



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FIBROPAPILOMATOSIS EN TORTUGA
GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) DE LA
PLAYA "ESCOBILLA" OAXACA, MÉXICO.

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

JESÚS EDUARDO RESÉNDIZ MORALES

TUTOR:
FERNANDO CONSTANTINO CASAS

COMITÉ TUTORAL:
ENRIQUE MARTÍN ABURTO FERNÁNDEZ
JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias:

A mis padres Ángela Morales y Eduardo Reséndiz por todo su amor y apoyo...

A mi hermana Cynthia y Marco por absolutamente todo...

A mi sobrino Leo, que con su llegada cambio el color de mi vida...

A mi tía Caty por tanto apoyo...

A Marlen por compartirme su amor, por no dejarme caer y estar siempre cuando la necesité...

A todos los que después de tanto trabajo encontraron el hilo dorado en su piel, a los que después de tanto navegar contra el mar, encontraron otra corriente que los ha venido a salvar, a los que no reniegan de su suerte, desafían a la soledad, provocan al destino, a la vida y se enfrentan a la muerte, a los que antes de conocer el sol, conocieron el valor de otras cosas, a los que no tienen prejuicios y tienen paciencia y conciencia, a los que tienen fe y nunca pierden la esperanza, a los que cuando su mirada está en lugares sin luz se atreven a brillar, a los que les toca navegar contra el mar, a los que buscan paz pero se enfrentan a la guerra cuando es necesario, a todos los que van siempre para adelante, a todos los sinceros que sonríen con el corazón, a los verdaderos amigos, a todos los que son libres, auténticos y descarados, a los niños, a los que creen en la magia y la verdad, a los que se atreven a ser diferentes y son naturales, a todos los que van y vienen por este camino, esto que escribo, se lo escribo a los guerreros, que trabajan duro por alcanzar sus sueños y no han olvidado el lenguaje universal...

Finalmente a los que a pesar de todo siguen en pie y finalmente a las tortugas...

Agradecimientos:

- Al MVZ Carlos Cedillo Peláez y MC C. Gerardo Salas Garrido, por su valiosa colaboración en la parte de Patología, Microscopía electrónica de transmisión e Inmunohistoquímica.
- A la MC Martha Harfush Meléndez y al Hidrobiólogo Ernesto Alvabera Padilla del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) por el apoyo para este proyecto, por su asesoría, su tiempo y las facilidades para realizar el trabajo de campo.
- A los Técnicos Joel Rodríguez y Lorenzo Martínez por su colaboración.
- Al MC Alfredo Canela Hidalgo y a las MVZ Mariela Díaz Negrete, Adriana Montiel y Alicia Arrona.

Sin duda esta tesis no hubiera sido posible sin ustedes.

A [tod@s](#) los que colaboraron con su granito de arena.

¡Eternamente agradecido!

Índice	Página
1. Introducción.	1-3
1.1 Generalidades de las Tortugas marinas.	3-4
1.1.2 Tortuga golfina (<i>Lepidochelys olivacea</i>).	4
1.1.3 Piel de las Tortugas Marinas.	5
1.1.4 Epidermis.	5
1.1.5 Dermis.	6
1.1.6 Escamas.	6
1.1.7 Caparazón.	7
1.1.8 Fisiología de la piel.	7
1.1.9 Enfermedades y agentes causales frecuentes asociados a enfermedades en tortugas marinas.	8
1.2 Partículas virales.	9
1.2.1 Infecciones por herpesvirus en tortugas marinas.	9
1.2.2 Herpesvirus asociado a la fibropapilomatosis.	10
1.2.3 Neoplasias.	10
1.2.4 Fibroma.	11
1.2.5 Papiloma.	12
1.2.6 Fibropapiloma (FP).	13
1.2.7 Generalidades de los virus.	14
1.2.8 Herpesvirus.	14
1.2.9 Papilomavirus.	15
1.3. Iridovirus.	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. OBJETIVOS PARTICULARES	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Recorridos de playa e identificación de tortugas con FP.	18
6.1.1 Evaluación macroscópica de FP y recolección de muestras.	19
6.1.2 Datos biométricos.	20
6.1.3 Procesamiento y revisión de muestras.	21
6.1.4 Histopatología.	21
6.1.5 Inmunohistoquímica.	22-23

6.1.6 Microscopía electrónica de transmisión.	23-24
6.1.7 Análisis estadístico.	24
7. RESULTADOS.	25
7.1 Evaluación macroscópica de FP y datos biométricos.	25
7.1.1 Histopatología.	25-26
7.1.2 Inmunohistoquímica.	26
7.1.3 Ultraestructura.	26-28
8. Discusión.	29-37
9. Conclusiones.	38-39
10. REFERENCIAS.	39-47
11. ANEXOS.	48
Lista de cuadros.	
Cuadro 1. Características generales de los virus.	49
Cuadro 2. Datos biométricos y características de los FP de las tortugas evaluadas.	50-52
Cuadro 3. Hallazgos histopatológicos epidermales	53
Cuadro 4. Hallazgos histopatológicos dermales	54
Cuadro 5. Análisis de frecuencias de presentación de tortugas con FP en la zona de captura.	55
Cuadro 6. Análisis de frecuencias de la distribución corporal de FP en las tortugas.	55
Cuadro 7. Rango de Tamaño y análisis de frecuencias de grado de los FP	55
Cuadro 8. Análisis de frecuencias de la descripción macroscópica de los FP.	56
Cuadro 9. Rangos y medias de los Datos biométricos de las tortugas evaluadas.	56
Cuadro 10. Hallazgos histopatológicos epidermales de las tortugas evaluadas por medio de la prueba estadística Kruskal Wallis.	57
Cuadro 11. Hallazgos histopatológicos dermales de las tortugas evaluadas por medio de la prueba estadística Kruskal Wallis.	57
Cuadro 12. Inmunopositividad a Herpesvirus simplex tipos I y II.	58
Lista de gráficas	

Gráfica 1. Comparación de hallazgos histopatológicos epidermales en los tres grupos de tortugas evaluadas.	59
Gráfica 2. Comparación entre los hallazgos histopatológicos epidermales de las tortugas evaluadas.	59
Gráfica 3. Comparación de los hallazgos histopatológicos dermales de los tres grupos de las tortugas evaluadas.	60
Gráfica 4. Comparación entre los hallazgos histopatológicos dermales de las tortugas evaluadas.	60
Lista de Figuras.	
Figura 1. Vista satelital de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.	61
Figura 2. Vista aérea de la playa y del campamento tortuguero “Escobilla” del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT).	61
Figura 3. Inicio de la arribada de Tortuga golfina (<i>Lepidochelys olivacea</i>) durante agosto de 2006 en la Playa “Escobilla” Oaxaca, México.	62
Figura 4. Arribada de Tortuga golfina (<i>Lepidochelys olivacea</i>)	62
Figuras 5 y 6. Zona de recorridos de la playa “Escobilla” para recolección de muestras durante la arribada.	62
Figura 7. Identificación de un FP de aspecto morfológico de coliflor.	63
Figura 8. Formato de trabajo (propuesto).	63
Figura 9. Identificación y selección del FP para toma de biopsia.	64
Figura 10. Aplicación de anestesia local.	64
Figura 11. Colocación de pinzas de hemostasis y biopsia con bisturí.	65
Figura 12. Hemostasis posterior a la biopsia.	65
Figura 13. Curva mínima del caparazón (Ccl min.).	66
Figura 14. Recta máxima del caparazón. (Scl. Max.).	66
Figura 15. Lesión nodular identificada como FP.	67
Figura 16. Fibropapilomas de verrugas.	67
Figura 17. Fibropapilomas de verrugas.	68
Figura 18. Fibropapilomas mixtos.	68
Figura 19. Fibropapiloma de coliflor.	69
Figura 20. Fibropapilomas mixtos.	69
Figura 21 a y b. Corte histológico de un FP.	70

Figura 22 a y b. Corte histológico de un FP y una papila.	70
Figura 23 a y b. Corte histológico de un FP con ectoparásitos.	71
Figura 24 a y b. Corte histopatológico de un fibroma.	71
Figura 25 a y b. Inmunohistoquímica control positivo y negativo.	72
Figuras 26 y 27 a y b FP negativo a antígenos de herpesvirus mediante Inmunohistoquímica.	72
Figura 28. Ultrafotomicrografía del estrato córneo de un FP.	73
Figura 29. Ultrafotomicrografía de las células de la epidermis de FP.	73
Figura 30. Ultrafotomicrografía de citoplasma de queratinocitos.	73
Figura 31. Estructuras sugerentes de partículas virales.	74
Figura 32. Ultrafotomicrografía de queratinocito neoplásico de un FP.	74
Figura 33. Ultrafotomicrografía de célula del estrato basal de un FP.	75
Figura 34. Ultramicrografía de fibroblasto en dermis.	75

Resumen

Fibropapilomatosis en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de playa "Escobilla" Oaxaca.

Las descripciones de fibropapilomas en *Chelonia mydas* datan de 1930 en Florida. La prevalencia de la enfermedad se incrementó en los 80's alrededor del mundo. Se caracteriza por múltiples tumores fibroepiteliales en la superficie corporal. Las tortugas muestran emaciación y ceguera. A la fecha el agente causal de la fibropapilomatosis no ha sido caracterizado. En este estudio se tomaron datos biométricos de 30 hembras *Lepidochelys olivacea* de "Escobilla" Oaxaca, para monitorear el tamaño de la nidada y la edad aproximada de los animales. De acuerdo a la localización de los fibropapilomas, se determinó la incidencia y se clasificó a los tumores como leve (1), moderado (2) y severo (3). Se tomaron 30 biopsias de 2 a 5cm de diámetro, con anestesia local y fueron fijadas en formalina amortiguada al 10% para histopatología e inmunohistoquímica. Para microscopía electrónica de transmisión, se fijaron dieciocho muestras en glutaraldehído al 2.5%. Los resultados fueron: Curva mínima del caparazón: 67.5cm y recta máxima del caparazón: 70.5cm= tortugas adultas. Tamaño del tumor: 2-16.9cm. Clasificación de tumor: 17 moderados, 10 leves y 3 severos. La zona más afectada fueron las aletas anteriores derechas (12), seguida de las "zonas blandas" (9), aletas anteriores izquierdas (8) y caparazón (1). Los tumores fueron clasificados macroscópicamente como: 20 con aspecto de coliflor, 6 con aspecto verrugoso y 4 mixtos. Mediante microscopía de luz se observó: hiperplasia epidermal, acantosis, hiperqueratosis ortoqueratósica, degeneración de células basales y del estrato espinoso, pústulas intraepidermales, infiltrado de heterófilos y linfocitos. El diagnóstico final fue fibropapilomas cutáneos (29/30) y un fibroma. No hubo diferencia estadística significativa entre los resultados obtenidos ($p < 0.05$). No se observó inmunopositividad a antígenos de herpesvirus.

Ultraestructuralmente se observó en 15 casos partículas virales similares a iridovirus, con células epiteliales neoplásicas. Se concluye que se caracterizó macro y microscópicamente la fibropapilomatosis en *Lepidochelys olivacea* en "Escobilla" Oaxaca.

Es necesario continuar con estudios apoyados en técnicas específicas que permitan aislar al agente causal, debido a que en este estudio, no se pudo determinar la participación de las partículas virales similares a iridovirus en el desarrollo de la fibropapilomatosis.

Palabras clave: Fibropapilomatosis, histopatología, microscopía electrónica Inmunohistoquímica, *L. olivacea*.

1. INTRODUCCIÓN

En todas las poblaciones de organismos vivos, existen diversos factores ambientales que modifican o afectan su comportamiento y crecimiento, denominándose al conjunto de estos factores como "potencial biótico". El potencial biótico ofrece a los individuos que conforman una población, los recursos bióticos y abióticos necesarios para su existencia, presentándose de igual manera, factores limitantes para su crecimiento y sustento; Denominándose como "resistencia ambiental". Factores que constituyen parte de esta resistencia ambiental son las enfermedades de tipo metabólicas e infecciosas, las cuales a su vez son dependientes de fenómenos ambientales e intrínsecos (Ramírez A. 1997; Loredó G. *et al.* 2001; Castellanos R. *et al.* 2002; Murdock C, Wibbels T. 2004). Las tortugas marinas son organismos partícipes de ecosistemas en diferentes partes del mundo, que viven y están expuestas continuamente a una amplia gama de factores ambientales, incluyendo la exposición al desarrollo de enfermedades de tipo proliferativo como son los fibropapilomas. Los papilomas y fibropapilomas cutáneos son neoplasias benignas, cuya etiología y patogénesis son complejas en animales domésticos y humanos (Jelinek F, Tachezy R. 2005). Las primeras descripciones de tumores cutáneos identificados como fibropapilomas (FP) en tortuga verde (*Chelonia mydas*) datan de 1930 en las costas de Florida, Estados Unidos de América (Ehrhart L. *et al.* 1998; Coberley S. 2002 a). Incrementándose la prevalencia de la enfermedad de forma alarmante a partir de los años 80, alcanzando porcentajes de presentación del 50 hasta el 92% en diferentes zonas de Florida y Hawaii, en los Estados Unidos de América (Balazs G. *et al.* 1997; Coberley S. 2002 b).

La enfermedad fue descrita inicialmente en *Chelonia mydas*, de donde toma su denominación, "green turtle fibropapillomatosis" (GTFP) por sus siglas en inglés, también se ha referenciado en *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* y *Eretmochelys imbricata*, entre otras (Brooks D. *et al.* 1994; Herbst L. *et al.* 1995; Cberley S. 2001).

La fibropapilomatosis en tortugas marinas es una enfermedad neoplásica emergente, considerada por algunos autores, como asociada a una infección por un nuevo herpesvirus el cual ha sido denominado "Fibropapilloma turtle Herpesvirus" (FPTHV). Aunque también se han descrito partículas virales desnudas asociadas a la enfermedad (Lu Y. *et al.* 2000; Coberley S. 2002a). Se caracteriza por la presencia de fibropapilomas (FP) epiteliales en cuello, conjuntiva, extremidades, cola, regiones axilares e inguinales, caparazón y plastrón (Quackenbush S. *et al.* 2001; Greenblatt R. *et al.* 2005 a). También se han descrito fibromas en órganos internos como pulmón, hígado, riñón y tracto gastrointestinal, originando alteraciones en la flotabilidad, necrosis por presión del parénquima hepático, insuficiencia renal y obstrucción intestinal (Aguirre A. *et al.* 1994; Coberley S. 2002b; Work T, Balazs G. 2004; Greenblatt R. *et al.* 2005b). Las tortugas afectadas se suelen mostrar emaciadas, débiles, anémicas y en estado de depresión considerable y la afectación ocular suele conllevar ceguera. Los fibropapilomas pueden llegar a crecer en gran dimensión en periodos comprendidos entre un par de meses hasta varios años (Abreu F. *et al.* 1994; Herbst L. *et al.* 1999; Greenblatt R. *et al.* 2005b). Aunque la ruta exacta de infección del agente causal aún se desconoce; se tienen algunas teorías al respecto, proponiendo que los individuos se infectan al asistir a las diferentes áreas de limpieza de epibiontes y parásitos, en donde los peces limpiadores juegan el papel de transmisores de la enfermedad (Abreu F. *et al.* 1994). Otra teoría menciona que el agente etiológico pudiera ser habitante "normal" de los individuos y al haber inmunosupresión, manifestarse la FP. Los individuos se infectan debido al contacto directo (enfermosusceptible) y debido a que las zonas de alimentación favorecen el contacto entre estos e incrementan la posibilidad de contagio (Brooks D. *et al.* 1994; Balazs G. *et al.* 1997; Aguirre A. *et al.* 2000).

Por otro lado los ectoparásitos (sanguijuelas, balanos, etc.) podrían jugar el papel de vectores. (Work T, Balazs G. 2004; Greenblatt R. *et al.* 2004).

Histológicamente los FP muestran hiperplasia epidérmica papilar con o sin proliferación hiperplásica de la dermis, mostrándose como lesión inicial una degeneración vacuolar de las células epidérmicas del estrato basal e

inclusiones intranucleares que se apegan a las producidas por los herpesvirus. (Abreu F. *et al.* 1994; Aguirre A. *et al.* 1994; Adnyana, W. *et al.* 1997).

También es frecuente la observación de huevos de trematodos spirórchidos en el componente dermal de los fibropapilomas (Aguirre A. *et al.* 1998; Ehrhart L. *et al.* 1998; Aguirre A, Balazs G. 2000). Algunos autores, mediante estudios de microscopías óptica y electrónica, han logrado evidenciar en los FP, cuerpos de inclusión intranucleares compatibles con infección por herpesvirus, así como partículas virales con características de dicha familia de virus (Jones A. 2004; Aguirre A. *et al.* 1998).

El agente causante de la fibropapilomatosis en tortugas marinas (FPTM) aún no ha sido caracterizado en su totalidad. Existe gran controversia en cuanto a este punto, se han realizado diversas técnicas para tratar de aislar e identificar al agente etiológico, como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), inmunohistoquímica, microscopia electrónica, citometría de flujo, entre otras, sin llegar a una identificación precisa del agente etiológico. Los avances logrados en estas investigaciones han descartado agentes que se creían ocasionaban esta enfermedad tales como: papilomavirus y tremátodos de la familia Spirochidae. (Aguirre A. *et al.* 1998; Aguirre A. *et al.* 1999).

1.1 Generalidades de las Tortugas marinas

Existen actualmente 600 especies de reptiles vertebrados de la Clase reptilia. De tortugas marinas existen solo 6 géneros, 8 especies y 6 subespecies. En la actualidad las tortugas marinas se dividen en las de caparazón blando y con textura de cuero (familia *Dermochelyidae*), con una sola especie, tortuga Laúd o Baula (*Dermochelys coriacea*) y las de caparazón duro (familia *Cheloniidae*) con 7 especies (Wyneken J. 2004). La tortuga laúd, *Dermochelys coriacea* es de coloración negra con pequeñas manchas blancas. En el dorso presenta cinco crestas que se extienden por todo lo largo del caparazón, dos crestas forman las márgenes y se encuentran algunas crestas ventralmente en el plastrón. A los lados de la mandíbula superior, hay una pequeña muesca o corte y a nivel de las extremidades, carece de dedos. Las tortugas de la familia *Cheloniidae* se distinguen entre ellas, por la cantidad de escamas prefrontales y por los escudos del caparazón. La tortuga verde, *Chelonia mydas*, tiene un par de escamas prefrontales, el caparazón es liso, con 4 pares de escudos laterales, el color del caparazón cambia con la edad del animal, es negro en las tortugas recién nacidas, cambiando a marrón con canela en los juveniles y verde-grisáceo en los adultos, a veces con pequeñas manchas amarillas y marrones. El plastrón es blanco en los recién nacidos. Luego cambia a un amarillo cremoso, a veces pasando por una fase rosada o gris, dependiendo de la población de tortugas. Con excepción de las tortugas verdes melánicas (las llamadas tortugas negras) que se encuentran en algunas partes del Pacífico, los adultos tienen el plastrón amarillo crema. Las tortugas verdes tienen un dedo en cada extremidad. Tienen 4 escudos inframarginales de cada lado y dos poros de Rathke, uno en la escama axilar y el otro en la escama inguinal (Wyneken J. 2004).

1.1.2 Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*)

Las Tortugas golfinas adultas, tienen cuerpo gris oscuro, cabeza moderadamente pequeña. De crías son negras, al llegar a la edad adulta, típicamente tienen el caparazón casi circular con longitud similar a su amplitud y más de 6 escudos laterales lisos normalmente alineados. El plastrón usualmente consta de cuatro pares de escudos inframarginales con poros, 6 o más escudos vertebrales normalmente alineados y muchas escamas supraoculares (Hernández S, Valadez C. 1998; Wyneken J. 2004).

1.1.3 Piel de las Tortugas Marinas

La piel es un órgano activo, versátil e impermeable al agua, resistente a agresiones externas y muy flexible para permitir el movimiento. Presenta apéndices o modificaciones (uñas, caparazón y plastrón, ramificaciones periféricas de nervios sensitivos) y es además un importante órgano sensitivo. La piel es el principal regulador de la temperatura corporal, además de ser un órgano de secreción y excreción. (Chávez A. *et al.* 2000; Wyneken J. 2004). La piel en los reptiles es muy variada, en las tortugas es muy gruesa en las aletas, presentan un revestimiento externo de piel escamosa, coraza ósea, piezas córneas, piezas óseas o piel coriácea, carecen de glándulas cutáneas y de algunas glándulas olorosas. La piel de las tortugas marinas se compone de epidermis y dermis.

1.1.4 Epidermis

La epidermis está constituida por un epitelio estratificado plano ampliamente queratinizado formando escamas. El estrato celular que descansa sobre la membrana basal se denomina estrato germinativo. Inmediatamente por encima existe un número variable de capas celulares que corresponden con el estrato espinoso de los mamíferos, a continuación comienza el estrato córneo constituido por células que se aplanan, conteniendo queratina y han perdido el núcleo. Este estrato córneo se compone a su vez de tres capas: de alfa-queratina, de beta-queratina y de Oberhautchen, enumeradas desde el interior. El color de la piel está determinado por la melanina, la cuál se origina de los melanóforos. Origina una gran variedad de apéndices externos, tales como: escamas y uñas y oxigena diversos tipos de apéndices internos (Wyneken J. 2004).

1.1.5 Dermis

La dermis se encuentra por debajo de la epidermis y está constituida por tejido conectivo en el que aparecen embebidas estructuras óseas denominadas osteodermos, haces de fibras de colágeno y elastina, en donde además hay vasos sanguíneos y nervios. Los nervios penetran la epidermis, pero los vasos sanguíneos sólo llegan hasta la dermis. Consta de una delgada capa superficial situada por debajo de la epidermis y de una capa gruesa más profunda. El tejido conectivo es laxo, rico en melanóforos y una capa reticular más profunda integrada por tejido conectivo denso, rico en fibras de colágeno y vasos sanguíneos, ocasionalmente también se pueden observar melanóforos entre las células basales de la epidermis (Hernández S, Valadez C. 1998; Ramírez A. 1997; Ehrhart L. *et al.* 1998; Coberley S. 2002b; Wyneken J. 2004). En las áreas existentes entre los escudos, el número de capas epidérmicas aumenta y se invaginan hacia la dermis. La diferenciación hacia células formadoras de queratina ocurre en la zona más profunda de la invaginación dando lugar a las escamas (Coberley S, 2002b; Wyneken J. 2004).

1.1.6 Escamas

Las escamas son engrosamientos de la capa córnea de la epidermis, pueden ser de forma triangular, lisas, aquilladas o acanaladas e imbricadas, yuxtapuestas o separadas. Forman tubérculos o escudetes, con infinidad de aspectos y tamaños. La dermis, a su vez, produce osteodermas, originadas en lo más profundo de la dermis y al crecer son desplazadas hacia la superficie (Wyneken J. 2004; Manual de Asistente de investigación de la C.C.C. Costa Rica 2004; Maffucci F. *et al.* 2005).

1.1.7 Caparazón

Está constituido de placas óseas de origen dérmico que se fusionan dorsalmente a las costillas y a las vértebras, arregladas en forma de mosaico, por arriba forman una bóveda cubierta por escudos córneos, que se continúa lateralmente en la parte ventral con el plastrón.

Está articulado en los puentes, por medio de tejido conectivo cartilaginoso, lo que hace que haya distensión en dirección vertical, facilitando los movimientos de la respiración.

El caparazón tiene dos aberturas, una en la parte craneal, por donde salen la cabeza y las aletas anteriores y otra en la parte caudal y hacia abajo, por donde salen las aletas posteriores y la cola (Coberley S. 2002b; Wyneken J. 2004; Manual de Asistente de investigación de la C.C.C. Costa Rica 2004).

1.1.8 Fisiología de la piel

La principal función de la piel en los reptiles es el mantenimiento del balance interno de sales y líquidos, en conjunto con los riñones. La piel lo realiza a través de secreción de una solución hipertónica a través de glándulas especiales situadas en las órbitas oculares, conocidas como glándulas de sal. Éstas se encuentran bajo el epitelio de la cavidad nasal (Coberley S. 2002b; Wyneken J. 2004) y son túbulos ramificados tapizados por células cilíndricas no ciliadas o células cúbicas. Los túbulos están separados por una matriz pobre en células mixoides y pocas fibras colágenas. Sirven para excretar sodio, potasio y cloruros, que frecuentemente cristalizan observándose macroscópicamente depósitos blanquecinos de sales sobre los orificios nasales. En el caso de los riñones, producen orina muy concentrada en amonio y urea. Se desarrolla en la vejiga urinaria y en la cloaca, antes de ser expulsada junto con las heces (Wyneken J. 2004; Maffucci F. *et al.* 2005).

1.1.9 Enfermedades y agentes causales frecuentes asociados a enfermedades en tortugas marinas.

Diferentes microorganismos han sido asociados con enfermedades en tortugas marinas. Muchas bacterias Gram positivas y negativas así como hongos, han sido ligadas con enfermedades en estas especies, tales como estomatitis ulcerativa, rinitis obstructiva y neumonía, dermatitis focal erosiva (FED), enfermedad cutánea septicémica ulcerativa (SCUD), dermatitis papilar (PD), *Aeromonas* sp, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas* sp. y *Proteus* sp. También la enteritis o encefalitis ha sido asociada con infección por *Cariospora cheloniae*, parásito protozoario que ha sido observado en tortuga verde (*C. mydas*) de vida libre.

Esta coccidia ha sido descrita en crías provenientes de huevos de resiembra, pero también ha sido sospechosa de causar mortalidad en tortugas verdes jóvenes; además de las micosis superficiales por *Aspergillus* sp. y Micobacteriosis como *M. avium* y *M. marinum* (Ramírez C. 1997; Hernández S, Valadez C. 1998; Ehrhart L. *et al.* 1998; Coberley S. 2002b). Los trematodos, específicamente “espiróquidos” (*Learedius learedi*) han sido documentados en tortugas marinas de vida libre y varadas, se considera que estos trematodos juegan un papel importante en el desarrollo de una enfermedad de tipo neurológica en tortugas caguama (*Caretta caretta*), encontrándose bajo estudio actualmente (Coberley S. 2002a). Existe también controversia en cuanto a la notable presencia de ectoparásitos, diferentes tipos de sanguijuelas han sido relacionadas y se han propuesto como posibles vectores de transmisión de enfermedades infecciosas (Work T, Balazs G. 2004).

Ectoparásitos comunes en tortugas marinas:

Crustacea cirripeda, *Cirripeda toracica*, *Ozobranchus branchiatus*, *Ozobranchus margoi*, *Chelonibia testudinaria*, *Parasitos Bladder*, *Platylepa spp.* *Conchoderma virgalum* y *P. longicaecum*.

Otra teoría que se asocia al incremento y desarrollo de enfermedades en tortugas marinas, es la denominada patología medioambiental derivada de actividades humanas las cuales se resumen en: Enmallamiento, ingestión de restos antropogénicos, contaminantes químicos y pesca “accidental” (Ramírez C. 1997; Hernández S, Valadez C. 1998; Ehrhart L. *et al.* 1998; Coberley S. 2002b; Maffucci F. *et al.* 2005).

1.2 Partículas virales

Existen descripciones de varios virus que se asocian a enfermedades en tortugas marinas, muchos de los cuales son propuestos como agentes candidatos al desarrollo de FP. También se han descrito pequeñas estructuras parecidas a virus desnudos en asociación con FP y con base en su secuencia homóloga se ha hipotetizado que sean papilomavirus. Sin embargo, los esfuerzos para reproducir estos hallazgos no han sido exitosos y tampoco se ha podido detectar papilomavirus por otros investigadores (Coberley S. 2002a).

Algunos herpesvirus están asociados a diferentes enfermedades en tortugas marinas y han sido estudiados a lo largo del tiempo; se consideran como el principal responsable de la FP. (Quackenbush S. *et al.* 2001; Greenblatt R. *et al.* 2004).

1.2.1 Infecciones por herpesvirus en tortugas marinas

Se han documentado tres enfermedades asociadas con la infección por herpesvirus. Como el herpesvirus descrito en tortuga verde (*C. mydas*) con inducción experimental de FP, mismo que fue considerado como responsable de la presentación natural de FP en tortuga caguama (*C. caretta*), tortuga golfina (*L. olivacea*) y tortuga laúd (*D. coriacea*). También los herpesvirus han sido asociados con dos enfermedades de tortuga verde (*C. mydas*) en crianza, enfermedad de Gray-Patch (GPD) y dermatitis necrotizante de tortugas verdes recién nacidas y enfermedad de pulmón, tráquea y ojo (LETD) caracterizada por conjuntivitis, faringitis, traqueítis y neumonía (Coberley S. 2002b; Greenblatt *et al.* 2004). El conocimiento de la prevalencia de las infecciones de tortugas marinas por herpesvirus y su papel como agente causal es limitado; se sabe poco de la epidemiología y etiología de las enfermedades de tortugas marinas (LETD, GPD y FP). Los herpesvirus asociados con LETD y GPD sólo han sido documentados en tortugas de crianza y la prevalencia de estas enfermedades en poblaciones silvestres no ha sido evaluada, en contraste con las descripciones de FP, la enfermedad ha ido aumentando en poblaciones de tortugas marinas silvestres y se ha asociado a un herpesvirus (FPHV), además de ser consistentemente relacionado con la presencia de tumores (Quackenbush S. *et al.* 2001; Coberley S. 2002a).

1.2.2 Herpesvirus asociado a FP

La mayoría de las investigaciones de infecciones por herpesvirus en tortugas marinas, fueron enfocadas a la FP por su notable aumento en la prevalencia y severidad en poblaciones alrededor del mundo. Todos los intentos para aislar el herpesvirus asociado a FP no han tenido éxito, limitando los estudios para determinar el rol de este herpesvirus como agente causal de la FP. Sin embargo, el FPHV se encuentra regularmente asociado a la FP, siendo el principal candidato para considerarse como agente etiológico.

La FP de tortugas marinas es una enfermedad debilitante caracterizada por cambios proliferativos a nivel de piel, involucrando la dermis y epidermis, originando un proceso tumoral el cual le da nombre a la enfermedad. Se desconoce el por qué se ha incrementado la prevalencia de esta enfermedad (Coberley S. 2002b; Wineken J. 2004).

1.2.3 Neoplasias

Una neoplasia es un crecimiento nuevo, en donde hay falta de respuesta al control celular normal. Las células neoplásicas están transformadas y continúan dividiéndose sin obedecer las señales reguladoras que controlan el crecimiento celular normal. Las células neoplásicas satisfacen sus necesidades metabólicas compitiendo favorablemente con las células y tejidos normales (Meuten D. 2002).

Las neoplasias se pueden clasificar en simples, compuestos de tejidos plenamente formados, malignos, mixtos y malignos, estos últimos se apartan bastante del tipo normal del tejido (Meuten D. 2002; Pardo F. 1997).

Se describen los fibromas, papilomas y fibropapilomas como referencia a la neoplasia en estudio.

1.2.4 Fibroma

Lo compone tejido conjuntivo fibroso bien desarrollado, se pueden presentar a partir del tejido conjuntivo subcutáneo, submucoso, aponeurosis intermuscular, periostio, ligamentos, ocasionalmente en órganos internos, etc. (Meuten D. 2002; McGavin D. Zachary J. 2006; Van Dijk J. *et al.* 2007).

Macroscópicamente el fibroma tiende a formar una masa encapsulada redonda o lobulada. A continuación se describen los fibromas duros y blandos (Bancroft J. Stevens A. 1982; Meuten D. 2002; Van Dijk J. *et al.* 2007). El fibroma duro suele ser de pequeño volumen y firme, con superficie seca, brillante, blanca, grisácea, con dibujos estriados o concéntrico. El fibroma, también puede tener varios nódulos separados entre si por tejido conjuntivo común laxo (Meuten D. 2002; Van Dijk J. *et al.* 2007). Microscópicamente el fibroma duro tiene haces de tejido conjuntivo bien desarrollado y relativamente acelular, la disposición celular varía mucho, pueden ser entrelazados, en espiral o completamente irregulares.

Las fibras colágenas son gruesas, hialinas y dispuestas apartadamente en sentido paralelo entre si. Las células son pequeñas y fusiformes, con un anillo de citoplasma y núcleo estrecho, con extremos puntiagudos. Las células a veces son más numerosas en las cercanías de los vasos sanguíneos. El fibroma blando se presenta con mayor frecuencia que el duro, es de superficie húmeda, rosa grisácea y muy vascularizada. Si se origina de una superficie mucosa tiende a ser pedunculado (pólipo). En otro sitio la neoplasia simplemente aparta los tejidos adyacentes y al mismo tiempo el estroma se convierte en una cápsula.

El fibroma blando tiene una estructura fasciculada pero los haces de tejido conjuntivo son menos definidos, la proporción entre células y fibras esta invertida, los fascículos son netamente celulares y mucho menos fibrosos. Las células tienen tamaño de fibroblastos, son redondas, ovaladas, fusiformes o ramificadas con núcleo reticulado relativamente grande, redondo u oval. Las células están separadas por fibras colágenas delgadas, onduladas y dispuestas laxamente. El fibroma blando está moderadamente vascularizado. (Meuten D. 2002; Pardo F. 1997; Van Dijk J. *et al.* 2007). Los hallazgos en los fibromas incluyen: Edema, tejido mixomatoso, calcificación, osificación, inflamación y mineralización. (Pardo F. 1997; McGavin D. Zachary J. 2006; Van Dijk J. *et al.* 2007).

1.2.5 Papiloma

Se presenta como crecimiento exofítico en las superficies epiteliales de piel y membranas mucosas. El papiloma cutáneo en las tortugas marinas puede ser simple, pero más frecuentemente múltiple. Se localizan en cabeza, cuello, aletas, cola, regiones axilares e inguinales, caparazón, plastrón, ojos y boca. Los papilomas son macroscópicamente de aspecto áspero o algo agrietado, de base estrecha o ancha (pedunculado y sésil), consistencia firme a dura por queratinización excesiva. Microscópicamente se pueden observar hiperplasia epidermal, hiperqueratosis intensa que origina un callo verdadero, ulceración y acantosis multifocal (Pardo F. 1997; McGavin D. Zachary J. 2007; Van Dijk J. *et al.* 2007). Ultraestructuralmente se pueden observar partículas virales icosaédricas de 50 a 55nm de diámetro aproximadamente.

Sin envoltura y localizadas en el núcleo de las células, asociadas al género *Papovaviridae*. También, se puede apreciar epitelio escamoso, dispuesto alrededor de un centro fibroso. La capa basal con una sola hilera de células cilíndricas apretadas. La capa de células espinosas consta de células poliédricas unidas por puentes intercelulares finos. El estrato granuloso se caracteriza por células aplanadas con gránulos de queratohialina.

En el estrato córneo superficial se aprecian varias capas de escamas notablemente homogéneas. El revestimiento epitelial varía de espesor en distintas regiones siendo más grueso que la epidermis normal. El engrosamiento excesivo de la capa córnea, resulta en la aparición de queratina abundante y superficialmente en los espacios interpapilares. En las células de la región basal de la epidermis se observa actividad mitótica variable. El tejido conectivo fibroso que forma el centro de cada pliegue, deriva de la dermis y varía en cantidad según el pliegue. Los pliegues a veces se cortan de tal manera que se observan masas epiteliales de centro queratinizado y rodeadas de tejido conectivo fibroso. (Cheville N. 1994; Erlandson R. 1994; Eyden B. 1996; Dickersin R. 1999).

1.2.6 Fibropapiloma

Macroscópicamente son neoplasias de color blanco, gris o rosa, asemejando una coliflor o con aspecto verrugoso, se pueden presentar en cualquier zona corporal incluyendo órganos internos, ojos y boca, pueden ser de superficie lisa o rugosa de 0.05 a 30cm de tamaño y asemejan dibujos estriados en su superficie. Microscópicamente presentan proyecciones papilares caracterizadas por hiperqueratosis ortoqueratósica e hiperplasia del epitelio estratificado escamoso. En el estroma se pueden observar fibroblastos bien diferenciados con áreas densas de fibras de colágena y en algunos casos se puede observar necrosis de las células basales de la epidermis con vacuolización y moderada infiltración de células inflamatorias mononucleares. Ultraestructuralmente se observan cambios en las células de la epidermis como pleomorfismo, aumento de tamaño, vacuolización con partículas virales bien definidas con envoltura y virión en núcleo y citoplasma de las células.

En dermis fibroblastos pleomórficos con características neoplásicas y abundante colágena. (Aguirre A. *et al.* 1994; Oros J. *et al.* 1999; Herbs L. *et al.* 1999; Aguirre A. *et al.* 1998; Ehrhart L. *et al.* 1998; Aguirre A, Balazs G. 2000; Jelinek F, Tachezy R. 2005).

1.2.7 Generalidades de los Virus

Son agentes infecciosos intracelulares, que pueden medir de 20nm a más de 300nm de diámetro compuestos de un solo material genético funcional ADN o ARN, no poseen organelos funcionales y dependen del hospedero para producir energía y sintetizar macromoléculas. Fuera del hospedero, se consideran metabólicamente inertes, pero dentro del huésped, son metabólicamente activos. Esta parte es la fase replicativa, en donde el genoma viral, aprovecha las condiciones de las células huésped para producir copias de su genoma, ARN mensajero y proteínas virales para formar un nuevo virión e infectar al hospedero. (Murphy F. *et al.* 2000; Carter G. *et al.* 2004; Cedillo C. *et al.* 2006).

Para este estudio nos enfocaremos a la breve descripción de tres virus, los cuales han sido asociados a la Fibropapilomatosis en tortugas marinas: Herpesvirus, Papilomavirus e Iridovirus.

1.2.8 Herpesvirus

Son altamente patógenos para sus hospederos, tienden a ser epiteliotróficos y producen enfermedades agudas con notable daño tisular.

La mayoría de estas enfermedades empiezan en las células epiteliales, orofaringe y tracto respiratorio superior o piel.

Las lesiones características consisten en progresivo aumento de focos de edema, hiperemia y necrosis celular que destruye la capa epitelial y termina en ulceraciones. El virión del herpes consiste en base de ADN cuya capsida oscila entre 100 a 110nm de diámetro y tiene 162 capsomeros arreglados de manera icosaédrica, una capa amorfa referida como tegumento y envoltura la cual es una bicapa lipídica o membrana que rodea al tegumento. La envoltura contiene proyecciones de superficie que contienen glicoproteínas.

La nucleocapside consiste en una base de tres concéntricas capas, interna, media y capsida externa. La nucleocapside envuelta es la partícula infecciosa. Son de replicación intranuclear (Browman B. *et al.* 2003; Cheville N. 1994; Cedillo C. *et al.* 2006).

1.2.9 Papilomavirus

Pequeños virus de ADN icosaédricos no envueltos de 100nm de diámetro, que incluyen a los virus de papiloma y polyoma. Estos virus se replican lentamente en núcleo y causan infecciones latentes y crónicas. Pueden afectar piel, mucosas genitales y orales de varios animales. Histológicamente estas lesiones focales proliferativas desencadenan hiperqueratosis, paraqueratosis y acantosis, los virus de la familia *Papovaviridae* generalmente incrementan la actividad mitótica. (Cheville N. 1994; Murphy F. *et al.* 2000; Cedillo C. *et al.* 2006).

1.3 Iridovirus

Son virus de ADN, icosaédricos envueltos de 120 a 300nm de diámetro con replicación en citoplasma y núcleo. Existen varios géneros causantes de diversas enfermedades como el caso de los ranavirus que afectan a anfibios y peces. Pueden causar cambios citopáticos y daño celular. (Cheville N. 1994; Murphy F. *et al.* 2000; Cedillo C. *et al.* 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

La fibropapilomatosis en las poblaciones de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en las costas de Oaxaca, México es una enfermedad cada vez más frecuente, de la cual no se han hecho estudios para su conocimiento, desde los puntos de vista clínico, patológico y epidemiológico. Es necesario revisar esta enfermedad para desarrollar programas de prevención, control y tratamiento, ya que la fibropapilomatosis puede convertirse en una amenaza para la conservación de la especie.

3. HIPÓTESIS

La fibropapilomatosis en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en las costas de Oaxaca, México está asociada a un herpesvirus, el cual se puede identificar mediante histopatología (HP), inmunohistoquímica (IHQ) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar, analizar y caracterizar la fibropapilomatosis en poblaciones de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de playa “Escobilla” Oaxaca, México.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolectar datos biométricos de 30 tortugas golfinas (*L. olivacea*) hembras de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.
- Examinar y evaluar los fibropapilomas de la superficie corporal, cuello y área de la cabeza, así como las aletas en tortugas golfinas (*L. olivacea*).
- Evaluar histopatológicamente biopsias de fibropapilomas de tortugas golfinas (*L. olivacea*).
- Aplicar la técnica de inmunohistoquímica para identificar herpesvirus en fibropapilomas de tortugas golfinas (*L. olivacea*).
- Revisar ultraestructuralmente fibropapilomas de tortugas golfinas (*L. olivacea*) en búsqueda de partículas virales.
- Integrar la información macro, microscópica, inmunohistoquímica y ultraestructural para emitir un diagnóstico integral.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de campo se llevó a cabo durante la arribada de agosto de 2006, en la playa “Escobilla” Oaxaca, México; la cual se localiza entre los municipios de Santa María Tonameca y a 34km al suroeste de San Pedro Pochutla; a 274km al sur de la Ciudad de Oaxaca por la carretera federal No. 200 hacia Puerto Escondido y la carretera federal No. 175 con destino a Puerto Ángel, 100 metros antes de llegar a Santa Elena, en la desviación a la izquierda por un camino de brecha, hasta llegar a la playa Esta playa fue decretada en 1986 como Parque Federal Nacional de 75ha (Figuras 1 y 2. Playa “Escobilla” Oaxaca).

6.1 Recorridos de playa e identificación de tortugas con fibropapilomas

Durante la arribada (Figuras 3 y 4) se llevaron a cabo recorridos por la playa en cuatro turnos, abarcando una distancia de 12km (Figuras 5 y 6). El primer turno fue de las 7:00 a las 10:00hrs; el segundo de las 14:00 a las 17:00hrs, el tercero de las 20:00 a las 24:00hrs y el cuarto turno de las 24:00 a las 4:00hrs. Para los turnos nocturnos, se empleó una lámpara de luz roja para la visualización de los animales. Para la detección de fibropapilomas (FP) en las tortugas, se consideraron los criterios empleados en el Manual de necropsias de la “U.S. Geological Survey National Wild Life Health Center Hawaii field station 2000” y en el Manual de asistente de investigación C.C.C. Costa Rica 2004. Contemplándose como FP aquel tejido de neoformación de aspecto nodular, de superficie lisa o rugosa y de consistencia firme al tacto. Se consideró la distribución corporal en la que se pudieran presentar y su frecuencia. Durante los recorridos se observaron más de 500 tortugas aproximadamente, seleccionándose 30 tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) hembras en desove, las cuales presentaron diversas lesiones cutáneas sugerentes de FP. Para cada tortuga, posterior al desove y en cuanto comenzaban a cubrir los nidos, se practicó un examen minucioso de la superficie corporal, abarcando cuello, cabeza, aletas anteriores y posteriores, poniendo particular atención en las áreas de alrededor de los ojos y la zona donde se aplican las placas de identificación en aletas anteriores.

Para examinar alrededor de la cola y cloaca, se levantaron las tortugas por la parte posterior del caparazón y se procedió a la revisión de la piel.

6.1.1 Evaluación macroscópica de FP y recolección de muestras

Al identificar que una tortuga presentaba FP (Figura 7) se contabilizaban los tumores, su distribución, aspecto (verrugoso o en coliflor) y se seleccionaba un tumor de forma aleatoria y representativo de las lesiones en general para la recolección de muestras, clasificándose de acuerdo a su tamaño empleando los criterios modificados descritos por Work y Balazs (2004), midiéndolos con cinta métrica de fibra de vidrio y graduando los tumores menores de 3cm como leves (grado 1), de 3 a 8cm como moderados (grado 2) y aquellos mayores de 8cm como severos (grado 3). La distribución y cantidad de FP para cada tortuga se documentaron en un formato de registro, el cual fue propuesto para fines de esta investigación (Figura 8), modificado de lo descrito en el Manual de necropsias de la “U.S. Geological Survey National Wild Life Health Center Hawaii field station 2000” y en el manual de asistente de investigación de la C.C.C. Costa Rica, 2004. Para cada tortuga, el FP seleccionado para la recolección de muestras (Figura 9) se limpiaba su superficie y el tejido adyacente con agua corriente (tortugas 1 a 5) cuando era necesario y posteriormente se infiltraba subcutáneamente 3.0mL de xilacina al 2% en 5 puntos alrededor de la base del FP (Figura 10) y transcurrido 1 minuto postaplicación, se sujetaba la base del FP con pinzas de hemostasis y se incidía el tejido con una navaja de bisturí (Figura 11). Cuando los tumores eran mayores de 3cm, se realizaron 2 cortes de 2 a 4.0cm de largo por 1.5 a 2cm de grosor, los cuales se unían en el interior del tejido tumoral, obteniendo una biopsia en forma de rodaja.

Cuando la neoplasia era menor a 3cm, se reseccionaban por completo mediante un corte transversal por encima de las pinzas de hemostasis. Posterior a la extracción de la biopsia, se realizó hemostasis por compresión hasta detener el sangrado (Figura 12).

La biopsia obtenida se colocaba en una caja de Petri con parafina (la cual se empleaba como base) y se fraccionaban en tres partes similares. Los dos primeros fragmentos se colocaron independientes en tubos tipo vacutainer de 10mL, fijándose por inmersión en formalina amortiguada al 10% (pH 7.4), para histopatología (HP) e inmunohistoquímica (IHQ); El tercer fragmento se fijó por inmersión en glutaraldehído al 2.5% (pH 7.2, 0.1 M) manteniéndose en refrigeración y protegido de la luz, para microscopía electrónica de transmisión (MET). Cada una de las muestras fue identificada y almacenada bajo las condiciones descritas hasta su remisión al Departamento de Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, México, D.F., para su posterior procesamiento.

6.1.2 Datos biométricos

Para determinar el tamaño de la nidada y edad aproximada de los animales, se tomaron datos biométricos de cada tortuga evaluada, midiendo la curva mínima del caparazón (CCL min), que comprende la distancia desde el borde anterior central del caparazón en línea recta (sobre línea media) hasta el borde caudal central del caparazón, empleando una cinta métrica de fibra de vidrio (Figura 13); así como la recta máxima del caparazón (SCL max), que comprende la distancia desde el punto anterior del caparazón (hendidura lateral a línea media) en diagonal a la escama posterior más larga (borde posterior del caparazón) utilizando una cinta métrica de fibra de vidrio (Figura 14). Las mediciones se realizaron en tres repeticiones, considerándose como medida precisa, el promedio de las distancias para cada caso basados en el Manual de asistente de investigación C.C.C. Costa Rica (2004).

6.1.3 Procesamiento y revisión de muestras

Las muestras remitidas se procesaron y revisaron en los diferentes laboratorios del Departamento de Patología: Laboratorio de Histopatología, Laboratorio de Inmunohistoquímica y Biología Molecular y en la Unidad de Microscopía Electrónica “MVZ Aurora Velázquez Echegaray”.

6.1.4 Histopatología

Las 30 muestras remitidas se procesaron con la metodología de rutina para HP, embebiéndose los tejidos en parafina y realizando cortes de 5 a 7µm de grosor, tiñéndose con hematoxilina y eosina (H&E), para su posterior revisión con microscopía óptica convencional (Prophet E. *et al.* 1992). Microscópicamente se evaluó la epidermis y dermis del tejido tumoral, empleando los criterios modificados propuestos por Herbs y colaboradores (1999), Jelinek F. y Tachezy R. (2005) y Work y Balazs (2004); revisándose para cada corte histológico, 10 campos aleatorios en campo 40x. En epidermis se evaluó la hiperplasia, acantosis, hiperqueratosis, erosiones, úlceras, degeneración de las células basales y del estrato espinoso, pústulas intraepidermales, presencia de células inflamatorias (heterófilos, linfocitos y melanomacrófagos), células pigmentarias, así como presencia de agentes infecciosos asociados a ellos (cuerpos de inclusión virales, bacterias y ectoparásitos). La evaluación de epidermis comprendió la proliferación de fibroblastos, arreglo de la colágena, células inflamatorias (heterófilos, linfocitos y melanomacrófagos), células pigmentarias y asociación de agentes infecciosos similar a lo descrito en epidermis. Para cada cambio se evaluó su grado en ausente (0), leve (1), moderado (2) o severo (3) y su distribución en local, zonal, multifocal, multifocal coalescente o difusa.

6.1.5 Inmunohistoquímica

A las biopsias obtenidas y previamente revisadas bajo microscopía de luz se procesaron para el análisis inmunohistoquímico, empleando la técnica del complejo avidina biotina peroxidasa (ABC), se utilizó un anticuerpo primario y monoclonal (**HSV1 antibody [T96] ab8230**) de la marca ABCAM® y un anticuerpo secundario biotinilado anticabra de origen murino. A los tejidos seleccionados se les realizaron cortes de 5µm de grosor y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con silano al 1% diluída en agua destilada. Posteriormente las laminillas se desparafinaron en una estufa por 1h a 60°C y se lavaron realizando dos cambios con xilol de 30 minutos cada uno y dos con acetona por 5 minutos cada una a temperatura ambiente (TA).

Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron en alcohol etílico en concentraciones decrecientes de (100, 96, 70 y 50%) realizando tres lavados de 3 minutos cada uno por cada concentración utilizada. Finalmente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada a TA. Para inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, las laminillas se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 30% con metanol absoluto a una relación 1:8 realizando 2 cambios de 45 minutos cada una a TA. Posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada uno a TA con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, para la recuperación antigénica las laminillas se sumergieron en solución TRIS con pH de 7.6 y se sometieron a tratamiento físico (calor) en horno de microondas convencional marca Sanyo modelo No. EMA-108s, a potencia 4 por 5 minutos, inmediatamente se detuvo la reacción al sumergir las laminillas en PBS frío. Para el bloqueo de la avidina y biotina endógena se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina (soluciones A y B) donde se aplicó 50µL de cada solución por laminilla y se incubaron en cámara húmeda por 30 minutos a TA cada una. Para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo secundario a proteínas titulares se utilizó suero de cabra no inmune aplicando 50µL sobre las muestras e incubando por 30 minutos en cámara húmeda a TA, posteriormente se decantó la solución para colocar el anticuerpo primario. Se utilizó un anticuerpo primario **HSV1 antibody [T96] (ab8230)** de la marca ABCAM® a una dilución 1/200 de origen murino diluido en PBS. Las laminillas se incubaron en cámara húmeda por 12 horas a temperatura de 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. En seguida se aplicó el anticuerpo secundario de origen murino anti cabra y se incubó por una hora en cámara húmeda a TA. Después se hicieron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Seguidamente se aplicó a cada laminilla un conjugado enzimático que contiene estreptoavidina y peroxidasa y se incubó en cámara húmeda por 30 minutos a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Para identificar la presencia de antígenos se utilizó como cromógeno AEC (aminoetilcarbazol), sustrato amortiguador y peróxido de hidrógeno al 0.6% revelando durante 2 minutos con 30 segundos. Inmediatamente después se realizó un lavado con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción y se sumergieron las laminillas en agua destilada.

Como contraste se utilizó hematoxilina de Meyer durante 2 minutos. Finalmente se hizo el montaje colocando un cubreobjetos en las muestras de tejido sellado con resina hidrosoluble. Durante cada procesamiento de inmunotinción se utilizaron secciones de tejido epitelial humano el cual fue positivo a herpes simplex tipo 1 demostrado por la técnica de inmunohistoquímica y se corrieron testigos negativos sustituyendo el anticuerpo primario por solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

6.1.6 Microscopía electrónica de transmisión

Las 18 muestras remitidas se procesaron con la metodología de rutina para MET. De cada tejido remitido, se obtuvieron de 4 a 5 fragmentos de tejido tumoral que incluían epidermis y dermis, midiendo de 2 a 3 mm³ en promedio. Una vez obtenidos los fragmentos, se post fijaron con OsO₄ al 1%, se deshidrataron con serie ascendente de acetonas, posteriormente se infiltraron e incluyeron en resinas epóxicas (Epon 812). Una vez procesadas las muestras, se realizaron cortes semifinos de 150 a 200nm de grosor, tiñiéndose con azul de toluidina. Posteriormente se realizaron cortes finos de 70 a 80nm de grosor, montándose en rejillas de cobre de 200 mesh y contrastándose con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se revisaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 a 50kv (Hunter E. 1993; Eyden B. 1996; Vazques G. 2000; Cedillo C. *et al.* 2006). Ultraestructuralmente, se revisaron las células de los diferentes estratos de epidermis y dermis, para la identificación de partículas virales, empleando los criterios descritos por Cedillo C. *et al.* (2006) y Cheville N. (1994). Considerando su localización en el núcleo y/o citoplasmática, la morfología de las partículas virales, presencia o ausencia de envoltura, arreglo y distribución de las partículas, tamaño de las partículas con y sin envoltura. Así mismo, se evaluaron las células de ambos componentes tisulares para correlacionar con los hallazgos histopatológicos, cambios de tipo proliferativo y/o neoplásico, considerando su morfología celular, complejos de unión, organelos y componentes citoplasmáticos, anisocitosis y anisonucleosis, morfología nuclear y patrón del nucleolo (Cheville N. 1994; Eyden B. 1996).

6.1.7 Análisis estadístico

Para Valorar estadísticamente los resultados macroscópicos obtenidos y comparar las lesiones observadas histopatológicamente, los animales se dividieron en 3 grupos según la fecha de muestreo. Grupo 1. Fecha de muestreo: 8 y 12 de agosto de 2006. Grupo 2. Fecha de muestreo: 13 de agosto de 2006 y Grupo 3. Fecha de muestreo: 14 de agosto de 2006. Los datos fueron transformados y se realizó un análisis de frecuencias y se aplicó la prueba de Kruskal Wallis (Daniels W. 1987; Kuehl R. 2003). Mediante el programa estadístico “Statgraphics” plus 5.0® y “The SAS” system®.

RESULTADOS

7.1 Evaluación macroscópica de FP y datos biométricos

Macroscópicamente los FP seleccionados para la recolección de muestras, presentaron aspecto de coliflor (20/30) representando el 66.6%, verrugas (6/30) 20% y mixtos (4/30) 13%, eran firmes al tacto, de color rosa pálido la mayoría y otros grisáceos y blancos. Los tumores se distribuyeron en aletas anteriores (12/30 derechas 40% y 8/30 izquierdas 26.6%), zonas blandas (9/30) 30% y caparazón (1/30) 3.33%. Los tumores presentaron un diámetro de 2.0 a 16.9cm, clasificándose de acuerdo a su tamaño como 10 de grado 1 (leves), 17 de grado 2 (moderados) y 3 de grado 3 (severos) (Figuras 15-20). Los datos biométricos tomados del total de las tortugas oscilaron para la CCL min. de 64 a 71cm, con promedio de 67.5cm y para SCL max. un rango de 65 a 76cm con promedio de 70.5 cm. Con base en dichos promedios, se estimó que las tortugas estudiadas eran adultas con edad de 10 a 20 años y el tamaño estimado de la nidada era de 200,000 animales. La cantidad, distribución, aspecto, tamaño de FP para cada tortuga, así como sus datos biométricos, se describen en el cuadro 2.

7.1.1 Histopatología

En epidermis, se observó hiperplasia epidermal de moderada a severa con acantosis leve de multifocal a difusa e hiperqueratosis ortoqueratósica de leve a moderada difusa. Las células basales y del estrato espinoso, presentaron cambios leves de tipo degenerativo, con distribución multifocal y zonal. Se apreciaron células inflamatorias compuestas por heterófilos y linfocitos, así como melanomacrófagos, ambos en leve cantidad y con distribución multifocal. En varios de los casos, se encontraron sobre la superficie y en el estrato córneo, bacterias en forma de cocobacilos y bacilos, así como estructuras parasitarias compatibles con crustáceos. A nivel de la dermis, predominaron los acúmulos de colágena irregulares con fibroblastos embebidos en la matriz, de aspecto fusiforme con escaso a moderado citoplasma, núcleos ovales y pleomórficos con nucleolos prominentes (Figuras 21-24).

Se observaron vasos sanguíneos de neoformación en moderada cantidad, así como células inflamatorias perivasculares y melanomacrófagos multifocalmente, asociados a aquellos casos con estructuras parasitarias en la epidermis (Figuras 25 y 26). En una de las neoplasias se apreció el predominio del componente mesenquimatoso con las mismas características antes descritas para la dermis, sin presentarse a nivel de epidermis, cambios de tipo proliferativo (Figuras 27 y 28). Los diagnósticos morfológicos emitidos fueron de **fibropapilomas** (29/30) y **fibroma** (1/30) cutáneos con y sin presencia de estructuras parasitarias. Los cambios particulares de cada neoplasia se engloban en los cuadros 3 y 4. No se encontró diferencia estadística significativa $p < 0.05$ por medio del análisis de frecuencias y la prueba de Kruskal Wallis (cuadro 5-11) en los datos evaluados ni entre los hallazgos histopatológicos.

7.1.2 Inmunohistoquímica

No se encontraron antígenos de herpesvirus en los 30 casos procesados al no demostrar inmunopositividad a herpesvirus simplex tipos I y II de color café rojizo en 29 casos diagnosticados como fibropapiloma epitelial por histopatología y 1 como fibroma epitelial (Figuras 29, 30, 31, 32 y 33). Con base en resultado del estudio, el número de casos con inmunohistoquímica negativa fue del 100%. Ver cuadro No 12.

7.1.3 Ultraestructura

En epidermis, se apreció la separación de las capas de queratina, del estrato córneo, observándose entre los espacios generados, la presencia de estructuras de ovals a bacilares con membrana bien definida y contenido granular de moderada densidad compatibles con bacterias (Figura 34). Las células del estrato córneo presentaban forma plana alargada, anucleadas y con diferente grado de degeneración (Figura 35).

En las muestras evaluadas, en los estratos espinoso y granuloso, las células se encontraban discretamente separadas por espacios electrolúcidos, eran de ovals a poliédricas, adheridas con abundantes complejos de unión que incluían desmosomas y hemidesmosomas de diferentes tamaños distribuidos aleatoriamente y de forma irregular. Los queratinocitos presentaban de escaso a moderado citoplasma con abundantes filamentos de queratina libre y en paquetes con escasos organelos (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, entre otros), glicógeno y formaciones vacuolares. En quince de dieciocho de las muestras procesadas (83.3%), se observó en el citoplasma de los queratinocitos de estos estratos, estructuras de redondas, semipoliédricas y poliédricas, de 122 a 210nm de diámetro, la mayoría electrodensas y algunas asemejando la presencia de envoltura electrondensa, sugerentes de partículas virales, con características y tamaño similar a los virus de la familia *Iridoviridae* (Figuras 36 y 37) Ver cuadro No. 1. Los núcleos de las células eran de redondos a ovals con y sin escotaduras en la membrana nuclear, de diferentes tamaños, con acúmulos de discretos a leves de heterocromatina plegada a la periferia, ocupando la eucromatina la mayor parte del contenido nuclear, encontrándose de uno a dos nucleolos prominentes y en otras células nucleolo de aspecto reticular. Algunas células presentaron en el núcleo zonas de aspecto fino granular de moderada electrodensidad con siluetas electrolúcidas, asemejando estructuras pseudopoliédricas libres de 175nm aproximadamente embebidas en dicho material, siendo sugerente de matriz de replicación viral (Figura 38). Las células del estrato basal estaban separadas por amplios espacios intercelulares electrolúcidos con presencia de puentes intercelulares (proyecciones del citoplasma) y desmosomas de diferentes tamaños. Las células eran plemórficas con múltiples invaginaciones de la membrana celular de leves a moderadas, la cantidad de citoplasma era de leve a moderada con múltiples acúmulos de filamentos de queratina y escasos organelos, dando un aspecto de mayor densidad con respecto a los queratinocitos de los demás estratos.

Los núcleos presentaban forma pleomórfica con invaginaciones leves de su membrana, con acúmulos discretos de heterocromatina plegada a la periferia y con uno a dos nucléolos prominentes (Figura 39). Las secciones de componente mesenquimatoso, estaban constituídas por células fusiformes alargadas a poliédricas con proyecciones citoplasmáticas cortas, moderada cantidad de citoplasma con moderada cantidad de organelos, el núcleo era alargado, observándose también en otras células núcleos indentados marcadamente. Dichas células, se encontraban embebidas en abundantes paquetes de colágena dispuestos en diferentes direcciones y de forma irregular. En estas secciones, no se apreciaron partículas virales en las células neoplásicas mesenquimatosas (Figura 40).

8. Discusión

Las arribadas de tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*), se llevan a cabo en los meses de junio a noviembre de cada año, llegando a encontrar más de 300,000 hembras anidadoras en el total de la temporada (Castellanos R. *et al.* 2002). Se han monitoreado arribadas de hasta 150, 000 animales en diferentes lugares de anidación de esta especie en playas de la India y Costa Rica, en las que se informó una incidencia del 3% del total de la población con presencia de FP (Chávez A. *et al.* 2000). La playa “Escobilla” en Oaxaca México, es una de las playas más grandes de anidación de esta especie a nivel mundial, en donde se realizan programas de monitoreos con el fin de promover la conservación de estos animales (Castellanos R. *et al.* 2002; Reporte anual del Centro Mexicano de la Tortuga CMT 2007). En la presente investigación se determinó una arribada aproximada de 200,000 animales en agosto de 2006, reportada por el CMT en 2007 y con base en los datos biométricos obtenidos de 30 hembras, se encuentra que la edad aproximada de los animales es de 10 a 20 años (Wineken J. 2004), señalándolas como adultos jóvenes. Coincidiendo con lo señalado por Aguirre y colaboradores en 2000, quienes con base en la morfología, tamaño de las lesiones identificadas como FP y los datos biométricos, describen en un estudio con tortugas verdes (*C. mydas*) varadas en las costas australianas que la fibropapilomatosis afecta principalmente a animales adultos. Lo anterior también coincide con Ehrhart y colaboradores en 1998, que proponen en un trabajo de investigación en tres zonas geográficas de las costas del Atlántico, que la FP se desarrolla en tortugas verdes (*C. mydas*) adultos jóvenes durante sus rutas migratorias, basados en las capturas en las zonas de alimentación, los datos biométricos y en los hábitos alimenticios de los animales, que a esta edad aún se alimentan de peces y con lo reportado por Greenblatt R. *et al.* en 2005 los cuales señalan que la FP en tres distintas especies de tortugas marinas de tres diferentes áreas geográficas, tiene alta prevalencia en animales inmaduros.

Oros *et al.* en 1999 sugieren que la FP fue descrita inicialmente en animales adultos en vida libre en las costas de Florida y en animales adultos jóvenes bajo condiciones de cautiverio en las Islas Caimán y que la mayor incidencia de FP se encuentra en animales de 40 a 90cm de longitud aproximadamente según la especie. Macroscópicamente, Work y Balasz en 2004 en un estudio enfocado a la identificación de bacterias en la piel de tortugas verdes (*C. mydas*) moribundas en las costas de Hawaii, miden y clasifican los tumores otorgando la siguiente nomenclatura: 1 menor de 5cm, 2 mayor de 5 y menor de 10cm y 3 mayor de 10cm. Basado en ello, en nuestro estudio se propone una clasificación modificada para tortugas golfinas (*L. olivacea*) tomando en cuenta el tamaño de la especie, el tamaño de las lesiones e identificación de la zona corporal afectada más común como señala Herbst y colaboradores en 1999 quienes en un estudio de patología y patogénesis comparada con tortugas verdes (*C. mydas*) varadas vivas en las costas de Florida y Hawaii, identificaron las zonas corporales afectadas incluyendo ojos, boca y órganos internos e indicando que la presencia de tumores externos es proporcional a la presencia de tumores en órganos internos, dando seguimiento a este estudio con cortes histológicos seriados de cada tumor y cada zona. Adnyana y colaboradores en 1997 en las costas de Indonesia observaron en tortugas verdes (*C. mydas*) de vida libre, que la mayor parte de los FP estudiados eran en cabeza, aletas y zonas blandas, determinando que esta enfermedad afecta principalmente la piel de estos animales y posteriormente los ojos y órganos internos y como Oros *et al.* en 1999 refieren que los FP tienen mayor incidencia en cuello, extremidades, cola, regiones axilares e inguinales, caparazón, plastrón y posteriormente zonas oculares, párpados, conjuntiva limbo y córnea y finalmente en órganos internos. Bancroft J. y Stevens A. en 1982 y Meuten D. en 2002 describen la morfología macroscópica de los tumores epiteliales incluyendo fibromas y papilomas en animales domésticos como de aspecto verrugoso y de coliflor basándose en el tamaño, forma, color, consistencia, lugar, etc.

Jelinek F. y Tachezy R. en 2005 utilizan esta misma descripción para una evaluación de histopatología y microscopía electrónica de papilomas epiteliales en ganado bovino. Basados en lo anterior y en los criterios de identificación macroscópica propuestos por Aguirre y colaboradores en 1994, quienes clasifican la morfología macroscópica de los tumores epiteliales identificados como FP en *C. mydas* como coliflores y verrugas, con base en su apariencia, consistencia, tamaño y color y que también ha sido utilizada en estudios con *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* y *Natator depressus* en Hawaii, Barbados, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Panamá, Colombia, Venezuela, Belice, Australia e Indonesia por Adnyana *et al.* en 1997; Balasz *et al.* 1999; Erhart *et al.* en el 2000 Nigro O. *et al.* 2004 respectivamente. En este estudio, se utilizó la descripción macroscópica de aspecto de coliflor, verruga y mixtos y se encontró la misma morfología macroscópica en tortuga golfina *L. olivacea*. Aguirre y colaboradores en 1994, 1998 y 2000 con tortugas varadas, moribundas y en vida libre respectivamente, en las costas de Hawaii y Florida, evaluaron histopatológicamente los FP encontrados en la piel de las tortugas marinas y sus cambios de tipo proliferativo en epidermis y dermis, señalando como lesión inicial la degeneración vacuolar del estrato basal, además de observar cuerpos de inclusión en los núcleos de epidermis, degeneración balanoide y necrosis como lo producido por los herpesvirus, incluyendo FP de órganos internos en *C. mydas*. Herbs y colaboradores en 1999 también con *C. mydas* proponen algunos criterios similares de evaluación histopatológica, como proliferación epidermal y dermal, hiperqueratosis degeneración celular, presencia de cuerpos de inclusión, etc. Sin embargo, en nuestra investigación, basados en estos criterios y en los de evaluación histopatológica para tumores cutáneos utilizados en el Departamento de Patología de la FMVZ, se modificaron, se clasificaron de acuerdo a su localización (focal, multifocal, zonal y difuso) y se añadió grado de severidad (+) leve (++) moderado y (+++) severo.

Microscópicamente, las lesiones cutáneas evaluadas, presentaron cambios de tipo proliferativo como hiperqueratosis ortoqueratósica e hiperplasia del epitelio estratificado escamoso. En el estroma se encontraron fibroblastos bien diferenciados con áreas densas de fibras de colágena, vacuolización y moderada infiltración de células inflamatorias mononucleares hallazgos que son similares a lo descrito por diversos autores como Jacobson E. *et al.* 1991 quienes en *C. mydas* y *Caretta caretta* señalan la proliferación epidermal y dermal como lesión característica de los FP y posible daño por la presencia de un virus; Aguirre A. *et al.* 1994, 1998, 1999 y 2000 además de los cambios de tipo proliferativo señalados, hacen hincapié en la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares como los que producen los herpesvirus y el daño citopático como necrosis, también producido por éstos y asocian la presencia de FP a un virus similar a los de la familia de los herpesvirus apoyados en otras técnicas diagnósticas, además de concluir que pueden estar asociados como vectores los ectoparásitos comunes en tortugas marinas y los papilomavirus de la familia *Papovaviridae*. Herbs *et al.* en 1997 y 1999 con FP de tortugas verdes (*C. mydas*) también observan cambios en la epidermis y dermis, cuerpos de inclusión nucleares y otros microorganismos como bacterias y huevos de trematodos mediante histopatología, además de encontrar antígenos de herpesvirus mediante inmunohistoquímica y concluyen que el desarrollo de FP está asociado a herpesvirus y otros microorganismos tales como bacterias y ectoparásitos; Oros *et al.* 1999 señalan que observaron mediante histopatología los cambios epidermales y dermales mencionados, pero no observan cuerpos de inclusión ni características que indiquen la presencia de un virus como agente causal y mencionan que el desarrollo de la FP está asociado posiblemente a la presencia de ectoparásitos quienes fungen como vectores o bien las patologías derivadas de actividades humanas, como pesca ilegal, contaminación marina por pesticidas y residuos derivados del petróleo.

Herbs L. y Klein P. en 1995 y Ehrhart L. *et al.* 1998 coinciden al concluir que la FP es una enfermedad de gran impacto en las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas y que el desarrollo de los FP cutáneos y los cambios histopatológicos que se observan, al evaluarlos están asociados a múltiples factores predisponentes, tales como inmunosupresión, contaminación ambiental y de las zonas de alimentación, presencia de ectoparásitos, bacterias y un agente causal identificado por el daño histopatológico producido y la positividad a antígenos de herpesvirus mediante inmunohistoquímica, como “parecido” a los de la familia de los herpesvirus. Matushima E. *et al.* 2001 no encontraron evidencia histopatológica, inmunohistoquímica ni ultraestructural contundente de que los herpesvirus y los papilomavirus sean los agentes causales de la FP en tortugas verdes (*C. mydas*) en Brasil. Narama I. *et al.* en 2004 y Jelinek F. y Tachezy R. en 2005 reportan estudios de FP en mamíferos y tienen características histopatológicas similares con los fibropapilomas que se revisaron excepto por el daño citopático y los cuerpos de inclusión. En nuestro estudio, no se encontraron cuerpos de inclusión nucleares ni citoplasmáticos o lesiones características causadas por herpesvirus asociados a la replicación viral como necrosis, daño citopático, degeneración balonoide de células epidermales, vacuolización etc. Como mencionan Aguirre *et al.* 1999 y 2000; Coberley S. *et al.* 2002b; Lu Y. *et al.* 2003 Greenblatt R. *et al.* 2005. Diferentes técnicas diagnósticas y moleculares han sido utilizadas para examinar la posible reacción entre herpesvirus de mamíferos y reptiles con la intención de identificar al agente causal de la FP en tortugas marinas, dulceacuícolas y terrestres (Coberley S. *et al.* 2002 a; Hiroyuki K. *et al.* 2004; Origi F. *et al.* 2004). Los antígenos del herpesvirus que afectan a las tortugas marinas han sido identificados previamente mediante inmunohistoquímica en tumores de tortugas verdes (*C. mydas*) varadas y moribundas en las costas de Florida y Hawai (Greenblatt R. *et al.* 2005 a).

La prueba de Inmunohistoquímica es una técnica determinante para la identificación de antígenos de agentes virales tales como adenovirus, poxvirus y papilomavirus (Damian M. *et al.* 2005). Así como del herpesvirus que afecta a las tortugas marinas usando LETV como antígeno (LETV-único herpesvirus de tortugas marinas aislado de plasma y mantenido en cultivo) (Coberley S. 2002b). En su estudio de Inmunohistoquímica en plasma de tortugas verdes que presentaban FP, Coberley S. *et al.* en 2002 a y b, observaron inmunopositividad a anticuerpos contra LETV y HSV concluyendo que existe una clara relación entre estos dos antígenos, el herpesvirus que afecta a las tortugas marinas y la presencia de FP. La inmunopositividad a antígenos en FP y plasma de tortugas marinas, sugiere que existe respuesta a proteínas particulares de los herpesvirus (gB y gG) aunque también pueden existir otros virus involucrados a la reacción positiva con antígenos de herpesvirus (Herbst L. *et al.* 1995). En nuestro estudio, mediante inmunohistoquímica del complejo avidina biotina peroxidasa (ABC), no se observó inmunopositividad para antígenos específicos de herpesvirus simplex tipo 1 y tipo 2 (HSV1) como lo que proponen diversas teorías, que mencionan que el agente causal de la FP en tortugas marinas es considerado un virus “similar” a los de la familia de los herpesvirus (Aguirre *et al.* 1994 y 1999; Coberley S. *et al.* 2001). Cabe señalar que aún cuando en FP se producen efectos y daños celulares característicos de los herpesvirus, aún no se ha logrado aislar, inocular, obtener replicación y determinar su verdadera participación en el desarrollo de FP en tortugas marinas. Herbst y colaboradores en 1994, tampoco pudieron identificar por inmunohistoquímica la presencia de antígenos de herpes simplex tipo 1 en 19 tortugas varadas con FP epiteliales utilizando como anticuerpo primario LETV concluyendo que la presencia de un herpesvirus no es responsable del desarrollo de FP en *C. mydas*.

Matushima E. *et al.* en 2001 en las costas de Brasil, llevaron a cabo un estudio de inmunohistoquímica con la técnica peroxidasa antiperoxidasa en FP de piel de tortugas verdes (*C. mydas*) tratando de identificar antígenos de papilomavirus y herpesvirus simplex tipos I y II utilizando anticuerpos policlonales, sin encontrar positividad franca a antígenos específicos del grupo de los papilomavirus BPV ni a antígenos específicos del grupo de los herpes simplex. Con base en lo anterior, en el estudio de FP en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México mediante histopatología y microscopía electrónica de transmisión, no se pudo encontrar evidencia contundente de que el agente causal de la FP sea un herpesvirus. Mediante microscopía electrónica, en los FP de tortugas marinas, se observan cambios en las células de la epidermis como pleomorfismo, aumento de tamaño, vacuolización con partículas virales bien definidas con envoltura y virión en núcleo y citoplasma de las células, en dermis fibroblastos pleomórficos con características neoplásicas y abundante colágena. (Aguirre A. *et al.* 1994; Oros J. *et al.* 1999; Herbs L. *et al.* 1999; Aguirre A. *et al.* 1994; Ehrhart L. *et al.* 1998; Aguirre A. *et al.* 1998; Jelinek F. y Tachezy R. 2005). Ultraestructuralmente en este estudio, la morfología en los queratinocitos de los estratos basal, espinoso y granuloso en la epidermis, así como de los fibroblastos en dermis, son indicativos de células neoplásicas de tipo benigno, sin encontrarse cambios morfológicos sugerentes de malignidad o displasia, concordando con los descrito por microscopía óptica y lo citado en la literatura (Aguirre A. *et al.* 1994; Ehrhart L. *et al.* 1998; Lu Y. *et al.* 2000; Meuten D. 2002;). La pérdida de la relación núcleo-citoplasma, anisocitosis y anisonucleosis, presencia de escotaduras en la membrana nuclear, formación de nucleolos prominentes y de aspecto reticular, son criterios presentes en las células de epidermis y dermis, para ser considerados como de células neoplásicas benignas (Oros J. *et al.* 1999; Lu Y. *et al.* 2000; Meuten D. 2002; Coberley S. 2002b).

La presencia de abundantes complejos de unión (desmosomas y hemodesmosomas) y acúmulos irregulares intracitoplasmáticos de filamentos de queratina en células epidermales, son alteraciones particulares de los tumores de origen epidermal y la abundante producción de colágena en paquetes irregulares, proliferación de retículo endoplásmico y pleomorfismo nuclear son alteraciones presentes en las neoplasias de tejido conjuntivo (Erlandson R. 1994; Eyden B. 1996; Ehrhart L. *et al.* 1998; Aguirre A, Balazs G. 2000; Lu Y. *et al.* 2000; Meuten D. 2002). Durante la evaluación de las células epiteliales de este estudio, no se apreciaron zonas de replicación viral de herpesvirus, las cuales generalmente se manifiestan por acumulo intranuclear de viriones maduros e inmaduros con la fragmentación y disgregación nuclear y la presencia en el citoplasma de partículas maduras con las envolturas que caracterizan a este grupo de virus (Cheville N. 1994; Aguirre A, Balazs G. 2000). No se apreciaron tampoco partículas virales de otros agentes descritos en la literatura asociados a fibropapilomas en tortugas marinas como retrovirus, papilomavirus o virus desnudos (Aguirre A. *et al.* 1999; Coberley S. 2002a; Lu Y. *et al.* 2003; Nie Z. *et al.* 2006). Por otro lado, en este estudio los queratinocitos de los estratos espinoso y granuloso presentaron en el citoplasma estructuras redondas, semipoliédricas y poliédricas electrodensas de 122 a 210nm de diámetro, que con la aplicación de criterios para identificación de partículas virales (Cheville N. 1994; Aguirre A. *et al.* 1998; Cedillo C. *et al.* 2006), que incluye su localización en el citoplasma, morfología y tamaño, aunado a la presencia en algunas de ellas, de una pseudoenvoltura o membrana electrodensa, sugieren ser partículas virales pertenecientes a la familia *Iridoviridae*. Los virus de la familia *Iridoviridae* comprenden un grande y complejo grupo de microorganismos asociados con enfermedades en peces de agua dulce, marinos y anfibios (Qin Q. *et al.* 2006). Los iridovirus son agentes de distribución mundial, causantes de enfermedades infecciosas y proliferativas en diferentes especies de reptiles, anfibios y peces (Mao J. *et al.* 1999; Wen J. *et al.* 2004).

Reportándose en los últimos años nuevos informes con respecto a la presentación de este agente, nuevas variantes y su adaptación a otras especies como descripciones que indican aislamientos de iridovirus en tortugas de concha blanda (*Trionyx sinensis*) (Chen Z. *et al.* 1999), así como un iridovirus en una colección de quelonios, que mediante microscopía electrónica de transmisión, PCR y análisis secuencial, el agente viral se clasificó como perteneciente del género Ranavirus (Hyatt A. *et al.* 2002). En el caso de los peces, algunos iridovirus desencadenan enfermedades de tipo proliferativo como en el caso de la linfoquistosis, generando nodulaciones tumorales a nivel de la piel (Noga J. 1996). En 2005 Chi-Tung T. y colaboradores lograron identificar la secuencia completa del genoma de los iridovirus y compararon su organización genómica; también existen diversos informes en los cuales se han realizado análisis moleculares para clonar el DNA y encontrar la presencia de virus y determinar su participación en enfermedades en reptiles (Paul E. *et al.* 2007). O como el de San-Tai S. *et al.* en 2005, que describen iridovirus relacionados con enfermedades de tipo infecciosas, causantes de lesiones necróticas, ulcerativas y hemorrágicas en tortugas de concha blanda (*Pelodiscus sinensis*).

La presencia de ectoparásitos nombrados comúnmente “balanos” en tortugas marinas es cada vez más frecuente (Greenblatt R. *et al.* 2004). En *L. olivacea* es común observar balanos de diferentes tamaños en la superficie corporal (Hernández S, Valadez C. 1998). Estos ectoparásitos han sido propuestos como posibles vectores de la fibropapilomatosis en tortugas marinas (Greenblatt R. *et al.* 2004; Gámez S. *et al.* 2006). En este estudio, se encontraron ectoparásitos considerados como “balanos” en la superficie de los FP y fueron evaluados microscópicamente (Maybelle C, Lichtenfels R. 1973) y ultraestructuralmente (Largersson N. *et al.* 2002). Posteriormente fueron identificados en el Instituto de Biología de la UNAM como *Crustacea cirripeda*. Debido a que no se encontró relación en la diseminación de partículas virales (Leibovitz L, Koulis S. 1989) mediante histopatología, inmunohistoquímica y ultraestructura se consideraron como hallazgos incidentales.

9. Conclusiones

Se caracterizó macro y microscópicamente la Fibropapilomatosis en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa "Escobilla" Oaxaca, México.

La Fibropapilomatosis en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) tiene partículas virales similares a iridovirus.

La patología de Fibropapilomas es una enfermedad de presentación relativamente frecuente en las poblaciones de tortugas marinas, asociada a un agente viral parecido a los de la familia *Iridoviridae* y a la presencia de patologías asociadas, predisponentes y la persistencia subclínica de la infección crónica.

Las lesiones cutáneas proliferativas son similares a las descritas anteriormente y no se asocian a la presencia de otros virus antes descritos debido a que sus efectos citopáticos no fueron comprobados.

Ultraestructuralmente se han tratado de asociar agentes virales y sus efectos aparentemente irreversibles en fibropapilomas, cuyo rol en la cronicidad de la enfermedad no ha sido adecuadamente estudiado ni descrito.

Los cambios en la ultraestructura epitelial no han sido tan claramente documentados ni comprobados anteriormente en tortugas marinas con presencia de tumores epiteliales, sin embargo en estos animales se han evidenciado hallazgos histopatológicos compatibles con fibropapilomas.

Existen escasos estudios encaminados a evaluar el cambio y las anormalidades epiteliales extra e intracelulares y ninguno diseñado para evaluar de acuerdo a estos cambios y a la respuesta a los tratamientos ya sean médicos o quirúrgicos, la irreversibilidad de dicha patología.

Es necesario continuar con estudios apoyados en técnicas específicas que permitan aislar al agente causal, debido a que en este estudio, no se pudo determinar la participación de las partículas virales similares a iridovirus en el desarrollo de la fibropapilomatosis

10. REFERENCIAS

1. Ramírez CA. Efectos nocivos provocados por el uso de plaguicidas en la fauna silvestre de México y sus consecuencias ecológicas. 1997. Available from: URL: <http://www.ambiente-ecologico.com/revist54/ramire54.htm>.
2. Loredó G, Brukman A, Harris M, Kaegle D, Leclair E, Gutman R, Denney E, Henkelman E, Murray P, Fallon J, Tuan R, Gilbert S. Development of an evolutionarily novel structure fibroblast growth factor expression in the carapacial ridge of turtle embryos. *Journal of experimental zoology (Mol. Dev. Evol)*. 2001; 291: 274-281.
3. Castellanos R, De Cervantes R, Bustos J, Ávila D, Orozco M. Fibropapillomatosis in female olive ridleys (*Lepidochelys olivacea*) in Majahuas Beach, Tomatlán, Jalisco, México. proceedings of the Twenty-second Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, April 4-7, Miami, Florida. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-331. 2002: 27.
4. Murdock C, Wibbels T. Cloning and expression of aromatase in a turtle with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology* 2003; 130: 109–119.
5. Jelinek F, Tachezy R. Cutaneous Papillomatosis in cattle. *J. Comp. Path.* 2005; Vol. 132: 70-81.
6. Ehrhart L, Redfoot W, Bagley D,. Green turtles in three developmental habitats of the Florida Atlantic Coast: Population structure, fibropapillomatosis and post-juvenile migratory destinations. Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium, March 3-7, Mazatlán, Sinaloa, México U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436.1998: 32.
7. (a) Coberley S, Condit R, Herbst L, Klein P. Identification and Expression of Immunogenic Proteins of a Disease-Associated Marine Turtle Herpesvirus. *Journal of virology* 2002; 76 (20): 10553–10558.
8. Balazs G, Aguirre A, Murakawa S. Occurrence of oral fibropapillomas in the Hawaiian green turtle: Differential disease expression. *Mar. Turt. News*. 1997; 76: 1- 4.

9. (b) Coberley S. The role of herpesviruses in marine turtle disease. (tesis de Doctorado). Gainesville (Florida) EUA: Universidad de Florida, 2002.
10. Brooks D, Ginn P, Miller T, Bramson L, Jacobson E. Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). Vet.Pathol. 1994; 31:335-339.
11. Herbst L, Klein P. Green turtle Fibropapillomatosis: Challenges to Assessing the Role of Environmental Cofactors. Environmental Health Perspectives 1995; 4: 27-30.
12. Coberley S, Herbst L, Brown D, Llewellyn M, Ehrhart T, Bagley A, Schaf A, Moretti R, Jacobson E, Klein P. Detection of Antibodies to a Disease-Associated Herpesvirus of the Green Turtle, *Chelonia mydas*. Journal of Clinical Microbiology, 2001; 39 (10): 3572–3577.
13. (a) Lu Y, Aguirre A, Work T, Balazs G, Nerurkar V, Yanagihara R. Identification of a small, naked virus in tumor like aggregates in cell lines derived from a green turtle *Chelonia mydas*, with fibropapillomas. Journal of virological methods 2000; 86: 25-33.
14. (b) Lu, Y, .Wang Q, Yu A, Aguirre A, Balazs G, Nerurkar V, Yanagihara R. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction Arch Virol. 2000; 145: 1885–1893.
15. Quackenbush S, Casey R, Murcek R, Thomas P, Work T, Limpus C, Chaves A, DuToit L, Vasconcelos J, Aguirre A, Spraker T, Horrocks J, Lotus A, Balazs G, Casey J. 2001 Quantitative Analysis of Herpesvirus Sequences from Normal Tissue and Fibropapillomas of Marine Turtles with Real-Time PCR. Virology 2001; 287: 105-111.
16. (a) Greenblatt R, Work T, Dutton P, Sutton C, Spraker T, Casey R, Diez C, Parker D, Leger J, Balazs G, Casey J, Geographic Variation in Marine Turtle Fibropapillomatosis. Journal of Zoo and Wild Life Medicine 2005; 36 (3): 527-530.
17. Aguirre A, Balazs G, Zimmerman B, Spraker T. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. Journal of wild life diseases 1994; 30 (1): 8-15.

18. Work T, Balazs G, Wolcott M, Morris R. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Disease of aquatic organisms* 2004; 53: 41-46.
19. (b) Greenblatt R, Quackenbush S, Casey, R, Rovnak J, Balazs G, Work T, Casey J, Sutton C. Genomic Variation of the Fibropapilloma-Associated Marine Turtle Herpesvirus across Seven Geographic Areas and Three Host Species. *Journal of Virology* 2005; 79 (2): 1125–1132.
20. Johnson J. Husbandry and Medicine of Aquatic Reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2004; 13 (4): 223-228.
21. Abreu F, Brooks R, Ginn D, Miller P, Bramson T, Jacobson E. Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet. Pathol.* 1994; 31: 335-339.
22. Herbst L, Jacobson E, Klein P, Balazs G, Moretti R, Brown T, Sundberg J. Comparative Pathology and Pathogenesis of spontaneous and Experimentally Induced Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Vet Pathol* 1999; 36: 551–564.
23. Aguirre A, Balazs G. Blood chemistry values of green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomatosis. *Comparative Haematology International* 2000; 10: 132-137.
24. Greenblatt R, Work T, Balazs G, Sutton C, Casey R, Casey J. The *ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Virology* 2004; 321: 101-110.
25. Adnyana W, Ladds P, Blair D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Aust. Vet. J.* 1997; 75 (10): 737-742.
26. Aguirre A, Spraker T, Balazs G, Zimmerman B. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles of the Hawaiian Islands. *J. Wildl. Dis.* 1998; 34 (1): 91-98.
27. Jones A. Sea turtles: Olds Viruses and new Tricks. *Current Biology* 2004; 14: R842-R843.

28. Aguirre A, Limpus C, Spraker T, Balazs G. Survey of fibropapillomatosis and other potential diseases of marine turtles from Moreton Bay, Queensland, Australia. Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Conservation and Biology, March 2-6, South Padre Island, Texas, U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-443. 1999: 36.
29. Nigro O, Aguirre AI, Lu Y. Nucleotide sequence of an ICP18.5 assembly protein (UL28) gene of green turtle herpesvirus pathogenically associated with green turtle fibropapilloma. Journal of virological Methods 2004; 20: 107-112.
30. Wineken J. La anatomía de las tortugas marinas. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470 U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center, 75 Virginia Beach Drive, Miami, FL 33149, 2004.
31. Hernández S, Valadez C. Observation of the epizoa found on the turtle *Lepidochelys olivacea* at la Gloria, Jalisco, México. Ciencias Marinas 1998; 24 (1): 119-125.
32. Chávez A, Du Toit L., Marin G, Eure G. Fibropapilloma in the Ostional olive ridley (*Lepidochelys olivacea*). Disease of aquatic organisms 2004; 65: 51-55.
33. Caribbean Conservation Corporation (CCC) Manual de Asistente de Investigación programa de Tortuga verde. Tortuguero Costa Rica 2004.
34. Maffucci F, Caurant F, Bustamante P, Bentivegna F. Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from western Mediterranean sea turtles (southern Italy). Chemosphere 2005; 58: 535-542.
35. Meuten D.J. Tumors in domestic animals. 4ed. Ames: Iowa State, 2002.
36. Pardo Mindan F.J. Anatomía Patológica. Ed Mosby Doyma libros, 1997.
37. McGavin D, Zachary J. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4 Rev Ed. Elsevier Health Sciences (United Kingdom), 2006.
38. Van Dijk, J, Gruys E, Mouwen Saunders J. Color Atlas of Veterinary Pathology. 2nd Edition, Edited by ELSEVIER, 2007.

39. Bancroft J, Stevens A. Theory and Practise of Histological Techniques. 2nd ed. London, Melbourne and New York, Churchill Livingstone Edinburg 1982
40. Cheville NF. Ultrastructural Pathology an introduction to interpretation. IOWA State University Press/ AMES, 1994.
41. Browman B, Baker M, Rixon F, Chiu W, Quiocho F. Structure of the Herpesvirus Major Capsid Protein. The EMBO Journal (European Molecular Biology Organization) 2003; 22 (4): 757-765.
42. Erlandson R. Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Tumors with Clinicopathological, Immunohistochemical, and Cytogenetic Correlations Raven Press New York, 1994.
43. Eyden B, Shoin I. Organelles in Tumor Diagnosis an Ultrastructural Atlas. Igaku-Shoin New York-Tokyo, 1996.
44. Dickersin R. Diagnostic Electron Microscopy a Text/Atlas. Springer-Verlag New York Inc. 1999.
45. Murphy F, Gibbs P, Horzinek M, Suddert M. Veterinary virology 3rd edition academic press, 2000.
46. Carter G, Wise D, Flores E. A concise review of Veterinary Virology, International Veterinary information services, Ithaca NY 13 oct. 2004 (cited 2005) A3420.1005. Available from: URL: <http://www.ivis.org>
47. Cedillo C, Salas G, Constantino C. Diagnóstico ultraestructural de agentes virales. Estudio recapitulativo de 1996 a 2005. Memorias del XV Congreso Nacional de Patología Veterinaria; 2006 Junio; Zacatecas Zac. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios 2006: 164-171.
48. U. S. Geological Survey National Wildlife Health Center Hawaii Field Station Manual de necropsias de tortugas marinas para Biólogos en refugios o áreas remotas. Hawaii EUA 2000.
49. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobón L. Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington D.C. 1992. Versión en Castellano, Editado por Heffess Clara, Mullick Florabel, 1995.
50. Hunter E. Practical electron microscopy. A beginner's illustrated Guide. Second edition Cambridge University Press 1993.

51. Vázquez Nin G. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas. Ed. Fondo de Cultura Económica. UNAM 2000.
52. Daniels W. Bioestadística. Ed. Limusa, 1987.
53. Kuehl RO. Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis e investigaciones. Segunda edición, Tomson learning, 2003.
54. Jacobson E, Buergelt C, Williams B, Harris R. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle (*Chelonia Mydas*). Disease of aquatic organisms. 1991; 12: 1-6.
55. Oros J, Lackovich J, Jacobson E, Brown D, Torrent A, Tucker S, Klein P. Fibropapilomas cutáneos y fibromas viscerales en una tortuga verde (*Chelonia mydas*) Rev. Esp. Her. 1999; 13:17-26.
56. Matushima E, Longatto A, Di Loreto C, Kanamura C, Sinhorini I, Gallo B, Baptostolle C. Cutaneous papillomas in green turtles: a morphological, ultra-structural and inmunohistochemical in Brazilian specimens. Braz. J. Vet. Res. anim. Sci., São Paulo 2001; 38 (2): 51-54, 2001.
57. Narama I, Kobayashi Y, Yamagami T, Ozaki K, Ueda Y. Pigmented Cutaneous papillomatosis (pigmented epidermal nevus) in three pug dogs; histopatology, electron microscopy and analysis of viral DNA by the Polymerase Chain Reaction. J. Comp. Path. 2005; 132: 132-138.
58. Lu Y, Wang Y, Aguirre A, Zhao Z., Liu C, Nerurkar V, Yanagihara R. RT-PCR detection of the expression of the polymerase gene of a novel reptilian herpesvirus in tumor tissues of green turtles with fibropapilloma. Arch. Virol. 2003; 148: 1155-1163.
59. Damian M, Morales E, Salas G, Trigo F. Inmunohistochemical Detection of Antigens of Distemper Adenovirus and Parainfluenza Viruses in Domestic Dogs with Pneumonia. J. Comp. Path. 2005; 133: 289-293.
60. Nie Z, Tzeng Yi, Chang H, Chiu C Chang C, Chang C, Tao M. Microscopy-Based Mass Measurements of a Single Whole Virus in a Cylindrical Ion Trap. Angew Chem. Int Ed. 2006; 45: 31-8134.
61. Hiroyuki K, Ichiro S, Masayasu K, Hiroshi H, Takafumi S, Kenji K. Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. General and Comparative Endocrinology. 2004; 138: 50–57.

62. Origgi F, Romero D, Bloom A, Klein P, Gaskin J, Tucker J, and Jacobson E. Experimental Transmission of a Herpesvirus in Greek Tortoises (*Testudo graeca*). *Vet. Pathol.* 2004; 41:50–61.
63. Qin Q, Wu T, Jia T, Hedge A, Zhang R. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *Journal of Virological Methods* 2006; 131: 58-64.
64. Mao J, Green D, Fellers G, Chinchar V. Molecular Characterization of Iridoviruses Isolated from Sympatric Amphibians and Fish. *Virus Research* 1999; 63: 45-52.
65. Wen J, Qim W, Jin Q, Can H, Fan W, Choy L. Functional Genomics analysis of Singapore grouper iridovirus complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of virology* 2004; 78, (22): 12576-12590.
66. Chen Z, Zheng C, Jiang Y. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Research* 1999; 63: 147–151.
67. Hyatt A, Williamson M, Coupar B, Middleton D, Hengstberger S, Gould A, Sellec P, Wise T, Kattenbelt J, Cunningham A, Lee J. First identification of a ranavirus from green phytons (*Chondropython Viridis*). *Journal of Wild Life Diseases* 2002; 38 (2): 239-252.
68. Noga JE. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*, Blackwell Publishing mosby-year book inc, 1996.
69. Chi-Tung T, Jing-Wen T, Ming-Hsien W, Ming-Feng W, Ing-Cherng G, Chi-Yao C. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other Iridoviruses. *Journal of virology* 2005; 79 (4): 2010-2023.
70. Paul E, Chitnis N, Henderson C, Kaul R, Costa S, Billimoria S. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract. *Arch. Virol.* 2007; 152: 1353-1364.
71. San-Tai S, Li-Ming L, Jia-Ru C, Jung-Tsun C, Yuh-Lin Y.u. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding pituitary thyroid stimulating hormone subunit of the Chinese soft-shell turtle *Pelodiscus sinensis* and regulation of its gene expression *General and Comparative Endocrinology* 2005; 131: 192–201.

72. Gámez S, Osorio D, Peñaflores C, Ramírez J. Identificación de parásitos y epibiontes de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) que arribó a las playas de Michoacán y Oaxaca, México. *Vet. Méx.* 2006; 37 (4): 431-440.
73. Maybelle C, Lichtenfels R. Identification of Parasitic Metazoa in Tissue Sections. *Animal Parasitology*. Institute Agricultural Research Service U.S. Department of Agricultura Beltsville, Maryland 20705. Reprinted, 1973.
74. Lagersson N. The ultrastructure of two types of muscle fibre cells in the cyprid of *Balanus amphitrite* (Crustacea: cirripeda). *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 2002; 82: 573-578.
75. Leibovitz L, Koulis S. A viral disease of the Ivory Barnacle, *Balanus eburneus*, Gould (Crustacea ,Cirripeda) *Biol. Bull.* 1989; 176: 301-307.

Cuadro 1. Criterios generales de identificación ultraestructural de partículas virales.

Virus	Material genético	Morfología	Tamaño nm	Presencia de envoltura	Sitio de replicación	Localización
Herpesvirus	ADN Doble cadena	Icosaédrico	Virion 100-200	Si	Núcleo	Núcleo Citoplasma
Papilomavirus	ADN Doble cadena	Icosaédrico	50-55	No	Núcleo	Núcleo
Iridovirus	ADN Doble cadena	Icosaédrico	Virion 115-125 120-300	Si	Citoplasma Núcleo	Citoplasma

Basados en lo descrito por Cedillo C. *et al.* 2006.

Cuadro 2. Datos biométricos y características de los FP de las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) evaluadas.

ID #	Identificación de tortugas en la playa			FP superficie corporal		FP seleccionado para toma de muestras			Datos biométricos	
	Fecha	Hora	Zona	Cantidad	Distribución	Tamaño	Grado	Descripción macroscópica	CCLmin	SCLmax
T1	09/08/2006	02:00 am	Estaca 19	5	A C	3.0 cm	1 Leve	En aleta AI, aspecto de coliflor, rosa pálido grisáceo, firme, con ectoparásitos	69,68,68	73,74,71
T2	12/08/2006	01:00 am	Estaca 14	4	A ZB	3 cm	1 Leve	En aleta AD, aspecto de coliflor, blanco, firme	66,66,66	70,71,73
T3	12/08/2006	02:00 am	Estaca 11	3	A ZB	2 cm	1 Leve	En aleta AI, aspecto de coliflor, rosa, firme	69,70,70	73,75,74
T4	12/08/2006	02:30 am	Estaca 15	7	A ZB	12 cm	3 Severo	En aleta AD, aspecto de coliflor, redondo, rosa, muy irrigado	65,63,65	68,70,70
T5	13/08/2006	08 :00 am	Estaca 12	11	C A ZB	2.5 cm	1 Leve	En aleta AD, aspecto de coliflor, blanco rosado con gris, firme	66,66,66	69,67,69
T6	13/08/2006	09 :00 am	Estaca 9	2	A ZB	3 cm	1 Leve	En aleta AI, aspecto de verruga en racimo, rosa grisáceo, firme	67,67,68	70,70,69
T7	13/08/2006	09:30 am	Estaca 20	5	C A ZB	4 cm	2 Moderado	En aleta AI cerca de caparazón, aspecto de verruga en racimo, gris rosado, firme, irrigado	64,66,66	68,69,69
T8	13/08/2006	10:00 am	Estaca 17	1	A	2 cm	1 Leve	En aleta AD cerca de caparazón, aspecto de coliflor, gris rosado, firme	65,65,65	68,67,68
T9	13/08/2006	10:15 am	Estaca 10	3	A ZB	4 cm	2 Moderado	En aleta AD cerca de caparazón, aspecto de coliflor, rosa pálido grisáceo, firme, irrigado	69,68,65	70,73,72
T10	13/08/2006	11:20 am	Estaca 11	4	A ZB	3.2 cm	2 Moderado	En cuello, aspecto de coliflor, rosa pálido, firme, irrigado	70,71,70	75,75,75

ID= Identificación y número de tortuga; CCL min= Curva mínima del caparazón; SCL max= Recta máxima del caparazón; A= Aletas, C= Cabeza, ZB= Zonas blandas, Cap= Caparazón.

Cuadro 2. Datos biométricos y características de los FP de las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) evaluadas. (Continuación)

ID #	Identificación de tortugas en la playa			FP superficie corporal		FP seleccionado para toma de muestras			Datos biométricos	
	Fecha	Hora	Zona	Cantidad	Distribución	Tamaño	Grado	Descripción macroscópica	CCLmin	SCLmax
T11	13/08/2006	11:50 am	Estaca 13	2	A	3.9 cm	2 Moderado	En zonas blandas cerca de caparazón, aspecto de coliflor, rosa grisáceo, firme, irrigado	64,65,65	67,68,68
T12	13/08/2006	12:00 pm	Estaca 15	5	C A ZB	8.2 cm	3 Severo	En aleta AD, aspecto de coliflor, rosa pálido grisáceo, firme	69,69,69	73,75,73
T13	13/08/2006	12:50 pm	Estaca 11	6	C A ZB	5 cm	2 Moderado	En zonas blandas, aspecto de coliflor, semiredondo, rosa pálido grisáceo, firme, irrigado	66,66,65	69,69,67
T14	13/08/2006	16:00 hrs.	Estaca 21	7	C A ZB	3.1 cm	2 Moderado	En zonas blandas cerca de caparazón, aspecto de verruga, rosa pálido grisáceo, firme	70,70,70	75,73,72
T15	13/08/2006	16:20 hrs.	Estaca 21	5	C A ZB	4 cm	2 Moderado	En zonas blandas (entre AD y pecho), aspecto de verruga, rosa pálido grisáceo, firme	66,66,65	69,70,68
T16	13/08/2006	17:00 hrs.	Estaca 20	8	C A ZB	6.3 cm	2 Moderado	En zonas blandas cerca de aleta AI, aspecto de coliflor, rosa pálido, firme, irrigado	66,66,65	69,69,68
T17	13/08/2006	17:25 hrs.	Estaca 20	4	A ZB	4.3 cm	2 Moderado	En zonas blandas cerca de aleta AI, aspecto de coliflor, rosa pálido, firme, irrigado	65,65,65	68,68,68
T18	13/08/2006	18:00 hrs.	Estaca 18	9	C A ZB	5.2 cm	2 Moderado	En aleta AD, aspecto de coliflor, rosa pálido grisáceo, firme, irrigado	70,70,70	76,76,73
T19	13/08/2006	18:45 hrs.	Estaca 16	11	C A ZB Cap	2.2 cm	1 Leve	En zonas blandas cerca de caparazón y aleta AD, aspecto de verruga, rosa grisáceo, firme	66,66,66	69,69,68
T20	13/08/2006	19:20 hrs.	Estaca 14	1	Cap	2.4 cm	1 Leve	En zonas blandas cerca de aleta AD y caparazón, aspecto de verruga, rosa grisáceo, firme	68,68,68	69,69,69

ID= Identificación y número de tortuga; CCL min= Curva mínima del caparazón; SCL max= Recta máxima del caparazón; A= Aletas, C= Cabeza, ZB= Zonas blandas, Cap= Caparazón.

Cuadro 2. Datos biométricos y características de los FP de las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) evaluadas. (Continuación)

ID #	Identificación de tortugas en la playa			FP superficie corporal		FP seleccionado para toma de muestras			Datos biométricos	
	Fecha	Hora	Zona	Cantidad	Distribución	Tamaño	Grado	Descripción macroscópica	CCLmin	SCLmax
T21	13/08/2006	22:00 hrs.	Estaca 9	3	A ZB	2.1 cm	1 Leve	En zonas blandas cerca de aleta AI, aspecto de verruga, rosa pálido grisáceo, firme.	66,68,66	70,70,70
T22	13/08/2006	22:50 hrs.	Estaca 12	7	C A ZB	4 cm	2 Moderado	En zonas blandas, aspecto mixto, rosa pálido grisáceo, firme	69, 69,69	73,72,71
T23	13/08/2006	23:28 hrs.	Estaca 15	4	A	4.6 cm	2 Moderado	En zonas blandas, cerca de aleta AI, aspecto de coliflor, rosa pálido grisáceo, firme, irrigado	64,64,64	67,67,69
T24	14/08/2006	12:50 am.	Estaca 10	6	A ZB	5cm	2 Moderado	En zonas blandas, cerca de aleta AI, aspecto mixto, rosa blanco grisáceo, firme, irrigado	70,70,70	76,76,76
T25	14/08/2006	12:55 hrs.	Estaca 10	2	A	2.2 cm	1 Leve	En zonas blandas, cerca de aleta AI, aspecto coliflor, rosa blanco grisáceo, firme, irrigado	65,65,68	70,70,70
T26	14/08/2006	1:09 hrs.	Estaca 11	9	C A ZB P	3.1 cm	2 Moderado	En zonas blandas, cerca de aleta AD, aspecto semiredondo, rosa grisáceo, firme, irrigado.	66,65,70	71,72,71
T27	14/08/2006	2:00 hrs.	Estaca 13	8	C A ZB P	5.1 cm	3 severo	En zonas blandas, cerca de aleta AD, aspecto coliflor, rosa blanco grisáceo, firme, irrigado	61,61,61	65,67,69
T28	14/08/2006	2:38 hrs.	Estaca 16	15	C A ZB Cap P	16.9 cm	2 Moderado	En aleta AD, aspecto de coliflor y cebolla, semi redondo, rosa pálido, firme, irrigado	69,69,69	73,72,71
T29	14/08/2006	4:35 hrs.	Estaca 21	12	C A ZB P	4 cm	2 Moderado	En zonas blandas, cerca de aleta AD, aspecto coliflor, rosa blanco grisáceo, firme, irrigado	68,68,68	73,75,75
T30	14/08/2006	7:25 hrs.	Estaca 11	5	A ZB	5 cm	2 Moderado	En zonas blandas, cerca de aleta AD, aspecto coliflor, rosa blanco grisáceo, firme, irrigado	69,69,68	73,75,70

ID= Identificación y número de tortuga; CCL min= Curva mínima del caparazón; SCL max= Recta máxima del caparazón; A= Aletas, C= Cabeza, ZB= Zonas blandas, Cap= Caparazón.

Cuadro 3. Hallazgos histopatológicos epidermales proliferativos e inflamatorios en las tortugas golfinas

(*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

Tortuga #	Hiperplasia	Acanthisis	Hiperqueratosis	Erosión	Degeneración		Pústulas	Células inflamatorias			Melanomacrófagos
	Epidermal.		ortoqueratosis	/Ulceras	Células Basáles	Estrato Espinoso	Intraepidermales	HØ	LØ	MØ	MØ
T1	++ D	+D	++D	E ++Z	+ M	+	++ z	-	+	+ Z	+
T2	+++M	+ a ++	+D	E z	+ M	+ M	++ a +++Z	-	+	-	+
T3	++ M-D	+M	+D	-	-	-	++Z	-	-	-	+
T4	+ D	+	+D	E ++Z	++M	+a++M	++MF	+	++	+ Z	+++ Ex.
T5	+ D	-	+D	-	++Z	-	-	-	-	+ Z	+
T6	+ D	+ M	+D	-	-	-	-	-	-	-	-
T7	+++ M-D	++ D	+D	-	+F	-	+a++M	-	+M	-	++
T8	++ M-D	+ D	+D	-	+Z	-	-	+M	-	-	-
T9	++ M-D	+ D	+D	-	-	-	-	-	-	-	+
T10	++ M-D	+ D	+D	E++Z	+M	+M	+++	-	+M	-	+M
T11	-	-	+D	-	+M	-	-	-	-	-	+M
T12	++ D	+ D	+D	E+	+Z	+Z	-	+Z	+Z	-	+M
T13	-	-	+D	-	++M	+M	-	-	+M	-	+M
T14	++ M	+ M	+D	-	+Z	+Z	+++Z	+M	+M	-	+M
T15	++ M	+M	++D	-	-	-	-	-	-	-	+M
T16	+ D	-+ D	+D	E Z	+ Z	+ M	+ Z	-	-	-	+M
T17	++ D	+ D	+D	E Z	+ Z	-	+ Z	+ M	+ Z	+ Z	-
T18	++ D	++ M	+D	U Z	+ Z	+ Z	+ Z	-	+ M	-	+M
T19	++ D	++ D	+D	E Z	+ M	-	+ Z	-	-	-	+++ M
T20	-	-	+D	-	-	-	-	-	-	+ Z	+ M
T21	+ D	+ M	+D	-	-	-	-	-	-	+ Z	++ M
T22	+++ D	+++ D	+D	U E Z	+ M	+ M	+ M	+ Z	+ Z	-	+ M
T23	+ M	+ D	+D	U E Z	+ Z	+ M	+ M	-	-	-	++ M
T24	+ M	+ D	+D	-	-	-	-	+ Z	+ Z	-	+ M
T25	++ M	++ M	+D	-	-	-	+ Z	-	-	-	+ M
T26	+ D	+ M	+D	U Z	-	-	-	-	-	-	+ M
T27	+ D	+ M	+D	U E Z	-	-	+ M	-	-	-	++ M
T28	+ D	+ M	+D	E+Z	-	-	-	-	-	-	+++ M
T29	++ M	++ D	+D	E+Z	+ M	-	-	-	+ Z	-	+ M
T30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ M

(D)= difusa, (M)= multifocal, (Z) = zonal, (F)= focal, (Ex)= exocitosis.(+)=Leve, (++)= Moderado, (+++)=Severo. (-)= negativo; HØ= heterófilos; LØ= linfocitos; MØ=macrófagos.

Cuadro 4. Hallazgos histopatológicos dermales proliferativos e inflamatorios en las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

Tortuga #	Tejido conjuntivo (Colagena + fibroblastos)			Células inflamatorias			Melanomacrófagos
	Denso	Laxo	HØ	LØ	MØ	MØ	
T1	+++D	-	+M	+++M	+ a ++ M	++M	
T2	+++M	+ a ++M	+M	++M	+Z	+M	
T3	+++D	-	+	+M	+Z	+++M	
T4	++ a +++ M	++ A +++M	+++ GR. M	++ a +++M	++M	+++M S	
T5	+++ D	-	+ a ++ M	++ a +++M	++M	+++M	
T6	++ M	+ Z	+M	++M	+M	+M	
T7	++ Z	++ a +++M	+M	++M	+M	+M	
T8	++ D	-	+M	+M	-	+M	
T9	++ M	++M	+M	+M	-	+M	
T10	++ D	+M	+M	++M	+ a ++M	+M	
T11	++ D	+M	+M	+M	-	+M	
T12	++ a +++ D	-	+M	++ a +++ M	+ a ++M	+++M	
T13	+++ D	-	+M	++M	+M	+M	
T14	+++ D	-	++ a +++ M	++ a +++ M	+M	+M	
T15	+++D	++M	+M	+M	-	+ M	
T16	+++M	+M	+M	++M	+ a ++M	+ M	
T17	+++D	+M	+M	+M	-	++M	
T18	++ a +++ M	-	+M	++ a +++ M	+ a ++M	+ M	
T19	+++ D	-	+M	++M	+M	+++ M	
T20	++ M	-	++ a +++ M	++ a +++ M	+M	+ M	
T21	+++D	++M	+M	+M	-	++ M	
T22	+++D	+M	+M	++M	+ a ++M	+ M	
T23	+++M	++M	+M	+M	-	++ M	
T24	+++D	++M	+M	+M	-	+ M	
T25	++ a +++ M	+M	+M	++M	+ a ++M	+ M	
T26	+++ D	+M	+M	+M	-	+ M	
T27	++ M	-	+M	++ a +++ M	+ a ++M	++ M	
T28	+++D	++M	+M	+M	-	+++ M	
T29	+++M	+M	+M	++M	+ a ++M	++ M	
T30	+++D	+M	+M	+M	-	+ M	

(D)= difusa, (M)= multifocal, (Z) = zonal, (F)= focal, (Ex)= exocitosis; (+)=Leve, (++)= Moderado, (+++)=Severo. (-)= negativo; HØ= heterófilos; LØ= linfocitos; MØ=macrófagos.

Cuadro 5. Análisis de frecuencias de presentación de tortugas con FP en la zona de captura.

Zona estaca #	Número de casos	Frecuencia (%)
11	5	16.6
10, 13, 15, 20, 21	3	10
9, 12, 14, 16	2	6.66
18	1	3.33

Cuadro 6. Análisis de frecuencias de la distribución corporal de Fibropapilomas en las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

Zona corporal	#	Frecuencia (%)
Aletas anteriores derechas	12	40
Aletas anteriores izquierdas	8	26.6
Zonas blandas	9	30
Caparazón	1	3.33

Cuadro 7. Rango de Tamaño y análisis de frecuencias de grado de los FP en tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

Tamaño	Grado	#	Frecuencia (%)
Rango (cm)	1	17	56.6
2 a 16.9	2	10	33.3
	3	3	10

Cuadro 8. Análisis de frecuencias de la descripción macroscópica de los Fibropapilomas de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

Morfología	#	Frecuencia (%)
Coliflor	20	66.6
Verrugas	6	20
Mixtos	4	13.3

Cuadro 9. Rangos y medias de los datos biométricos obtenidos de las tortugas golfina (*Lepidochelys olivacea*) evaluadas.

Datos biométricos	Rango (cm)	\bar{x} (cm)
Curva mínima del caparazón	64 a 71	67.5
Recta máxima del caparazón	65 a 76	70.5

Cuadro 10. Medias y error estándar de los hallazgos histopatológicos epidermales proliferativos e inflamatorios de las tortugas evaluadas por medio de la prueba estadística Kruskal Wallis.

Hallazgos histopatológicos	Grupo 1 (x)	Grupo 2 (x)	Grupo3 (x)	(x) Final
Hiperplasia epidermal	2	1.5	1.4	1.83
Acantosis	1.35	1.05	1.14	1.17
Hiperqueratosis ortoqueratósica	1.25	1	0.85	1.03
Erosión	1.25	0.4	0.4	0.68
Degeneración				
Células basales	1	0.84	0.14	0.66
Estrato espinoso	0.87	0.4	0	0.42
Pustulas intraepidermales	2.12	0.71	0.2	1.01
Heterófilos	0.25	0.31	0.14	0.23
Linfocitos	1	0.42	0.2	0.54
Macrófagos	0.5	0.21	0	0.23
Melanomacrófagos	1.25	1.10	1.42	1.25
Error estándar	± 0.39a	± 0.29a	± 0.42a	± 0.45a

Valores con distinta literal indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Cuadro 11. Medias y error estándar de los hallazgos histopatológicos dermales proliferativos e inflamatorios de las tortugas evaluadas por medio de la prueba estadística Kruskal Wallis.

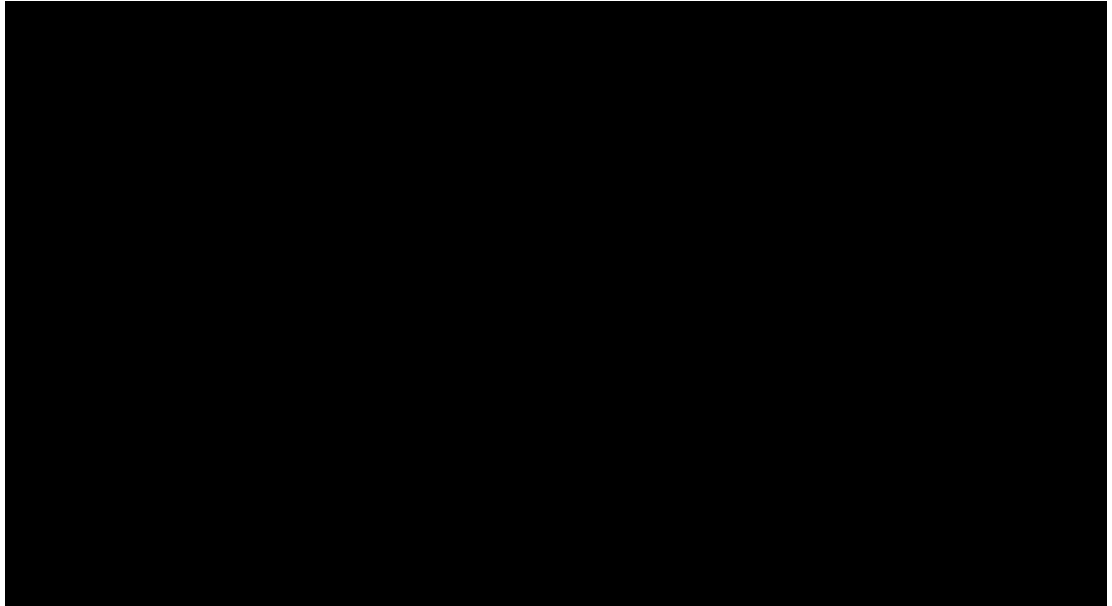
Hallazgos histopatológicos	Grupo 1 (x)	Grupo 2 (x)	Grupo3 (x)	(x) Final
Tejido conjuntivo				
Denso	2.8	2.7	2.7	2.73
Laxo	1	0.92	0.85	2.77
Heterófilos	1.5	1.2	0.85	1.18
Linfocitos	2.1	1.8	1.5	1.8
Macrófagos	1.3	0.92	0.65	0.95
Melanomacrófagos	2.25	1.3	1.57	1.70
Error estándar	± 0.33a	± 0.15a	± 0.22a	± 0.34a

Valores con distinta literal indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Cuadro 12. Inmuhistoquímica a Herpesvirus simplex tipos I y II (HSV1). de los casos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

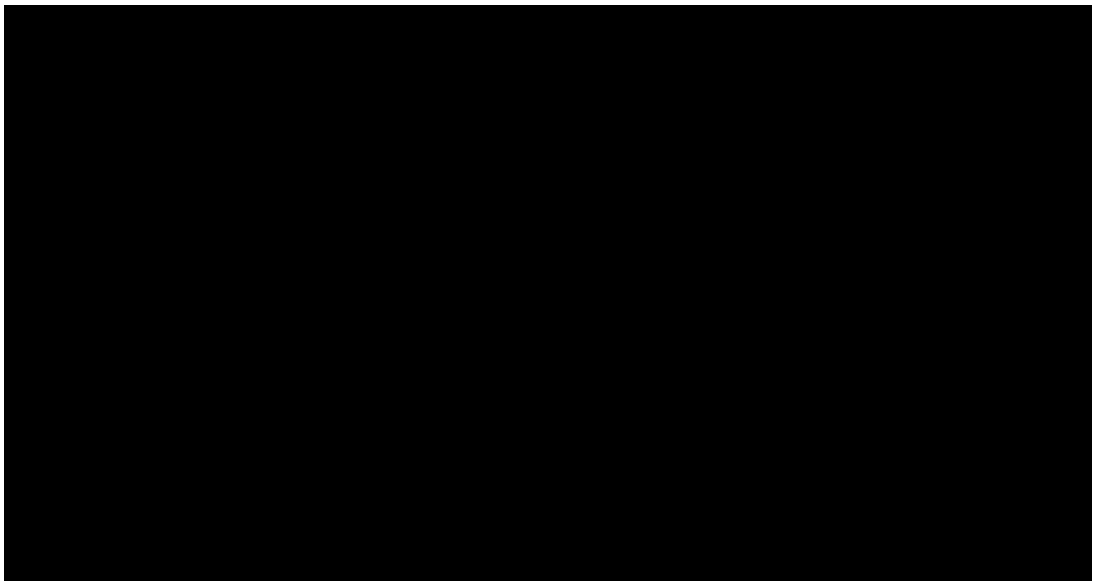
No. Caso	(+) / (-) Herpesvirus simpex (HSV1)
T1	(-)
T2	(-)
T3	(-)
T4	(-)
T5	(-)
T6	(-)
T7	(-)
T8	(-)
T9	(-)
T10	(-)
T11	(-)
T12	(-)
T13	(-)
T14	(-)
T15	(-)
T16	(-)
T17	(-)
T18	(-)
T19	(-)
T20	(-)
T21	(-)
T22	(-)
T23	(-)
T24	(-)
T25	(-)
T26	(-)
T27	(-)
T28	(-)
T29	(-)
T30	(-)

Gráfica 1. Comparación de los hallazgos histopatológicos epidermales proliferativos e inflamatorios en los tres grupos de las tortugas evaluadas.



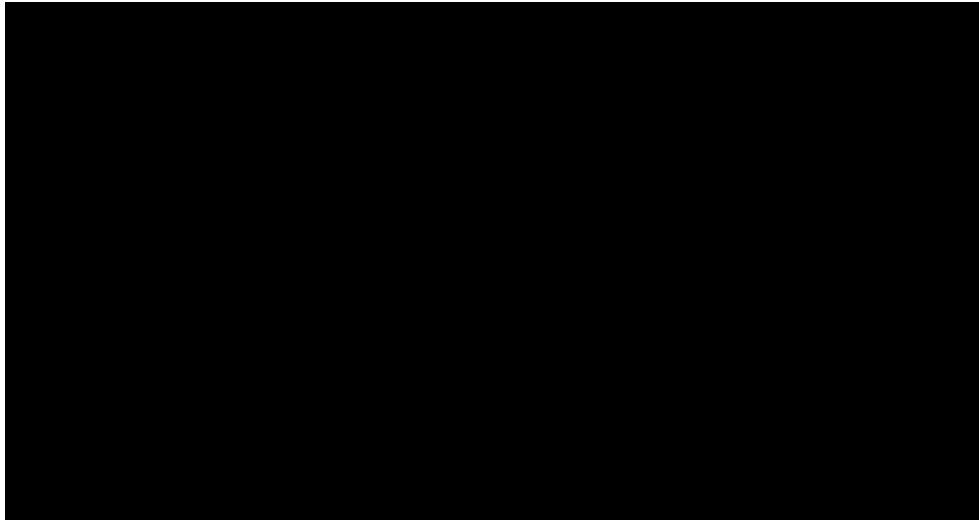
No existe diferencia estadística significativa $p < 0.05$ entre los 3 grupos.

Gráfica 2. Comparación entre los hallazgos histopatológicos epidermales de las tortugas evaluadas.



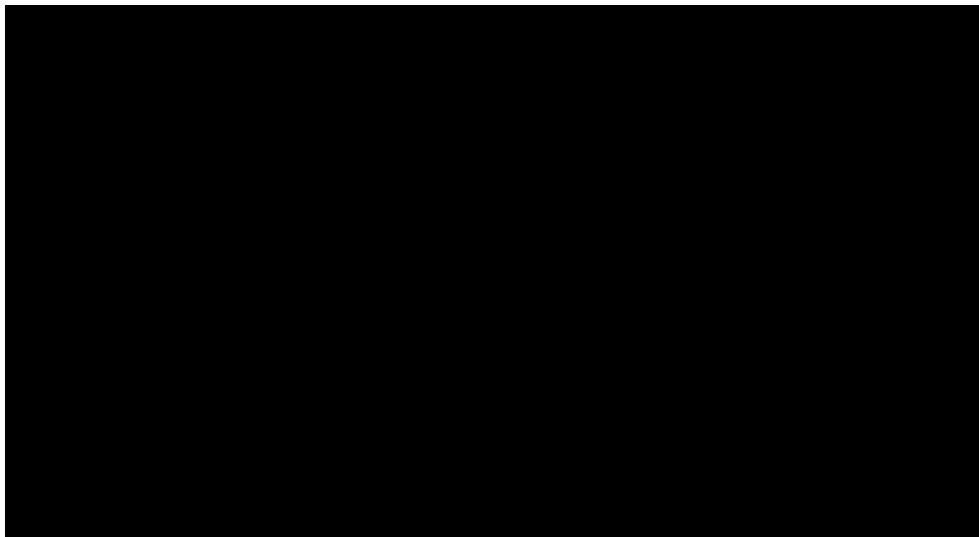
No existe diferencia estadística significativa $p < 0.05$ entre los hallazgos histopatológicos.

Gráfica 3. Comparación de los hallazgos histopatológicos dermales de los tres grupos de las tortugas evaluadas.



No existe diferencia estadística significativa $p < 0.05$ entre los 3 grupos .

Gráfica 4. Comparación entre los hallazgos histopatológicos dermales de las tortugas evaluadas.



No existe diferencia estadística significativa $p < 0.05$ entre los hallazgos histopatológicos.

Figuras



Figura 1. Vista satelital de la playa “Escobilla” Oaxaca, México.

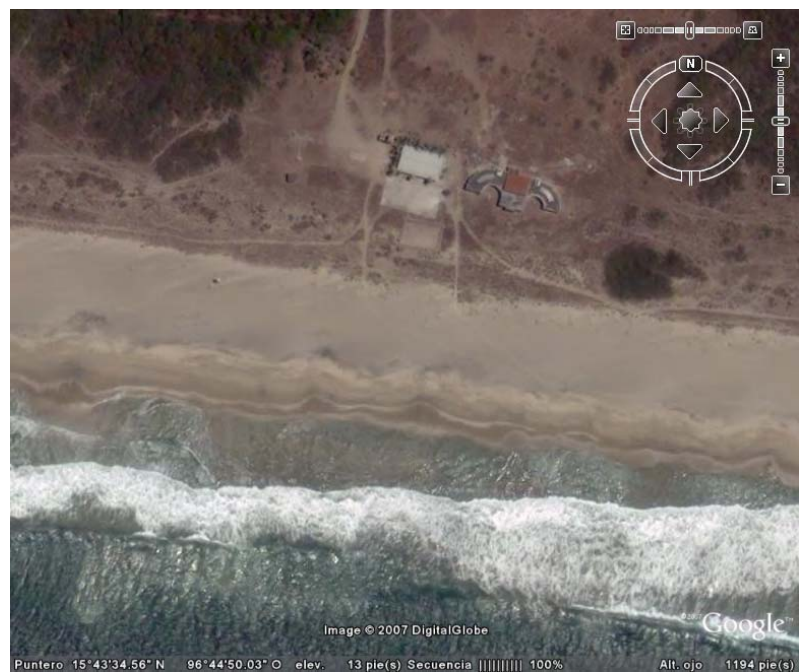


Figura 2. Vista aérea de la playa “Escobilla” Oaxaca, México y del campamento tortuguero del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT)



Figuras 3 y 4. Inicio de la arribada de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) durante agosto de 2006 en la Playa “Escobilla” Oaxaca, México.



Figuras 5 y 6. Zona de la playa “Escobilla” de aproximadamente 12km abarcada durante los recorridos para la recolección de muestras durante la arribada.





Figura 7. Identificación FP en la aleta anterior izquierda de aspecto morfológico asemejando a una coliflor de grado 3 (severo).

Figura 8. Formato de trabajo de campo propuesto.

Localización de fibropapilomas en superficie corporal de *Lepidochelys olivacea*.

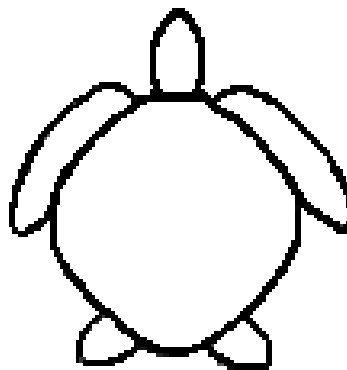
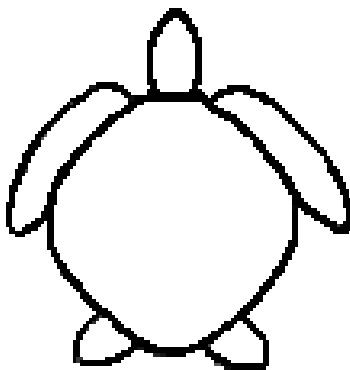
Fecha: _____ Hora: _____ Playa: _____ Zona: _____

Número de Tortuga: _____ Número de placa _____

Distribución de FP

Dorsal

Ventral



Cantidad de FP

Dorsal

Cabeza: _____ Caparazón: _____
 Aletas: _____ Partes _____
 blandas: _____
 Otros: _____ Lugar: _____

Ventral

Cabeza: _____ Caparazón: _____
 Aletas: _____ Partes _____
 blandas: _____
 Otros: _____ Lugar: _____

Datos Biométricos

Ccl min: _____ Scl max : _____

Ccl min: _____ Scl max : _____

Ccl min: _____ Scl max : _____

Recolección de muestras: Si: ___ No: ___

Cantidad: _____

Descripción macroscópica: _____

Preservación de tejido y empleo:

Formaldehído 10% _____

Glutaraldehído 2.5% _____

Alcohol _____

Refrigeración _____

Congelación _____

Histopatología _____ Inmunohistoquímica _____

Microscopía Electrónica _____

Parasitología _____

Microbiología _____

Biología molecular _____



Figura 9. Identificación y selección del FP para toma de biopsia.



Figura 10. Aplicación de anestesia local (xilacina al 2%) en la base del FP y en 5 sitios de infiltración.



Figura 11. Colocación de pinzas de hemostasis y Biopsia con bisturí del FP.



Figura 12. Hemostasis posterior a la biopsia.



Figura 13. Toma de datos biométricos Curva mínima del caparazón (CCL min.) en Tortuga golfina (*L. olivacea*) de playa "Escobilla" Oaxaca, México.



Figura 14. Toma de datos biométricos. Recta Máxima del caparazón (SCL. max.) en Tortuga golfina (*L. olivacea*) de playa "Escobilla" Oaxaca, México.



Figura 15. *Lepidochelys olivacea* en la playa “Escobilla” Oaxaca. Se observa lesión de aspecto nodular, de aproximadamente 6cm de diámetro en el centro de la aleta anterior izquierda.



Figura 16. Múltiples lesiones identificadas como fibropapilomas de aspecto verrugoso en las zonas blandas e inicio de las aletas frontales en *L. olivacea* en “Escobilla” Oaxaca, México.

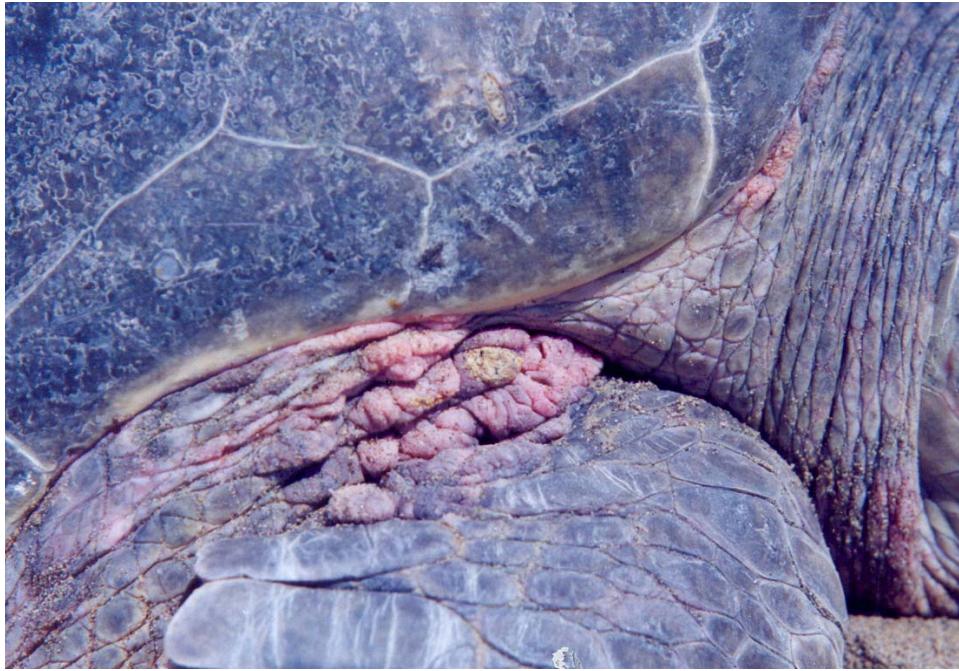


Figura 17. Lesiones macroscópicamente identificadas como FP en las “zonas blandas” e inicio de la aleta anterior derecha en Tortuga golfina (*L. olivacea*) clasificadas como de aspecto de “verrugas”, grado 2 (moderada).



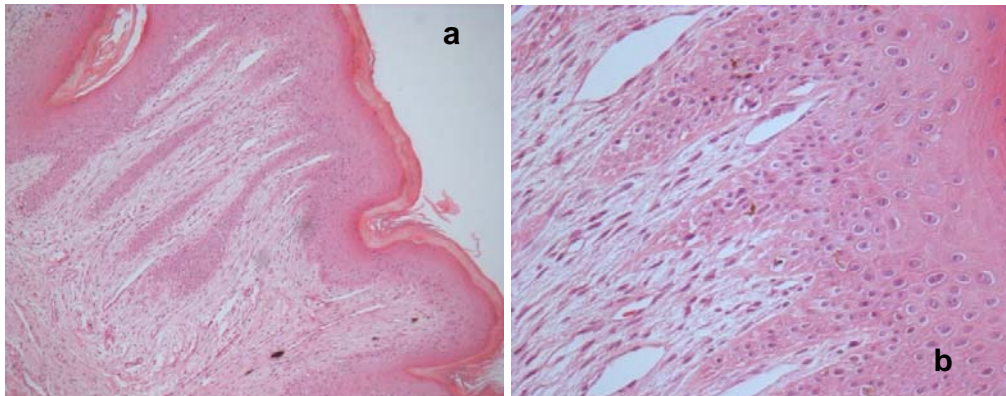
Figura 18. Lesiones nodulares macroscópicamente identificadas como FP en la parte anterior, central y trasera de la aleta anterior izquierda en Tortuga golfina (*L. olivacea*) clasificadas como “mixtas”, grado 3 (severo).



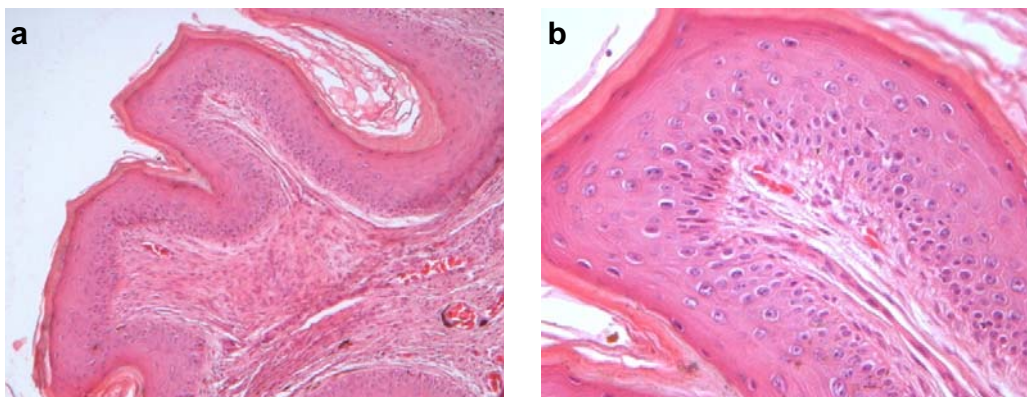
Figura 19. Lesion nodular macroscópicamente identificadas como FP en la parte trasera de la aleta anterior izquierda en Tortuga golfina (*L. olivacea*) clasificadas como de coliflor, grado 3 (severo).



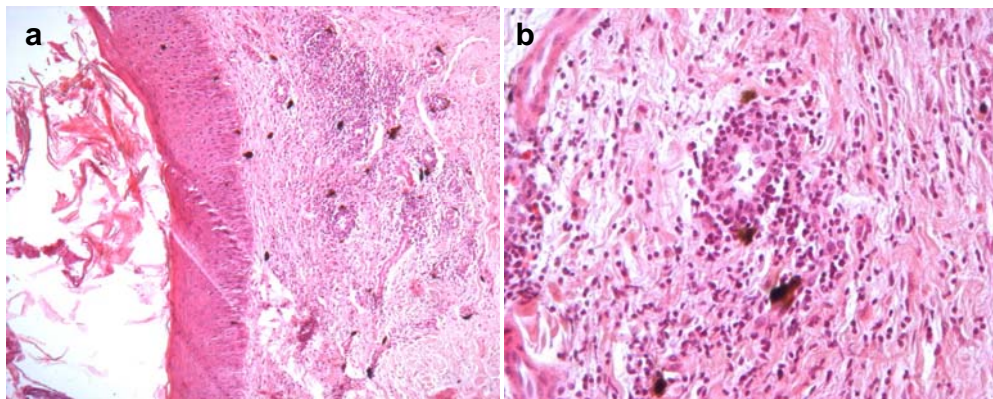
Figura 20. Lesiones en zonas blandas cerca del cuello identificadas como FP en *L. olivacea* clasificadas como “mixtas”, grado 2 (moderado).



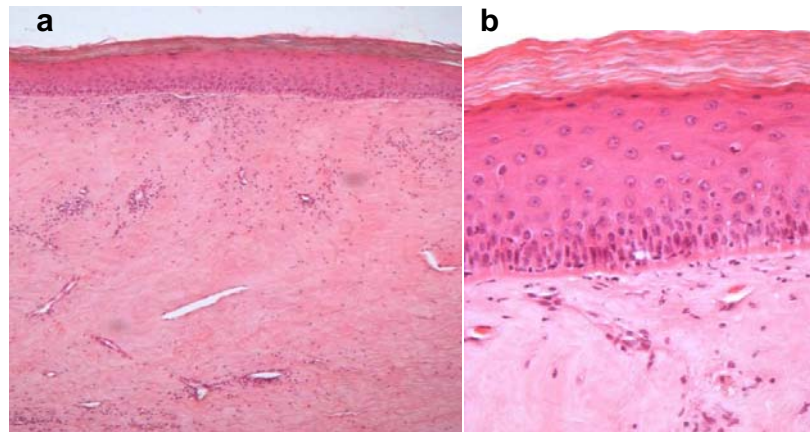
Figuras 21 a) Fibropapiloma de tortuga golfina (*L. olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México. En donde se nota hiperplasia epidermal, proliferación de fibroblastos en dermis y algunos melanomacrófagos H & E 4x. b) Detalle de un FP con de tortuga golfina (*L. olivacea*) con acantosis marcada y formación de clavos dermales-epidermales, angiogénesis y proliferación de fibroblastos en dermis H-E 40x.



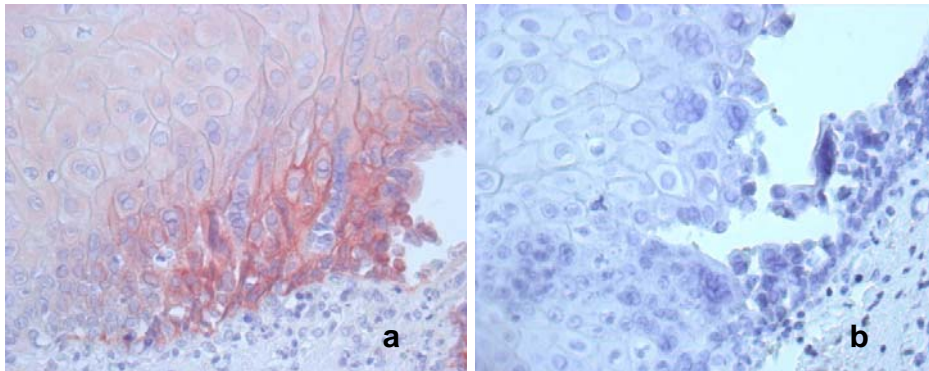
Figuras 22 a). Fibropapiloma de tortuga golfina (*L. Olivacea*) en donde se aprecia hiperqueratosis, acantosis, formación de papilas, proliferación de fibroblastos embebidos en paquetes de colágena en dermis, melanomacrófagos rodeando vasos sanguíneos y eritrocitos H & E 10x. b) Detalle de una papila en la que se encuentra la hiperplasia epidermal H & E 40x.



Figuras 23. a) FP de tortuga golfina (*L. olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México. Con presencia de ectoparásitos H & E 10x b) Dermis con infiltrado inflamatorio perivascular, compuesto por linfocitos y melanomacrófagos, asociado a ectoparásitos H & E. 10x.



Figuras 24 a) Fibroma de tortuga golfina (*L. olivacea*) de la playa “Escobilla” Oaxaca, México. Donde se aprecia hiperplasia epidermal y proliferación de tejido fibroso. Además de leve infiltrado de células inflamatorias mononucleares en dermis H & E 4x. b) Detalle del fibroma cutáneo de tortuga golfina (*L. olivacea*) con hiperqueratosis ortoqueratósica, hiperplasia epidermal y fibrosis dérmica H & E 40x.



Figuras 25. a) Inmunohistoquímica, control Positivo a Herpesvirus simplex tipos I y II (HSV1) b) Control negativo a inmunohistoquímica a Herpesvirus simplex tipos I y II (HSV1).

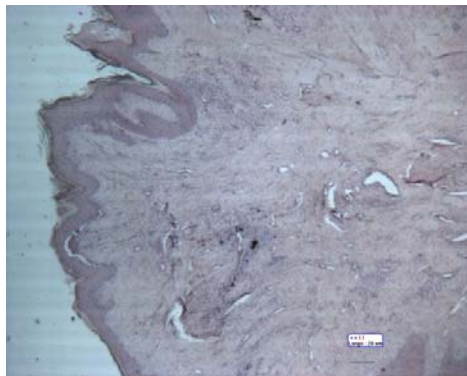
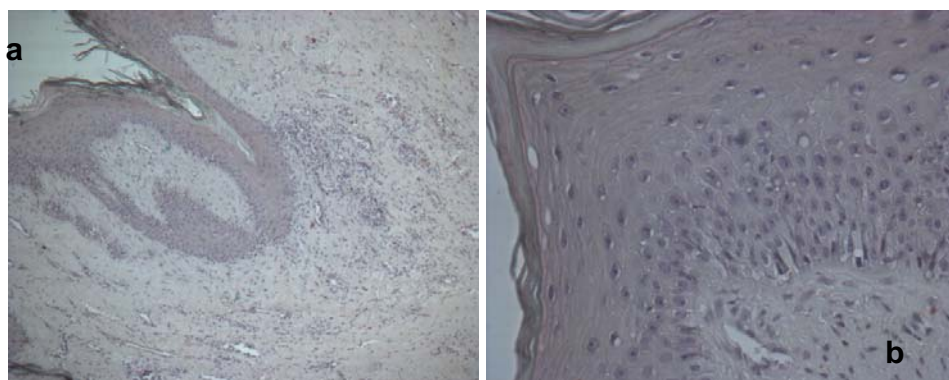


Figura 26. Fibropapiloma de tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*) de la playa "Escobilla" Oaxaca, México negativo a antígenos de herpes simplex tipos I y II (HSV1) mediante Inmunohistoquímica (4x).



Figuras 27. a) y b) Secciones de fibropapiloma de tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*) negativos a antígenos de herpes simplex tipos I y II (HSV1) mediante Inmunohistoquímica (10x y 40x) respectivamente.

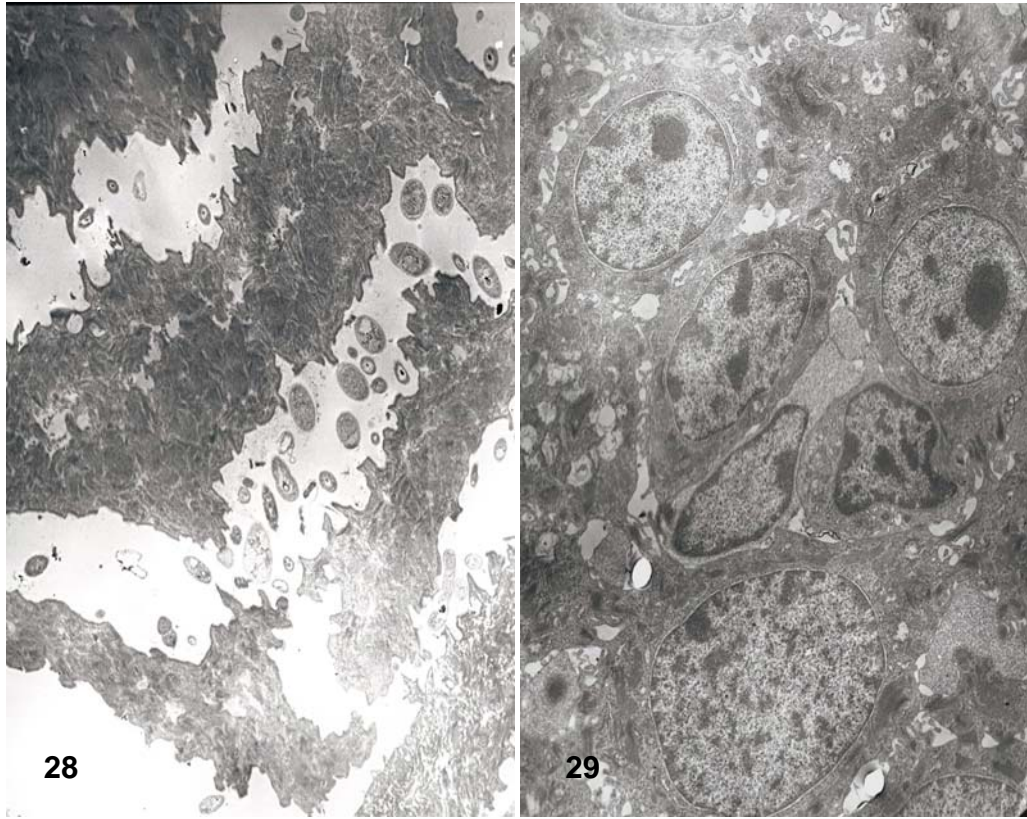


Figura 28. Ultraestructura de la epidermis de un Fibropapiloma donde se aprecia desprendimiento de las capas de queratina del estrato córneo y estructuras de ovals a bacilares con membrana bien definida y contenido granular de moderada densidad compatibles con bacterias (Citrato de plomo– acetato de uranilo, 7500x).
Figura 29 Epidermis de FP compuesta por células poliedricas y ovals de diferentes tamaños (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 12000x).

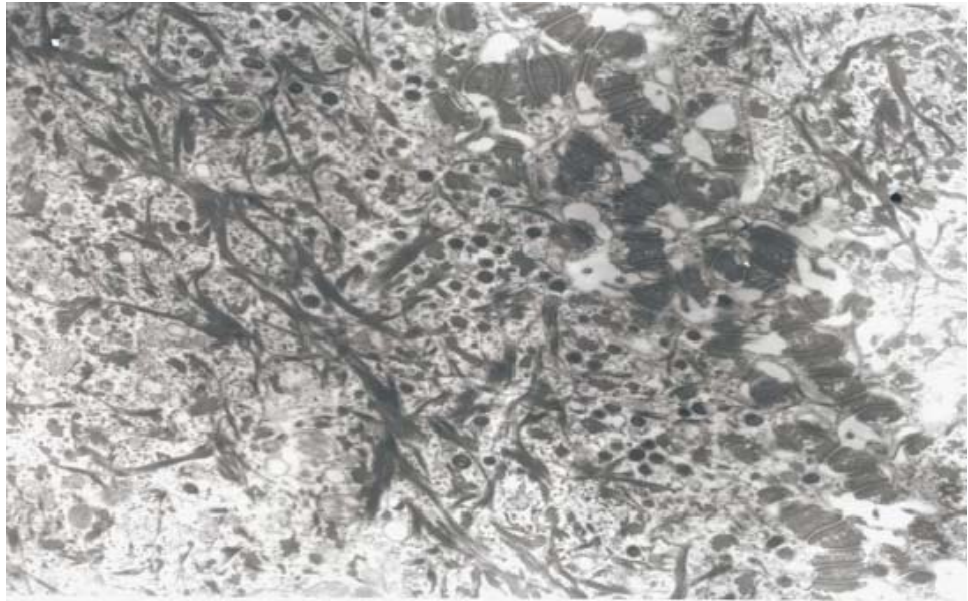


Figura 30. Citoplasma de queratinocitos neoplásicos, apreciándose múltiples estructuras electrodensas sugerentes de partículas virales de 122 a 220nm de diámetro (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 7500x).

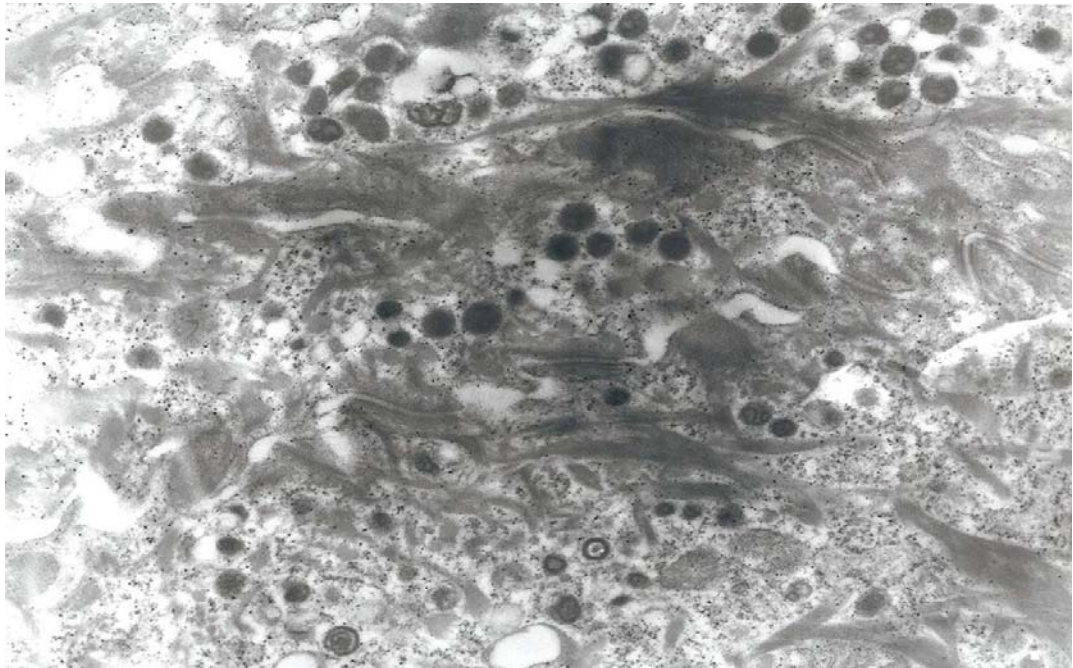


Figura 31. Ultramicrografía de epidermis en donde se aprecian estructuras icosaédricas electrodensas de 122 a 225 nm de diámetro algunas con envoltura bien delimitada dispuestas en citoplasma sugerentes de partículas virales, parecidas a las de la familia *iridiviridae*. (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 12000x).

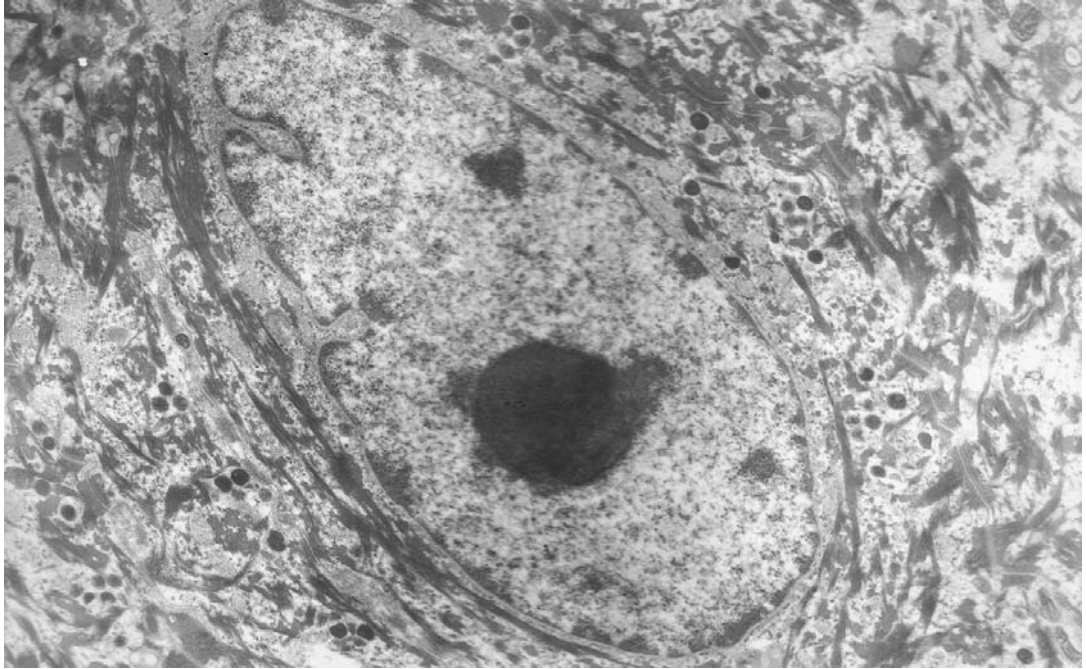


Figura 32. Queratinocito neoplásico con escaso citoplasma y presencia de abundantes tono filamentos y estructuras electrodensas semi redondas dispuestas alrededor del núcleo en el citoplasma, el núcleo se encuentra indentado con nucleolo prominente, (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 7500x).

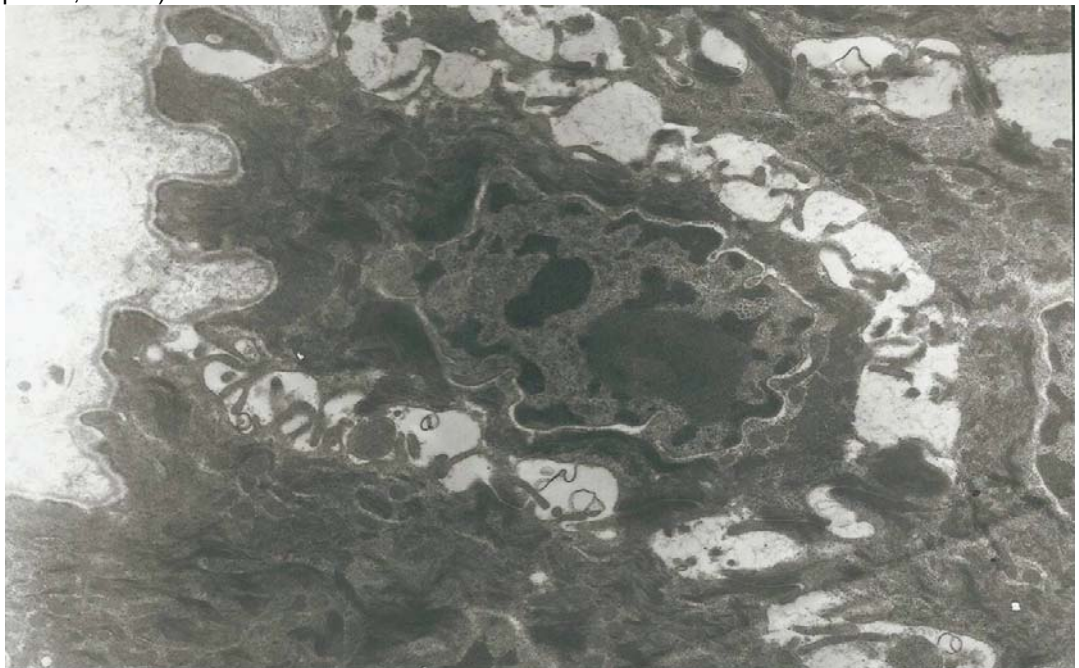


Figura 33. Ultramicrofotografía de una célula del estrato basal de bordes irregulares, con invaginaciones en su membrana nuclear, nucléolo prominente y escaso citoplasma, con espacios electrolúcidos asemejando vacuolas (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 4500x).



Figura 34. Ultramicrografía de la dermis en donde se aprecia un fibroblasto con características neoplásicas, intercalado en paquetes de abundante colágena. (Acetato de uranilo-Citrato de plomo, 7500x).