizii), DE BAHÍA MAGDALENA BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO"

Presentada por el alumno:

AMAURY CORDERO TAPIA

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **BIOTECNOLOGIA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



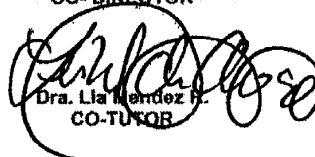
Dra. Susan C. Gardner
DIRECTOR DE TESIS



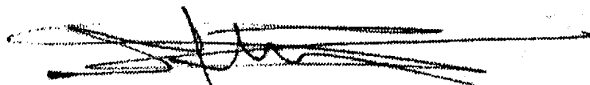
Dr. Jorge Arellano Blanco
CO-DIRECTOR



Dra. Tania Zenteno S.
CO-TUTOR



Dra. Lia Mendez B.
CO-TUTOR



Dr. Alvaro Aguilar S.
CO-TUTOR



Dr. Antonio Verdugo R.
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Se analizaron 53 individuos de tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*) 44 en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México, capturadas por pesca incidental, estas fueron muestreadas para estudios de histopatología, bacteriología, inmunología, de presencia de biotoxinas y nueve mantenidas en cautiverio en Bahía de los Ángeles, Baja California, evaluadas serológica y bacteriológicamente. No se observó la manifestación neoplásica cutánea característica de fibropapiloma (FP) en ningún espécimen. El estudio histológico reveló dos neoplasias renales (fibromas), lesiones herpéticas en dermis (vacuolización citoplasmática, cuerpos de inclusión intranucleares). Así mismo, se detectaron cambios degenerativos asociados a parasitos adultos, huevos de Tremátodos: Spirorchidos (prevalencia de 99.56%), infecciones bacterianas y deficiencia nutricional. La evaluación serológica reveló la presencia de títulos en contra de los géneros virales Rabdovirus, Herpesvirus, Ortomixovirus y a ocho serotipos de *Leptospira interrogans*. Se aislaron géneros bacterianos Gram negativos, aeróbicos, potencialmente patógenos para organismos acuáticos y terrestres incluyendo al ser humano (*Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Actinobacillus sp*, *Aeromonas sp*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Moraxella sp*, *Pseudomonas sp*, *Shigella sp*, *Serratia sp* y *Yersinia sp*). En corazón, se observó una infección simple por huevos y estadios adultos de *Learedius learedi* (Trematoda: Spirorchidae). En el estudio de la presencia de biotoxinas se encontraron resultados positivos para toxinas del tipo paralíticas (PSP) y al tipo diarreicas (DSP).

ABSTRACT

53 individuals of sea turtle (*Chelonia mydas agassizii*) 44 in Magdalena Bay analyzed themselves, Baja California Sur, Mexico, captured by incidental fishing and nine maintained in captivity in De Los Angeles Bay, Baja California, these were sampled for studies of histopatología, bacteriology, immunology of presence biotoxinas, evaluated serológica and bacteriologically. Characteristic tumour cutaneous manifestation of fibropapiloma (FP) was not observed in any specimen. Histological study revealed in two renal samples neoplastic changes (fibroma) and herpetic injuries in dermis (cytoplasmic vacuolated, within nuclei inclusion bodies). Also, degenerative changes were detected associate to adult parasites and eggs of Tremátodos: Spirorchidos (prevalence of 99,56%), bacterial infections and nutritional deficiency. The serological evaluation reveal the presence of titles against the virals sorts Rabdovirus, Herpesvirus, Ortomixovirus and to eight serovars of *Leptospira interrogans*. Gram negative Bacterial sorts were isolated, aerobics, potentially pathogenic for aquatic and terrestrial organisms including a the human being (*Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Actinobacillus sp*, *Aeromona sp*, *Enterobacter sp*, *Kleibsiella sp*, *Moraxella sp*, *Pseudomona sp*, *Shigella sp*, *Serratia sp* and *Yersinia sp*). In heart, observed a simple infection by eggs and adult stages of *Learedius learedi* (Trematodae: Spirorchidae). In the study of the presence of biotoxinas were positive results for paralytic toxins of the type (PSP) and to the type dyarreic toxins (DSP).

DEDICATORIA

A Alma D. Barajas Navarro, quien me ha dedicado su vida.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por cuatro años y medio de beca y el apoyo para el proyecto al cual mi trabajo estuvo integrado.

A mi comité tutorial, Dra. Susan Gardner gracias por darme esta oportunidad. Dra. Tania Zenteno, le agradezco sus observaciones y comentarios, siempre acertados. Dra. Lía Méndez por su aporte a este trabajo. Dr. Álvaro Aguilar y Dr. Antonio Verdugo, por su apoyo, conocimiento y facilidades dadas en sus respectivos laboratorios para lograr esta tesis. Dr. Jorge Arellano, le agradezco su apoyo, ecuanimidad y paciencia. Me quedo con su ejemplo, actitud y con la enseñanza de que cada reunión es una nueva lección, que la objetividad es razón no pasión, que se puede ser científico sin dejar de ser humano, de disfrutar ayudando. Dr. un honor ser su alumno. A todos por su paciencia y comprensión.

Al CIBNOR y todo el personal que se vio integrado en el desarrollo de esta investigación. Departamento de Posgrado, gracias Dra. Thelma. Laboratorio de Histología de CIBNOR en especial a Teresa Arteche, por su excelente trabajo en la elaboración de las laminillas indispensable para mi tesis. Norma Ochoa, Sofía Ramos y Roxana Inohuye (LIN, CIBNOR), por su ayuda en los aislamientos bacteriológicos y descripción parasitológica de esta investigación y por la diversión de trabajar juntos. Edgar Yuen, Esther Ojeda, Antonio Díaz y Ana Maria Talamantes, (biblioteca CIBNOR) por la pronta ayuda en cualquier tipo de servicio solicitado y por darle a su trabajo el valor agregado de llevarlo a cabo con afecto y calidad. Manuel Melero, Horacio Sandoval, Adriana Landa y Gerardo Hernández, por sus asesorías y disposición, para el desarrollo de esta tesis y elaboración de los carteles para congresos y a quienes me demostraron que lo fácil se puede tornar imposible.

A MC. Rigoberto Hernández por tu asesoría en los aislamientos bacterianos, Biología molecular, Serología, por dejarme ver que la FMVZ de la UNAM sigue siendo vanguardia. A todo el personal de la unidad de investigación inmunológica, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS, donde se llevaron a cabo las pruebas inmunológicas. Estimada Dra. Arcelia Alvarado Islas, Investigadora del INIFAP, por el desarrollo de las pruebas de IBR y PI-3, así como por su tiempo y su sonrisa.

Al grupo tortuguero del CIBNOR; Sionnan L Fitzgerald (mi gabacha favorita) por tu transparencia. Paloma Valdivia por tu gran entusiasmo, tan grande que logras contagiarme. Milagros López por tu camaradería. Itzel Sifuentes por tu empeño y dedicación ejemplo a seguir. Arturo Juárez por.....por nada, ok por tu camaradería. Héctor Castelán por tu aporte al grupo. A todos por sus investigaciones y por desarrollar una red humana de conciencia. Por el apoyo a los Pilares en la investigación de las tortugas marinas: G. Balazs, J. Nichols, J. Seminoff, P. Dutton, A. Aguirre, T. Work.

A Guillermo Miranda y Martina de Isla Magdalena, personas básicas y fundamentales para la toma de muestras, desarrollo, logro de este trabajo y de todos los elaborados por este grupo, por brindarnos su casa, amistad y familia, mi sincero agradecimiento. Gracias a todos los pobladores de Puerto San Carlos en especial a Don Jesús (el zurdo), a los de Isla Magdalena y Puerto Alcatraz por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo. Por confirmarme que lo grande de México esta en gente como ustedes.

A el cBM Erick Núñez Vázquez por su tiempo y apoyo en la bibliografía, desarrollo e interpretación de la extracción de biotoxinas, y la comprensión de ese mundo y el de la ciencia.

Gracias “compa”, mientras usted me viva no habrá carencia intelectual.

Al técnico Ariel Cruz Villacorta por su apoyo y asesoría en la separación y purificación de inmunoglobulinas. Así como, en la toma de imágenes en microscopia electrónica de barrido.

Gracias “compa”, por tu amistad y por ir siempre antes que yo.

A el Dr. Dariel Tovar, MC Martín Ramírez, Dr. Eduardo Ruiz (pilori), Ariel y Erick por las confortables y siempre productivas reuniones y pláticas académicas.

A Teresa Tapia Hernández, Manuel Cordero Soberanis y a sus hijos Darío Ademír, Noé, Jesús Antonio, Lisbeth y Ary. A los primeros por darme la vida y a todos por consentir al Benjamín de la familia, hicieron bien, aun lo merece. Si se malcrio y sigue así es por las malas compañías, pero por eso no se preocupen ya no se regenerara. Pero debo mencionarles que aun así, sin embargo y por lo tanto, todavía la nostalgia del núcleo y la guarida familiar lo asalta.

A Don Javier Barajas y Doña Juana Navarro, por su apoyo incondicional, por estar siempre disponibles, por todo y cuanto falta y sobre todo por su hija.

A Nycte, Amaury y Edurne, por la tibieza de su amor en el abrazo, por la felicidad de su sonrisa, por compartirme y darme vida en sus besos.

A Alma Barajas Navarro, por amarme tanto, por 23 años compartidos, por estar aquí y por lo que disfrutaremos. Por ser aun sutil pasión que me estremece cuando el viento te trae a mi.

Finalmente a quien me regalo una sonrisa y su sinceridad, cuenta conmigo siempre.

Espinelas

Que como el perro que lame
la mano de su señor,
el miedo ablande el rigor
con el llanto que derrame;
que la ignorancia reclame
al cielo el bien que le falta.

Yo, con la frente muy alta,
cual retando al rayo a herirme
soportaré sin rendirme
la tempestad que me asalta.

No esperes en tu piedad
que no inflexible se tuerza:
yo seré esclavo por fuerza
pero no por voluntad.

Mi indomable vanidad
no se aviene a ruin papel.
¿Humillarme? Ni ante aquel
que enciende y apaga el día.

Si yo fuera ángel, sería
el soberbio ángel Luzbel.
El hombre de corazón
nunca cede a la malicia.

¿No hay más Dios que la justicia
ni más ley que la razón!
¿Sujetarme a la presión
del levita o el escriba?

¿Doblegar la frente altiva
ante torpes soberanos?
Yo no acepto a los tiranos
ni aquí abajo ni allá arriba.

Salvador Díaz Mirón

CONTENIDO

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE PUBLICACIONES.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tortugas marinas	1
1.2 Tortuga prieta	1
1.3 Situación de las tortugas marinas.....	3
1.4 Situación de las tortugas marinas en México.....	4
1.5 Patología de la tortuga marina	5
1.6 Oncogénesis	5
1.7 Respuesta inmune	8
1.8 Inmunopatología de los tumores	10
2.0 ANTECEDENTES.....	13
2.1 Fibropapilomatosis en tortugas marinas.....	13
2.2 Herpes virus de la tortuga verde (Green turtle Herpes Virus:GTHV)	16
2.3 Parasitos.....	16
2.4 Bacterias	18
2.5 Transmisión.....	19
2.6 Biotoxinas	19
2.7 Contaminación.....	21
2.8 Tortugas en Baja California Sur	22
3.0 HIPÓTESIS	23
4.0 OBJETIVOS.....	24
5.0 ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	25
5.1 Área de estudio.....	25
5.1.1 Alimentación de la tortuga prieta en Bahía Magdalena	25
5.2 Organismos.....	26
5.3 Toma de muestras	26
5.3.1 Muestras hemáticas	26
5.3.2 Muestras bacteriológicas.....	26
5.3.3 Necropsia	27
5.3.3.1. La inspección externa	27

5.3.3.2 Inspección interna	27
6.0 METODOLOGÍA	31
6.1 Histopatología	31
6.2 Serología	31
6.2.1 Técnica de reducción de focos fluorescentes	31
6.2.2 Prueba de la inhibición de la hemaglutinación	32
6.2.3 Prueba de seroneutralización vs Aujeszky.....	33
6.2.4 Prueba de microaglutinación	34
6.3 Bacteriología	34
6.3.1 Siembra agar bacteriológico	35
6.3.2 Tinción de Gram	35
6.3.3 Bioquímicas	35
6.3.3.1 TSI (Triple azúcar hierro)	35
6.3.3.2 SIM	36
6.3.3.3 Urea	36
6.3.3.4 Citrato	36
6.3.4 Oxidación de azúcares	37
6.4 Parasitología	37
6.5 Biotoxinas	37
6.5.1 Extracción de biotoxinas hidrosolubles	38
6.5.2 Extracción de bitoxinas liposolubles	38
7.0 RESULTADOS	40
7.1 Histopatología	40
7.2 Bacteriología	45
7.3 Serología	49
7.4 Parasitología	49
7.5 Biotoxinas	51
7.5.1 Biotoxinas hidrosolubles	51
7.5.2 Biotoxinas liposolubles	52
8.0 DISCUSIÓN	53
9.0 CONCLUSIONES	60
10.0 LITERATURA CITADA	62
11.0 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	80

LISTA DE PUBLICACIONES

- **A. Cordero-Tapia**, S.C. Gardner, J. Arellano-Blanco, and R. B. Inohuye-Rivera. 2004. *Learedius learedi* infection in black turtles (*Chelonia mydas agassizii*) Baja California Sur, Mexico. Journal of Parasitology. 90(3): 645-647.

- Inohuye-Rivera, R., **Cordero-Tapia, A.**, Arellano-Blanco, J. and Gardner-Susan C. 2004. “*Learedius learedi* Price, 1934 (Trematoda: Spirorchidae) in Black turtle (*Chelonia mydas agassizii*) hearts from Magdalena Bay, Baja California Sur, Mexico. Comparative Parasitology. 71(1): 37-41.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características fenotípicas de la tortuga prieta (<i>Chelonia mydas agassizii</i>).....	3
Figura 2. Fibropapiloma en tortugas marinas	15
Figura 3. Presencia de huevos de trematodos.....	42
Figura 4 Huevo de trematodo, corte longitudinal.....	42
Figura 5 Huevo de trematodo	42
Figura 6 Huevo de trematodo corte transversal	42
Figura 7 Trematodo adulto en corazón	42
Figura 8 Trematodos adultos en peritoneo visceral	42
Figura 9 <i>Eimeria sp</i> en luz intestinal	43
Figura 10 Estructuras compatibles con <i>Criptosporidium sp</i>	43
Figura 11 Melanosis hepática	43
Figura 12 Hemosiderosis hepática.....	43
Figura 13 Esteatosis hepática.....	43
Figura 14 Lesión herpética.....	43
Figura 15 Cuerpos de inclusión intranucleares, piel	44
Figura 16 Degeneración muscular.....	44
Figura 17 Enteritis bacteriana.....	44
Figura 18 Enteritis parasitaria	44
Figura 19 Hiperplasia de tejido linfoide	44
Figura 20 Hiperplasia de ductos biliares	44
Figura 21 Fibroma renal	45
Figura 22 Estructura compatible con <i>Chlamydia</i>	45
Figura 23 Infiltrado no supurativoT	45
Figura 24 <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 25 <i>Salmonella sp</i>	47
Figura 26 <i>Kleibsiella sp</i>	47
Figura 27 Satelitismo bacteriano.....	47
Figura 28 <i>Learedius learedi</i> parásito adulto	50
Figura 29 Migración de huevos de trematodo.....	58
Figura 30 Estadios parasitarios en cámaras cardiacas	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Clave y datos de las tortugas prietas (<i>Ch. mydas agassizii</i>), pescadas incidentalmente en Bahía Magdalena	29
Tabla No.2. Hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S. empleados para la extracción de toxinas hidrosolubles y liposolubles.....	30
Tabla No 3. Numero de aislamientos bacterianos recuperados de la tortuga prieta (<i>Ch. mydas agassizii</i>), de Bahía Magdalena BCS, México.....	48
Tabla No. 4 Biotoxinas hidrosolubles en hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S., México.....	51
Tabla No 5. Biotoxinas liposolubles en hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S., México.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxiribo Nucleico
AO	Okadoic Acid
BC	Baja California
BCS	Baja California Sur
<i>C. mydas</i>	<i>Chelonia mydas</i>
CITES	Convention International Trade Endangered Species
Da	Dalton
DSP	Diarrhetic Shellfish poisoning
ej	Ejemplo
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fig.	Figura
FP	Fibropapiloma
g	Gramo
GPD	Grey Match Disease
GTFP	Green Turtle Fibro Papilloma
GTHP	Green Turtle Herpes Virus
HP	Herpes virus
IUCN	Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources
IL	Interleucina
Kg	Kilogramo

Km	Kilometro
LAK	Linfocin Active Killer
LRC	Largo Recto del Caparazón
LETD	Lung eye trachea disease
µg	Microgramo
µ	Microlitro
MHC	Major Histocompatibility Complex
N	Norte
NK	Natural Killer
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCB'S	Poly Chloro Bifenil's
PCR	Polymerase Chain Reaction
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
PSP	Paralitic Shellfish Poisoning
TNF	Tumour Necrotic Factor

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Tortugas marinas

Las tortugas marinas se dividen en dos grandes familias: Cheloniidae y Dermochelyidae, ambas provenientes de un ancestro común (Cryptodira) que data de hace 110 millones de años. Actualmente se reconocen siete especies de tortugas marinas. El único representante de la familia Dermochelyidae es la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), las demás, pertenecen a la familia Cheloniidae: tortuga caguama o amarilla (*Caretta caretta*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga lora (*Lepidochelys kempii*), tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), tortuga plana (*Natator depressus*) y tortuga verde (*Chelonia mydas*), con una variante que es la *Chelonia mydas agassizii* o tortuga prieta (Meylan y Meylan, 2000), aunque algunos autores no la consideran diferente de la tortuga verde (Karl y Bowen, 1999). Excepto por la tortuga lora y la tortuga plana, todas las tortugas marinas son cosmopolitas; habitan las cuencas oceánicas, donde pueden encontrarse desde el Ártico hasta Tasmania; presentan una fase pelágica en la cual se desconoce su actividad y desarrollo fisiológico; mantienen un comportamiento migratorio a lo largo de su vida, con el regreso periódico a las playas de anidación en la época reproductiva, denominado como filopatria (Meylan y Meylan, 2000), y se reporta que alcanzan la madurez sexual, según la especie y el hábitat entre los 15 y 50 años de edad (Balazs, 1982).

1.2 Tortuga prieta

La tortuga prieta (*C. mydas agassizii*) (Fig. 1), considerada por Pritchard y Mortimer (2000) como una octava especie, difiere de la tortuga verde en varios aspectos: Talla de acuerdo a la longitud recta del caparazón (LRC) de hasta 90 cm contra 120 cm en la tortuga verde (*C. mydas*); peso promedio el cual en la tortuga negra adulta es de 70 Kg, con un máximo de 120 contra un peso máximo de 180 kg en la tortuga verde; la coloración negra en el dorso en las crías permanece hasta la etapa adulta, puede ser uniforme o presentar un patrón moteado negro con un fondo grisáceo, en tanto que el color blanco en la región

ventral de las crías se transforma a gris a las pocas semanas de vida, por el contrario, las tortugas verdes presentan diferentes niveles de pigmentación según la zona geográfica; el caparazón de la tortuga negra es de forma oval, no aserrado, con una escotadura posterior en los adultos, con forma en tienda de campaña, aplanado en el perfil anterior, con cuatro pares de escudos costales, la tortuga verde a diferencia, presenta el caparazón ocasionalmente festoneado, no presenta escotadura, la coloración negra en el dorso de las crías se torna en una combinación de diferentes tonos de café en adultos, en un patrón de vetas radiales, moteado o liso; la cabeza es redondeada en la porción anterior, con un ancho de hasta 13 cm, presenta dos escamas prefrontales y cuatro postorbitales, mientras que en la tortuga verde es corta y prominente en la zona cráneo frontal y su longitud es proporcional (20%) a la longitud del caparazón; las extremidades son relativamente más largas en las tortugas prietas (Pritchard y Mortimer, 2000). Debe anotarse que la tortuga verde tiene diferencias en los intervalos de crecimiento por el área de alimentación (Bjorndal, 2000), con un crecimiento corporal lento debido a un consumo proteico bajo en el hábitat natural (Ross, 2000), su crecimiento reportado en Hawaii es de 1.7 a 2.0 cm anual, no se tienen datos de la tortuga prieta. En fase adulta la tortuga prieta está presente todo el año en la costas del noroeste de México (Península y Golfo de California), donde se alimentan de pastos marinos (ej. *Zostera*, *Thalasia*) y algas (ej. *Gelidium*, *Gracillaria*) de aguas poco profundas (Diez y Ottenwalder, 2000; López, 2000). La zona de desove mas grande de *C. mydas agassizii* es Colola, en las costas de Michoacán, arriban entre agosto y septiembre anualmente (Pritchard, 1997), el desplazamiento es a una velocidad entre 1.4 a 3.6 km/h y nadan de 37.7 a 89.5 km/día, (Wyneken, 1997). Sus huevos miden 4.5 cm y pesan 48 g en promedio (Balazs et al., 1996).

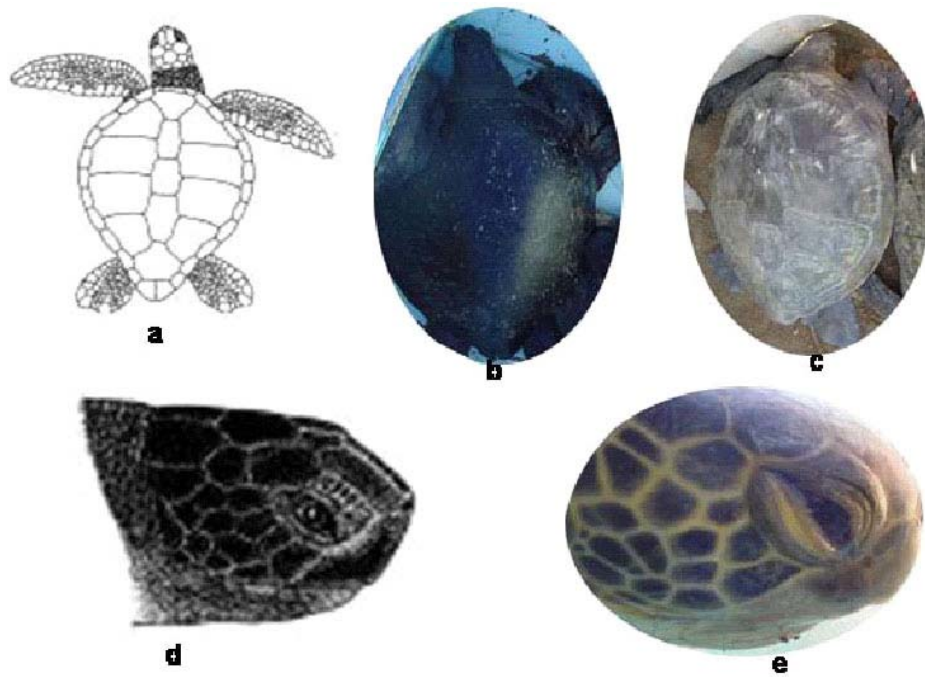


Fig. 1 Características fenotípicas de la tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*). Caparazón oval, aplanado en el perfil anterior, escotadura posterior, cuatro pares de escudos costales y cinco centrales; a, tortuga recién capturada; b, tortuga prieta con mas de 24 hrs fuera del agua; c. La cabeza es redondeada, presenta dos escamas prefrontales y cuatro postorbitales; d, e. La coloración negra puede ser uniforme o presentar un patrón moteado negro con un fondo grisáceo; b,c. Graficos a y d modificado de Pritchard y Mortimer (2000).

1.3 Situación de las tortugas marinas

Aunque en diferentes grados todas las especies de tortugas marinas están en las listas de especies en peligro de extinción, de la *Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources*: IUCN y de la *Convention International Trade Endangered Species*: CITES (US Fish and Wildlife Service, 1997). Lo anterior es fundamentalmente consecuencia de la tradición y costumbre de consumir los huevos y tortugas en cualquier etapa de desarrollo, de la pesca por medio de redes de arrastre las cuales no presentan métodos para la liberación de las tortugas marinas y los asentamientos humanos

habitacionales o industriales en las regiones costeras, con un alto impacto en el hábitat y con aporte de sustancias contaminantes (Lutcavage, 1997).

1.4 Situación de las tortugas marinas en México

En 1927 se inicia la protección de la tortuga marina en México con el artículo 5° del reglamento de pesca, donde se declara la veda de la comercialización y destrucción de los nidos de tortugas marinas. Confirmando lo anterior en 1929 se decreta la veda y se norman las tallas mínimas de captura. En 1964 se establece el Programa Nacional de Tortugas Marinas para la protección, conservación e investigación de las especies de tortugas marinas que arriban al país. La veda total a la comercialización de los huevos de todas las especies se decreta en 1966, creándose el Programa de Protección y Conservación de las Principales Playas de Anidación en Tamaulipas, Michoacán y Colima. En 1967 se amplia este programa a los estados de Oaxaca, Guerrero y Jalisco. De 1971 a 1972 se abre la captura, aprovechamiento y comercialización de tres especies, sin embargo, la sobreexplotación provoca la veda total, reservándose su explotación solo a las Sociedades Cooperativas de Producción Pesquera. En 1973, se establece un régimen parcial de vedas para todas las especies. Se decretan 16 zonas de reserva naturales en 1986. El ordenamiento ecológico se establece en 1988. Es en el Diario Oficial de la Federación del 31 de mayo de 1990 donde se establece una veda total e indefinida de los productos o subproductos de todas las especies de tortugas marinas, incluyendo capturar, molestar, perseguir o perjudicar de cualquier forma. En 1991, con 30 campamentos en 13 estados de la Republica, se ingresa a la convención internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES). En este mismo año, se establece una pena de seis meses a tres años de cárcel a quien capture dañe o comercialice en cualquier forma a las tortugas marinas y mamíferos marinos. En 1992, se crea el Centro Mexicano de la tortuga, en Mazunte Oaxaca, con fines sociales, científicos y tecnológicos. Los excluidores de tortugas marinas en la redes de pesca son obligatorias desde 1993. En mayo de 1994, El Diario Oficial publica y determina las especies y subespecies de flora y fauna terrestres y acuáticas en peligro de extinción, donde se incluye a las tortugas marinas. En 1996, se aumenta la pena de hasta seis años de

cárcel a quien trafique con productos o subproductos de cualquier especie de tortugas marinas (SEMARNAP, 1999). En la actualidad, es un delito federal.

1.5 Patología de la tortuga marina

El estudio patológico sistemático de los animales marinos se inicia a partir de los años 70's (Howard, 1983). Hoy en día, se reconoce un 66% de enfermedades infectocontagiosas transmitidas del los animales al hombre y un 44% de etiologías transmitidas del humano a los animales (Taylor, et al., 2001). Las enfermedades en las tortugas marinas no están del todo descritas, centrándose la atención a las afecciones de mayor impacto visual como lesiones o alteraciones físicas (neoplasias, traumas, infecciones ectópicas), siendo la fibropapilomatosis o fibropapiloma (FP) la de mayor tasa de prevalencia e incidencia y por ende la de mayor estudio (Balazs, 1991; Herbst, 1994; Herbst y Jacobson, 1995). La literatura no reporta eventos importantes de mortalidad de tortugas marinas asociados a procesos infecciosos agudos o subagudos. Los esfuerzos a nivel mundial de recuperación de tortugas marinas enfermas o traumatizadas se encaminan tanto al control de la afección como el aprendizaje de la clínica en estas especies (Walsh, 2000). En la zona de Baja California, se tiene un reporte de varamiento de tortugas marinas por causas no determinadas (PROFEPA, 1998).

Los contaminantes ambientales, pueden alterar fisiológicamente a los individuos afectados y modificar la respuesta inmune (Aguirre et al, 1994a; Duffy, 1994; Lipscomb, 1993; Pelletier, 1986). Las biotoxinas (ej. ácido okadáico, lingbiatoxina A) pueden actuar como causales de intoxicaciones en el género humano, en diferentes grados (Cardellina et al., 1979; Champetier et al, 1998; Silas y Fernando, 1984 ; Yasumoto, 1998), así como inmunosupresores y agentes carcinógenicos (Landsberg, 1995; Noga, 1998; Turner, 1997).

1.6 Oncogénesis

Las teorías de la formación de las neoplasias (oncogénesis) son variadas: oncogénesis somática (cambios tumorales incluidos en el proceso de envejecimiento del individuo,

células somáticas); oncogénesis física (ej. radiaciones ultravioleta, inducen la formación de dímeros entre dos bases de timina vecinas, interfiriendo con la replicación de ADN celular); oncogénesis química (sustancias químicas activas o transformadas metabólicamente, afectan ADN); oncogénesis viral (virus ADN ; se captura el oncogen del genoma viral en el ADN de la célula. Virus ARN, por medio de una transcripción en reversa, logran el efecto de un virus ADN). Se han descrito diversos factores de riesgo: genéticos, infecciones concomitantes y estrés, asociados a la oncogénesis (Butel, 2000; Owens; Prehn, 1997; Yuspa, 2000).

El término tumor se define genéricamente como hinchazón o tumefacción. Las neoplasias, incluyen a un grupo amplio de agentes etiológicos que provocan un crecimiento celular benigno o maligno, no controlado de cualquier tipo de tejido y la diseminación de estas células. A las neoplasias malignas, se les denomina cáncer en forma genérica y se utiliza al igual que tumor para definir el aumento tisular. Para que la neoplasia se presente, el tejido debe pasar por cambios celulares que van desde cambios normales como respuesta a una agresión hasta la pérdida del control de crecimiento y detalle celular. El primer cambio es la hipertrofia (aumento del tamaño celular), que se considera como un mecanismo de compensación celular para reestablecer la actividad normal del órgano o tejido. La hipertrofia puede ser adaptativa (hipertrofia cardíaca por endocarditis valvular) y hormonal (fisiológica: glándula mamaria en lactancia; patológica: hipertrofia endometrial por progesterona o PCB's). El segundo cambio es la hiperplasia (aumento en el número de células conservando su normalidad anatómica y funcional). La hiperplasia adaptativa puede ser fisiológica (nefrectomía, el riñón restante compensa la falta) o patológica (hiperplasia prostática por actividad sexual elevada). La hiperplasia hormonal puede ser fisiológica (glándulas endometriales en gestación y pubertad) o patológica (hiperplasia cortical suprarrenal; síndrome de Cushing). La hipertrofia y la hiperplasia se presentan generalmente simultáneas. El tercer cambio es la metaplasia, en donde se lleva a cabo la sustitución de células maduras de una estirpe por células maduras de otra, se trata de una sustitución no de una transformación, es un mecanismo de protección a una irritación constante (ej. metaplasia escamosa del epitelio respiratorio en fumadores). Estos tres primeros cambios pueden ser reversibles. El cuarto cambio es la displasia, de origen

congénito o adquirido, en donde se pierde el patrón, orientación y uniformidad celular, de origen congénito o adquirido, se determina como proceso preneoplásico, puede ser reversible si el origen es irritativo y éste se elimina. El último cambio se define como anaplasia, es la alteración de las células que modifica su proceso de diferenciación y provoca que adopten un aspecto primitivo e indiferenciado característico de las neoplasias malignas, en donde el mayor grado de indiferenciación se asocia con mayor agresividad e invasividad. La clasificación y nomenclatura de las neoplasias está dada por la estirpe celular involucrada y el comportamiento celular de éstas (benigno, maligno, diferenciado, funcional, etc), existen múltiples características de las neoplasias, pero se encuentran definidas en su gran mayoría por agente etiológico, desarrollo y resolución (Stevens y Lowe, 1995; García Conde-Bru, 1997).

La metástasis es la diseminación de las células neoplásicas a diferentes tejidos del lecho del tumor primario, sea esto por vía linfática o sanguínea, la cual ocurre siguiendo un patrón definido: proliferación progresiva (transformación celular continua) del tumor primario presentada por aporte de nutrientes; vascularización, producida por el factor tumoral de angiogénesis sintetizado por las células neoplásicas; invasión y desprendimiento, logrado por movimiento ameboso de las células y la proliferación de vasos sanguíneos; embolización, alrededor de 0.1% de las células malignas pasan a torrente sanguíneo; implante, asociado con un efecto de tropismo de las células neoplásicas; extravasación, donde las células malignas impactadas en lechos capilares atraviesan la pared e invaden el tejido; evasión de las defensas y proliferación progresiva, las células evaden las defensas corporales del individuo, instalándose y proliferando, llevando a cabo la metástasis (Sschottenfeld and Fraumeni, 1996; Mundy, 2002).

En humanos y animales domésticos en se ha comprobado que el fibropapiloma es causado por un Papilomavirus (Papovavirus), con más de 50 serotipos (Bosch et al., 1995; Nicholls and Stanley, 2000). Provoca lesiones cutáneas, indoloras y en forma de coliflor, entre 2-10 mm, que pueden unirse (coaleser). Histopatológicamente se observa un estroma de tejido conectivo y abundantes vasos de neoformación, ínterdigitaciones del estroma en el epitelio, el cual se presenta normal y continuo, puede observarse la proliferación de la capas excepto

de la basal, se puede presentar hiperpigmentación, cuerpos de inclusión basofílicos intranucleares, vacuolización citoplasmática en el estrato espinoso, núcleo pignótico y queratinización variable (Sschottenfeld and Fraumeni, 1996; Taylor et al., 1999). Las células con núcleos hipercromáticos rodeadas por un halo y con el citoplasma oscuro en la periferia son llamados coilocitos. Las metástasis son hacia órganos con epitelio o mucosas queratinizadas (sistema digestivo y genital), estas inician como lesiones lisas, tornándose rugosas, pueden llegar a desarrollar el aspecto papilomatoso (Stevens, y Lowe, 1995; Beveridge, y Sobin, 1974). En las tortugas marinas, la neoplasia conocida como fibropapiloma, aunque muestra lesiones histopatológicas similares a las descritas anteriormente, no se ha establecido con claridad el agente etiológico, algunos investigadores han descrito la posible participación de parásitos, toxinas y diversos virus.

1. 7 Respuesta inmune

La respuesta inmune en animales superiores parece haber evolucionado de los mecanismos de reconocimiento que permitieron a los organismos multicelulares primitivos distinguir entre lo propio y lo no propio. Estos mecanismos de reconocimiento pueden identificarse en especies marinas tales como estrellas de mar y corales donde parecen colaborar en el mantenimiento de la individualidad biológica y la eliminación de agentes potencialmente patogénicos. En los vertebrados, el reconocimiento de constituyentes no propios del individuo o constituyentes propios modificados (antígenos endógenos o exógenos), se efectúa tanto por mecanismos de defensa no específicos (inmunidad innata) como por mecanismos específicos (inmunidad adaptativa). La respuesta inmune adaptativa a su vez puede operar a través de mecanismos humorales (anticuerpos) como por células inmunes (linfocitos T). Los agentes inductores de la respuesta inmune (antígenos) son presentados por medio de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*: MHC). La intensidad de la respuesta inmune depende tanto de las características del antígeno como extrañeza (en base a su estructura molecular), peso molecular (mayor a 10000 Da), complejidad molecular y estabilidad estructural, como a características genéticas del propio individuo. La primera exposición a una molécula antigénica (respuesta primaria), la respuesta inmune humoral presenta una fase latente

(alrededor de una semana) en la que no se detectan anticuerpos específicos, demostrándose una concentración máxima entre los 10 y 14 días posterior a la infección o inoculación. En la respuesta inmune celular (ej. en los trasplantes) se observa una situación similar en el rechazo primario de injertos. La fase latente es utilizada por el individuo para captura y procesamiento (presentación) del antígeno por medio de células fagocíticas (macrófagos, células dendríticas y células B). Este procesamiento produce la formación de anticuerpos específicos por células plasmáticas en contra del antígeno inductor y la generación de células de memoria derivadas de linfocitos B encargadas de la respuesta inmune humoral, o la producción de linfocitos T citotóxicos y células NK y linfocitos T de memoria, encargados de la respuesta inmune celular. En la respuesta inmune secundaria estos cambios provocan el acortamiento del periodo de latencia a no más de tres días y que la concentración de anticuerpos sea más alta produciendo una inmunidad a largo plazo por semanas, meses o años (William, 1999; Tizard, 1995).

Los vertebrados poseen una respuesta inmune con especificidad y memoria, capaz de actuar en forma rápida y eficaz ante un estímulo antigénico (Abba, 1994). Los reptiles, aves y anfibios, además de la producción de inmunoglobulina M (IgM), producen una inmunoglobulina Y (IgY), homóloga de la inmunoglobulina G (IgG) de los mamíferos (Origi et al., 2001; Chiou, 2002). En la tortuga verde se ha observado una respuesta inmune del tipo humoral y celular (Herbst y Klein, 1995; Work et al., 2000). La incapacidad de responder adecuadamente a ciertos agentes infecciosos puede deberse tanto a factores genéticos asociados a una mayor susceptibilidad así como a agentes ambientales capaces de deprimir la respuesta inmune (Larski, 1998; Ross, 1996), con la consecuente incapacidad para responder a factores externos e internos que generalmente no deberían afectar al individuo (Guise, 1997; Repetto, 1996). Las tortugas marinas enfermas disminuyen hasta 50% de sus actividades anatomofisiológicas (Brill et al., 1995), lo cual pudiera facilitar su captura.

1. 8 Inmunopatología de los tumores

La respuesta inmune celular se considera responsable de la detección y eliminación de patógenos intracelulares, inaccesibles a factores humorales, La autoinmunidad es una manifestación de respuesta inmune exagerada contra antígenos propios, en tanto que el rechazo de injertos es el resultado de una respuesta agresiva en contra de antígenos extraños, en este mismo sentido una infección se hace crónica debido a una respuesta inmune insuficiente o no efectiva y el desarrollo de cáncer se ha asociado a un sistema inmune parcialmente afectado.

Individuos inmunosuprimidos por cualquier causa, incluyendo los transplantados, desarrollan neoplasias. La respuesta inmune celular antitumoral está asociada a las células asesinas naturales (Natural Killer; NK), linfocitos T citotóxicos y macrófagos activados. Las NK no necesitan sensibilización previa, liberan factores citotóxicos (TNF-alfa) y una perforina. La producción de interleucinas (IL-2, IL2R), aumentan su actividad citotóxica (células asesinas activadas por linfocinas: LAK), previniendo su muerte (IL3) o estimulando su función e intensificando su actividad (IL4). Los macrófagos activados por interferón liberan factores antitumorales (arginasa, reactivan metabolitos de oxígeno), pueden intensificar la producción de IL-1 o factor de necrosis tumoral (TNF) que estimulan a las células T cooperadoras (CD4+), aunque, la forma de la eliminación de las células tumorales *in vivo* aun no es clara.

La respuesta inmune antitumoral ha sido extensivamente investigada en individuos con cáncer y en animales de experimentación. En general se considera que existen al menos tres tipos de antígenos reconocidos por el huésped inmunocompetente: péptidos asociados al tumor restringidos por moléculas MHC compartidos por tumores histológicamente distintos y ausentes en tejido normal; antígenos específicos de diferenciación; antígenos únicos generados por mutación de punto en genes que regulan funciones celulares clave.

Los antígenos asociados al tumor son reconocidos por las células inmunes del huésped, como lo demuestra la respuesta mediada por anticuerpos y por células inmunes tanto en

humanos como en animales de experimentación. Una respuesta inmune celular efectiva debiera atacar a las células tumorales y limitar su proliferación, posiblemente debido a un sistema de vigilancia que detecta y elimina clonas de células neoplásicas de reciente aparición. Sin embargo, la respuesta inmune generada en contra de estos antígenos parece ser no efectiva en la eliminación del tumor, los antígenos carcinoma embrionario y la alfa fetoproteína no son reconocidos por linfocitos CD4+ ni por células CD8+. Por ello, se considera que los antígenos asociados al tumor son no inmunogénicos o débilmente inmunogénicos.

Las causas por las cuales los tumores evitan esta “vigilancia inmunológica” son diversas. Ciertos tumores malignos secretan el factor inhibidor de la activación de los macrófagos. Neoplasias de tipo linfocito del tipo B, al parecer suprimen la formación de anticuerpos, en tanto las de linfocitos T suprimen la respuesta inmune celular. Las tumoraciones provocadas por sustancias químicas, pueden secretar factores inmunosupresores (prostaglandinas). Los factores bloqueadores incluyen también anticuerpos antitumorales que no fijan complemento, enmascarando los antígenos tumorales, evitando así la acción de las células T citotóxicas (William, 1999; Tizard, 1995).

Algunas células pueden evadir la vigilancia a través de la modulación antigénica, en tal forma que las células tumorales pierden antígenos (histocompatibilidad, grupos sanguíneos) o ganan antígenos (antígeno carcinoma embrionario, alfa-fetoproteína). Los tumores inducidos por oncovirus ganan antígenos característicos del virus inductor (leucemia viral felina, Marek) principalmente. Las neoplasias inducidas por métodos químicos, llevan antígenos de superficie distintivos de la neoplasia no de la sustancia. Aunque tumores inducidos por una misma sustancia química pueden presentar en la misma masa tumoral subpoblaciones antigénicamente diferentes (Tizard, 1995).

Las células tumorales parecen ser responsables de la inmunosupresión en pacientes con cáncer. Existen varios reportes sobre la existencia de factores inmunosupresores producidos por el tumor y no por el tejido normal en humanos, algunos de estos factores han sido purificados parcialmente y han sido incluidos dentro de las citocinas, péptidos virales y

metabolitos normales sobre expresados. Esto parece ser cierto en el caso de los linfocitos infiltrantes del tumor en humanos (TIL), células T CD3+, con proporciones variables de células T citotóxicas CD8+ y células T cooperadoras CD4+. Estas son principalmente células T de memoria CD45RO+, sin embargo las TIL son pobremente respondedoras posiblemente por su interacción con factores tumorales inmunosupresores (Zbar et al., 2002).

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Fibropapilomatosis en tortugas marinas

El porcentaje de mortalidad por causas naturales: infecciosas y no infecciosas, no ha sido documentado en las tortugas marinas (Ross, 2000; Lutcavage, 1997). Si bien, en éstas se han aplicado diversos métodos diagnósticos de uso cotidiano para otras especies: análisis hemáticos (Aguirre, 1998^{a,b}; Work y Balazs, 1999); parasitología, bacteriología (Herbst, 2000); prueba mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*: PCR) (Aguirre, 1998; Lu et al., 2000; Castelán, 2004); inmunoensayos enzimáticos (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*: ELISA) (Gracsyk et al., 1995); técnicas inmunológicas específicas para la detección de agentes patógenos, dirigidas principalmente a los asociados a FP (Herbst y Klein, 1995); cultivo celular de otras especies animales, así como el desarrollo de líneas celulares de tortuga marina, específicamente de *Ch. mydas* (Melody et al., 1997; Lu et al., 1999; Work et al., 2001); estudio del metabolismo oxidativo (Valdivia, 2003) y de contaminantes ambientales (Gardner et al., 2003; Juárez, 2004), no se han obtenido estadísticas confiables para poder entender con mayor claridad la interrelación de esta patología con la estructura del ecosistema (Bjorndal, 2000). Aún en la zona de mayor incidencia de FP en tortugas marinas, Bahía Kaneohe, Hawai (Balazs, 1991), el reporte de Lu et al. (2000) indica la presencia del virus asociado al FP (Green Turtle Fibro Papilloma: GTFP) en diversos órganos de peces arrecifales sin manifestación del FP los individuos portadores del virus.

En la literatura internacional existen reportes a partir de 1938 sobre FP (Smith y Coates, 1938). Se ha estimado una prevalencia de entre el 1.4% hasta el 90% en diferentes zonas geográficas. El tumor primario de FP es reportado en el tercer párpado, posteriormente se disemina manteniendo un orden; zona periocular, cuello, hombros, boca, cloaca, caparazón y apéndices externos. Tiene aspecto de coliflor, es de diferente forma y tamaño y muestra un comportamiento metastásico de hasta el 30%, afectando hígado, riñón y bazo principalmente (Aguirre et al., 1998; Herbst et al., 1994, 1999; Lu et al., 2000; Swimmer, 2000; Williams et al., 1994). La severidad de FP ha sido clasificada de forma relativa,

basándose en su tamaño y en la apreciación visual, determinándola el prosector (Work y Balazs, 1999; Aguirre y Balazs, 2000). Esto sugiere la necesidad de hacer una reevaluación histopatológica, para su estricta caracterización basándose en los cambios de sus componentes celulares y anatomopatológicos involucrados de la neoplasia.

El FP se ha reportado en todas las zonas de anidación masiva, incluyendo México (Oaxaca) en una tortuga *L. olivacea* (Quackenbush et al., 2001). Se ha considerado que las lesiones neoplásicas en tortugas marinas representan una sola entidad patológica, sin embargo, el FP se relacionado con afección por diversos agentes causales: *Herpes virus*, *Retrovirus* y *Papiloma virus* (Herbst et al., 1995,1999; Casey et al., 1997; Yu, 2001), biotoxinas marinas (Landsberg, 1996), metales pesados (Repetto, 1996), parásitos y cicatrización (Aguirre, 1998, Herbst, 1994). Los estudios histopatológicos de tumores en las tortugas marinas en diferentes partes del mundo (Aguirre et al., 1999; Herbst, 1994), reportan cúmulos uniformes de proliferación celular fusiforme (fibroblastoide) de origen mesenquimal, acantosis, hiperplasia del estrato espinoso y basal (10-15 capas celulares), con presencia de hiperqueratosis ortoqueratótica en forma papilar, núcleos con cuerpos de inclusión, células fusiformes en forma linear paralelas a la dermis, vacuolización citoplasmática, cambios reportados en papiloma y fibropapiloma en humanos y especies animales domesticas (Beveridge y Sobin, 1974). De igual forma se reportan como cambios asociados a FP, la necrosis central de la neoplasia, donde la infiltración linfoide en el estrato basal se asocia a una dermatitis crónica y al fenómeno de regresión tumoral (Aguirre et al., 1994 a,b, 1999). Diferencias en hemodinamia, hematocrito y niveles séricos de diversos componentes, la hipoproteinemia, hipocalcemia, hipolipemia, leucopenia, linfopenia, eosinopenia, heterofilia, neutrofilia, anemia y el incremento de glucocorticoides y lactato, se han observado en los individuos afectados por la neoplasia, tanto en vida libre como mantenidos en cautiverio (Work y Balazs, 1999; Aguirre et al., 1998; Aguirre y Balazs, 2000; Swimmer, 2000). Work et al. (2001) no encuentra diferencias significativa en el estado inmunológico celular y humoral de las tortugas en presencia o ausencia de FP, por lo que no considera un estado de inmunodepresión como prerequisite para la presencia de esta neoplasia. Sin embargo si se ha reportado una asociación positiva entre la presencia de FP y el largo recto del caparazón (LRC) (Aguirre et al., 1998; Landsberg et al., 1999).

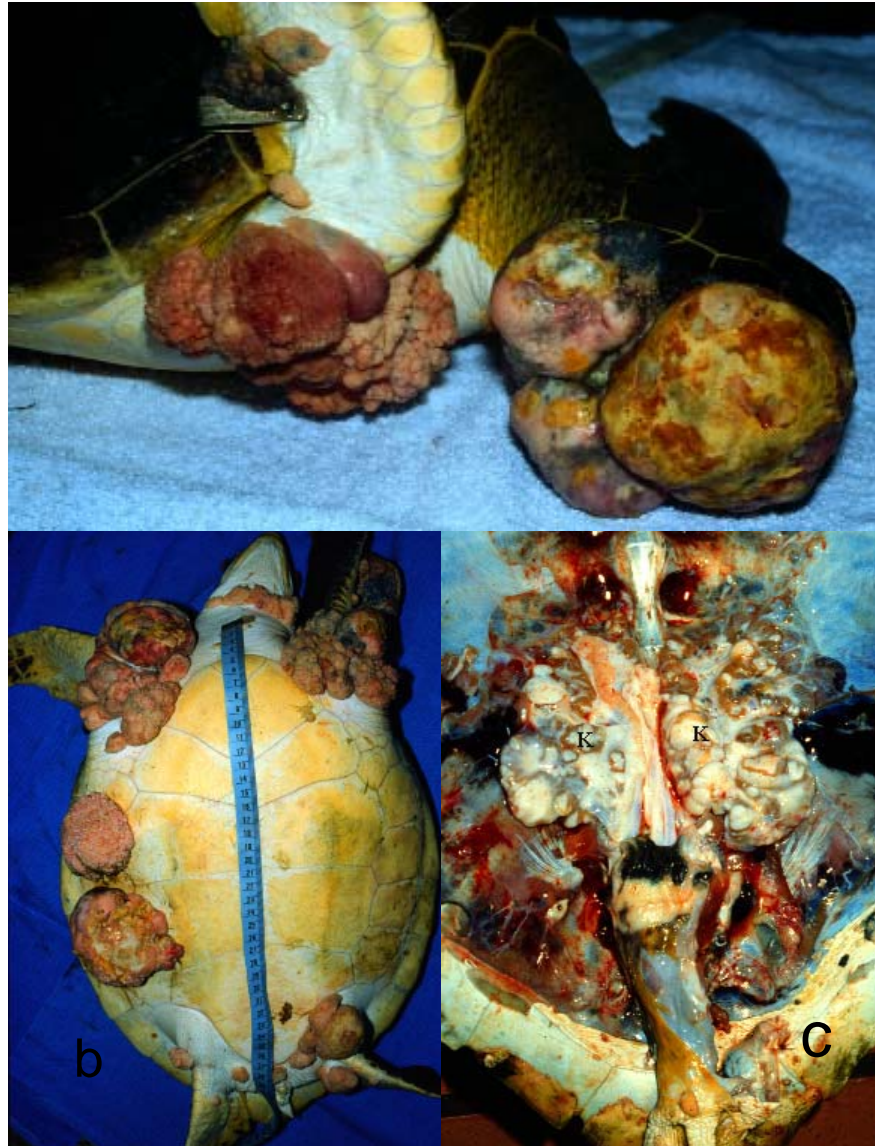


Fig. 2 Fibropapiloma en tortugas marinas. La neoplasia es de tamaño variable, se presenta en ojo, boca y apéndices(a,b). Presencia de metástasis en riñón (c). Fotos modificadas de la página web del College of Veterinary Medicine, Florida University: www.vetmed.ufl.edu/sacs/wildlife/photos/GTFibro.

2.2 Herpes virus de la tortuga verde (Green Turtle Herpes Virus: GTHV)

El genero viral *Herpes virus* (HV) ha sido aislado hasta en un 95% de las tortugas marinas de vida libre con FP y de forma experimental reprodujo la neoplasia (Herbst et al., 1994, 1999). El HV, perteneciente a la subfamilia alfa, también se ha asociado a enfermedades tales como “enfermedad de pulmón-ojo-tráquea” (*lung-eye-trachea*; LETD) y “enfermedad de la mancha gris” (*grey patch disease*; GPD) en tortugas marinas (Curry et al., 2000; Lauckner, 1985), en “la enfermedad del tracto respiratorio superior” en tortugas terrestres y ermitañas del mediterráneo (Orrigi et al., 2001; Lu et al., 2000). El ADN viral encontrado solo en los tumores viscerales de tortugas marinas con FP externo e interno, tiene una similitud del 53% con el HV de rinotraqueitis viral bovina (BHV-1) y de pseudorabia (Aujezky), así como un 59% de homología con el Herpes simple tipo 1 (HSV-1) y un 55% con el virus de la enfermedad de Marek (Gallid-HV2), 48% con mononucleosis viral (Epstein Barr) y 46% con el virus del sarcoma de Kaposi (KSHV) (Lackovich et al, 1999; Quackenbush et al, 1998, 2001; Yu et al, 2001). En *Ch. mydas agassizii* sin FP cutáneo se reporta un herpes virus con 75% de similitud con el herpes bovino 2 (HPV-2) (Castelán, 2004).

En *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* con FP, se secuenció una región interior del gen herpesviral, y difirieron en uno de 61 aminoácidos (Lackovich et al., 1998). Estas etiologías mantienen antigenicidad cruzada, situación que complica el diagnóstico del HV asociado a la fibropapilomatosis de la tortuga verde (GTFP), dado que los anticuerpos contra éste, solo se han encontrado en la manifestación clínica de la neoplasia (Coberley et al., 2001). El Herpes virus de la tortuga verde (GTHV) sobrevive en el agua marina 96 horas (Curry et al., 2000) y por inoculación provoca agregados en líneas celulares de tortuga marina (Lu et al., 1999).

2.3 Parasitos

Las infecciones parasitarias mixtas y/o simples, por huevos y/o por formas adultas de trematodos de la familia Spirorchiidae son comunes en los diferentes géneros de las

tortugas marinas y en diferentes zonas geográficas del mundo: Australia, *Ch. mydas* (Cribb and Gordon, 1998), Puerto Rico, *Ch. mydas*, *D. coriacea*, *E. imbricata* (Dyer, 1991, 1995a, 1995b, 1995c; Rand y Wiles, 1985), incluyendo el suroeste, noroeste y noreste de México (Caballero et al., 1950, 1962, Cordero et al., 2004, Inohuye et al., 2004; Pérez, 1996). La infección parasitaria llega a prevalecer hasta en un 95% de las tortugas examinadas en eventos de varamientos y mortalidad (Dailey, et al., 1991, 1993; Gordon et al., 1998; Sey, 1977).

Los huevos de este género miden entre 167 y 213 μ y en general se encuentran dentro de los vasos sanguíneos o pueden romper éstos con su consecuente salida al parénquima. El estado adulto del parásito se recupera de las cámaras cardiacas (Glazebrook et al., 1981, 1990; Dyer et al., 1991; Rand y Wiles 1985; Caballero, 1955). La infestación por huevos y tremátodos adultos provocan hemiplejía (Kinne, 1985), fluido mucoide en boca y nariz, taquipnea, consolidación tisular, áreas de pigmentación, nódulos, trombosis, degeneración de la grasa y del tejido subcutáneo, ascitis, degeneración muscular, edema subcutáneo y pulmonar, hidropericardio, poliserositis miliar, aneurismas, endocarditis, trombosis (Aguirre, 1998; Glazebrook, 1989; Gordon, 1998; Dyer, 1991; Rand, 1985). Las lesiones microscópicas más comunes son granulomas e infartos, edema perivascular, proliferación papilar de la capa íntima en vasos, endocarditis necrótica, vacuolización e hinchazón de las células endoteliales, hemosiderosis y gránulos de hemosiderina (citoplasma de hepatocitos, epitelio alveolar y en las células de la pulpa roja). La hemosiderosis y los gránulos de hemosiderina se han asociado a una infección crónica y a una anemia hemolítica (Glazebrook, 1981, 1989; Gordon, 1998; Dyer, 1991; Raidal, 1998; Rand, 1985).

La respuesta inflamatoria en contra del parásito se caracteriza por la presencia de células epitelioideas, infiltrado linfocitario, tejido fibroso y células gigantes a cuerpo extraño. Algunos autores asocian la severidad de ésta respuesta a la cantidad de huevos presentes en la lesión, mayor a 50, respuesta granulomatosa severa; menor de 20 baja; de 2 a 3 junto al vaso nula (Glazebrook, 1981, 1989; Rand, 1985), por el contrario, Gordon et al. (1998) encontró similar severidad en presencia de uno o hasta 200 huevos. En el 94% de las tortugas marinas que manifiestan FP, se observan huevos de trematodos asociados

(Aguirre, 1998). Graczyk et al. (1995), mediante la técnica de ELISA desarrollada para la detección de tremátodos Digenea: *Spirorchidae* (*Learedius*, *Hapalotrema* y *Carettacola*), observó variación en los títulos de anticuerpos anti parásito según el origen geográfico, mas aún, el 58% de las tortugas negativas a la prueba, presentaron FP. El ciclo biológico del parásito es aún desconocido, la infección puede estar asociada al cambio de dieta en las tortugas marinas de carnívora a herbívora entre los 30 a 40 cm de LRC, por la ingestión de invertebrados (camarones, moluscos, briosoarios, pronocéfálicos) que se encuentran en huevos de peces o adheridos a la vegetación que ingieren las tortugas marinas, manteniendo la cercaria latente o viva (Aguirre, 1998; Aznar, 1998; Cribb, 1998; Glazebrook, 1989; Pérez, 1996; Raidal, 1998).

2.4 Bacterias

Los huevos de parásitos han sido asociados a transporte de bacterias: *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp*, *Moraxella sp* (Raidal, 1998) y *Pseudmona fluorescens* (Glazebrook, 1989). En la literatura internacional existen reportes de etiologías bacterianas en tortugas marinas, en donde se han aislado por métodos convencionales diversos tipos de bacilos y cocos, Gram positivos y Gram negativos. Los principales géneros bacterianos reportados están clasificados como Gram negativos y dentro del grupo de las enterobacterias. Estos han sido aislados de diferentes órganos de tortugas marinas clínicamente sanas mantenidas en cautiverio, así como las que presentan lesiones o que manifiestan enfermedad. Los géneros reportados son: *Aeromona hydrofila*, *Arizona sp*, *Edwardsiella sp*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Mycobacterium sp*, *Flavobacterium sp*, *Proteus sp*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putrefaciens*, *Salmonella sp*, *Vibrio alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *Streptococcus* no hemolítico. (Aguirre et al., 1994 b; Glazebrook y Campbell, 1990; George, 1997; Wiles y Rand, 1987). Todos estos géneros bacterianos son potencialmente patógenos para humanos y para especies animales marinas ((Howard, 1983) y terrestres (Acha, 2001). Se ha reportado en sueros de tortugas marinas (*Ch. mydas*) la presencia de anticuerpos en contra de *Clamydia* (Aguirre et al., 1994 b).

2.5 Transmisión

En el caso de etiologías infecciosas, la transmisión en tortugas marinas puede asociarse al contacto directo, como ocurre en los territorios de pastoreo, donde los machos utilizan mordidas en cara, cuello, aletas y zona perianal, durante el apareo y como defensa contra otros machos de la zona (Alvarado y Figueroa, 1990; Crowell, 1987). La manifestación clínica de los agentes infecciosos, es facilitada por factores estresantes internos y externos; factores fisiológicos (hormonal; apareamiento, migración) y ambientales (hábitat, temperatura, alimentación, contaminación), que dependerán de la zona geográfica en donde se encuentren las tortugas (Coberley, 2001). Los vectores participantes en la diseminación de agentes infecciosos se encuentra en estudio, por ejemplo, peces en simbiosis con las tortugas marinas que comen (limpian) los organismos adheridos a la superficie corporal de éstas, muerden los tumores cutáneos cuando están presentes y continúan su proceso en los diferentes individuos del grupo presente (Lu et al., 2000c) y de los cuales se ha aislado GTHP (Lu et al., 2000).

La urbanización o modificación del medio ambiente (tierras para cultivo y explotaciones animales para consumo humano), lleva a tener mayor contacto o interacción entre los animales de vida libre y su microbiota (flora bacteriana, parasitaria, viral), con los animales domésticos (de compañía o de producción) y con el ser humano, con la consecuente transmisión y posible mutación de estos microorganismos en las transmisiones entre los organismos de la misma o de diferente especie (Taylor et al., 2001).

2.6 Biotoxinas marinas

Las biotoxinas marinas son producidas principalmente por microalgas (ej. dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias). Su transmisión esta dada por la redes tróficas, los principales vectores son los organismos filtradores (moluscos bivalvos: almejas, ostras, etc), así como peces, gasterópodos, crustáceos pueden actuar como transvectores. Se clasifican según la sintomatología en el humano en cinco tipo de síndromes: Envenenamiento Paralizante por Consumo de Mariscos (Paralytic Shellfish Poisoning: PSP); Envenenamiento Diarreico por

Consumo de Mariscos (Diarrhetic Shellfish Poisoning: DSP); Envenenamiento Amnésico por Consumo de Mariscos (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP); Envenenamiento Neurotóxico por Consumo de Mariscos (Neurotoxic Shellfish Poisoning: NSP) y Envenenamiento Ciguaterico por Consumo de Mariscos (Ciguatera Fish Poisoning: CFP) (Yasumoto y Murata, 1993; Yasumoto, 2001).

Por otra parte, desde el siglo XVII se han registrado en diversos países del mundo casos de envenenamiento debido al consumo de tortugas marinas; principalmente por las especies *Ch. mydas*, *E. imbricata* y *D. coriacea* (Halstead, 1959, 1968; Hashimoto et al., 1967; Hashimoto, 1979; Silas y Fernando, 1984; Ranaivoson et al., 1994). Los síntomas de la intoxicación incluyen náusea, vómito, diarrea, dolor intenso de estómago, disnea, taquicardia, dolor de cabeza, vértigo, fiebre, halitosis, adormecimiento de los labios, boca y lengua, ulceración en la boca y lengua con fisuras y blanqueamiento, dificultad para deglutir, en casos graves se presenta además hipersalivación, decaimiento, sueño y muerte. Este cuadro clínico fue caracterizado y nombrado como el “síndrome del Chelonotoxismo” por Halstead (1968). Recientemente Yasumoto, (1998) describió a la lingbiatoxina A, (una toxina previamente descubierta en la cianobacteria *Lyngbya majuscula* por Cardellina et al., 1979) como la causa de intoxicaciones por ingesta de tortugas marinas en Madagascar (Champetier de Ribes et al., 1997) y que provoca la patología descrita (Ito et al., 2002). En Hawai y Japón esta cianotoxina ha sido asociada como el agente causal de “la dermatitis severa del bañista” (Mynderse et al., 1977; Cardellina et al., 1979; Hashimoto, 1979).

Otra toxina que recientemente detectada en hígado y riñón de tortugas marinas de Hawai es el ácido okadáico (AO) es una toxina polieter, lipofílica, perteneciente al síndrome DSP y producida por dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*, la cual ha sido asociada a FP en dichas tortugas (Landsberg et al., 1999). El AO en exposición crónica ha sido descrito en ratones y ratas como promotor del desarrollo de carcinomas cutáneos y papilomas, hiperplasia adenoide, y adenocarcinomas en la zona glandular gástrica (Fujiki et al., 1985; Fujiki y Suganuma, 1993). También, la exposición crónica de lingbiatoxina A, promueve la formación de tumores en ratones (Fujiki et al., 1981, 1984 a,b,).

La evaluación de Arthur et al. (2001; 2002) de *L. majuscula* en la dieta de la *Ch. mydas* (de Hawai y Australia). Determinando que la cianobacteria es un componente variable de la dieta de la tortuga verde, su consumo puede ser de hasta 41 µg de lingbiatoxina A y 125 µg de debromoaplisitoxina por día, lo cual puede estar asociado a FP.

En México se desconoce la presencia de toxinas marinas, en tortugas marinas y su posible relación con la FP. Así como, el impacto real en la salud pública, sin embargo se tienen registros históricos de intoxicación por consumo de tortuga marina desde 1740 (Chevallier y Dúchense [1851] citados por Strainchamps, 2000). En Bahía Magdalena, los pescadores describen que el consumo de *E. imbricata* y en ocasiones el consumo de hígado de *Ch. mydas* les "cae pesado", provocándoles dolor de estómago y diarrea por tres días.

2.7 Contaminación

Estudios de contaminación realizados en el Golfo de California, no revelan una distribución uniforme ni una presencia constante o estable de sustancias contaminantes (PEMEX, 1991). Algunas especies de bivalvos nativos han sido estudiadas como posibles bioindicadores de contaminantes marinos, pero no se han obtenido datos que sustenten su confiabilidad (Gutiérrez, 1999). Debe mencionarse así mismo, la posibilidad de encontrarse diferencia en los resultados en estudios similares tales como lo observado por Gardner et al. (2003) que encuentra en diferentes órganos de tortugas marinas, 17 congeneres de PCB's, en tanto que Juárez (2004), en un estudio paralelo en la misma zona no encuentra tales, pero si 10 compuestos organoclorados.

Fitzgerald (2004), encuentra la presencia y niveles elevados de metales pesados (Fe, Cd, Ni, Cu, Zn, y Mn) en cuatro especies de tortugas marinas, incluyendo a la tortuga prieta, de diferentes zonas de Baja California Sur. Una fuente importante de estos elementos son las formaciones geológicas, como la de San Gregorio ubicada en La Paz, BCS, de donde se extrae fosforita utilizada como fertilizante agrícola, la cual es también rica en elementos como cadmio y arsénico. Méndez et al., (1998) reportan niveles de cadmio de hasta 32 ppm en sedimentos vecinos a esta zona. En la península de Baja California existen reportes

donde se mencionan niveles anómalos de cadmio en diferentes individuos de la cadena trófica; en sedimentos (Méndez et al., 1998), mejillones (Villaescusa et al., 1991) plankton (Martín y Broenkow, 1975) e insectos (Cheng et al., 1976). Con respecto a la contaminación por plomo, se han reportado concentraciones que fluctúan entre 0.04 y 6.7 ugPb/g en peso seco de almeja *Chione californiensis*, (Pérez et al., 1993), siendo el límite permisible establecido por la OMS de 1 ugPb/g para bivalvos. En Ballenas varadas en la costa de Baja California Sur, no se han detectado altos niveles de metales (Méndez et al., 2002), por lo que un factor importante debe ser la permanencia de los organismos en estas costas.

2.8 Tortugas en Baja California Sur

La tortuga prieta (*Ch. mydas agassizii*) es un habitante común de las costas de BCS (Pritchard, 1997; Pritchard y Mortimer, 2000). Bahía Magdalena, es conocida como una zona importante para la alimentación de la tortuga prieta durante todo el año (López, 2002), calculándose para ésta una tasa mínima de mortalidad de 47 tortugas por mes (564 por año), sin evidenciarse las causas patológicas de las mismas (Gardner y Nichols, 2001).

En el estado de Baja California Sur (BCS) no existen estudios de la presencia de etiologías infecciosas en tortugas marinas, tal como han sido descritas en otras entidades del país y a nivel internacional (Quackenbush, 2001). El desconocimiento específico de los agentes causales de enfermedades en las tortugas marinas puede deberse a una falla en el proceso diagnóstico o a la falta de un esfuerzo constante para su identificación. Por tal motivo, consideramos de interés conocer los agentes infecciosos o no infecciosos (Jacobson, 1996; Lutcavage, 1990) específicos de la zona de Bahía Magdalena, potencialmente patógenos para la tortuga negra y las posibles zoonosis que de ella puedan derivarse (Eckert, 2000; Taylor et al., 2001).

3.0 HIPOTESIS

Si la tortuga marina *Chelonia mydas agassizii* de Bahía Magdalena es afectada por agentes etiológicos, infecciosos y no infecciosos asociados a fibropapilomatosis, entonces la evaluación histopatológica, serológica, bacteriológica, parasitológica y toxicológica de las tortugas recuperadas muertas por pesca incidental revelara la presencia de fibropapilomatosis a nivel clínico o subclínico.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de agentes infecciosos y no infecciosos, relacionados o no al fibropapiloma en la tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*) de Bahía Magdalena, Baja California Sur, México.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En cada uno de los tejidos recuperados de la tortuga prieta:

- 1.-Caracterizar y clasificar las lesiones histológicas encontradas.
- 2.-Determinar la microbiota aerobia de boca, ojo y cloaca.
- 3.-Determinar la presencia de etiologías virales.
- 4.- Determinar la presencia de ácido okadáico y lingbiatoxina A.
- 5.- Determinar la presencia de hemoparásitos Trematodos: Spirorchidos.

5.0 ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Se visitó mensualmente, de Marzo a Noviembre del 2001, el puerto pesquero Magdalena y puerto Alcatraz en la Isla Margarita, ubicadas en el complejo lagunar de Bahía Magdalena en BCS, al noroeste de México, 24° 15'N a 25° 20'N y 111° 30' y 112° 15' O (Gardner y Nichols, 2001), con una temperatura promedio de 22.5 °C con una máxima de 28 °C y una mínima de 19 °C (López, 2002) y en una ocasión Bahía de los Ángeles, Baja California (BC), 28° 58'N a 113° 33' (Resendiz y Nichols, 2002). Puerto Magdalena, nuestra principal área de estudio tiene una población constante de alrededor de 27 familias, todas ellas se dedicadas a la pesca artesanal por medio de redes, trampas y buceo.

5.1.1 Alimentación de la tortuga prieta en Bahía Magdalena

La dieta de la tortuga marina en el complejo insular de Bahía Magdalena, es variada y dependiente de la zona en donde pastorea. En el Pacífico (sustrato rocoso), predomina el pasto marino *Phyllospadix torreyi*, y diversas algas que habitan sustratos duros y de alta energía como *Gelidium robustum* (alga roja), *Pterocladia capillacea* (alga roja) y *Codium simulans* (alga verde). En Bahía Magdalena, por el contrario, hay una gran variedad de algas de sustratos arenosos y también del pasto zosteraria marina que es el de mayor abundancia. El consumo principal de las tortugas prietas es de algas rojas carnosas como; *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria Pacifica* e *Hypnea johnstonii*, y en menor grado de *Zostera* y *Codium amplivesiculatum* (alga verde). En la zona de manglares, predominan las algas de ambientes arenosos y epifitas que se unen a esponjas y conchas presentes en el fondo, las principales especies que consume en invierno y primavera son *Codium amplivesiculatum* y el alga roja *Gracilaria textorii* (López, 2002).

5.2 ORGANISMOS

Se muestran un total de 53 tortugas marinas *Ch. mydas agassizii* con un rango de largo recto de caparazón de entre 40 y 60 cm. De estas, 44 murieron por pesca incidental en Bahía Magdalena, BCS. Nueve tortugas mantenidas en cautiverio en el campamento tortuguero “Archelon” en Bahía de los Ángeles, BC, fueron evaluadas exclusivamente en estudios hematológicos y bacteriológicos.

5.3 TOMA DE MUESTRAS

5.3.1 Muestras hemáticas

La vena yugular externa, de 32 individuos muestreados, se localizó a ambos lados de la línea media del cuello entre 1/3 y 1/2 de la distancia entre la zona occipital y el borde anterior del caparazón, de 0.5 a 2 cm. de distancia a la línea media. Se introdujo la aguja en un ángulo de 90° con respecto al cuello. Se emplearon por cada tortuga tres tubos Vacutainer; uno sin anticoagulante (5ml) y dos tubos con anticoagulante, uno con heparina de sodio (5 ml) y uno con heparina de litio (3 ml). (Owens, 2000; Wibbels, 2000; Dutton, 1996).

5.3.2 Muestras bacteriológicas

Con hisopos estériles humedecidos en solución salina estéril se muestreo boca (paladar, nasofaringe y comisuras) y ojo (conjuntiva) esto con movimientos circulares y girando el hisopos en la superficie, en la cloaca se introdujo lentamente el hisopo húmedo girándolo en un sentido. En los órganos obtenidos de 24 especímenes, se esterilizó la superficie colocando una espátula al rojo vivo, posteriormente se realizó un corte en cruz con tijeras flameadas, en ese corte se introdujo en diferentes direcciones un hisopo estéril. Los hisopos se almacenaron durante la estancia en la Isla (entre 3 a 7 días), cada uno dentro de una bolsa de plástico y en hielo.

5.3.3 Necropsia

5.3.3.1 Inspección externa:

El cadáver se analizó cráneo-caudalmente y latero-lateral en la posición decúbito ventral y decúbito dorsal, sucesivamente. Tomando como base las características físicas normales de las tortugas marinas (Rainey, 1981; Wyneken, 2001; Work, 2000), se identificaron en el cadáver los cambios externos, tales como: autólisis, estado nutricional, integridad corporal, presencia de nodulaciones, parásitos, excoriaciones, lesiones infecciosas, traumas o marcas de identificación. Las muestras hemáticas se tomaron directamente del corazón

5.3.3.2 Inspección interna:

La necropsia de 16 tortugas prietas en Bahía Magdalena, se efectuó siguiendo la metodología de Rainey (1981) y Work (2000), llevando un orden sistemático y secuencial para la inspección y toma de muestras de órganos y tejidos externos e internos. Se colocó a la tortuga en posición decúbito dorsal. Se incidió con un cuchillo en la unión del plastrón con el caparazón y se continuó el corte siguiendo el perímetro del plastrón, se disecaron los ligamentos de las masas musculares pectorales y pélvicas unidas a éste para su total separación. Se cortó la piel del cuello longitudinalmente en línea media ventral, para la exposición de esófago y traquea. Los órganos internos se analizaron conforme su presentación anatómica. Adicionalmente, se obtuvieron muestras de algunos tejidos internos de 28 especímenes diferentes, los cuales fueron recuperados y facilitados por pescadores de la isla.

Dependiendo de la conservación de los órganos (fijados o no en formalina al 10%), fueron destinados para análisis histológico, bacteriología, parasitología, inmunología y pruebas biológicas para la demostración de biotoxinas marinas. De Bahía Magdalena se recuperaron de 44 especímenes 197 tejidos, 51 hisopos para bacteriología, 22 muestras sanguíneas. De nueve tortugas mantenidas en cautiverio en el campo tortuguero ejidal Archelon (Bahía de

Los Ángeles), se obtuvieron nueve muestras hemáticas y 27 muestras para bacteriología (hisopos oculares, orales y cloacales). El total del número de muestras por tejido obtenidos en este estudio es el siguiente: 22 de riñón, 30 de hígado, 19 de músculo esquelético, 19 de pulmón, 18 de intestino, 15 de piel, 15 de corazón, 14 de bazo, 7 de estómago, 7 de traquea, 5 de páncreas, 5 de grandes vasos, 4 de esófago, 2 de vejiga, 2 de cerebro, 2 de timo, 2 de tiroides, 2 de glándulas axilares y 31 sueros, Tabla # 1 y 2.

En el laboratorio se efectuó la siembra en agares bacteriológicos de las muestras de hisopos y órganos internos. Los sueros obtenidos de las muestras hemáticas fueron alicuotados en viales Eppendorf y mantenidas en congelación a -70°C hasta su uso.

Tabla No. 1. Clave y datos de las tortugas prietas (*Ch. mydas agassizii*), pescadas incidentalmente en Bahía Magdalena; Isla Magdalena (I. Magd), Isla Margarita (I. Marg) y las mantenidas en cautiverio en Bahía de los Angeles (B. Ang.). Las muestras fueron para histopatología (H), Bacteriología (B) y Sueros para inmunología (S). En algunos casos, no se tiene datos (S/D).

CLAVE	FECHA	LUGAR	MEDIDAS CM.	TIPO MUESTRA
T1	ABRIL/2001	I. Magd	53.5/40.5	H,
T2	ABRIL/2001	I. Magd	1.47/1.26	S,H,B
T3	ABRIL/2001	I. Magd	S/D	H
T4	ABRIL/2001	I. Magd	53/46	H
T6	ABRIL/2001	I. Magd	56/42	H
T7	ABRIL/2001	I. Magd	47/38.5	S
T8	29/03/2001	I. Magd	S/D	S,H
T9	15/03/2001	I. Magd	S/D	H
T10	18/03/2001	I. Magd	S/D	H
T11	S/D	I. Magd	S/D	H
T12	S/D	I. Magd	S/D	H
T13	S/D	I. Magd	47/35.5	H
T14	S/D	I. Magd	48.5/45/5	H
T15	S/D	I. Magd	53.5/43	H
T18	27/06/2001	I. Marg	40/37	S,H, B
T19	27/06/2001	I. Marg	67/56	S,B
T20	07/06/2001	B. Ang	72/51	S,B
T21	07/08/2001	B. Ang	70.8/58.7	S,B
T23	07/11/2001	B. Ang	S/D	S,B
T25	07/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T26	07/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T27	07/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T28	07/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T29	07/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T30	08/12/2001	B. Ang	S/D	S,B
T31	28/07/2001	I. Magd	48/39	S, H
T32	29/07/2001	I. Magd	47/38	S, H, B
T33	29/07/2001	I. Magd	56/43	S, H, B
T34	29/07/2001	I. Magd	63/52	S, H, B
T35	08/01/2001	I. Magd	46/35	B
T37	08/04/2001	I. Marg	46/37	S, H, B
T38	08/04/2001	I. Marg	49/38	S, H, B
T39	08/04/2001	I. Marg	63/51	S, H, B
T40	08/08/2001	I. Magd	46/41	S, H,B
T41	01/09/2001	I. Magd	S/D	S, H,B
T42	01-Sep	I. Magd	S/D	S, H,B
T43	01-Sep	I. Marg	S/D	S, H,B
T44	01-Sep	I. Marg	S/D	S, H,B
T46	01-Sep	I. Magd	S/D	S, H,B

Tabla No.2 Hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S. empleados para la extracción de toxinas hidrosolubles y liposolubles.

Especie	Ejemplar	Peso (g)	Época de colecta
Ch. mydas agassizzi	1	56	invierno-primavera
Ch. mydas agassizzi	2	22	invierno-primavera
Caretta caretta	3	24	invierno-primavera
Ch. mydas agassizzi	4	19	invierno-primavera
Caretta caretta	5	11	invierno-primavera
Ch. mydas agassizzi	6	37	verano
Ch. mydas agassizzi	7	28	verano
Ch. mydas agassizzi	8	18	verano
Ch. mydas agassizzi	9	10	verano
Ch. mydas agassizzi	10	5	verano
Ch. mydas agassizzi	11	22	verano
Ch. mydas agassizzi	12	12	verano
Ch. mydas agassizzi	13	15	verano
Ch. mydas agassizzi	14	35	verano
Ch. mydas agassizzi	15	21	verano
Ch. mydas agassizzi	16	5	verano

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Histopatología

Los órganos de las tortugas marinas (183 tejidos), fueron procesados por métodos histológicos convencionales (Prophet, 1992), en el laboratorio de histología e histoquímica del CIBNOR, SC. En detalle: los tejidos fueron colocados en cápsulas de plástico, con la superficie a observar en contacto con ésta; se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 micras en un micrótopo Leica RM2025; los cortes obtenidos se colocaron en baño de flotación adicionado con gelatina tipo reactivo, se recuperaron por medio de porta objetos y se fijaron por calor en una platina térmica; Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina Eosina y una vez teñidos se observaron en un microscopio óptico (Olimpus BX41). Las imágenes de los cortes que presentaron cambios o alteraciones celulares relevantes se digitalizaron y se analizaron en un analizador de imágenes (Image-Pro Plus versión 4.1 for Windows).

6.2 Serología

Se obtuvieron 31 sueros a partir de las muestras sanguíneas sin anticoagulante (3 ml promedio c/u), se separaron en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -70° C. Estos sueros se procesaron, por medio de diferentes técnicas diagnósticas de virología, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Centro Medico Nacional Siglo XXI, del IMSS y Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM para determinar el contacto con diferentes géneros de agentes infecciosos, causantes de enfermedades en animales terrestres y acuáticos.

6.2.1 Técnica de reducción de focos fluorescentes

El diagnóstico de infección por Rabdovirus (Bourhy y Sureau, 1990), agente causal de rabia en animales terrestres, ascitis primaveral en la carpa, septicemia hemorrágica viral en salmónidos, necrosis hematopoyética infecciosa de los salmónidos y viremia ende los

cíclidos del río grande, se efectuó mediante reducción de focos fluorescentes. Para el análisis se usó una línea celular de neuroblastoma murino, la cual fue mantenida en botellas de cultivo en plástico de 25 cm³ conteniendo 10 ml de medio (BHK) suplementado con 10% de SFT hasta formar una monocapa confluyente de alrededor de 6 millones de células. La monocapa celular se lavó con 3 ml de PBS, pH 7.2 y se desprendió del fondo usando 2 ml de tripsina por botella durante 30 segundos. Las células desprendidas, se resuspendieron en 15 ml de medio de cultivo, 100 µl de esta suspensión celular se cultivaron por 24 h en placas de 96 pozos de fondo plano hasta formar una monocapa. Los sueros de las tortugas, inactivados a 56° C durante 30 m fueron diluidos en forma seriada al triple (3, 9, 27, 81), 50 µl de la dilución respectiva se colocaron en los pozos de una placa de incubación, excepto en los controles, junto con 50 µl de virus rábico ya estandarizado y se incubaron durante 1 h en una atmósfera de CO₂ al 5%. De la placa de células se retiró el medio de cada pozo y se colocó la mezcla del virus y suero en los pozos de similar identificación (ej A5:A5). La mezcla final (células de neuroblastoma, suero, virus) se incubó en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 20 h a 37° C, posteriormente la placa se fijó con acetona al 80% por 30 m, se adicionó 30 µl de conjugado fluorescente antinucleocapside del virus de la rabia en cada pozo y se incubó durante 30 minutos más a 37° C, evitando el contacto con la luz. Finalmente, se colocó 150 µl de líquido de montaje a cada pozo y los resultados se observaron al microscopio de inmunofluorescencia. La reducción de los focos fluorescentes a nivel celular revela la presencia de anticuerpos específicos en contra del virus.

6.2.2 Prueba de la inhibición de la hemaglutinación

La prueba de inhibición de la hemaglutinación es utilizada para identificar la presencia anticuerpos anti Mixovirus (Mahy, 1991; Purchase, 1989), agente causal de la influenza en diversas especies animales; influenza porcina, influenza aviar, influenza humana, etc. Para el ensayo se utilizaron eritrocitos humanos del tipo O Rh - al 1%. El virus estandarizado fue proporcionado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). Para titular su actividad hemaglutinante el virus se sometió a diluciones decuples (1:10) en placas de 96 pozos y se incubó en una proporción 1:1 con glóbulos rojos. Una hemoaglutinación del 50% de glóbulos rojos se tomó como una unidad hemoaglutinante

(UHA), el virus se uso a una concentración de 4 UHA. Los sueros de cada tortuga, fueron inactivados a 56° C en baño Maria durante 30 m, y se hicieron diluciones logarítmicas base 2 hasta la dilución 1/256. De cada dilución 50 µl se incubaron con 50µl del virus a 4 UHA a temperatura ambiente durante 1 h, después de esto se aplicaron 50 µl de glóbulos rojos al 1% y se incubaron por 1h más a temperatura ambiente. El titulo del suero correspondio a la ultima dilución capaz de inhibir totalmente la hemoaglutinación provocada por el virus.

6.2.3 Prueba de seroneutralización del virus de Aujeszky (Mahy, 1991; Purchase, 1989).

El genero Herpes virus causa diferentes enfermedades: Aujeszky afecta a mamíferos (suinos, caninos, etc.). La laringotraqueitis afecta a las aves. En especies acuícolas provoca enfermedades como la enfermedad viral del bagre, plaga del pez ángel y enfermedad de los herpes virus de los salmónidos.

Se utilizaron células MDBK cultivadas en botellas de plastico hasta formar una monocapa confluyente de alrededor de 6 millones de células. Las células se resuspendieron en 15 ml de medio de cultivo y de esta suspensión, se aplicaron 100 µl a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano y se incubaron durante 24 hrs. Los sueros de cada tortuga se inactivaron a 56°C durante 30 minutos. El virus proporcionado por PRONABIVE, se diluyó en 1 a 30 (2.9ml de medio + 100µl de virus) en medio BHK sin suero. 50 µl de esta dilución del virus se aplicaron a cada pozo, junto con 50µl de medio sin suero y 50µl de suero de una tortuga diferente por cada línea de pozos. La mezcla se incubó en cámara húmeda, a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, durante una hora. 50µl de la mezcla de neutralización (Suero-virus) se añadió a la placa con células y se incubó nuevamente a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, durante una hora. Se considera que los sueros con anticuerpos específicos evitan el efecto citopático provocado por el virus. De tal manera que en los pozos en donde puede apreciarse efecto citopático el suero es negativo.

6.2.4 Prueba de micro aglutinación (Myers, 1985).

Leptospira interrogans es un genero altamente infeccioso que afecta a diferentes especies terrestres y marinas (Myers, 1983; Godinez, 1999). La prueba de microaglutinación microscópica se aplicó a los sueros de las tortugas marinas para verificar la presencia de anticuerpos en ellos. Esta prueba se realizó en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad Universitaria, México, D F.

Los sueros se diluyeron a 1:25 con solución salina amortiguada de fosfatos (SAF). pH 7.2. En cada pozo de una placa de fondo plano se colocaron 50 µl de suero diluido y 50 µl de antígeno (cultivo liquido de cada serovar) para obtener una dilución 1:50, como prueba tamiz. La placa con la muestras se incubo 2 h a temperatura ambiente y la lectura se realizó en el microscopio de campo oscuro. Los sueros que reaccionaron con un 50% de leptospiras aglutinadas en el campo visual se consideraron positivos. Los sueros positivos, fueron diluidos mediante diluciones dobles seriadas hasta la dilución 1:3,200, poniéndose en contacto con el serovar al cual fue positivo, tomando el tiempo de incubación que la prueba tamiz, así como su interpretación.

6.3 Bacteriología

Los hisopos y órganos se sembraron en medios de cultivo bacteriológico en el laboratorio de microbiología del CIBNOR. Todas las muestras se sembraron individualmente por estría abierta y cruzada para obtener y purificar colonias bacterianas en cajas Petri de medios bacteriológicos (agarosa sangre y agar Mac Conquey) en promedio 2 cajas por individuo, su purificación fue en medios similares y su almacenamiento en medio de transporte Stuart. Para determinar su morfología, se aplico la tinción de Gram. Su resiembra se realizo con los mismos medios y métodos de purificación en el Departamento de Microbiología e inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

6.3.1 Siembra en agar bacteriológico

El hisopo se sembró tocando una parte que no excediera ½ cm en los medios bacteriológicos, agarosa sangre y agar MacConkey. Se dispersaron con asa bacteriológica por estría abierta y cruzada y se incubaron durante 24 h, se eligieron y sembraron colonias en otras cajas con los mismos medios, para su purificación y se repitió la forma de siembra y tiempo de incubación. Para la conservación se tomo una asada de colonias aisladas y se inoculó por picadura en el medio de transporte Stuart.

6.3.2 Tinción de Gram

A las colonias bacterianas aisladas se les aplicó la tinción de Gram, para conocer su morfología y su afinidad a la tinción. En un porta objetos se suspendió la colonia bacteriana en una gota de agua destilada, para cada colonia bacteriana purificada y se fijó por medio de calor. La colonia bacteriana se cubrió en secuencia con cristal violeta y bicarbonato de sodio (1:1), durante 15 segundos, con Yodo durante 15 seg, con alcohol-acetona de 3 a 5 seg y con Fuscina básica 15 seg después de cada uno de los pasos se lavó con agua destilada y al final con agua corriente. Todas las tinciones se observaron en microscopio óptico a 100X, considerándose como Gram positivas a las bacterias que se tiñeron de color azul y como Gram negativas a las que se tiñeron de color rojo. A las bacterias Gram negativas (posibles enteró bacterias) se les realizaron estudios de caracterización por medio de pruebas bioquímicas de TSI, SIM, urea y citrato.

6.3.3 Bioquímicas

Todas las técnicas realizaron de acuerdo a lo descrito por Staley (1989).

6.3.3.1 TSI (triple azúcar hierro), para diferenciar bacilos Gram negativos entéricos de otros géneros bacterianos.

Las muestras se siembran por picadura y estría continua. Esta prueba se basa en la capacidad de algunas bacterias de utilizar los azúcares. Los carbohidratos pueden ser utilizados mediante la oxidación con la producción de ácido. Se usa el rojo fenol como indicador que a pH alcalino se torna color amarillo y en pH ácido a rojo. La producción de

ácido sulfhídrico (H_2S), algunas bacterias pueden reducir el tiosulfato de sodio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con el sulfato ferroso del medio produciendo sulfuro de hierro: un resultado positivo se considera cuando se forma un precipitado de color negro en el medio. La producción de gas por fermentación de carbohidratos, se determina con la producción de burbujas o el desplazamiento del medio. El resultado de estas tres reacciones, tiene 6 diferentes posibilidades (Staley, 1989; Quinn et al., 1994).

6.3.3.2 SIM

Denominado SIM debido a las reacciones metabólicas que pueden presentar las bacterias inoculadas; S, producción de ácido sulfhídrico (H_2S). I, producción de indol. SIM sirve para diferenciar *E. coli* de *Enterobacter* y *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* de otros *Proteus*. Determina la producción de triptofanasa y la oxidación del triptofano con producción de indol. La realización de la prueba implica la aplicación de una gota del reactivo de Kovac's y se consideran positivos cuando se forma de inmediato un anillo de color rojo. En un medio semisólido se inocula por picadura la colonia bacteriana y se observa la capacidad de motilidad (M), que se manifiesta cuando el medio es turbio al centro y claro en la periferia.

6.3.3.3 Urea

Esta metodología se utiliza para diferenciar entre especies de enterobacterias *Proteus spp*, *Pasteurella spp*, *Corynebacterium spp* y *Brucella spp*. Determina la capacidad de las bacterias de producir la enzima ureasa que desdobla la urea en amoníaco y se usa el rojo fenol como indicador. Se tomaron como positivos los que presentaron una coloración roja en el medio.

6.3.3.4 Citrato

Se utiliza para diferenciar *Enterobacter* y *Klebsiella* de *E. coli*. Se evalúa la capacidad de la bacteria para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono, con azul de bromotimol como indicador. Se usa siembra por estría abierta y se reportan resultados positivos cuando los medios que tornaron de verde a azul

6.3.4 Oxidación de azúcares

La oxidación de azúcares: maltosa, rafinosa, salicin, xilosa, esculina, lactosa, sucrosa, glucosa, VP30, ramnosa, arabinosa, trealosa se usa para determinar la especie de las bacterias. Todas ellas en medio líquido, se inocularon con una asada de la colonia bacteriana. Se tomo como positiva, cuando vira el color del medio.

6.4 Parasitología

Asociado a la evaluación de los cortes histológicos, se examinaron cuatro vísceras cardiacas, esto en el laboratorio de Parasitología del CIBNOR, S.C. La disección de las mismas se efectuó siguiendo el sentido de la circulación sanguínea para verificar la presencia de parásitos adultos de trematodos spirorchidos, bajo el microscopio estereoscópico. Los parásitos recuperados se colocaron en alcohol 70% durante 48hrs. A cada uno de los especímenes se les aplicó la tinción de Tricromica de Gomori, modificada de Sheehan y Hrapchak, 1973 para posteriormente clasificarse en base a sus características morfológicas.

6.5 Biotoxinas

Se disecó el hígado de 16 tortugas marinas (14 de *Ch. mydas agassizii* y 2 de *Caretta caretta*) obtenidas en Bahía Magdalena, B. C. S., los cuales fueron transportados en hielo a la Unidad de Patología Marina del CIBNOR para su procesamiento. Cinco de los hígados fueron colectados en la época de invierno-primavera (febrero-abril del 2001 y 11 en verano (julio-agosto del 2003). Una vez en el laboratorio los hígados fueron pesados y clasificados para la extracción de toxinas hidrosolubles (empleando el método de PSP de la AOAC, 1995) y liposolubles (basado en el método de DSP descrito por Yasumoto et al., 1978 y 1984).

6.5.1. Extracción de Biotoxinas hidrosolubles (PSP: Paralytic Shellfish Poisoning, AOAC, 1995).

El análisis de toxinas hidrosolubles se realizó con base en la metodología descrita para toxinas paralíticas (saxitoxina -STX- y análogos) de la AOAC, 1995). Cabe señalar que este bioensayo en ratón es el método internacional oficialmente utilizado y ha sido adoptado por la Norma Oficial Mexicana (NOM) para la detección de este tipo de toxinas. La extracción consistió en la homogeneización del tejido en HCl 0.1 N (en una relación 1:1 peso-volumen) llevando a ebullición durante 5 min, aforando el volumen perdido y ajustando el pH a 4.0 con HCl o NaOH (según el caso); centrifugación a 1,100 g durante 10 minutos; recuperación y filtración del sobrenadante a través de membranas 0.22 µ. Para el bioensayo, se inyectó intraperitonealmente 1 ml de extracto a cada uno de 3 ratones albinos cepa CD-1 de un peso entre 18-23 g; se observaron los signos clínicos por 24 hrs y se tomó el tiempo de sobrevivencia. La concentración de STX en unidades ratón (UR), se definió como la concentración de toxina capaz de matar a un ratón de peso entre 18-23 g en un intervalo de 5-15 min y es equivalente a 0.2 µg de STX.

La concentración de toxina en la muestra se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{gVPM}/100 \text{ g de tejido} = \text{media URC}/\text{ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$$

Donde VPM es la cantidad de veneno paralizante en el hígado de la tortuga; URC son las unidades de ratón corregidas (según tablas de Soomer en AOAC, 1995); FC y FD representan los factores de conversión predeterminados, el primero de la toxina estándar y el segundo del factor de dilución.

6.5.2. Extracción de Biotoxinas liposolubles (DSP: Diarrhetic Shellfish Poisoning, Yasumoto et al., 1978 y 1984).

El análisis de biotoxinas liposolubles se efectuó de acuerdo a la técnica descrita para la valoración de toxinas diarreas (ácido okadáico -AO- y dinofisitoxinas -DTXs-) por Yasumoto et al., (1978 y 1984). En detalle, el tejido se homogeneizó en acetona fría en una proporción 1:3 (tejido-solvente) y se dejó reposar en frío (7 °C) y al resguardo de la luz por 24 h. Posteriormente, cada extracto fue filtrado usando papel filtro Whatman No.1 y un filtro Bushner. Los extractos acetónicos obtenidos fueron evaporados en un rotavapor a

50 °C (y los residuos resuspendidos en 25 ml de metanol al 80%) y se lavaron dos veces con 25 ml de hexano mediante un embudo de separación. Cada extracto se diluyó a 50% de metanol y se extrajo nuevamente con diclorometano volumen a volumen. Posteriormente, las muestras fueron evaporadas a 35 °C para la eliminación del diclorometano y los residuos fueron resuspendidos en una solución salina (0.15 M de NaCl) con 1% de Tween 60. Finalmente 0.5 ml de cada extracto se inyectó vía intraperitoneal, por triplicado en ratones albinos CD-1 de 18-23 g de peso, se observaron los signos clínicos durante 48 h y se registró el tiempo de sobrevivencia. El cálculo de la toxicidad para AO se realizó mediante la fórmula: $\text{Log (UR)}=2.6 \log (1+T-1)$, donde UR= Unidad ratón, 2.6 log fue calculado para el estándar de AO y T= tiempo de muerte en horas.

7.0 RESULTADOS

7.1 HISTOPATOLOGIA

Se observaron cambios degenerativos asociados a la presencia de agentes infecciosos en el 100% de los especímenes analizados. La infección por parásitos de diferentes géneros y especies, en diferentes estadios mostró una prevalencia del 99.56%. La presencia de estructuras compatibles con huevos de trematodos spirorchidos se asoció en todos los tipos de tejido analizado a la presencia de un exudado no supurativo, de ligero a moderado, multifocal, con presencia de células gigantes y focos de necrosis, en algunas ocasiones sin respuesta inflamatoria (Fig. 3). Estas estructuras se encontraban desplazando y lesionando los tejidos. Un hallazgo común fue la presencia de células gigantes a cuerpo extraño.

La estructura de los huevos se caracterizó por presentar una cutícula queratinizada de color verde. En cortes longitudinales el exterior se observó de forma ovoide con prolongaciones polares filamentosas (1:1, filamento- cuerpo), estas se retraen por su línea media hacia el cuerpo, una de las terminaciones tiene forma de ventosa, se aprecia una cavidad ovoide con extremos romos, con un cúmulo celular que la ocupa total o parcialmente (Fig. 4, 5). En el corte transversal, dependiendo del nivel del corte, se observa de forma circular con extremos traslapados y un cúmulo celular al centro. Los cortes en los extremos se aprecian como círculos de menor diámetro, con doble cutícula con o sin cúmulo celular (Fig.6).

La prevalencia y proporción de los huevos en los tejidos fue la siguiente: Intestino: 14 de 18 (0.77); Riñón: 7 de 22 (0.31); Pulmón: 8 de 19 (0.42); Músculo esquelético: 6 de 19 (0.31); Estómago: 3 de 7 (0.42); Corazón: 4 de 11 (0.33); Piel: 2 de 15; Hígado: 3 de 20; Páncreas: 2 de 5; Bazo: 8 de 14; Cerebro 2 de 2.

La presencia de trematodos adultos (Fig. 7) se asoció con una similar respuesta inflamatoria en 2 de 7 corazones (0.28); en 1 de 18 peritoneo visceral (0.05) (Fig.8). Adicionalmente, en algunos tejidos fueron observadas estructuras parasitarias compatibles con *Eimeria sp* en 2 de 18 (0.11) (Fig. 9) y *Criptosporidium sp* en 3 de 18 (0.16) muestras de intestino (Fig.10).

Los cambios degenerativos inflamatorios asociados a daños celulares por diferentes agentes (virus, bacterias, hemoparasitos, intoxicaciones, etc) observados en los tejidos analizados fueron; la hemosiderosis y melanososis (Fig.11, 12) en 8 de 20 (0.4) muestras de hígado; 2 de 14 (0.14) muestras de bazo; 1 de 18 (0.05) intestino; 1 de 22 (0.04) de tejido renal; 1 de 5 (0.20) muestras de Aorta; 1 de 15 (0.06) muestras de piel. Infiltración citoplasmática de lípidos (esteatosis) de moderada a severa se observo en 11 de 20 (0.55) tejidos hepáticos (Fig.13). Lesiones herpeticas con presencia de vacuolización citoplasmática de moderada a severa en células basales y en estrato espinoso, así como núcleos con cromatina densa y cuerpos de inclusión (Fig.14, 15) se observaron en 4 de 15 (0.26) tejidos epidérmicos. Degeneración miofibrilar de ligero, moderada y severa se observo en dos de 19 (0.10), muestras de músculo esquelético (Fig.16). Depleción linfoide moderada se observo en dos muestras bazo de 14 (0.14). Atrofia del epitelio traqueal de moderado a severo en dos de siete muestras (0.28), con presencia de colonias bacterianas. Atrofia de vellosidades de moderada a severa se observo en dos de 18 (0.11) muestras de intestino también con presencia de colonias bacterianas (Fig. 17), así como de huevos y de parasitos adultos (Fig.18).

Los cambios hiperplásicos compensatorios, de reparación o de sustitución en los diferentes tejidos, revelaron las siguientes prevalencias: hiperplasia mesangial moderada en tres de 22 riñones (0.13), hiperplasia del tejido linfoide y focos de fibrosis en uno de 18 (0.05) de muestras de intestino (Fig. 19), hiperplasia del tejido linfoide en tejido pulmonar en 1 de 19 (0.52), hiperplasia de ductos biliares se observo en dos de 20 (0.1) muestras (Fig. 20) y proliferación de células cúbicas a cilíndricas, discontinuas, con presencia de cilios en el borde apical en peritoneo visceral en cinco de 18 (0.27) muestras.

Los cambios hiperplásicos neoplásicos (fibroma) se observaron en dos de 22 (0.9) muestras renales, observándose focos de células fusiformes sin un arreglo definido, con presencia de mitosis y con desplazamiento del parenquima (Fig. 21).

Se observaron estructura compatibles con *Chlamydia sp* en 1 de 19 (0.05) muestras pulmonares (Fig. 22). En uno de 11 (0.09) tejidos cardiacos y en dos de 20 (0.1) tejidos hepáticos se observo un infiltrado supurativo multifocal moderado. El infiltrado no supurativo se observo en forma moderada en la mucosa y submucosa de tres muestras

intestinales de 18 (0.16), en 4 de 11 (0.36) tejidos cardiacos, sin asociación a una etiología aparente (Fig. 23).

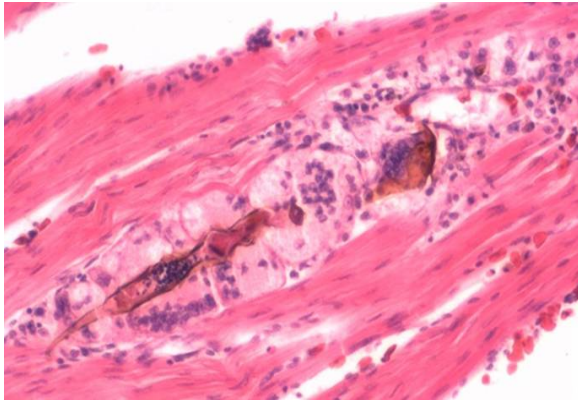


Fig. 3 Presencia de huevos de trematodos. Miositis parasitaria focal no supurativa ligera, necrosis focal, 20 x.

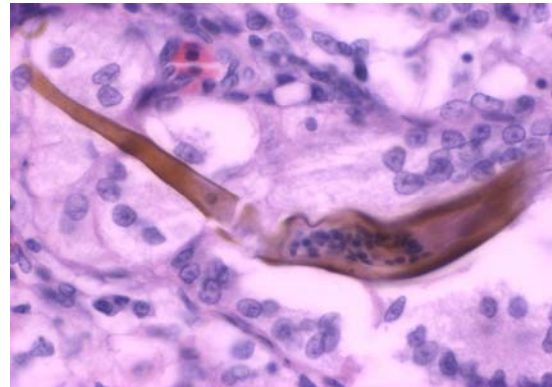


Fig.4 Huevo de trematodo. Corte longitudinal huevo de trematodo, cúmulo celular en la cavidad. Riñón 40x.

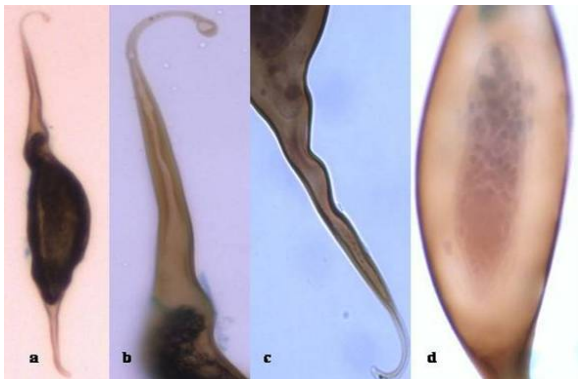


Fig.5 Huevo de trematodo (a) con prolongaciones filamentosas (b, c) una terminación en ventosa (b) y cúmulo celular en cavidad (d).

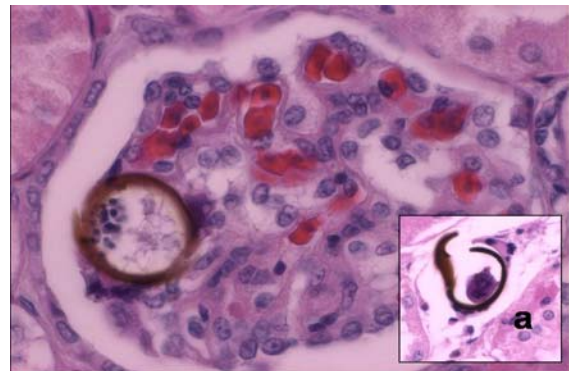


Fig. 6 Huevo de trematodo en corte transversal , extremos traslapados y el cúmulo celular en la cavidad, y extremos abiertos (a), Riñón 40x

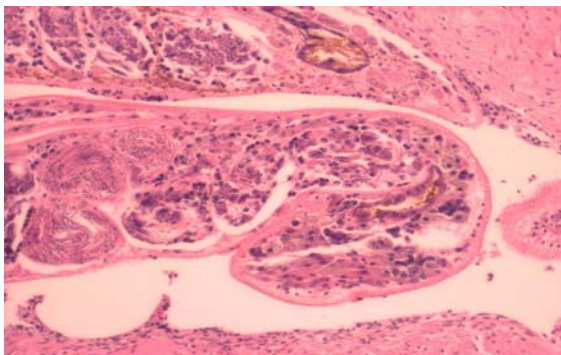


Fig. 7 Trematodo adulto en corazón, ligera respuesta inflamatoria 10x

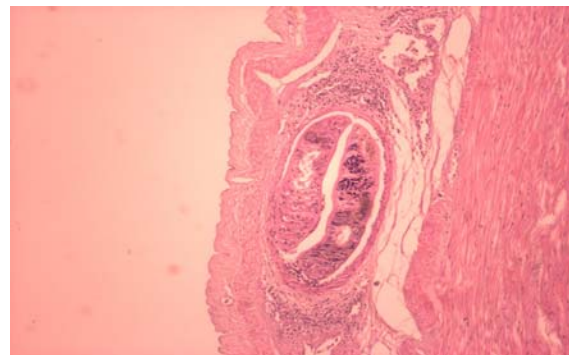


Fig. 8 Trematodos adultos en peritoneo visceral, ligera respuesta inflamatoria, 4x.

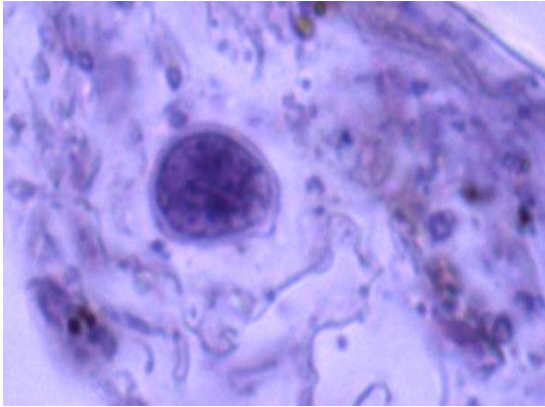


Fig. 9 *Eimeria* sp en luz intestinal de tortuga, 100x.

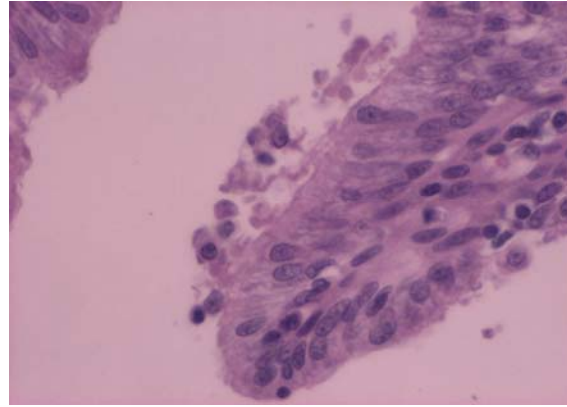


Fig. 10 Estructuras compatibles con *Cryptosporidium* sp en vellosidad intestinal, 100x.

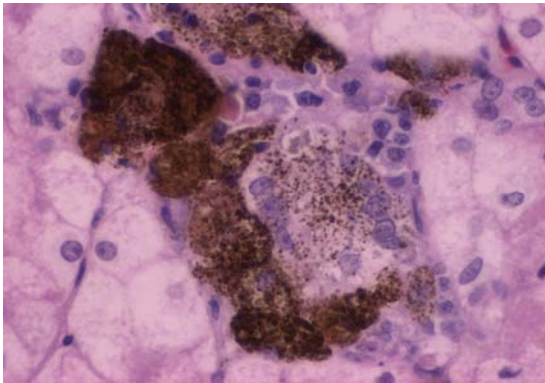


Fig. 11 Melanosis hepática. Las células presentan reacción cromática, 100x.

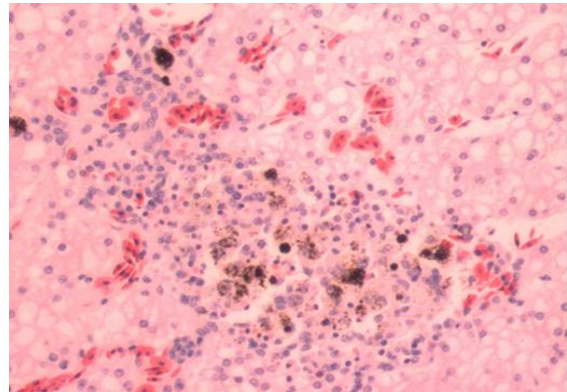


Fig.12 Hemosiderosis hepática. Los macrófagos presentan hemosiderina fagocitada, 20x.

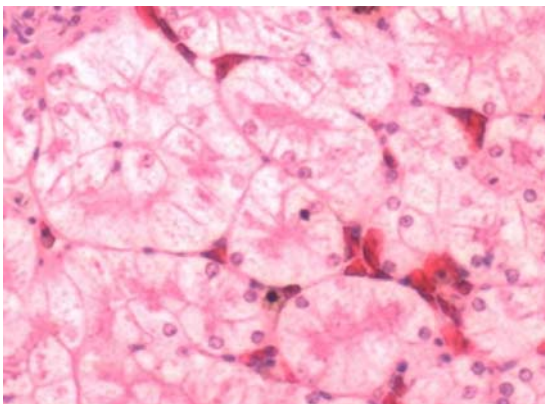


Fig.13 Esteatosis hepática. El citoplasma de los hepatocitos presentan vacuolas lipídicas, 40x.

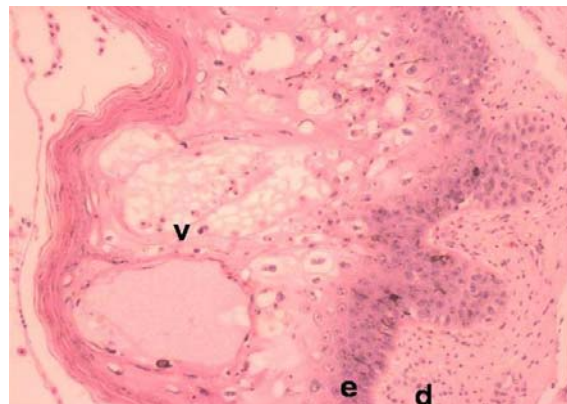


Fig. 14 Lesión herpética. Epidermis (e) con vacuolización celular (v) e infiltrado mononuclear en dermis (d), 10x.

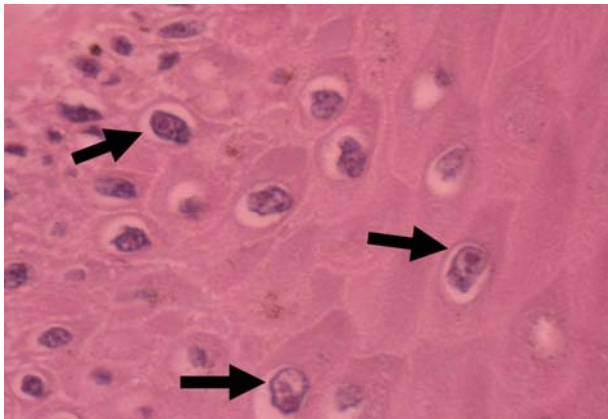


Fig. 15 Cuerpos de inclusión intranucleares (flechas) en estrato basal de piel, reportado como FP 40x

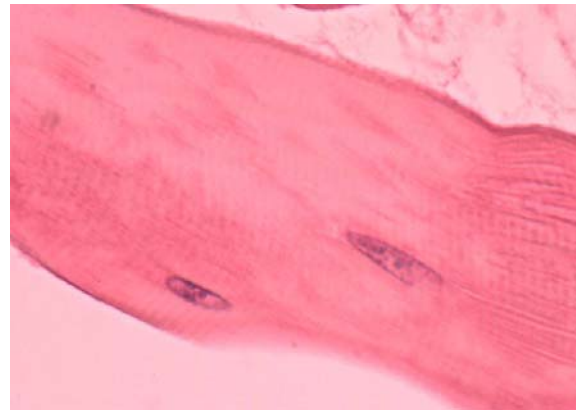


Fig. 16 Degeneración muscular (miofibrilar). Pérdida de las bandas o estrías musculares, 40 X

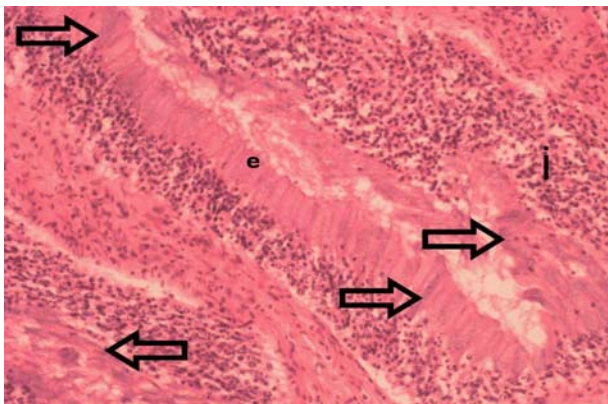


Fig. 17 Enteritis bacteriana. Colonias bacterianas (flechas) presentes en el epitelio (e), infiltrado mononuclear (i), 10x.



Fig. 18 Enteritis parasitaria. Nemátodo en vellosidades (óvalos), 10x

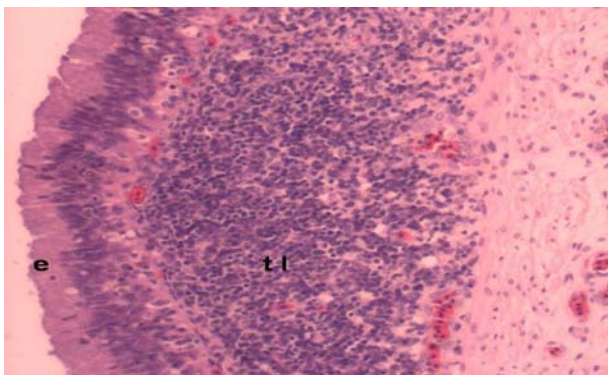


Fig. 19 Hiperplasia de tejido linfoide. Foco de hiperplasia del tejido linfoide (tl), subepitelial (e) en intestino, 10x.

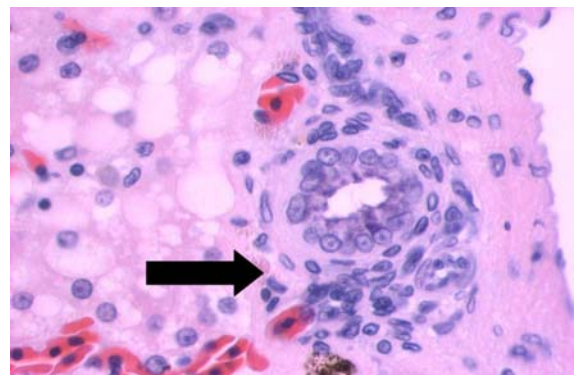


Fig. 20 Hiperplasia de ductos biliares. Hiperplasia de células del ducto biliar (flecha), 40x.

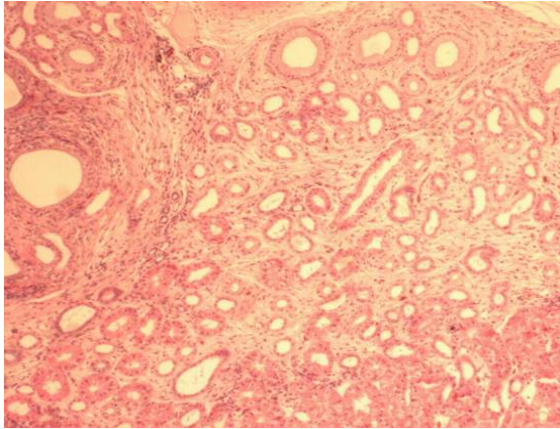


Fig.21 Fibroma renal. Las células fusiformes desplazan y sustituyen el tejido renal, 10x.

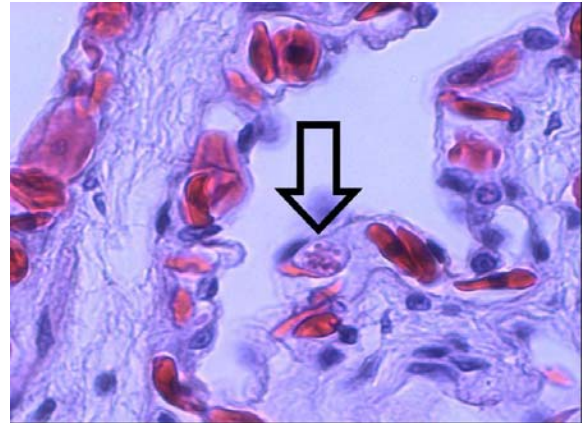


Fig. 22 Estructura compatible con Chlamydia sp. Estructura en tejido pulmonar, 100x.

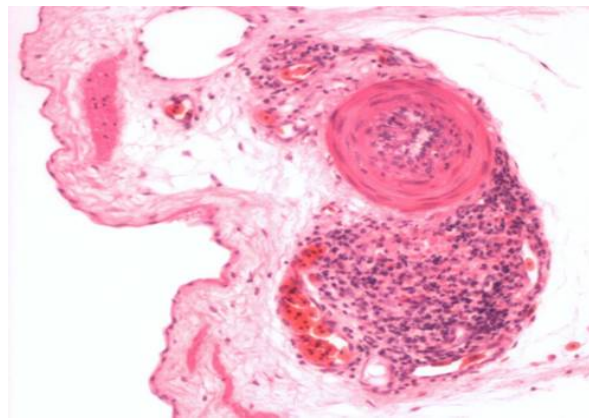


Fig.23 Infiltrado no supurativo. Infiltrado mononuclear perivascular moderado focal, 20x.

7.2 Bacteriología

Se recuperaron 27 especies de 12 géneros de bacterianos gram negativos aeróbicos, en un total de 58 aislamientos. Los sitios anatómicos de recuperación se describen en detalle en la tabla. La bacteria con mayor aislamientos fue *Escherichia coli* (Fig. 24) con siete (12.06%), siendo de estos 5 en boca, uno en cloaca y uno en bazo. Seguida de *Salmonella spp*

(Fig.25) con seis aislamientos (10.34%), tres de pulmón, dos de cloaca y uno de boca. *Shigella spp* se aisló en cuatro ocasiones (6.89%). *Serratia spp* y *Yersinia kinshaseni* se aislaron en tres ocasiones (5.17%). En nueve especies se obtuvieron dos aislamientos (3.44%), *Alcaligenes faecali*, *Aeromona hidrofila*, *Aeromona salmonicida*, *Enterobacter spp*, *Moraxella spp*, *Serratia plymuthica*, *Yersinia sppia pestis*, *Yersinia Fredriksenni*. En 11 especies se obtuvo un aislamiento (1.72%) de cada uno recupero *Actinobacillus salpingitidis*, *Aeromona spp*, *Enterobacter cloacae*, *Kleibsiella spp* (Fig. 26), *Kleibsiella pneumonia*, *Pseudomona maltis*, *Pseudomona fluorescens*, *Serratia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii* y *Yersinia intermedia* (Tabla No. 3). En dos casos no se pudo establecer el genero, estas correspondieron a una bacteria de colonias pequeñas, de forma circular de borde bien definido, color grisaceo, β hemolitica (4 aislamientos de boca) y a una bacteria de colonia mucoide, blanca, de bordes no definidos, coalescente (1 aislamiento de boca). Esta ultima aparentemente con función de nodriza (Fig.27).

La boca fue el órgano con mayor numero de especies aisladas (12 de los 25), de la cloaca se recuperaron 10 especies, de riñón siete, de hígado cuatro, de pulmón tres y de bronquios y grasa una.



Fig.24 *Escherichia coli*. Colonias de *E. coli* en agra sangre (izquierda) y agar Mac Conkey (derecha).



Fig.25 *Salmonella sp.* Colonia bacteriana de *Salmonella sp* en agar sangre.



Fig.26 *Klebsiella sp.* Colonia bacteriana mucoide en agar Mac Conkey.



Fig. 27 Satelitismo bacteriano. Colonias nodrizas (grandes, mucoides) y colonias satélites (pequeñas, grisáceas).

Tabla No 3. Numero de aislamientos bacterianos recuperados de la tortuga prieta (*Ch. mydas agassizii*), de Bahía Magdalena BCS, México.

ESPECIE BACTERIANA	BOCA	CLOACA	OTROS ÓRGANOS	TOTAL
<i>Actinobacillus salpingitidis</i>	-	1	-	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	-	-	2
<i>Aeromonas</i> spp	-	-	1 riñón	1
<i>Aeromonas hidrofila</i>	-	-	1 riñón, 1 hígado	2
<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	1	1 hígado	2
<i>Enterobacter</i> spp	-	1	1 riñón	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	1	-	1
<i>Escherichia coli</i>	5	1	1 bazo	7
<i>Klebsiella</i> spp	-	-	1 riñón	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	1 riñón	1
<i>Moraxella</i> spp	1	-	1 pulmón	2
<i>Pseudomonas maltis</i>	1	-	-	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	-	-	1
<i>Salmonella</i> spp	1	2	3 pulmón	6
<i>Shigella</i> spp	1	-	1 riñón, 2 pulmón	4
<i>Serratia</i> spp	2	1		3
<i>Serratia plymuthica</i>	2			2
<i>Serratia enterocolitica</i>		1		1
<i>Yersinia</i> spp	1		1 hígado	2
<i>Yersinia kinshasenii</i>		1	2 hígado	3
<i>Yersinia pestis</i>	1		1 pulmón	2
<i>Yersinia enterocolitica</i>			1 riñón	1
<i>Yersinia Fredriksenni</i>	2			2
<i>Yersinia kristensenii</i>		1		1
<i>Yersinia intermedia</i>			1 hígado	1
Sin clasificación	4 Hemolíticas, 1 Nodrizas		Hemolíticas: 1 grasa.	6
TOTALES	25	11	22	58

7.3 SEROLOGÍA

Veinticinco de los sueros sometidos a las diferentes pruebas diagnosticas mostraron anticuerpos contra ocho serotipos de *Leptospira interrogans*, tres mostraron anticuerpos contra Rabia (Rabdovirus), dos contra Aujeszky (Herpesvirus), y uno de estos contra Influenza (Mixovirus). Todos los sueros fueron negativos a Rinitis infecciosa bovina (IBR, Herpes virus) y a Parainfluenza-3 (PI3, Paramixovirus).

7.4 PARASITOLOGÍA

El análisis histopatológico muestra estructuras compatibles con huevos de trematodos en 97.5% de los tejidos. Se obtuvieron hasta 75 ejemplares en un solo corazón, de trematodos spirorchidos adultos (Caballero, 1955) pertenecientes a la especie *Learedius learedi* (Inohuye et al., 2004). Las características anatómicas de la especie son pequeñas espinas en toda la superficie corporal. La ventosa ventral se encuentra a la mitad del cuerpo es pedunculada, circular con pequeñas espinas en la periferia. El cuerpo es elongado, plano, de extremos redondeados, con una constricción en la zona de la ventosa ventral, ventosa terminal en forma de copa. Ausencia de faringe y prefaringe, esófago largo ligeramente sinuoso rodeado por células glandulares, bulbo esofágico presente en la unión del esófago y ciegointestinal, el cual se bifurca anterior a la ventosa ventral, la curvatura del ciego termina cercano al polo posterior. Presenta numerosos testículos de tamaño variable, de bordes lisos, confluyendo o separados. La vesícula seminal externa es dilatada, localizada del lado derecho entre los testículos y los ovarios. El cirrus esta bien desarrollado con una pequeña vesícula seminal interna, y pars prostática y un largo ducto eyaculatorio. Poro genital medial y ventral común entre el ovario y el reservorio vitelino. El ovario es grande y con escasas lobulaciones, el oviducto emerge del lado derecho del ovario se une a la apertura del receptáculo seminal ovoide dextrolateral del reservorio vitelino, se continua posteriormente y crea el canal de Laurer con una papila en el poro dorsal. La glándula de Mehlis se encuentra detrás del reservorio vitelino (Fig.28). El útero es pequeño y el huevo fusiforme, con procesos polares (Fig 5).



Fig. 28 *Learedius learedi*. Parásito adulto obtenido de cámaras cardíacas de tortuga mariana (*Ch. mydas agassizii*)

7.5 BIOTOXINAS

7.5.1 Biotoxinas hidrosolubles

En los ratones tratados con los extractos hidrosolubles de los hígados de los ejemplares numero 5 (*Caretta caretta*) y 10, 12 y 15 (*Ch. mydas agassizii*). Se observaron signos clínicos semejantes a los descritos para la presencia de toxinas tipo parálíticas. Sin embargo, debido a que no ocurre la muerte de los ratones en los bioensayos, no pudo ser cuantificado el nivel de toxinas (tabla No.3).

Tabla No. 4 Biotoxinas hidrosolubles en hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S., México

No. ratones	Especie (ejemplar)	Tratamiento	Signos clínicos
3	Ch. mydas agassizii (1)	1 ml (extracto)	----
3	Ch. mydas agassizii (2)	1 ml (extracto)	----
3	Caretta caretta (3)	1 ml (extracto)	----
3	Ch. mydas agassizii (4)	1 ml (extracto)	----
3	Caretta caretta (5)	1 ml (extracto)	Temblor, disnea, saltos y diarrea
2	Ch. mydas agassizii (6)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (7)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (8)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (9)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (10)	1 ml (extracto)	Arqueamiento severo de la zona lumbar, disnea, parálisis de los cuartos traseros
2	Ch. mydas agassizii (11)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (12)	1 ml (extracto)	Disnea y parálisis cuartos traseros
2	Ch. mydas agassizii (13)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (14)	1 ml (extracto)	----
2	Ch. mydas agassizii (15)	1 ml (extracto)	Letargo y parálisis de los cuartos traseros
2	Ch. mydas agassizii (16)	1 ml (extracto)	Letargo
4	Control	1 ml (0.1 N HCl)	----

7.5.2 Biotoxinas liposolubles.

En los ratones tratados con el extracto lipofílico del hígado del ejemplar No. 4 presentaron signos clínicos semejantes a los descritos para DSP-toxinas, los extractos de los ejemplares No. 7 y 11 causaron signos inespecíficos de intoxicación. Los extractos en estudio tampoco causaron la muerte de los ratones, por lo que no se pudo cuantificar la biotoxina (tabla 5).

Tabla No 5. Biotoxinas liposolubles en hígados de tortugas marinas de Bahía Magdalena, B. C. S., México

No. ratones	Especie (ejemplar)	Tratamiento	Signos clínicos
3	Ch. mydas agassizzi (1)	1 ml (extracto)	-----
3	Ch. mydas agassizzi (2)	1 ml (extracto)	-----
3	Caretta caretta (3)	1 ml (extracto)	-----
3	Ch. mydas agassizzi (4)	1 ml (extracto)	Decaimiento, diarrea y parálisis de los cuartos traseros.
3	Caretta caretta (5)	1 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (6)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (7)	0.5 ml (extracto)	Temblo y saltos
2	Ch. mydas agassizzi (8)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (9)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (10)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (11)	0.5 ml (extracto)	Temblo y saltos
2	Ch. mydas agassizzi (12)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (13)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (14)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (15)	0.5 ml (extracto)	-----
2	Ch. mydas agassizzi (16)	0.5 ml (extracto)	-----
4	Control	1 ml (Tween 60)	-----

8.0 DISCUSIÓN

Este estudio describe por primera vez los cambios histológicos, parasitológicos e inmunológicos en la tortuga prieta en BCS, México. No se tienen datos comparativos o de referencia para este estudio. No existen reportes científicos previos ni de observación por parte de los pescadores de Bahía Magdalena de neoplasias cutáneas o viscerales que sugieran la presencia de FP en esta zona. El FP como se ha descrito ampliamente para la tortuga verde, se caracteriza por iniciar en el tercer párpado, diseminándose a zona periocular, cuello, hombros, boca, cloaca, caparazón y apéndices externos, con aspecto de coliflor de diferente forma y tamaño, muestra un comportamiento metastásico de hasta el 30%, afectando hígado, riñón y bazo principalmente, estudios histopatológicos describen cúmulos uniformes de proliferación celular fusiforme (fibroblastoide) de origen mesenquimal, acantosis, hiperplasia del estrato espinoso y basal (10-15 capas celulares), con presencia de hiperqueratosis ortoqueratótica en forma papilar, núcleos con cuerpos de inclusión, células fusiformes en forma linear paralelas a la dermis y vacuolización citoplasmática. En base a nuestros resultados, podemos demostrar la presencia de una o varias de estas características en las tortugas prietas evaluadas tales como tumores viscerales, lesiones megalocíticas, parasitosis, presencia de biotoxinas y presencia de anticuerpos en contra de agentes virales asociados, no obstante nunca encontramos una lesión patognomónica que pudiera confirmar la existencia de FP en la zona ni encontramos más de dos factores asociados a este juntos. Las lesiones neoplásicas epidérmicas reportadas en la literatura como FP cutáneo, no se presentaron en los especímenes muestreados. Nuestra observación de dos fibromas renales semejantes a lo reportado por L. Herbst (1999) como lesiones metastásicas viscerales de FP, en nuestro estudio no tuvieron relación con alguna lesión neoplásica en piel. Las lesiones histológicas observadas tales como degeneración megalocítica, con vacuolización citoplasmática, con presencia de cuerpos de inclusión, reportados como lesiones iniciales del FP. En ausencia de presentación cutánea de FP, difícilmente podría confirmar la naturaleza metastásica de los tumores observados.

De igual forma nuestra observación concuerda con lo estimado por Norton et al., (1990) y Orós et al., (1998), con respecto a que todos tumores viscerales han sido identificados como fibromas y/o mixofibromas. Sin embargo, en nuestro estudio los tumores viscerales no tuvieron relación con las lesiones cutáneas de FP como lo reportan Herbst (1999) y Aguirre, A. et al. (1998; 1999).

Los hallazgos histológicos en este trabajo de lesiones en piel de cloaca, evidencian la presencia y daño de HV en las tortugas prietas de Bahía Magdalena BCS y confirman los resultados serológicos de este mismo trabajo al demostrar la presencia de anticuerpos en contra de un serotipo de HV que afecta a los cerdos. Lo anterior, se confirma con lo reportado por Castelan (2004), quien replica material genómico de un serotipo de HV que afecta a los bovinos, de muestras de tortugas prietas de la BCS. Esto es, el genero HV esta presente en las tortugas prietas de la BCS, y se demuestra la presencia de serotipos que mantienen una porcentaje alto de similitud mayor al 50% con el GTHP (Quackenbush et al., 1998, 2001; Yu et al., 2001), reportado por diferentes autores (Aguirre et al., 1998; Herbst et al., 1999; Landsberg et al., 1999; Work et al., 2001), como causal de GTFP.

Las lesiones megalocíticas y la de cuerpos de inclusión observadas e el presente estudio son asociadas en animales terrestres a una infección por HV, pero no a una presentación neoplásica. En base a nuestros resultados consideramos que los tumores viscerales en las tortugas marinas no son dependientes y/o provocados exclusivamente por tumores cutáneos ni que estos tumores sean causados por una infección por HV. Las lesiones cutáneas asociadas HV en diferentes especies marinas y terrestres, con presentacion de diferentes cuadros clínicos (Blanchard et al., 2001; Brewer et al., 1996; Homer et al., 1998; Muro et al., 1998; Pettan- Brewer, 1996; Richman et al., 2000), debe tomarse con precaución, debido que es una entidad común en el medio terrestre y acuático, que mantiene un potencial patogénico y virulento, pero es poco factible que un solo serotipo se manifieste en un espécimen en diferentes rutas patofisiológicas (GPD, LETD, FP), aunque la posibilidad se incrementa cuando se habla de diferentes individuos y poblaciones (Larski, 1988; Purchase, 1989).

Otros hallazgos no reportados en la literatura de tortugas marinas y de interés en la salud de las mismas son la hiperplasia de ductos biliares en hígado y del mesangio en riñón, lesiones

que se asocian a intoxicaciones subagudas o crónicas por diferentes compuestos químicos (incluyendo los compuestos organoclorados). Las células peritoneales viscerales con borde de cepillo, no son normales en este sitio anatómico, aunque no presentaban cambios asociados a malignidad se debe tomar como metaplasia, uno de los pasos para llegar a la neoplasia (tumor).

Nuestro estudio revela la presencia de huevos de trematodos toda clase de tejido muestreado con una prevalencia de 97.5% , cifra superior a lo reportado por Dailey et al., 1993 (85%) y Aguirre et al.,1998 (94%), Sin embargo, sólo observamos una respuesta inflamatoria severa en presencia de mas 200 de huevos por campo, en los otros tejidos la respuesta fue ligera o nula independiente del numero de huevos, opuesto a lo mencionado en diferentes estudios (Glazebrook et al., 1981, 1989; Gordon et al., 1998; Rand y Wiles, 1985). Lauckner (1985), describe que las infecciones en general son mixtas y que los huevos migran por torrente sanguíneo, contrario a lo observado en nuestro trabajo en donde se observo solo un género parasitario (Inohuye et al., 2004), si bien se encontraron huevos dentro de los vasos sanguíneos, también observamos la migración a través del parénquima, con movimiento independiente, punto que ayuda para el entendimiento del ciclo biológico hasta ahora desconocido, confirmando la expulsión del huevo por medio de las heces como se observa en la figura 29 (Cordero et al., 2004), no se encuentran pruebas para confirmar como posible salida la orina (Smith, 1972; Dailey y Morris, 1995). En endocardio se observaron parasitos adultos y un nódulo conteniendo un gran número de huevos, demostrándose que no todos ellos son vertidos a torrente sanguíneo y que se mantiene una migración tisular (Fig.30).En este trabajo se caracterizo el parásito adulto y los huevos de este como *Learedius learedi* (Inohuye et al., 2004). Nuestro estudio, si bien revela una extensa invasión a tejidos por huevos del parásito con la consecuente lesión tisular (Cordero et al., 2004), los daños observados no se asocian a los descritos en el FP, por lo que al igual que Aguirre et al (1998) no consideramos que la infección parasitaria sea un agente causal de FP.

En este trabajo no se observo manifestación de FP. Sin embargo, dos de 20 sueros (10%) presentaron anticuerpos contra un Herpes virus, genero asociado a FP (Aguirre y Spraker, 1996; Herbst et al., 1998.1999). El análisis, se llevo acabo con el serotipo de la enfermedad

de Aujeszky como antígeno, el cual guarda una similitud con el GTHV de 53% (Quackenbush et al., 1998, 2001; Yu et al., 2001). Este hallazgo, indica un contacto previo con HV, debido a la reactividad cruzada entre diferentes serotipos de este género (Coberley, 2001; Castelan, 2004), indicando así la presencia de HV en tortugas marinas y terrestres, con o sin manifestación neoplásica (Orrigi et al., 2001). Un suero con títulos a HV también presentó títulos en contra del virus de Influenza, género causal de la gripe en humanos y de graves enfermedades respiratorias en diferentes animales domésticos.

Un suero de los 20 (5%) fue positivo a Rabdovirus (Rabia), género que ha demostrado efecto en las líneas celulares de tortugas marinas (Lu et al., 1999), en este trabajo el serotipo de Rabdovirus usado fue el causal de rabia, además de la antigenicidad cruzada por el género se debe tomar en cuenta la posibilidad de la transmisión o papel refractario de los reptiles hacia la rabia. Estos resultados demuestran que las tortugas están expuestas y se infectan con diferentes etiologías virales, que pueden ser patógenas o potencialmente patógenas a ellas y a otras especies animales, actuando como vectores en sus viajes migratorios.

Los resultados bacteriológicos de este trabajo son diferentes a los encontrados en las tortugas marinas de Hawai por Aguirre et al., (1994b) y sólo concuerda con dos géneros encontrados en tortugas en cautiverio con presencia de lesiones cutáneas en Australia y Bermudas (Glazerbrook y Campbell, 1990; Wiles y Rand, 1987; Radial et al., 1998). La diferencia encontrada en este trabajo, puede asociarse a la zona geográfica de los estudios. Los géneros aislados pueden actuar como agentes oportunistas o como patógenos primarios, tanto en especies animales marinas o terrestres, por contacto directo o indirecto. En cualquier caso, los géneros bacterianos aislados pueden afectar a las tortugas marinas o ser transmitidas tanto a especies marinas como terrestres, incluyendo al humano por medio de ingesta de cualquier producto de la tortuga marina (carne, huevos). El género bacteriano de *Shigella* sp, no se había reportado en tortugas marinas (Herbst y Jacobson, 1995). El género *Moraxella* sp, aislado en este trabajo, se reporta como productora de biotoxinas PSP, cuando se ha aislado de organismos marinos (Kodama et al., 1990). Todas las enterobacterias son potencialmente zoonóticas.

En el presente trabajo se observaron daños histológicos asociados a intoxicaciones, sin embargo estos cambios no pueden definir el tipo de sustancia contaminante. Aguirre et al. (1994), encuentran una correlación negativa entre la presencia de agentes contaminantes (organoclorados, bifeniles policlorinados, organofosforados, carbamato) y la fase clínica de FP cutáneo. En diferentes zonas costeras de la Península de Baja California, se reporta la presencia de metales pesados (Shumilin et al., 2000; 2001; Méndez, 1998; Kot et al., 1999). En este trabajo no se encuentran daños asociados a PCB's, pero no puede asegurar su ausencia o presencia de estos en las tortugas marinas. Sin embargo, Gardner et al. (2003) reportan la presencia de PCB's en tejidos de *Ch. mydas agassizii*, mientras Juárez (2004) reporta la ausencia de estos en la misma especie y en la misma zona de muestreo este estudio.

Nuestros resultados aportan la presencia de Biotoxinas en hígados de las tortugas marinas muestreadas, factor reportado como inmunodepresor y carcinogénico. Así como, causal de síndromes tóxicos de consideración en la salud pública no se tiene definido (Landsberg, 1995; Noga, 1998; Turner, 1997).

Se han encontrado en las tortugas prietas (*Ch. mydas agassizii*) de Bahía Magdalena BCS, México, todos los agentes reportados como posibles causas de la FP, inclusive lesiones asociadas a esta, pero no se observó ninguna manifestación o lesión cutánea característica de esta. Por lo tanto, consideramos que el FP es provocado por una gente específico o la coexistencia de varios factores predisponentes presentes en las zonas donde se manifiesta clínicamente, así como factores genéticos asociados con la susceptibilidad y/o resistencia a padecer FP que difieren en las diferentes especies de tortugas marinas, entre ellas la *Ch. mydas mydas* y *Ch. mydas agassizii*.



Fig. 29 Migración de huevos de trematodos. De un cúmulo de huevos en páncreas (a), se observa la migración a través del parenquima, fuera de vasos sanguíneos (b), y su salida a la luz intestinal (c,d).

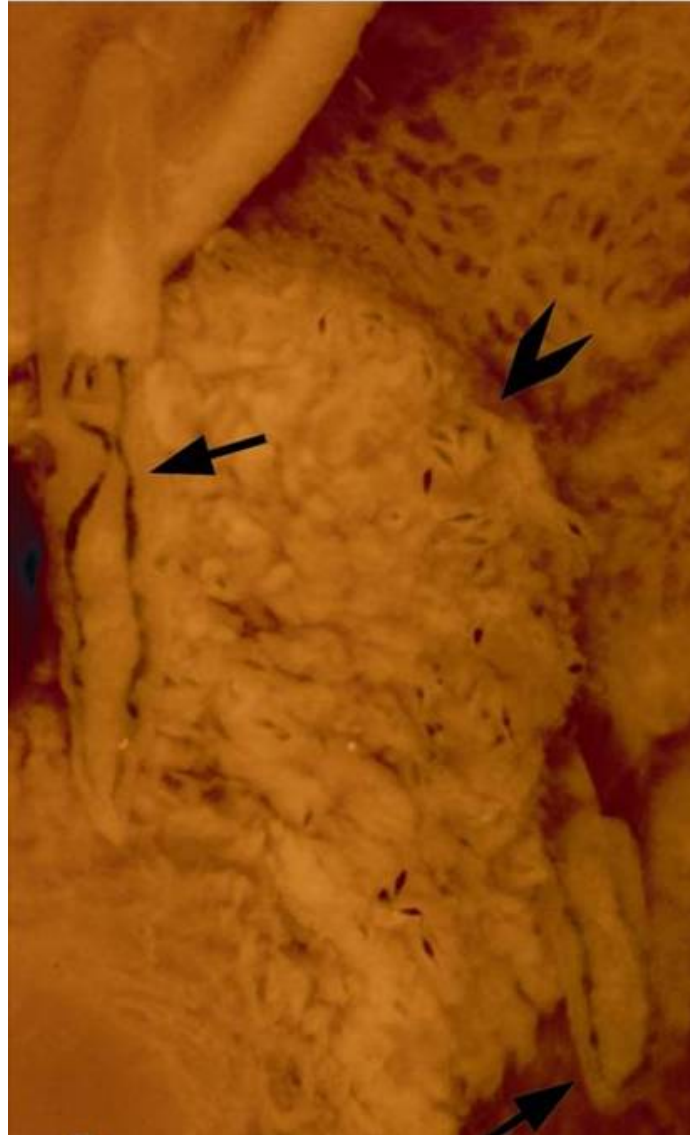


Fig. 30 Estadios parasitarios en cámaras cardiacas. Se aprecian parasitos adultos (flechas) y huevos en tejido miocárdico (puntas de flecha).

9.0 CONCLUSIONES

Las tortugas marinas son vectores y portadoras de agentes etiológicos infecciosos y tóxicos que afectan a otras especies animales, tanto marinas como terrestres, incluyendo al humano.

En base a la población de tortuga prieta evaluada, podemos considerar que la fase clínica de la FP cutánea, no está presente en Bahía Magdalena, BCS, México. Sin embargo, el género Herpes virus y todos los factores no virales (bacterias, parásitos, contaminantes, biotoxinas) reportados como posibles agentes causales de la FP están presentes.

La manifestación clínica de la FP, podría ser resultado de un complejo de factores predisponentes genéticos y ambientales: especie, edad, sexo, estado nutricional, presencia de agentes infecciosos y no infecciosos asociados con inmunosupresión, carcinogénesis y desarrollo del FP. Alternativamente, y dado que el agente causal del FP no se ha identificado plenamente, podríamos considerar que el verdadero agente de la fibropapilomatosis no se encuentra presente en Bahía Magdalena, BCS, México.

Adicionalmente, podemos considerar que la definición de fibropapiloma en diferentes publicaciones no concuerda con una sola entidad clínica. Así, los tumores viscerales reportados en la literatura no son necesariamente metástasis de FP cutáneo y podrían tener un origen distinto y ser provocados por diferentes etiologías; los huevos de trematodos podrían no ser agente etiológico para FP, pero si una patología común de alta prevalencia e incidencia en tortugas marinas, como lo demuestra la elevada prevalencia de infección por trematodos (97.5%) y en particular de *Learedius learedi* (> 90%) en la tortuga marina *Ch. mydas agassizii* de Bahía Magdalena, BCS, México, de la misma forma puede interpretarse las biotoxinas, reportadas como carcinógenos, presentes en estas mismas en ausencia de FP clínica.

Nuestros resultados demuestran daños reportados como FP dérmica y metastásica, sin observarse ninguna presentación clínica, por ello, concluimos que es una necesidad urgente determinar la patología del FP. Esto es, identificar el verdadero agente causal y su vía de

infección, describir la patogenia para con ello conocer los factores extrínsecos e intrínsecos asociados a esta y las características de cronicidad, severidad e intensidad de los cambios anatomofisiológicos tanto celular como sistémico en el transcurso de la enfermedad, así como su resolución. Solo de esta forma se evitara divagar entre las posibles etiologías, los posibles daños macroscópicos y microscópicos, cambios clínicos y subclínicos. Con ello elaborar un verdadero diagnóstico de FP.

10.0 LITERATURA CITADA

- Abba, A. K. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed. W. B. Saunders Company. USA.
- Acha, P. and Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol 1. 3a ed. Organización Panamericana de la Salud.
- Aguirre, A. Balazs, G. Zimmerman, B. and Galey, F. 1994. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. Marine pollution Bulletin.28(2): 109-114.
- Aguirre, A. Balazs, G. Zimmerman, B. and Spraker, T. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. J. Wildl. Diseases. 30(1): 8-15.
- Aguirre, A.A. and Spraker, T. R. 1996. Microscopic and ultrastructural evidence of herpesvirus-like virus in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. NOAA. Southwest fisheries center administrative Report H-96-066C, Honolulu.
- Aguirre, A. A. 1998. Fibropapilomas en tortugas marinas: un taller del XVIII Simposio sobre la Biología y la Conservación de las Tortugas Marinas. Noticiero de Tortugas Marinas 82:10-12.
- Aguirre, A. Spraker, T. Balazs, G. and Zimmerman, B. 1998. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles from the Hawaiian islands. J. Wildl. Dis.34(1): 91-98.
- Aguirre, A. 1999. FP papers presented at the 19th Annual Sea Turtle Symposium.(internet) Available from: <http://www.turtles.org/99fp.htm>.
- Aguirre, A. A., O'Hara, T.D., Speaker, T. R., Jessup, D. A. 2002. Monitoring the health and Conservation of Marine Mammals, Sea Turtles, and Their Ecosystems. IN: Conservation Medicine, ecological health in practice. Oxford University Press. Chapter 7.
- Alvarado, J. y Figueroa, A. 1990. Comportamiento reproductivo de la tortuga negra *Chelonia agassizi*. Ciencia y desarrollo. 17(98).

- AOAC. 1995. AOAC official method 959.08 Paralytic Shellfish Poison, biological method, final action. In: Cunniff, P (ed). AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 th edition. Chap. 35. AOAC. International, Arlington, V.A: 21-22.
- Arthur, K., Limpus, C. and Balazs, G. (2001). The effects of the toxic Cyanobacteria *Lynbya majuscula* on Marine Turtle. International Sea turtle Symposium. Miami, USA. Poster.
- Arthur, K., Limpus, C. and Balazs, G. (2002). The toxic cyanobacteria *Lynbya majuscula* as a component of green turtle diet. Proceedings of the Twenty-third Sea Turtle Biology and Conservation. Kuala Lumpur, Malaysia. Poster.
- Aznar, F.J., Badillo F.J. and Raga J.A. 1998 Gastrointestinal helminths of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western mediterranean: constraints on community structure. *J Parasitol.* 84(3): 474-479.
- Badillo, F.J. 1996. Estudio taxonómico y ecológico de los helmintos de la tortuga boba, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), en el Mediterráneo Occidental. Trabajo de tesis para obtener la licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España: 74 pp.
- Balazs, G. 1982. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago, Pp11-125. IN; K.A. Bjorndal (Ed), *Biology and Conservation of Sea Turtles.* Smithsonian Institution Press. Washington, D.C: 583 pp.
- Balazs, G. H. 1991. Current status of fibropapillomatosis in the Hawaiian green turtle , *Chelonia mydas*. In *Research plan for marine turtle fibropapilloma.* G. H. Balazs, and S. Pooley (eds). U. S. Department of Commerce, (NOAA-TM-NMFS-SEFSC-436), Washington, DC: 112-114.
- Balazs, G. H., Rice, M., Murakawua, K. K. y Watson, G. 1996. Growth rates and residency of immature green turtles at Kiholo bay, Hawaii. <http://www.turtles.org/kiholo.html>.
- Beveridge, W. y Sobin, L. 1974. International histological classification of tumours of domestic animals. *Bulletin of the World Health Organization.* 50 (1-2):142 pp.

- Bjorndal, K. 2000. Prioridades para la investigación en hábitats de alimentación. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4:13-15. (traducción al español).
- Blanchard, T. Santiago, N. Lipscomb, T. Garber, R. Mcfee, W. and Knowles, S. 2001. Two novel alpha herpesvirus associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. . J. Wildl. Dis. 37(2): 297-305.
- Bourhy, H y Sureau, P. (1990). Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia. Comisión des laboratoires de référence et d' expertise de'l Institut Pasteur. Unité de la Rage, Institut Pasteur. Versión espagnole par J. A. Montaña.
- Brill, R. Balazs, G. Holland, Kim. Chang, R. Sullivan, S. and George, J. 1995. Daily movements, habitat use, and submergence intervals of normal and tumor-bearing juvenile green turtles (*Chelonia mydas* L.) within a foraging area in the Hawaiian Islands. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 185: 203-218.
- Bosch, F., Manos, M., Munos, N., Sherman, M., Jansen, A., Peto, J., Schiffman, M., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: worldwide perspective. J. Natl. Cancer Inst. 87: 796-802.
- Butel, J. 2000. Viral carcinogenesis; revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. Carcinogenesis. 21(3): 405-426.
- Caballero, E. 1962. Trematodos de las tortugas de México. Presencia de *Orchidasma amphiorchis* (Braun,1899) Loos, 1900 en una tortuga marina, *Chelonia mydas* de las costas del estado de Tamaulipas, México. Anales del Instituto de Biología (Univ. Méx). 33(1-2): 47-55.
- Caballero, E.y D. Zerecero. 1950. Trematodos de las tortugas de México. Rev. Med. Vet. Y Paras. 9(1-4): 123-132.
- Caballero, E., D Zerecero and R. Grocott. 1955. Helmintos de la Republica de Panamá, trematodos de *Chelonia mydas* (L.) tortuga marina comestible del Océano Pacifico del Norte, 2a parte. Anales del Instituto de Biología México XXVI, 1: 149-191.

- Cardellina, J. Marner, F. Moore, R. 1979. Seaweed dermatitis: Structure of Lyngbyatoxin A. *Science*. 204: 193-195.
- Casey, R. Quackenbush, S. Work, T. Balazs, G. Browser, P. and Casey, J. 1997. Evidence for retrovirus infections in green turtle, *Chelonia mydas* from the Hawaiian islands. *Dis. Aquat. Org.* 31:1-7.
- Castelán, M. H. 2004. Detección de Herpes virus mediante PCR en tortugas marinas habitantes en aguas costeras de la Península de Baja California. Trabajo de tesis para obtener el título de Biólogo Marino. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz BCS, México. 40 pp.
- Champetier, R. G., Ranaivoson, G., Ravaonindrina, N., Rakotonjanabelo, A.L., Rasolofonirina, N., Roux, J.F., and Yasumoto, T. 1998. Un probleme de sante publique reemergent a Madagascar: les intoxications collectives par consommation de' animaux marins. Aspects epidemiologiques, cliniques et toxicologiques des episodes notifiés de janvier 1993 a janvier 1998. *Arch. Inst. Pasteur. Madagascar.* 64:71-76.
- Cheng L., Alexander, G.V., Franco P.J. 1976. Cadmium and other metals in sea sckaters. *Water Air and Soil Pollution.* 6: 33-38.
- Chiou, V. 2002. Duck antibodies for IVD applications. *IVD Technology*, April: p31. <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/04/0003html>.
- Coberley, S. Herbst, L. Ehrhart, Ll. Bagley, D. Hirama, S. Jacobson, E. and Klein P. 2001. Survey of Florida green turtles for exposure to a diseases-associated herpesvirus. *Diseas. Aqua. Org.* 47: 159-167.
- Cordero, A., Gardner, S., Blanco, A., and Inohuye, R. 2004. Learedius learedi infection in Black Turtles (*Chelonia mydas agassizii*), Baja California Sur, México. *J. Parasitol.* 90 (3): 645-647.
- Cribb, T.H. 1998. The Diversity of Digenea of Australian animals. *International Journal for Parasitology.* 28(1998): 899-911.
- Cribb, T. H., and Gordon, A. N. 1998. Haplotrema (Digenea: Spirorchidae) in green turtle (*Chelonia mydas*) in Australia. *Journal of Parasitology.* 84(2): 375-378.

- Crowell, D. 1987. Behavior and communication of sea turtles. Thesis to obtain degree Doctor of Philosophy. Texas State University.
- Curry S. Brown, D. Gaskin, J. Jacobson, E. Ehrhart, L.I. Blahak, S. Herbst, L. and Klein, P. 2000. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *J. Wildl. Dis.* 36(4): 792-797.
- Dailey, M., Fast M., and Balazs, G. 1991. *Carettacola hawaiiensis* N. sp. (Trematoda:Spirorchidae) from the green turtle, *Chelonia mydas*, in Hawaii. *Journal Parasitology.* 77(6): 906-909.
- Dailey, M., Fast M., and Balazs, G.. 1993. *Hapalotrema dorsopora* sp. n. (Trematoda: Spirorchidae) from the Heart of the Green Turtle (*Chelonia mydas*) with a Redescription of *Hapalotrema postorchis*. *Journal Helminthology, Society of Washington* 60(1): 5-9.
- Diez, E. y Ottenwalder, J. 2000. Estudios de habitat.. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4: 45-49 (traducción al español)
- Duffy, L.K., Bowyer, R.T., Testa, J.W. y Faro, J.B. 1994. Chronic effects of the Exxon Valdez oil spill on blood and enzyme chemistry of river otters. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(4): 643-647.
- Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies, IN; B.W. Bowen y W.N. Witzell, Eds. Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetic, NOAA, Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Dept. Comercio: 17-24.
- Dyer, W., Williams,E., and Bunkley-Wiliams, L. 1991. Some digeneans (Trematoda) of green turtle, *Chelonia mydas* (Testudines: Cheloniidae) from Puerto Rico. *Journal of Helminthological Society of Washington.* 58(2): 176-180.
- Dyer, W., E.Williams and L. Bunkley-Wiliams. 1995a. Digenea of green turtle (*Chelonia mydas*) and the Leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) from Puerto Rico. *Caribbean Journal of Sciences.* 31(3-4): 269-273.

- Dyer, W., E. Williams and L. Bunkley-Williams. 1995b. *Angiodictyum mooreae* n. sp. (Digenea: Microscaphidiidae) and other Digeneans from an Atlantic Hawksbill Turtle *Eretmochelys imbricata* from Puerto Rico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 7: 38-41.
- Dyer, W., Williams, E., Bunkley-Williams, L., and Moore, D. 1995c. Some digeneans (Trematoda) of the Atlantic Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata imbricata* (Testudines: Cheloniidae) from Puerto Rico. *Journal of Helminthological Society of Washington* 62(1): 13-17.
- Eckert, K. 2000. Diseño de un programa de conservación. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4: 6-8. (traducción al español)
- Fitzzgerald, S. 2004. Los metales pesados en cuatro especies de tortugas marinas de baja California, Mexico. Trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz BCS, México: 120pp.
- Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M., Sugimura, T., and Moore, R.E. (1981). Indole alkaloids: dihydroteleocidin b, telocidin, and lymngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 3872-3876.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Hakii, H., Bartolini, G., Moore, R., Takamaya, S., and Sugimura. (1984a). A two-stage mouse skin carcinogenesis study of lymngbyatoxin A. *Clinical Oncology*: 174-176.
- Fujiki, H., Sugimura, T. (1984b). New potent tumor promoters: teleocidin, lymngbyatoxin A and aplysiatoxin. In: Slaga, T., Montesano, R. (eds). *Cancer surveys*. Vol. 2. *Oxford University Press*, London. 539-556.
- Fujiki, H., Ikegami, K., Hakii, H., Suganuma, M., Yamaizumi, Z., Yamazato, K., Moore, R. and Sugimura, T. 1985. a blue-green alga from Okinawa contains aplysiatoxins, the third class of tumor promoters. *Jpn. J. Cancer Res*. 76: 257-259.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2 A: The okadaic acid class of compounds. *Ad in Canc Res*. 61: 143-194.

- Garcia Conde-Bru, J. 1997. Oncología, In: Medicina interna. Ed. Masson S.A. Barcelona, España: 3083-3163.
- Gardner, S.C., M.D. Pier, R. Wesselman and J.A. Juárez. 2003. Organochlorine Contaminants in Sea Turtles from the Eastern Pacific. Mar. Pol. Bull. 46(9):1082-1089
- Gardner, S. and Nichols, W. 2001. Assessment of sea turtles mortality rates in the Bahía Magdalena region, Baja California Sur, México. Chelonian Conservation and Biology. 4(1): 197-199.
- George, R. 1997. Health problems and diseases of sea turtles. in The Biology of Sea Turtles. eds Peter L. Lutz y John A. Musick. CRC Press. Washington, USA. 363-385.
- Glazebrook, J. Campbell, R. and Blair, D. 1981. Pathological changes associated with cardiovascular trematodes (Digenea: *spirorchidae*) in a green sea turtle *Chelonia mydas* (L) J Comp Path. 9 : 361-368.
- Glazebrook, J. Campbell, R. and Blair, D. 1989. Studies on cardiovascular fluke (Digenea: Spirorchidae) infections in sea turtles from the Great Barrier Reef, Queensland, Australia. J. Comp. Path. 101:231-250.
- Glazebrook, J., and Campbell, R. 1990. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. Dis. Aqua. Org. 9: 97-104.
- Godinez, R.C., Zelaya de Romillo, B., Auriolos, G. D., Verdugo, R.A., Rodríguez, R.E., and Peña, M.A. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups from Gulf of California. Journal Wildlife Diseases. 35(1): 108-111.
- Gordon, A.N., Kelly, W.R. and Cribb, T.H. 1998. Lesions caused by cardiovascular flukes (Digenea: *Spirorchidae*) in stranded green turtles (*Chelonia mydas*). Vet. Pathol 35(1): 21-30.
- Graczyk, T.K., Aguirre, A.A. and Balazs, G. 1995. Detection by ELISA of circulating anti-blood fluke (*Carettacola*, *Hapalotrema*, and *Learedius*) immunoglobulins in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). J. Parasitol. 81(3): 416-421.
- Guise, S. 1997. Immune functions in Beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of natural killer cell activity. Vet. Immunol. Immunopathol. 58(3-4): 345-354.

- Gutierrez, E. Villaescusa, J. y Arreola, A. 1999. Bioacumulación de metales en mejillones de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Ciencias Marinas*. 25(4): 557-578.
- Halstead, B. W. 1959. *Dangerous Marine Animals*. Cornell Maritime Press. USA.
- Halstead, B. W. 1968. *Poisonous and Venemous Marine Animals of the World*. The Darwin Press. USA.
- Hashimoti, Y., Ko-nosu, S. and Yasumoto, T. 1967. Epidemiological research of poisoning caused by turtles in Okinawa. Tokyo University report. 1-5.
- Hashimoto, Y. (1979). *Marine Toxins and other Bioactive Marine Metabolites*. Japan Scientific Press. Japan.
- Herbst, L.H.,1994 Fibropapilomatosis of marine turtles, *Annu. Rev. Fish Dis.* 4: 389-425.
- Herbst, L., Jacobson, E. 1995. Diseases of marine turtles, IN: K.A. Bjorndal Ed, *Biology and Conservation of Sea Turtles*, Revised edition. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.:593-596.
- Herbst, L. H. y Klein,P.A. 1995. Monoclonal antibodies for the measurements of class-specific antibody responses in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 46: 317-335.
- Herbst, L., Jacobson, E. R., Moretti, R, Brown, T. Sundberg, JP. and Klein PA. 1995. Experimental Transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Dis. Aquat. Org.* 22: 1-12.
- Herbst, L. et al, 1998. Serologic asociation between spirorchidiasis, herpes virus infection, and fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) from Florida. *J Wil Dis.* 34(3): 496-507.
- Herbst, L. Jacobson, E. Klein, P. Balazs, G. Moretti, R. Brown, T, and Sunderbg, J. 1999. Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*), *Vet. Pathol.* 36: 551-564 .
- Homer, B. Berry, K. Brown, M. Ellis, G. and Jacobson, E. 1998. Pathology of diseases in wild desert tortoises from California. . *J. Wildl. Dis.* 34(3): 508- 523.
- Howard, E.1983, *Pathobiology of Marine Mammals Diseases*, Vol II, CRC press.

- Inohuye, R. R., Cordero, T. A., Arellano, B. J., and Gardner, S. C. 2004. *Learedius learedi* Price, 1934 (Trematoda: Spirorchidae), in black turtle (*Chelonia mydas agassizii*) hearts from Magdalena Bay, Baja California Sur, Mexico. *Comp. Parasitol.* 71(1): 37-41.
- Ito, E. Satake, M. and Yasumoto, T. 2002. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon.* 40: 551-556.
- Jacobson, R. 1996. Marine turtle farming and health issues. *Marine Turtle Newsletter* 72: 13-15.
- Jekel, J. Katz, D. and Elmore, J. 2001. *Epidemiology, biostatistics, and preventive medicine.* 2n edition. Ed W.B. Saunders. Philadelphia, USA: 417 pp.
- Juarez, C. A. 2004. Determinación de contaminantes organoclorados en tres especies de tortugas marinas de Baja California Sur. Trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz BCS, México. :68 pp.
- Karl, S. A., and Bowen, B.W. 1999. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus chelonian). *Conservation Biology.* 13 (5): 990-999.
- Kinne, O. 1985. *Diseases of marine animal: volume 4, part 2.* ed BAH. Germany.
- Kodama, M., Ogata, T. , Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T., and Miwatami, T. 1990. Production of paralytic shellfish toxins by bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon.* 28:707-714.
- Kot, F., Green, C., Páez, F., Shumilin, E., and Rodriguez, D. 1999. Distribution of mercury in sediments from La Paz lagoon, Peninsula of Baja California, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 45-51.
- Lackovich, J. K., Brown, D. R. & Klein, P. A. 1998. PCR confirms absence of papillomavirus from sea turtle fibropapillomas. 18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Mazatlán, Sinaloa, México.
- Lackovich, J. Brown, D. Homer, B. Garber, R. Mader, D. Moretti, R. Patterson, A. Herbst, L. Oros, J. Jacobson, E. Curry, S. and Klein, P. 1999. Association of

- herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Dis. Aquat. Org.* 37: 89-97.
- Landsberg, J.H. 1995. Tropical reef-fish disease outbreaks and mass mortalities in Florida, USA: what is the role of dietary biological toxins?. *Dis Aquat Org.* 22: 83-100.
- Landsberg, J.H. 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection?. *J Shellfish Res.* 15 (2): 203-230.
- Landsberg, J. Balazs, G. Steidinger, K. Baden, D. Work, T. and Russell D. 1999. The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. *J. Aquat. Anim. Health.* 11: 199-210.
- Larski, 1988. *Virología para Veterinarios.* 2ª, ed. La Prensa Médica Mexicana. México:566 pp.
- Lauckner, G. 1985. Diseases of reptilia. In *Diseases of marine animals*, O. Kinne (ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany. :553-626 .
- Lipscomb, T.P. et al. 1993. Histopathologic lesions in sea otters exposed to crude oil. *Vet. Pathol.* 30(1):1-11.
- Lopez, M. 2002. Ecología alimenticia de *Chelonia mydas agassizii* en Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. Trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el Uso y Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz BCS, México. 89pp.
- Lu, Y. Nerurkar, V. Aguirre, A. Work, T. Balazs, G. and Yanagihara, R. 1999. Establishment and Characterization of 13 cell lines from a green turtle (*Chelonia mydas*) with fibropapillomas. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35: 389-393.
- Lu, Y. Aguirre, A. Work, T. Balazs, G. Nerurkar, V. and Yanagihara, R. 2000a. Identification of small, naked virus in tumor-like aggregates in cell lines derived from a green turtle, *Chelonia mydas*, with fibropapillomas. *J. Virol. Methods.* 86: 25-33.
- Lu, Y. Wang Y. Yu, Q. Aguirre, A. Balazs, G. Nerurkar, V. and Yanagihara, R. 2000b. Detection of herpes viral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 145:1885-1893.

- Lu, Y. Yu, Q. Zamzow, J. Wang, Y. Losey, G. Balazs, G. Nerurkar, V, and Yanagihara, R. 2000a. Detection of green turtle herpes viral sequence in Saddleback Wrasse *Thalassoma duprey*: A possible mode of transmission of green turtle fibropapilloma. *J. Aquat. Animal health*. 12: 58-63.
- Lutcavage, M.E., Boshell, P.G. y Jones, D.R., 1990 .Oxygen transport in the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*). *Physiol Zool*. 63(5): 1012-1024.
- Lutcavage, M.E., Plotkin, P., Witherington, B. y Lutz, P.L., 1997. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Mahy, B., 1991. *Virology a Practical Approach*. Oxford University.
- Martin J.H. and Broenkow, W.W. 1975. Cadmium in plankton: Elevated concentrations off Baja California. *Science*. 190: 884-885.
- Méndez, L., Acosta, B., Alvarez-Castañeda, S.T., Lechuga-Devéze, C.H. 1998. Trace metal distribution along the southern coast of Bahía de La Paz (Gulf of California) México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 61:616-620
- Méndez, L., Alvarez-Castañeda, S.T., Acosta, B and A.P. Sierra-Beltrán. 2002. Trace metals in tissues of gray whale carcasses (*eschrichtius robustus*) from the northern pacific mexican coast. *Bulletin of Marine Pollution*. 44(3): 217-221
- Meylan A. y Meylan, P. 2000. Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las tortugas marinas. IN: *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas*. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4:3-5. (traducción al español)
- Mundy, G. 2002. Metástasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature*. 2: 584-593.
- Muro, J. Ramis, A. Pastor, J. Velarde, R. Tarres, J. And Lavin, S. 1998. Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *J. Wildl. Dis*. 34(3): 487-495.
- Myers, D.M., 1985. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de Leptospirosis*. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina: Organización Mundial de la Salud.

- Noga-Edward, J. 1998. Toxic algae, fish kills and diseases. *Fish-Pathol.* oct 33(4): 337-342
- Norton, T. M., Jacobson, E. R. & Sundberg, J. P. 1990. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. *J. Wildl. Dis.* 26: 265
- Nycholls, P.K., and Stanley, M. A. 2000. The immunology of animal papillomavirus. *Vet. Immunol and immunopath.* 73(2): 101-127.
- Orós, J., Lackovich, J. K., Jacobson, E. R., Brown, D. R., Tucker, S. & Klein, P. A. 1998. Fibropapillomatosis in sea turtles: a remarkable case, in Proceedings 16th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Norway: 128 pp
- Orrigi, F. Klein, P. Mathes, K. Blahak, S. Marschang, R. Tucker, S. and Jacobson. 2001. Enzyme-Linked Immunosorbent Absorbent for detecting Herpes virus exposure in Mediterranean tortoises (Spur-thighed tortoise {*Testudo graeca*} and Herman s tortoise {*Testudo hermanni*}). *J. Clinic. Microbiol.* 39(9):3156-3163.
- Owens, D. 2000, Ciclos reproductivos y endocrinología. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4.: 137-142. (traducción al español)
- Owens, D Wei, S. and Smart, R. 1999. A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 20(9): 1837-1844.
- Pelletier, E. 1986. Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: A review. *Mar. Environ. Res.* 18(2):111-1132.
- PEMEX. 1991. Evaluación de la concentración de hidrocarburos, metales pesados y algunos aspectos del agua superficial en el golfo de California, 1984-1985. PEMEX.
- Perez Ponce de León, G., García L. and Leon V. 1996. Gastrointestinal Digenetic Trematodes of Olive Ridley's Turtle (*Lepidochelys olivacea*) from Oaxaca, México. Taxonomy and Infracomunity Structure. *J Helminthol Soc Wash.* 63(1): 76-82.
- Pérez, Z. A. J., Levy, P. V. A., Vega, B. M. L., Uribe, H. R. y Aguilar, B. J. C., 1993. Evaluación de plomo en la almeja *Chione californiensis* de la ensenada de La Paz, B. C. S. muestras de 1988 a 1989. *Res. V Congr. Latinoamer. de Cienc. del Mar.* 60.
- Prehn, R. 1997. Regeneration versus neoplastic growth. *Carcinogenesis.* 18(8):1439-1444.

- Pritchard, PC. 1997. Evolution, phylogeny and current status. in The Biology of Sea Turtles. eds Peter L. Lutz y John A. Musick. CRC Press. Washington, USA.:1-28.
- Pritchard, PC, H. y Mortimer, J,A. 2000, Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4: 23-41 (traducción al español).
- PROFEPA-SEMARNAP. 1998. Mortandad de tortugas marinas an la Laguna Ojo de Liebre. B.C.S. Informe técnico.
- Prophet, E. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D. C. American Registry of Pathology.
- Purchase, H.G. 1989. A Laboratory Manual for Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3th ed., American Association of Avian Pathologists.
- Quackenbush, S. Work, T. Balazs, G. Casey, R. Rovnak, J. Chaves, A. du Toit, L. Baines, J. Parrish, C. Bowser, P. and Casey, J. 1998. Three closely related Herpesvirus are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. Virol. 246: 392-399.
- Quackenbush, S. Casey, R. Murcek, R. Paul, T. Work, T. Limpus, C. Chaves, A. du Toit, L. Vasconcelos, J. Aguirre, A. Spraker, T. Horrocks, J. Vermeer, L. Balazs, G. and Casey, J. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas on marine turtles with real-time PCR. Virol. 287:105-111.
- Raidal, S., M. Ohara, R. Hobbs, and R. Prince. 1998. gram-negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Chelonia mydas*). Aust Vet J. 76: 415-417.
- Rainey, W. 1982. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-82.
- Ranaivoson, G., Champetier, R.G., Mamy, E.R., Jeannesod, E.R., Razanfinjano, P. and Chanteu, S. 1994. Mass food poisoning after eating seaturtle in Antalaha district. Arch Inst Pasteur Madagascar. 61 (2): 84-86.
- Rand, T. G. and Wiles, M. 1985. Histopathology of infections by *Learedius learedi* Price, 1934 and *Neospororchis schistosomatoides* Price, 1934 (Digenea: *Spirorchidae*) in wild green turtles, *Chelonia mydas* L., from Bermuda. J Wildli Dis. 21(4): 461-463.

- Repetto, R., 1996, Pesticides and the immune system. World Resources Institute.
- Resendiz, A., and Nicholls, J. 2002. Report to Wildcoast on first year of grupo tortuguero de las Californias monitoring project. Bahia de los Angeles, BCN. 35 pp.
- Richman, L. Montali, R. Cambre, R. Schmitt, D. Hardy, D. Hildbrant, T. Bengis, R. Hamzeh, F. Shahkolahi, A. and Hayward, G. 2000. Clinical and pathological findings of a newly recognized disease of elephants caused by endotheliotropic herpesvirus. . J. Wildl. Dis. 36(1):1-12.
- Roos, P.S., et al. 1996. The immunotoxicity of enviromental contaminants to marine wildlife: a review. Ann Rev Fish Dis. 6: 179-191.
- Ross,J. 2000. La crianza y reproducción en cautiverio de tortugas marinas: una evaluación de su uso como estrategia de conservación,. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4: 225-231 (traducción al español)
- Sschottenfeld D, and Fraumeni JF. 1996. Cancer epidemiology and prevention, 2a ed. Oxford: Oxford University Press.
- SEMARNAP. 1999. SEMARNAP, Programa Ambiental de México, Programa Nacional de Protección y Conservación de Tortugas Marinas, Resultados (1992-1997). Ed. Secretaria de Medio ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Distrito Federal, México. 81 pp.
- Sey, O. 1977. Examination of helminth parasites of marine turtles caught along the Egyptian coast. Acta zoologica academiae scientiarum hungaricae. 23(3-4):387-394.
- Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1973. Theory an practice of histotechnology. 2nd Ed. Mosby Company Saint Louis. 481pp.
- Shumilin, E., Kalmykov, St., Sapozhnikov, D., Nava-Sánchez, E., Gorsline, D., Godinez-Orta, L., Sapozhnikov, Yu., Holguin Quiñones, O., and Rodriguez Castañeda, A. 2000. Major and trace element accumulation in coastal sediments along southeastern Baja California studied by instrumental neutron activation analysis and 210 Pb age-dating. J. Radioanalytic and Nuclear Chem. 246 (3): 533-541.

- Shumilin, E., Páez, F., Green, C., Sapozhnikov, D., Rodriguez, D., and Godínez, L. 2001. Arsenic, antimony, selenium and other trace elements in sediments of the La Paz lagoon Peninsula of Baja California, Mexico. *Marine Pollut. Bull.* 42(3):174-178.
- Silas, G. E. and Fernando, B. A. 1984. Turtle poisoning. *Sea Turtle Research. CMFRI Bulletin* 35: 62-75.
- Smith, G. and Coates, W. 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica.* 23:84-89.
- Smith, J. W. 1972. The blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae) and Spirorchidae of cold-blooded vertebrates and some comparison with the schistosomes. *Helminthological Abstracts, series A,* 41:161-204.
- Staley, B. 1989. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Eds. Williams y Wilkins. Baltimore, U.S.A.
- Stevens, A. and Lowe, J. 1995. *Pathology.* ed Mosby, Liverpool, England:35-99.
- Strainchamps, V. (2000). Intoxication alimentaire par consommation de tortue marine à bec d'oiseau (*Eretmochelys imbricata*) en Polynésie Française. Thèse Doctorat Médecine. Université Bordeaux 2. France.
- Swimmer, J. 2000. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *J. Wildl. Dis.* 36(1):102-110.
- Taylor, J.A., Tewari, K, Liao, S.Y., Hughes, C.C., and Villareal, L.P. 1999. Immunohistochemical analysis, Human papillomavirus DNA detection, hormonal manipulation, and exogenous gene expression of normal and dysplastic human cervical epithelium in severe combined immunodeficiency mice. *J. Virol.* 73 (6):5144-5148.
- Taylor, L.H., Latham, S. M., and Woolhouse, M.E. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356: 983-989.
- Turner, J. T. y Tester, P.A. 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limnol. Oceanogr.* 42(5):1203-1214.
- Tizard, I. 1995. Resistance of tumours, Chapter 16 in: *Veterinarian Immunology.* 4th Ed. Texas A&M, Veterinary University, Texas, USA: 210-223.

- U.S. Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior. 1997. Sinopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). Biological report 97 (1): 120.
- Valdivia, J. P. 2003. Metabolismo oxidativo asociado a la presencia de tumores en tortugas marinas. Trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el Uso y Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz BCS, México. 129pp.
- Villaescusa C., J. A., E. A. Gutierrez G., G. Flores M. Y A. Arreola Ch., 1991. Metales traza en el mejillón, *Modiolus capax*, del Golfo de California; variaciones geográficas. Res. III Congr. de la Asoc. de Investigadores del Mar de Cortes. ITESM-Campus Guaymas. 17.
- Walsh, M. 2000. rehabilitación de tortugas marinas,. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4:232-238 (traducción al español)
- Wibbels, T. 2000. Determinación del sexo en las tortugas marinas en habitats de alimentación. IN: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las tortugas Marinas. K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreau-Grobois y M. Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo especialista en tortugas marinas, publicación No. 4:160-164 (traducción al español)
- Wiles, M. And Rand, T. 1987. Integumental ulcerative disease in a loggerhead turtle *Caretta caretta* at the Bermuda aquarium: microbiology and histopathology. Dis. Aquat. Org. 85:85-90.
- William, E. P. 1999. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. NY. E U.:1589pp.
- Williams, E. Bunkley-Williams L. Peters, E.Pinto-Rodriguez, B. Matos-Morales, R. Mignucci-Giannoni, A. Hall, K. Rueda-Almonacid, J. Sybesma, J. Bonnelly de Calventi, I. And Boulon. R. 1994. An Epizootic of cutaneous fibropapillomas in green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: part of panzootic?. J. Aqua. Animal Healt. 6:70-78.

- Work, T. 2000. Manual de necropsia de tortugas marinas para biólogos en refugios o áreas remotas. U.S. Geological Survey National Wildlife Health Center Hawaii Field Station. Traducción al español Sonya Renee Ubico.
- Work, T. Balazs, G. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J. Wildl. Dis.* 35(4):804-807.
- Work, T. Balazs, G. Rameyer, R. Chang, S. and Berestecky, J. 2000. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Vet. Immunol. Immunopath.* 74: 179-194.
- Work, T. Rameyer, R. Balazs, G. Cray, C., and Chang, S. 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *J. Wildl. Dis.* 37(3):574-581.
- Wyneken, J. 1997. Sea turtle locomotion: Mechanics, behavior and energetics. IN: *The Biology of Sea Turtles*, Peter L. Lutz y John A. Musick. Eds CRC Press:137-164.
- Wyneken, J. 2001. *The Anatomy of Sea Turtles*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. and Murata, M. 1978. Occurrence of a new type shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44:1249-1255.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y. and Matsumoto, K. And Clardy, J. 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In Ragelis E.P. (ed.). *Seafood Toxins*. ACS Symposium series 262. American Chemical Society, USA.: 207-214.
- Yasumoto, T. and Murata, M. 1993. *Marine Toxins*. *Chem Rev.* 93:1897-1909.
- Yasumoto, T. 1998. Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the pacific. *Toxicon.* 36: 1515-1518.
- Yasumoto, T. 2001. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem Record.* 1: 228-242.
- Yu, Q. Hu, N. Lu, Y. Nerurkar, R and Yanagihara, R. 2001. Rapid acquisition of entire DNA polymerase gene of a novel herpes virus from green turtle fibropapilloma by a genomic walking technique. *J. Virol. Method.* 91:183-195.
- Yuspa, S. 2000. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis.* 21(3): 341-344.

- Zbar, A., Guillou, P., Bland, I., and Syrigo, K. (eds). 2002. Immunology for surgeons. Springer ed. England. 454 pp.