



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA EN
LEUCOCITOS SANGUÍNEOS DE TORTUGA VERDE
(*Chelonia mydas*) EN CAUTIVERIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

SAC NICTEC YAZMIN FRANCO NOGUEZ

ASESORES: MVZ MC. ERIK GONZÁLEZ BALLESTEROS
DR. FERNANDO ALBERTO MUÑOZ TENERIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA EN LEUCOCITOS SANGUÍNEOS
DE TORTUGA VERDE (Chelonia mydas) EN CAUTIVERIO.

Que presenta la pasante: Sac Nictec Yazmin Franco Noguez
Con número de cuenta: 30014036-9 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 13 de Septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
VOCAL	MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce	
SECRETARIO	MC. Erik González Ballesteros	
1er SUPLENTE	MVZ. María Guadalupe Mondragón Olvera	
2do SUPLENTE	MC. Tiziano Santos Morín	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradecimientos:

A todas las personas e instituciones que participaron e hicieron posible la realización de este proyecto, muchas gracias por todas las facilidades y apoyo otorgados en especial al Parque Ecológico Xcaret y al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Zacatenco.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO** por ser mi casa, mi lugar de estudio y el alma mater que nutrió mi conocimiento.

A mis asesores, Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería y MC. Erik González Ballesteros gracias por compartir su conocimiento, experiencia, paciencia y pasión por la ciencia, a la Dra. Ana Negrete por el gran apoyo y confianza mostradas durante mi estancia en Xcaret, gracias fueron los grandes pilares de este trabajo.

Por sus acertados comentarios al Dr. Guillermo Valdivia Anda, MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce, MVZ. María Guadalupe Mondragón Olvera, y al MC. Tiziano Santos Morín muchas gracias.

A mis padres Esther y Juvenal quienes siempre me han dado el ejemplo de lucha, entrega, honestidad y responsabilidad, gracias por formar los cimientos de mi educación, todo lo bueno que tengo es gracias a ustedes, que siempre me han mostrado un gran apoyo y amor en todo momento, me han dado las bases para ser de mi, una mejor persona.

A mis hermanos Itzel, Zanya, Juve y Juan gracias por hacer de mi vida toda una gama de emociones, e inyectar una dosis de alegría, ternura y hasta disgustos diarios ¡los quiero mucho!

A mi abuelita Lolita (R.I.P.), quien me enseñó a tener el coraje para luchar por todo aquello en lo que se cree, espero estés orgullosa.

A Daniel por tantos momentos compartidos desde que éramos niños, no solo eres mi mejor amigo si no que eres parte de mi familia por eso y más, gracias hermano.

A Vicky por ser mi mejor amiga, por tantos momentos, risas e ilusiones compartidas, y claro por tu valiosa participación artística en este trabajo de tesis. ¿Sabes? Tienes el talento!!

A Marco por enseñarme a ver la aventura que hay en la vida, por contagiarme de tu entusiasmo al conocer nuevos lugares y experiencias, por impulsarme a seguir adelante en todo momento y por tu gran confianza. Gracias por compartir mi vida y mis logros.

A Yesi que no solo fue una maestra para mi si no también una amiga, gracias por todos los momentos divertidos, y las horas de trabajo compartidas en el área de Tortugas Marinas junto a todo el quipo de tortugueros.

A Miguel gracias por el gran apoyo y cariño mostrado en todo momento, se que cuento con un gran amigo.

A mis amigos : Que han sido parte de este viaje, Alejandro, Gaby, Cirani, Rosa, Juan, Yoali, Susana, Pilar, Carlitos, Sadot, Chelita, Diana, Eunice, Gracias por su amistad, por todos los momentos divertidos que hemos pasado y por su gran apoyo incondicional, los quiero mucho.



1. Índice.

1. Índice	1
1.1. Índice de tablas y figuras.....	3
2. Resumen.....	4
3. Introducción	
3.1. Aspectos biológicos de las tortugas marinas.....	5
3.2. Las tortugas marinas en México.....	12
3.3. Cría en cautiverio de tortugas marinas.....	14
3.4. Principales enfermedades infecciosas en tortugas marinas.....	16
3.5. Características del sistema inmune en reptiles.....	18
3.6. Fagocitosis.....	23
3.6.1. Infección, diapédesis y quimiotaxis.....	24
3.6.2. Receptores mediadores de la fagocitosis.....	25
3.6.3. Ingestión o internalización.....	26
3.6.4. Fusión fagosoma – lisosoma.....	27
3.6.5. El sistema de la mieloperoxidasa y metabolitos del nitrógeno.....	27
3.6.6. Digestión y exocitosis.....	27
3.6.7. Métodos para evaluar la fagocitosis.....	28
4. Justificación.....	30
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivos.....	30
7. Materiales y Métodos.....	30
7.1. Localización geográfica.....	31
7.2. Animales de estudio.....	31
7.3. Separación de granulocitos.....	32
7.4. Separación celular (<i>Cell Sorting</i>).....	33
7.5. Citocentrifugación (<i>Cytospin</i>).....	33
7.6. Preparación de las perlas de látex y OVA – Alexa.....	34
7.7. Ensayo de fagocitosis.....	34

7.8. Análisis estadístico.....	34
8. Resultados	
8.1. Purificación de granulocitos.....	35
8.2. Separación celular.....	37
8.3. Citocentrifugación (<i>Cytospin</i>).....	38
8.4. Ensayo de fagocitosis.....	40
8.4.1. Porcentaje de fagocitosis en granulocitos con perlas de látex.....	40
8.4.2. Porcentaje de fagocitosis en granulocitos con OVA - Alexa.....	40
8.4.3. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos con perlas de látex.....	42
8.4.4. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos con OVA - Alexa.....	44
8.4.5. Porcentaje de fagocitosis en mononucleares con perlas de látex.....	44
8.4.6. Porcentaje de fagocitosis en mononucleares con OVA - Alexa.....	44
8.4.7. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares con perlas de látex.....	46
8.4.8. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares con OVA - Alexa.....	46
9. Discusión.....	48
10. Conclusiones.....	53
11. Perspectivas.....	54
12. Referencias bibliográficas.....	55

1.1. Índice de tablas y figuras.

Tabla 1. Taxonomía Tortugas Marinas.....	6
Tabla 2. Características de Tortugas Marinas que anidan en México.....	10
Tabla 3. Situación de riesgo de las tortugas marinas en México.....	13
Figura 1. Esquema general del ciclo de vida de las tortugas marinas.....	9
Figura 2. Métodos de la cría en cautiverio.....	14
Figura 3. Lesión inicial de dermatitis en una cría de tortuga blanca (<i>Chelonia mydas</i>).....	17
Figura 4. Proceso Fagocítico.....	28
Figura 5. Esquema de las capas interfase plasma / Percoll.....	32
Figura 6A. Regiones de leucocitos analizadas por citometría de flujo de una tortuga juvenil	36
Figura 6B. Regiones de leucocitos analizadas por citometría de flujo de una tortuga de una tortuga adulta.....	36
Figura 7. Regiones de leucocitos seleccionadas para el Cell Sorting.....	37
Figura 8A. Granulocitos de tortuga verde (<i>Chelonia mydas</i>).	38
Figura 8B. Heterófilos de tortuga verde (<i>Chelonia mydas</i>).....	39
Figura 9A. Mononucleares de tortuga verde (<i>Chelonia mydas</i>)	39
Figura 9B. Linfocitos de tortuga verde (<i>Chelonia mydas</i>)	40
Figura 10. Gráficas de barras del porcentaje de fagocitosis en granulocitos.....	41
Figura 11. Comparación de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos que fagocitaron perlas de látex y OVA-Alexa.....	43
Figura 12. Gráficas de barras del porcentaje de fagocitosis en mononucleares.....	45
Figura 13. Comparación de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares que fagocitaron perlas de látex y OVA-Alexa.....	47

2. Resumen.

Objetivo. Desarrollar una metodología para evaluar la fagocitosis en leucocitos de sangre periférica en tortuga verde (*Chelonia mydas*).

Materiales y métodos. Para el presente trabajo se utilizaron muestras de sangre de tortugas marinas juveniles y adultas de la especie *Chelonia mydas*. La sangre fue separada por gradiente de densidad utilizando Percoll al 57% , se obtuvieron las capas de la interfase plasma/Percoll y se determino la viabilidad celular. Se procedió a la identificación de subpoblaciones celulares por medio de separación celular (*cell sorting*) y confirmación por microscopía óptica. Las muestras fueron adquiridas (la acción de evaluar una suspensión de células en un citómetro de flujo se llama adquisición), en el citómetro de flujo las subpoblaciones celulares, fueron separadas en heterófilos y linfocitos. Para realizar el ensayo de fagocitosis a cada tubo se le adiciono 100 µl de la preparación celular con 100 µl de la preparación de OVA – Alexa (ovoalbúmina con Alexa Fluor 647) o perlas de látex y fueron incubadas a 37 °C durante 15, 30, 45, y 60 minutos. Como control negativo se utilizó 100 µl de la preparación celular fijada en paraformaldehído, posteriormente las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

Resultados. El análisis por citometría de flujo reveló dos regiones bien definidas: una con elevada granularidad y tamaño variable y otra con muy poca granularidad y de menor tamaño, correspondiente a la región de granulocitos y mononucleares respectivamente. El tiempo óptimo de fagocitosis para granulocitos con perlas de látex correspondió a las células incubadas durante 15 minutos a 37° C. El tiempo optimo de fagocitosis para granulocitos con OVA - Alexa correspondió a las células incubadas durante 45 minutos a 37 ° C, también se demostró la existencia de actividad fagocítica en linfocitos de la tortuga verde.

Conclusión. El análisis por citometría de flujo, demostró ser una herramienta con gran potencial para ser utilizada en futuros estudios para evaluar la respuesta inmune en las tortugas marinas y otros reptiles.

3. Introducción

3.1. Aspectos biológicos de las tortugas marinas.

Durante toda la era mesozoica los dinosaurios dominaron la vida terrestre, y en esta era evolucionaron aproximadamente 17 órdenes de reptiles, de los cuales cuatro existen actualmente: *Crocodylia*, *Rhynchocephalia*, *Testudines* y *Squamata*, el orden *Chelonia* y *Crocodylia* son los órdenes más antiguos de los reptiles en la actualidad¹.

La familia *Cheloniidae* incluye a las tortugas marinas, que aparecieron a finales del Mesozoico, en el Cretácico Superior, hace por lo menos 200 millones de años. Han sido descritos más de 50 géneros de tortugas marinas, totalizando alrededor de 100 especies que en su mayoría se fueron extinguiendo antes de terminar el Cenozoico, quedando en la actualidad sólo cinco géneros con ocho especies, aunque algunos consideran a *Chelonia agassizi* como una subespecie de *Chelonia mydas*, pero esto no es completamente aceptado. Por otra parte, el origen de la familia *Dermochelyidae* no es claro, sin embargo sólo una especie del género *Dermochelys*, que se originó en el Mioceno hace 25 millones de años, sobrevive hasta nuestros días: la tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*)^{2,3,4,5}.

La exitosa diversificación de las tortugas marinas, particularmente en el periodo cretácico, fue uno de los más importantes eventos de este grupo y de los reptiles marinos en general^{6,7}. El caparazón debió requerir modificaciones orientadas a disminuir el rozamiento y modificar los lóbulos del plastrón para facilitar la natación con movimientos laterales de los miembros. Para la natación, los miembros anteriores se hicieron más largos y potentes ya que generan la energía propulsora y se eliminaron las uñas; que quedaron reducidas y con una función secundaria en los machos durante la cópula⁷.

Otra importante adaptación que sufrieron las tortugas marinas, fue el hecho de solucionar el problema del exceso de sal y la pérdida de agua. Esta situación queda solucionada por medio de dos mecanismos: el primero, es la secreción de una orina muy concentrada, que en las tortugas contiene amonio y urea en lugar de ácido úrico (la concentración de la orina se desarrolla tanto en la vejiga urinaria como en la cloaca, antes de ser expulsada junto con las heces), y el segundo mecanismo es la

secreción de una solución hipertónica a través de glándulas especiales situadas en las órbitas oculares, conocidas como glándulas de la sal; éstas secretan continuamente un líquido espeso, el cual es muy visible cuando las tortugas salen a la playa a desovar; durante la nidación, esta abundante secreción cumple otra misión, que es mantener protegidos los ojos al evitar la fricción que les produciría la arena, levantada constantemente por el viento y por los mismos animales, durante la excavación y tapado de los nidos^{7,8,9}.

Las tortugas se han adaptado con mucho éxito a su ambiente y son miembros importantes de los ecosistemas marinos en todo el mundo. Desafortunadamente, las adaptaciones evolutivas que han capacitado a las tortugas marinas para sobrevivir a los períodos glaciares y a otras catástrofes ambientales no las han preparado para poder soportar las presiones ejercidas sobre ellas por los humanos y es por esta razón que todas las especies de tortuga marina se encuentran en peligro de extinción.

Tabla 1. Taxonomía Tortugas Marinas⁹.

Reino:	<i>Animalia</i>	
Phylum:	<i>Chordata</i>	
Subphylum:	<i>Vertebrata</i>	
Clase:	<i>Reptiles</i>	
Orden:	<i>Quelonios</i>	
Suborden:	<i>Criptodira</i>	
Familia:	<i>Cheloniidae</i>	<i>Dermochelidae</i>
Genero y especie:	<i>Chelonia agassizi</i>	<i>Dermochelys coriacea</i>
	<i>Chelonia mydas</i>	
	<i>Caretta caretta</i>	
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	
	<i>Lepidochelys kempii</i>	
	<i>Lepidochelys olivacea</i>	
	<i>Natator depressus</i>	

Tomado de: Lutz PL, 2003.

Las tortugas marinas por ser reptiles, son organismos vertebrados de respiración pulmonar y poiquilotermos, incapaces de regular su temperatura corporal por si solos, dependiendo de una fuente de calor externa. Se caracterizan por tener la piel seca, desprovista casi totalmente de glándulas y protegida por escamas córneas ^{1,6}.

La cabeza y las extremidades no puede introducirse en el caparazón, la boca no presenta dientes y tanto la mandíbula como los maxilares están recubiertos por una capa córnea con forma de pico ^{8,9,10}.

Los pulmones se sitúan adosados a la pared dorsal interna del caparazón además de participar en la respiración, actúan como órganos que regulan la flotabilidad. El intercambio gaseoso no se da solo en los pulmones, sino que también participan los sacos cloacales, que están altamente vascularizados, tanto la sangre como el tejido muscular pueden almacenar oxígeno en grandes cantidades, ayudando a que la tortuga permanezca bajo el agua por largos períodos de tiempo. El plastrón abisagrado permite algo de contracción y expansión de la cavidad del pecho ¹⁰.

El esófago esta cubierto de papilas córneas a modo de espinas, cuya función es impedir que escape la presa capturada, así como participar en la trituración de alimento como primer paso en la digestión. La cavidad celómica de gran tamaño en las tortugas marinas, contiene una gran masa intestinal necesaria para digerir materiales vegetales y pequeñas criaturas marinas. Está cavidad también permite que la hembra produzca y mantenga un gran volumen de huevos, las hembras de las tortugas marinas también son capaces de almacenar esperma viable durante varios años, aunque la fertilidad decrece con el tiempo, esto permite que la hembra fertilice numerosos grupos de huevos sin tener que volver a aparearse ^{7,8,9,10}.

El sentido de la orientación esta muy desarrollado, puesto que son capaces de desovar en la misma playa en la que han nacido muchos años después, aunque el mecanismo intrínseco es todavía desconocido ¹⁰.

Los huevos no presentan chalazas (albúmina que sostienen la yema en medio de la clara en los huevos) por lo que no deben moverse durante la incubación, puesto que el embrión sufriría importantes cambios posicionales y traumatismos que podrían ocasionar la muerte. Para que un huevo se desarrolle completamente hasta la fase de eclosión, le toma de 6 a 13 semanas. Este período es determinado principalmente por la temperatura de incubación y que también es de vital importancia para la determinación del sexo de la progenie. Cada una de las especies de tortugas marinas tiene un notable ciclo de vida especializado y complejo (Figura 1). Los individuos requieren de una amplia variedad de ambientes para desarrollarse, llegar a su fase adulta y completar su ciclo de vida. Los ambientes de los que dependen las tortugas marinas incluyen playas, mar abierto, aguas costeras y estuarinas^{8,10,11}.

A las tortugas marinas les toma varias décadas alcanzar la madurez; el periodo que transcurre desde su eclosión hasta que regresan a anidar a la misma playa, puede ser desde los 10 a los 50 o más años, durante su ciclo de vida, cada organismo se dispersa y migra recorriendo distancias que pueden abarcar decenas de miles de kilómetros; una tortuga puede continuar anidando por más de 20 años. Normalmente, las tortugas tienen una alta productividad, el número de huevos por nido puede variar desde los 80 a 200 huevos dependiendo la especie^{12,13}.



Figura 1. Esquema general del ciclo de vida de las tortugas marinas. Elaborado por Lic. Tenorio Garrido V.Y

Tabla 2. Características de Tortugas Marinas que anidan en México^{11,13}.

Especie	Tortuga Caguama 	Tortuga Carey 	Tortuga Lora 	Tortuga Blanca 
Peso Promedio	80-100 kg	60 – 70 kg	40 kg	50-120 kg
Nombre Científico	<i>Caretta caretta</i>	<i>Eretmochelys Imbricada</i>	<i>Lepidochelys kempii</i>	<i>Chelonia mydas</i>
Distribución geográfica	Pacífico ,Golfo y Mar Caribe mexicano	Pacífico ,Golfo y Mar Caribe mexicano	Golfo de México	Golfo y caribe mexicano
Tamaño aproximado	Más de 85 cm de longitud del caparazón.	Más de 60 cm de longitud del caparazón.	Más de 50 cm de longitud del caparazón.	Más de 70 / 99 cm de longitud del caparazón.
Características	Caparazón ancho y grueso con una joroba en la parte posterior. El color es café-rojizo. Aletas cortas con dos uñas cada una.	Caparazón con concha dura y escudos traslapados. Color jaspeado (amarillo, naranja, café, negro). Dos uñas en cada aleta.	Caparazón casi circular. Color gris-crema o verde grisáceo oscuro. Dos uñas en cada aleta.	Caparazón con concha dura de forma acorazonada. Alargado en la parte posterior y de color oscuro redondeado y de color verde. Una uña por aleta

Modificado de: Huerta P, 2006 y Márquez R, 2002.

Tabla 2. Características de Tortugas Marinas que anidan en México^{11,13}.

Especie	Tortuga Golfina 	Tortuga Prieta 	Tortuga Laúd 
Peso Promedio	40 kg	40-80 kg	100-200 kg
Nombre Científico	<i>Lepidochelys olivacea</i>	<i>Chelonia agassizi</i>	<i>Dermochelys coriacea</i>
Distribución geográfica	Pacífico mexicano	Pacífico mexicano	Pacífico, Golfo y Mar Caribe mexicano
Tamaño aproximado	Más de 55 cm de longitud del caparazón.	Más de 70 / 99 cm de longitud del caparazón.	Más de 125 cm de longitud del caparazón.
Características	Caparazón con concha dura, más ancho que largo. Color verde olivo. Dos uñas en cada aleta (algunos adultos pueden perder una uña de las aletas delanteras).	Caparazón con concha dura de forma acorazonada. Alargado en la parte posterior y de color obscuro (prieta) Una uña por aleta.	Caparazón con 7 quillas a lo largo. Parece estar forrado por piel, sin escamas. Negro con manchas blancas. Aletas delanteras muy grandes, sin uñas. Mancha rosa en la parte dorsal de la cabeza.

Modificado de: Huerta P, 2006 y Márquez R, 2002.

3.2. Las tortugas marinas en México.

México es uno de los países con mayor número de tortugas marinas en el mundo, ya que de las ocho especies existentes, siete habitan en los mares mexicanos y además, nacen en sus playas. La única especie que no se encuentra en México es la tortuga Kikila (*Natator depressus*) o Australian Flatback Turtle^{6,12,13}.

En la actualidad, las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas se encuentran reducidas por diversas causas como son: la pesca excesiva, el comercio ilícito, el saqueo de nidadas, la captura y sacrificio de hembras que arriban a anidar, la captura incidental de juveniles y adultos, y la modificación y degradación del hábitat.

En los aspectos histórico, económico y alimenticio, las tortugas marinas en México han tenido gran importancia regional y forman parte de la cultura de varios pueblos costeros del país, particularmente de los Seris de Sonora, los Pómaros de Michoacán y los Huaves de Oaxaca, en donde además de tener valor cultural, mágico y religioso, forman o formaron parte esencial de su dieta^{13,14}.

En México, la captura de tortugas marinas se desarrolló de tal manera que durante casi dos décadas (1965-1982) contribuyó al mercado con más de la mitad de la producción mundial debido a que su piel se comenzó a utilizar como sustituto de la piel de cocodrilo. El caparazón y la carne se procesaron industrialmente y se recolectaron grandes cantidades de huevo para su venta^{13,14}.

La captura se mantuvo hasta 1989; al no considerarse los límites biológicos de las poblaciones, pronto se rebasaron los niveles óptimos de explotación y se agotaron varias de las colonias más importantes de esta especie¹⁴.

Las pesquerías de tortuga marina en las aguas nacionales fueron prohibidas total e indefinidamente mediante el Acuerdo por el que se establece la veda total para las Especies y Subespecies de Tortuga Marina en Aguas de Jurisdicción Federal del 31 de mayo de 1990^{11,13,15}.

En 1991, la venta, compra y consumo de algún producto de tortuga se le tipifica como delito federal. En 1992, en el Diario Oficial de la Federación se decreta el uso obligatorio de los Dispositivos Excluidores de Tortugas en todas las embarcaciones camaroneras del Golfo de México, y también se encuentran incluidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, al igual que en la Convención Internacional para el Comercio de Especies de Flora y Fauna Silvestre Amenazada (CITES) y en la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)^{15,16}.

Tabla 3. Situación de riesgo de las tortugas marinas en México¹⁵.

Especie	NOM-059-ECOL-2001	Cites	IUCN
<i>Caretta caretta</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	Peligro de extinción
<i>Chelonia mydas</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	Peligro de extinción
<i>Chelonia agassizii</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	Peligro de extinción
<i>Dermochelys coriacea</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	Peligro de extinción
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	En peligro crítico de extinción
<i>Lepidochelys kempfi</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	En peligro crítico de extinción
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Peligro de extinción	Apéndice I	Peligro de extinción

Tomado de: Norma Oficial Mexicana -NOM-059-ECOL-2001.

2.3. Cría en cautiverio de tortugas marinas.

Existen diversos métodos para la cría en cautiverio de tortugas marinas, algunos buscan proteger los nidos manteniéndolos en cajas de unicel o corrales dentro de instalaciones con baja o mediana tecnificación, con el objetivo de mantenerlos a salvo de depredadores naturales y comercio ilegal (Figura 2 A).

Las tortugas recién eclosionadas son liberadas al mar en sus playas de origen, lo antes posible, para evitar que la reserva de alimento en el vitelo se agote.

Otros sistemas plantean el mantenimiento en cautiverio durante algunos meses o hasta el primer año, buscando librar la elevada mortalidad natural que sucede durante este tiempo (Figura 2 B). Ambos sistemas buscan el mismo objetivo: acelerar la recuperación de las poblaciones silvestres^{6,11,13,17}.

A



B



Figura 2. Cría en cautiverio. (A) Métodos de cría en cautiverio en cajas de unicel y corrales.

(B) Estanques de exhibición del programa de iniciación, en el parque Xcaret en Quintana Roo de tortuga verde (*Chelonia mydas*), imágenes fotográficas de PMVZ Franco N.S.Y.

La explotación comercial es una estrategia que se desarrolla a varios niveles.

1) En ranchos. Considerado como cultivo parcial. A diferencia del método anterior, la producción en estos establecimientos no es autosuficiente y siempre dependerá de la colecta de los excedentes de huevos y crías producidos en el medio silvestre, particularmente de aquellos que de alguna manera podrían llegar a ser destruidos, ya sea por depredación natural o por fenómenos meteorológicos (ciclones, inundaciones, erosión de playas, etc.), suponiendo además que existe un control absoluto de la depredación humana. En estos lugares la producción comercial estará estrechamente relacionada con las variaciones que presenten las poblaciones en el medio natural^{6,13}.

2) En granjas. Considerando como cultivo integral. Sólo durante la etapa inicial depende de los stocks silvestres. Para la granja primero se adquieren adultos en número suficiente para formar el grupo de reproductores y la colecta anual de huevos y crías en cantidades decrecientes hasta que la producción llega a ser autosuficiente^{6,13,17}.

La primera y más grande granja tortuguera fue desarrollada en la isla Gran Caimán en las Antillas Mayores, en 1968. La especie explotada fue la tortuga verde (*green turtle*) también llamada en México tortuga blanca, debido al mejor sabor de su carne y a la mayor facilidad de adaptación al cautiverio. De esta especie se obtenía carne, aceite, piel y subproductos, así como artesanías de los escudos del caparazón. Cuando las tortugas marinas fueron consideradas dentro del apéndice I de CITES (Convention Internacional for the Trade Endangered Species) y el Acta sobre Especies en Peligro de Extinción de los Estados Unidos, se cerraron los mercados estadounidenses, europeo y japonés; obligando a la granja a reducir su producción solo para el consumo local y turístico de la isla^{6,13}.

En México existen diversos programas de protección y conservación de la tortuga marina como el que coordina el parque ecológico Xcaret que nació originalmente gracias al CIQROO (Centro de Investigaciones de Quintana Roo) en 1990, tres años después, cedió el desarrollo y operación del programa a Xcaret, esto incluyó el programa de auto-injerto, el programa de iniciación y la protección de playas, ésta

última actualmente a cargo de la Fundación Flora, Fauna y Cultura de México A.C. desde hace 6 años. En 1993 se recibió un primer grupo de 247 tortugas a las que se protegió durante 12 meses para después ser liberadas ya con la marca de auto-injerto, 30 de ellas permanecieron en el parque para dar seguimiento al estudio de este innovador programa que al día de hoy ha liberado a la fecha más de un millón 136 mil 534 crías de tortuga caguama, y un millón 626 mil 560 crías de tortuga verde provenientes principalmente de la playa Xcacel.

3.4. Principales enfermedades infecciosas en tortugas marinas.

Las tortugas marinas, al igual que otros vertebrados, son susceptibles a agentes patógenos como bacterias, hongos, parásitos y virus.

Se han descrito casos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en granjas de la Isla Caimán, con lesiones granulomatosas en varios tejidos, en tales casos se aisló *Chlamydia psittaci*. En las costas de Australia se informó de casos de enfermedad y mortalidad de *Chelonia mydas*, en las que se aisló *Salmonella sp*, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Moraxella sp*, que estaban causando abscesos en intestino, riñón, hígado, pulmón y cerebro. En tortugas marinas *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* y *Dermochelys coriacea* con lesiones en piel y cuadro séptico, se identificaron: *Vibrio alginolyticus*, *Aeromona hydrophila*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, *Bacillus sp* y *Staphylococcus sp*. Las tortugas juveniles *Caretta caretta* de las Islas Canarias presentaron mortalidad y divertículo esofágico con severa esofagitis necrótica fibrinosa, en este caso se aisló *Aerococcus viridans*¹⁸.

En la actualidad las tortugas de vida libre son afectadas principalmente por una enfermedad tumoral llamada fibropapilomatosis, esta fue inicialmente descrita en ejemplares adultos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en 1930 en las costas de Florida; los animales desarrollan tumores de células epiteliales (papilomas), de fibroblastos dermales (fibromas) o ambos (fibropapiloma) generalmente en las partes blandas, principalmente en axilas, cuello y párpados^{6,17,19}. Esta enfermedad afecta a las tortugas marinas, en especial a la tortuga verde, y esta, es considerada una enfermedad de distribución mundial que amenaza la supervivencia de estas especies

a largo plazo. Su etiología aun no ha sido identificada, pero se han encontrado tres virus relacionados: herpesvirus, retrovirus y papilomavirus, además de que existen datos que indican que entre los factores asociados está la degradación y la contaminación de los mares, lo cual puede estar provocando estados de inmunosupresión que facilitan el desarrollo de la enfermedad^{6,19}.

En el caso de los animales en cautiverio las infecciones en la piel son muy comunes y tienen una alta prevalencia, ya que este tipo de enfermedades están relacionadas con el hacinamiento y al estrés del cautiverio al que están expuestos. La patogenia de muchas de estas enfermedades se debe a que al estar hacinados, los animales de manera natural tienden a morderse entre ellos y estas lesiones se infectan, probablemente por una incapacidad para montar una respuesta inmune efectiva para eliminar la infección. Las principales bacterias relacionadas son *Vibrio alginolyticus*, *Aeromona hidrofila*, *Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.* En la dermatitis ulcerativa, se aprecian pústulas y úlceras localizadas en el cuello, punta y bordes de las aletas y cola (Figura 3). En la estomatitis ulcerativa se observan pequeñas úlceras en la cavidad oral con mayor incidencia en las primeras semanas de vida, que provocan mortalidades del 20 hasta el 50 % y la prevalencia puede alcanzar el 100%. En la dermatitis ulcerativa, las lesiones aparecen desde las primeras semanas de nacidas y pueden mantenerse en un estado crónico recurrente durante años^{6,18,20}.



Figura 3. Lesión inicial de dermatitis. En una cría de tortuga verde (*Chelonia mydas*).

Imagen fotográfica de PMVZ Franco N.S.Y.

Las tortugas que no son tratadas o que no responden al tratamiento, se vuelven letárgicas, anoréxicas y mueren en pocas semanas dependiendo de la edad, siendo las crías las más vulnerables pudiendo morir en pocos días.

A la necropsia, además de las lesiones dermatológicas se encuentran lesiones clásicas de sepsis (congestión, hemorragia y necrosis generalizada).

En la histopatología se observa en todos los órganos afectados, un infiltrado difuso por heterófilos y mononucleares, con presencia de microcolonias de bacterias Gram negativas y detritus celulares^{6,20}.

También las infecciones por herpes virus han sido reportadas en la piel de tortugas jóvenes menores de un año criadas en cautiverio y usualmente presentan diferentes tipos de lesiones; una de estas es extensiva y diseminada y casi siempre evoluciona a una necrosis de la piel y la muerte de la tortuga, a esta condición particular de la piel se le conoce como parche gris por el color grisáceo de las lesiones²¹. Esta enfermedad ha sido asociada a temperaturas altas del agua y observada en tortugas verde (*Chelonia mydas*) recién nacidas en cautiverio, aproximadamente de 8 a 12 semanas después de la eclosión, donde se ha visto que la mortalidad alcanza entre un 2 al 25% aproximadamente, dependiendo de las condiciones en que se mantienen a las tortugas, donde la muerte se observa a las 8 semanas aproximadamente después de la aparición de los signos^{1,21,22}.

En general, estas enfermedades reportadas en cautiverio, sugieren que el sistema inmune se encuentra deprimido ya que la etiología forma parte de su flora normal y generalmente existe una correlación entre los brotes de enfermedad y las condiciones en que los animales son mantenidos.

3.5. Características del sistema inmune en reptiles.

Como resultado de su localización en el árbol evolutivo; los reptiles tienen un sistema inmune altamente desarrollado y por ello comparten muchas semejanzas a los vertebrados endotérmicos. Por ser poiquilotermos el sistema inmune se encuentra drásticamente relacionado con el medio ambiente, teniendo cambios notables

durante el ciclo estacional, en los cuales se han reportado modificaciones en la estructura y función^{1,22,,23}.

Los reptiles tienen como órganos linfoides primarios a la médula ósea y al timo, y como órgano linfoide secundario solo se conoce al bazo, ya que carecen de linfonodos, placas de Peyer o bolsa de Fabricio; aunque se ha demostrado la presencia de agregados linfocitarios en algunas especies de reptiles; estos no han sido reportados en la tortuga marina²².

Los reptiles poseen las funciones desarrolladas por la médula ósea, incluyendo hematopoyesis y la maduración de los linfocitos B. El timo forma parte importante del sistema inmune reptiliano y se han reportado cambios por temporada, involucionando durante el invierno hasta llegar a tejido fibroso y grasa que llega a ser difícilmente diferenciado. Sin embargo esta característica es totalmente reversible en primavera cuando las condiciones vuelven a ser óptimas y el timo comienza su regeneración hasta el máximo desarrollo en verano, diferenciándose en médula y corteza. En la tortuga verde, el timo es un órgano bilateral, situado cerca de las arterias subclavias, a ambos lados de la tráquea y craneal al corazón cuya densidad celular es regulada por la época del año; éste se origina como resultado de los sacos faríngeos III y IV. Como en los mamíferos, el timo reptiliano se compone de cápsula, corteza y médula^{1,6, 22}.

El bazo es un órgano ovalado rodeado de una cápsula de tejido conectivo denso, localizado inmediatamente después del páncreas a la altura del duodeno, se encuentran presentes linfocitos B y T; éste filtra la sangre removiendo células muertas, antígenos y detritus celulares. La estructura del órgano es muy similar al bazo de los mamíferos, componiéndose de pulpa roja y pulpa blanca. La pulpa roja está formada por cordones celulares esplénicos y sinusoides sanguíneos, la pulpa blanca se encuentra compuesta de capas de linfocitos rodeando y siguiendo las arterias esplénicas, pero careciendo de centros germinales^{1,6,10,22}.

Los linfocitos T parecen ser las células predominantes en timo y circulación sanguínea^{6,22}.

Estas células se encuentran fuertemente moduladas por varios factores tanto ambientales como hormonales; por esta razón sus niveles fluctúan durante todo el año, teniendo su nivel y actividad máxima en la primavera⁶.

Los linfocitos B se mantienen más o menos constantes durante todo el año, son redondos u ovalados y en muchas ocasiones de forma irregular, moldeándose a la forma de las células cercanas, cromatina finamente distribuida de coloración violeta pálido y ocasionalmente fuerte. El citoplasma generalmente escaso se observa de color azul claro a violeta con las tinciones de Romanowsky²³.

Las células plasmáticas reptilianas son muy similares a los plasmocitos de mamíferos en cuanto a sus características de tinción y morfología⁶.

Los monocitos son más grandes que los linfocitos y de una forma redonda o amiboidea, con núcleo redondo, oval, o indentado y parecen tener poca variación estacional en el número y porcentaje (0.5-5%)^{1,6,23,24}.

Los macrófagos tisulares reptilianos son, en general, de dos tipos: macrófagos de morfología muy semejante a los de mamífero y melanomacrófagos, los cuales presentan elevada pigmentación y generalmente se encuentran como células residentes de diversos órganos parenquimatosos, siendo muy numerosos en hígado y, en menor grado, en bazo. Los melanomacrófagos están presentes en todos los poiquiloterms, y es muy probable que el beneficio evolutivo que aportan a estas especies radique en que mantienen una buena capacidad fagocítica, aún a temperaturas muy bajas cercanas a 0 ° C., encontrándose su temperatura óptima de fagocitosis a los 27° C. Este mecanismo puede ser de gran beneficio para evitar procesos infecciosos en reptiles que hibernan o en aquellos que habitan en zonas con climas templados^{1,6}.

Los eosinófilos son células redondas u ocasionalmente ovaladas, están caracterizados por pseudópodos membranarios y gránulos esféricos usualmente con núcleo excéntrico que puede ser simple o lobulado, con gránulos redondos grandes y escasos de coloración rojiza a violeta. El núcleo presenta forma lenticular u oval de color púrpura y ubicación excéntrica, estas características son observadas con las tinciones de Romanowsky^{1,6,23,24}.

Los basófilos son células redondas con un núcleo denso de color azul o púrpura con citoplasma bien definido que contiene numerosos gránulos basofílicos, son raros en la tortuga blanca²³. Los trombocitos son homólogos a las plaquetas de los mamíferos y son células elipsoidales basofílicas y relativamente pequeñas y en forma de huso, que poseen un núcleo basófilo grande y central, sólo que al parecer, estas llevan una actividad de fagocitosis activa⁶.

Los heterófilos miden 10 a 18 μm y son caracterizados por un núcleo excéntrico azul o morado, con gránulos fusiformes rosados en citoplasma muy elongados y son tan numerosos que desplazan el núcleo hacia la periferia, son los granulocitos más numerosos en las tortugas (82%) los cuales juegan un rol muy importante en la respuesta inmune durante infecciones bacterianas, respuesta inflamatoria y/o o necrosis tisular de forma muy similar a los neutrófilos en mamíferos, pero a diferencia de estos, no parecen ser la línea dominante en los inicios de la respuesta inflamatoria y pueden persistir durante todo el proceso inflamatorio y la reparación tisular^{6,22,23,24}.

Los reptiles sintetizan por lo menos tres clases de inmunoglobulinas (IgM, IgD y la IgY) y los mamíferos sintetizan 5 clases de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE). La IgD ha sido reportada en la tortuga china de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*) y en el anolis verde (*Anolis carolinensis*) sin embargo no se ha reportado en la tortuga verde (*Chelonia mydas*)^{25,26}. Benedict y Pollard (1972) encontraron que la tortuga verde tenía tres clases de inmunoglobulinas (5.7S, 7S y 17.S), las inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas solubles que reconocen y se unen a los antígenos, poseen una estructura común formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de mayor tamaño, denominadas cadenas pesadas, y dos, de menor tamaño, llamadas cadenas ligeras²⁷. La inmunoglobulina IgM varía ligeramente en su peso molecular de 850-900 kDa en forma de pentámero entre las diferentes especies, y 200 kDa en su forma de monómero. Se encuentra en forma de pentámero en la circulación sanguínea y en forma de monómero en la membrana celular de linfocitos B. Esta inmunoglobulina es producida en muy escasa cantidad y de forma intermitente durante el inicio de la respuesta inmune humoral^{1,6,22,27}.

La segunda es una inmunoglobulina denominada IgY. Esta tiene un peso molecular de 180 KDa en forma de monómero y probablemente forma dímeros en mucosas. Solamente en tortugas, algunas aves anseriformes y peces pulmonados se ha identificado otro isotipo de Ig; es una Ig de menor peso molecular, una IgY trunca de 5.7S con un peso molecular de 120KDa. Esta Ig carece de dos dominios carboxilo terminal en su cadena pesada haciendo esta molécula menos flexible y menos apta para la opsonización y la fijación del complemento^{6,27}.

Aunque de menor grado que en aves y mamíferos, los reptiles presentan una respuesta inmune primaria detectable en un periodo posterior a 10 días en promedio y alcanzando un pico entre los 20 y los 60 días pos inmunización, sin olvidar todas las variantes por especie, antígeno, vía de administración, dosis, temporada del año, estado nutricional, etc²².

En algunas especies de reptiles se da una respuesta secundaria con un pico mayor de anticuerpo, lo cual sugiere, con la presencia de células de morfología tipo plasmáticas la existencia de memoria inmunológica^{1,6}.

Actualmente existe un conocimiento básico pero importante acerca de la inmunidad innata y adaptativa en los reptiles. La inmunidad adaptativa gira alrededor de los linfocitos T y B, los cuales poseen receptores altamente específicos. El sistema inmune innato se caracteriza por poseer mecanismos efectores, como la fagocitosis, en la que los microorganismos que infectan los tejidos, son ingeridos y posteriormente destruidos por células fagocíticas profesionales.

Los defectos en la inmunidad innata llegan a producir susceptibilidad a virus y bacterias. Se ha demostrado que tortugas blancas inmunosuprimidas son mas vulnerables a una infección provocada por bacterias. En los reptiles la bacteremia causa cambios metabólicos graves como la alteración del balance electrolítico, perfiles de coagulación, y toxemia y en tortugas más seriamente afectadas, los heterófilos aparecen con gránulos basófilos agrupados y en el citoplasma aparece un gran número de vacuolas. En animales gravemente afectados se observa heterofilia, monocitosis, leucopenia, anemia e hipoproteinemia²⁸.

La bacteremia puede ser un buen indicador de la inmunosupresión de tortugas marinas²⁸.

3.6. Fagocitosis.

A finales del siglo XIX Elie Metchnikoff, zoólogo ruso, descubrió el proceso de fagocitosis en invertebrados cuando examinaba larvas de estrella de mar. Observó que introduciendo una espina de rosal en la cavidad del cuerpo de la larva de estrella de mar, ésta era atacada por células móviles que se acercaban a la espina e intentaban defender a la larva mediante la ingestión del invasor en un proceso llamado fagocitosis²⁹.

La fagocitosis constituye un mecanismo fundamental y conservado entre todos los organismos del reino animal, como defensa innata contra las infecciones y, los defectos en ésta, se asocian a una susceptibilidad creciente a la infección³⁰.

Los neutrófilos o heterófilos, según sea el caso, reciben junto a monocitos, y macrófagos, la denominación general de fagocitos profesionales, por presentar una gran capacidad de fagocitar. Los heterófilos de los reptiles son células capaces de buscar, reconocer, fagocitar y destruir intracelularmente partículas extrañas o microorganismos por la acción de enzimas en el proceso de estallido respiratorio, como la mieloperoxidasa demostrada en los heterófilos y eosinófilos de cocodrilo *Caiman crocodilus yacare* y en tortugas *Phrynops hilarii*³².

El proceso fagocítico incluye varias etapas secuenciales que comprenden la quimiotaxis, la adhesión e internalización (las cuales se optimiza por la opsonización), y los cambios físicos y bioquímicos intracelulares que capacitan a los fagocitos para matar y digerir a los microorganismos. Este proceso comprende el incremento en el metabolismo general de las células, la formación del fagosoma, la interacción del fagosoma con endosomas y lisosomas para formar el fagosoma maduro (fagolisosoma), la acidificación del fagolisosoma, la formación de especies y radicales reactivos del oxígeno y del nitrógeno, de las hidrolasas lisosomales, procesamiento y presentación de antígenos y finalmente la expulsión del material de desecho mediante el proceso de la exocitosis (Figura 4)^{31,34}.

Los procesos químicos que constituyen el mecanismo microbicida y que conllevan la destrucción del material ingerido pueden ser categorizados en dos grandes grupos: sistema independiente de oxígeno y sistema dependiente de oxígeno. El primero es un conjunto de compuestos que actúan en ausencia de oxígeno, mientras que el segundo está constituido por una serie de reacciones de oxidorreducción que conducen al denominado “estallido respiratorio” que acompaña a la fagocitosis y en el que se produce un gran consumo de oxígeno^{31,34}.

3.6.1. Infección, diapédesis y quimiotaxis.

Las situaciones de inflamación por infección o trauma, propician cambios en el microambiente tisular que dan origen a la formación y/o liberación de materiales tanto exógenos (los derivados de los microorganismos) como endógenos (los que resultan de las alteraciones tisulares), con actividad quimiotáctica; esto ocasiona que las células fagocíticas acudan al lugar de inflamación, incrementando la síntesis y expresión de proteínas de adhesión, propiciando que los fagocitos se adhieran a las superficies de los endotelios activados y rueden sobre ellos hasta procurarse una salida entre las uniones de las células endoteliales, liberándose del vaso sanguíneo por un proceso denominado diapédesis, mediado por quimiocinas y otros factores con actividad quimiotáctica^{30,34}.

Dentro de ciertos límites, este fenómeno de quimiotaxis es más marcado mientras mayor es la concentración de los factores quimiotácticos liberados al microambiente tisular. La capacidad fagocítica de las células aumenta de forma considerable con opsoninas del suero; las opsoninas más importantes son las colectinas, los anticuerpos IgG y el componente C3b del complemento^{30,33,34}.

Las células responden al contacto con los microorganismos, extendiendo su membrana y emitiendo prolongaciones a manera de pseudópodos que terminan por rodear y englobar a los microorganismos, formando una vacuola fagocítica o fagosoma. En la mayoría de los casos, la vacuola se fusiona, reversiblemente, con los lisosomas para dar origen al fagolisosoma, esta fusión permite el contacto de la partícula fagocitada con las hidrolasas lisosomales del fagocito^{29,33}.

Antes de esto si es un microorganismo el fagocitado debe morir por efecto de los radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos etc. Como resultado de esta actividad, continuamente se remueven porciones de la membrana plasmática para formar la envoltura de la vesícula endocítica^{29,33}.

3.6.2. Receptores mediadores de la fagocitosis.

En la ingestión de microorganismos por las células fagocíticas participan principalmente dos tipos de receptores: los receptores para constituyentes propios de los microorganismos llamados receptores de reconocimiento de patrones o PRRs (Pattern-Recognition Receptors) y los receptores para opsoninas. Dentro de los PRRs se encuentran los receptores *scavenger* o SR, receptores para manosa, dectina-1, CD14, y C1q y los receptores tipo Toll (Toll-like Receptors o TLRs) todos ellos reconocen componentes estructurales conservados en los microorganismos llamados PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Los receptores para opsoninas incluyen a los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG (FcγR), C3b/C3bi (CR1/CR3), y colectinas (complejo calreticulina- CD91)^{29,33}.

Además de la entrada a través de receptores para opsoninas y de receptores de reconocimiento de patrón, algunos microorganismos también pueden penetrar a los fagocitos a través de microdominios lipídicos (lipid rafts) y de caveolas^{29,30}.

Los rafts son microdominios lipídicos presentes en la membrana plasmática y endosomal de todas las células eucariotas, estas regiones se encuentran enriquecidas en colesterol, glucoesfingolípidos y glucolípidos con fosfatidil inositol a través de los cuales se enlazan a las membranas celulares³³.

Las caveolas por su parte, localizadas en la membrana plasmática que adoptan una forma de botella y que además de los lípidos antes mencionados tienen unida al colesterol una o más proteínas de la familia de las caveolinas (caveolinas 1, 2 y 3) que se encuentran recubriendo la superficie citoplásmica de la caveola. Las caveolinas transportan colesterol del retículo endoplásmico donde se produce, a la caveola y regulan la actividad de las proteínas de señalización (tirosin cinasas) que se encuentran en la caveola^{30,33}.

La interacción de los microorganismos con los receptores presentes en la membrana de los fagocitos genera en estas células una serie de cambios bioquímicos³³.

3.6.3. Ingestión o Internalización.

Tan pronto como se forma la vacuola fagocitaria los movimientos dentro del citoplasma se activan y los lisosomas se aproximan a la membrana del fagosoma, se fusionan con el y liberan su contenido al interior para iniciar los procesos encaminados a la destrucción y digestión del microorganismo o molécula fagocitada³⁵.

La unión de microorganismo - receptor induce cambios conformacionales en el receptor, que se transmiten a moléculas adyacentes (proteínas G reguladoras y segundos mensajeros), activándolas. Cuando el segundo mensajero que se activa es una fosfolipasa C, esta enzima hidroliza los fosfolípidos con inositol de la membrana, produciendo inositol trifosfato (IP3) y diacil- glicerol (DAG). El IP3 participa en la movilización de calcio, en tanto que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC). Una de las PKC activadas se trasloca a la cara interna de la membrana celular donde interacciona con las proteínas del sistema de la NADPH oxidasa y las fosforila³³.

La fosforilación activa al sistema, uno de cuyos componentes es el citocromo B₅₅₈ y esto promueve la captación de oxígeno molecular y su reducción a anión superóxido (O₂⁻), el primer metabolito o especie reactiva del oxígeno (ERO o ROS por *reactive oxygen species*) que se acumula dentro y fuera de las células. El anión superóxido no es estable y rápidamente se convierte en peróxido de hidrógeno, el segundo ROS. A través de diversas interacciones, estos metabolitos dan origen a los iones hidroxilo (OH) y al singlete de oxígeno (O₂), los otros ROS. Una vez producidos, los ROS interaccionan con proteínas, polisacáridos, lípidos, DNA y RNA de los microorganismos, y los rompen o modifican, anulando su función, siendo esta la manera en que las células fagocíticas matan a los microorganismos fagocitados^{29,33}.

3.6.4. Fusión fagosoma – lisosoma.

Simultáneamente a los cambios antes señalados ocurre la fusión de la vacuola fagocítica con los lisosomas citoplásmaticos para formar el fagolisosoma.

Los lisosomas también son una vesícula delimitada por membrana que contiene una colección de enzimas hidrolíticas las cuales están como enzimas no activas en las células que se encuentran en reposo. Dentro de los fagolisosomas, los microorganismos quedan expuestos al efecto dañino tanto de los metabolitos del oxígeno como de las enzimas hidrolíticas³⁰.

3.6.5. El sistema de la mieloperoxidasa y metabolitos del nitrógeno.

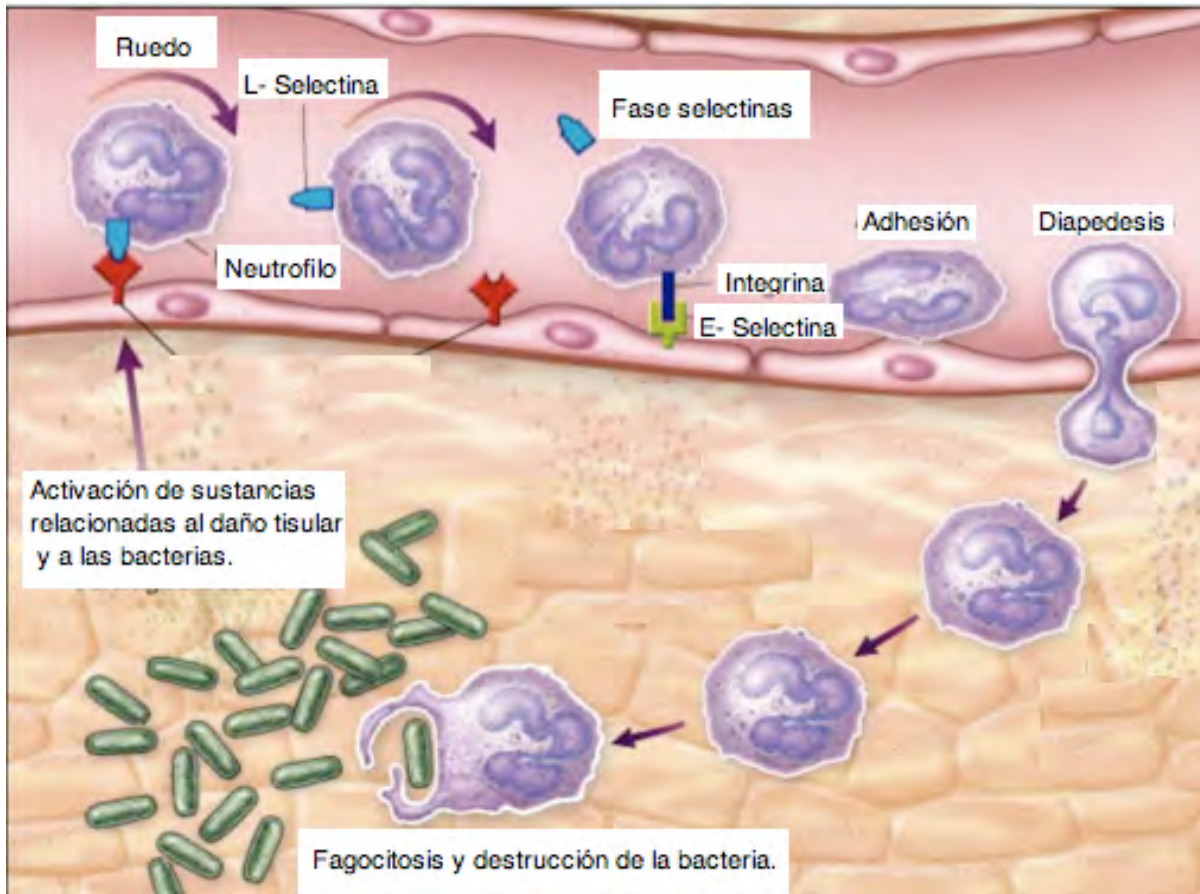
La mieloperoxidasa (MPO) es una oxido reductasa, particularmente una peroxidasa y es la única que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso, Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa³⁶.

Además de los metabolitos del oxígeno, las células fagocíticas, principalmente los macrófagos, responden a los estímulos infecciosos con la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico es un producto del metabolismo de la arginina, y su síntesis se incrementa cuando los macrófagos son activados por interferón gamma. Como los metabolitos del oxígeno, el óxido nítrico es un compuesto altamente tóxico. Juntos, constituyen los elementos microbicidas, muy eficientes³⁶.

3.6.6. Digestión y exocitosis.

Los microorganismos que son ingeridos mueren debido al efecto tóxico de los metabolitos del oxígeno y el nitrógeno, pero su digestión es el resultado de la actividad de las enzimas hidrolíticas lisosomales. donde comienza la hidrólisis de las sustancias. Los elementos que componen el material hidrolizado, carbohidratos, aminoácidos, etcétera, pasan a través de la membrana de la vacuola digestiva por diferentes mecanismos de transporte, hacia la matriz citoplasmática, donde serán utilizadas en los procesos metabólicos celulares, mientras que otros son desechados por exocitosis³⁰.

La exocitosis es el proceso celular por el cual las vesículas situadas en el citoplasma se fusionan con la membrana citoplasmática y liberan su contenido³⁰.



Modificado de: Delves P,2000.
Figura 4. Proceso Fagocítico³¹.

3.6.7. Métodos para evaluar la fagocitosis.

Desde el punto de vista metodológico se han descrito técnicas que tienen por objetivo medir apropiadamente la fagocitosis. Esta se puede medir a partir de la ingestión de partículas inertes o con células microbianas como bacterias y levaduras, estos ensayos pueden hacerse del siguiente modo:

Métodos *in vivo*.

Estos métodos consisten básicamente en medir la depuración en la circulación de material inyectado por vía intravenosa (coloides, bacterias, macromoléculas, eritrocitos opsonizados, etc).

Métodos *in vitro*.

La ventaja de la medición de la fagocitosis *in vitro* radica en que las poblaciones celulares, las partículas, los factores opsonizantes y demás condiciones experimentales están bien definidas.

a) Microscopía: Consiste en contar el número de partículas ingeridas en función del tiempo. Su ventaja es que provee una vía visual directa y como tal es de gran valor para validar los resultados obtenidos con otros métodos o para contar el número de partículas ingeridas por un determinado número de fagocitos. La desventaja consiste en que carece de resolución suficiente lo que impide el conteo de partículas pequeñas.

b) Uso de partículas marcadas: Estos métodos tienen un enfoque alternativo ya que la fagocitosis puede cuantificarse por la medición de la fluorescencia. Como ejemplo tenemos la citometría de flujo que es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. El principio básico de la citometría de flujo es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas de forma individual por delante de un laser. La principal característica de la citometría es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre estas, permite el análisis de dos parámetros de dispersión, lateral (SSC), frontal (FSC) y tres de fluorescencia (en equipos con un solo laser) FL1,FL2, FL3 y de una cuarta fluorescencia en equipos con dos laser. La acción de evaluar una suspensión de células en un citómetro de flujo , se llama adquisición (se adquiere la información de un determinado número de células en un tiempo determinado).

Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora^{37,38}.

Es así como los datos se pueden visualizar como graficas de puntos, densidad, histogramas, etcétera obteniéndose en cada caso información numérica como por ejemplo coeficiente de variación, media de intensidad de fluorescencia, mediana, y media geométrica. La separación celular por citometría de flujo o “cell sorting” es el proceso de separación física de poblaciones celulares que se diferencian en uno o varios parámetros que son analizables por citometría de flujo, permitiendo la obtención de poblaciones celulares con elevada pureza y exactitud^{37,38}.

Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínicas, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas también es utilizada en el conteo y función de subpoblaciones de linfocitos y otras células del sistema inmune³⁷.

4. Justificación.

Debido a la alta prevalencia de infecciones bacterianas que causan elevados índices de morbilidad y mortalidad en las poblaciones de tortugas marinas en cautiverio, es necesario desarrollar técnicas específicas y cuantitativas que permitan determinar el estado de la respuesta inmune en tortuga verde (*Chelonia mydas*); en particular de mecanismos efectores de la respuesta inmune, como la fagocitosis, la cual es fundamental en este tipo de infecciones.

5. Hipótesis.

La actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) puede ser evaluada adecuadamente por medio de técnicas y análisis de citometría de flujo.

6. Objetivos.

General:

Desarrollar una metodología para evaluar la fagocitosis en leucocitos de sangre periférica en tortuga verde (*Chelonia mydas*).

Particulares:

1. Purificar leucocitos de sangre periférica de tortuga verde utilizando un gradiente de densidad e identificar las subpoblaciones por microscopia óptica después de un proceso de separación celular en el citómetro de flujo.
2. Estandarizar un ensayo in vitro para evaluar la fagocitosis en leucocitos utilizando ovoalbúmina y perlas de látex fluorescentes.
3. Mediante citometría de flujo determinar el tiempo óptimo en el cual en el ensayo de fagocitosis se encuentra la máxima eficacia fagocítica.

7. Materiales y Métodos.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio 8 del Edificio de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 1), en el laboratorio 15 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco y en las instalaciones del Parque Ecológico Xcaret, Quintana Roo. La adquisición y análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de citometría de flujo, del CINVESTAV.

7.1. Localización geográfica.

El parque Xcaret se encuentran localizado en el Estado de Quintana roo, en el sureste de México, a 65 km al sur de la ciudad de Cancún.

7.2. Animales de estudio.

Para el presente trabajo se utilizaron muestras de sangre de tortugas marinas juveniles y adultas de la especie *Chelonia mydas*, perteneciente al programa de conservación de tortugas marinas del parque Xcaret, bajo el permiso federal INE/CITES/DFYFS-ZOO-P0011-99-Q.ROO.

Se tomaron 6 ml de sangre del seno venoso cervical de acuerdo a la técnica descrita por Owen y Ruiz³⁷ de individuos clínicamente sanos. Para tomar las muestras se utilizaron guantes de látex, aguja para sistema Vacutainer calibre 21G, holder y

tubos de ensayo al vacío BD Vacutainer[®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con heparina de litio.

Las muestras fueron transportadas en refrigeración hacia la Ciudad de México en un periodo no mayor a 36 horas, para su posterior procesamiento en el laboratorio 8 del Edificio de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 1).

7.3. Separación de granulocitos.

La sangre completa fue colocada en tubos de poliestireno de 4 ml (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) depositándola cuidadosamente sobre un volumen igual de Percoll[®] (Pharmacia, Uppsala, Sweden) al 57% centrifugada a 1300 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. La primera capa en la interfase plasma/Percoll, conteniendo los granulocitos, y la segunda conteniendo los mononucleares (Figura 5) fueron recolectadas y resuspendidas en 2ml de medio cultivo RPMI 1640 con glutamax y HEPES (Invitrogen Carlsbad, CA USA). Se lavaron 2 veces con 2ml de medio de cultivo RPMI a 300 x g durante 3 minutos y fueron resuspendidas en 1ml de medio de cultivo RPMI. Las células fueron contadas y la viabilidad determinada con azul de tripan al 0.4 % y ajustadas a una densidad de 2×10^5 células en 100 μ l de medio RPMI

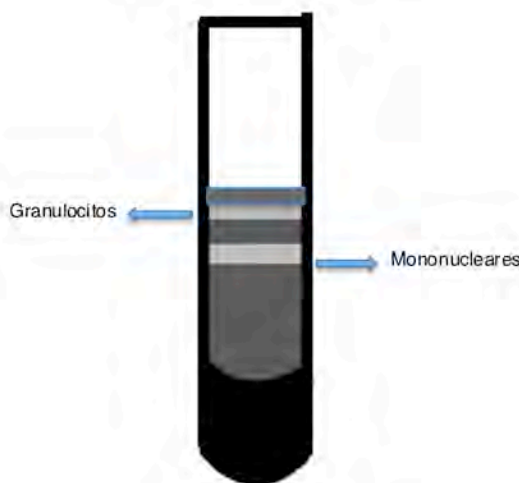


Figura 5. Esquema. Capas interfase plasma / Percoll.

7.4. Separación celular (*cell sorting*).

La sangre completa fue colocada en 2 tubos de poliestireno de 15ml, en un volumen igual de Percoll al 57% centrifugada a 1300 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4C°. La primera capa en la interfase plasma/Percoll, conteniendo los granulocitos, y la segunda conteniendo los mononucleares fueron recolectadas y resuspendidas en 1ml de medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con 2ml de solución de Hanks sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, y resuspendidas en 1ml de buffer fosfato salino 0.15 M, 7.2 pH (PBS). Las células fueron fijadas en 1ml de paraformaldehído al 1% .

Las muestras fueron adquiridas, en el laboratorio de citometría de flujo, del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco en la unidad Beckman Coulter MoFlo XDP (Brea,CA USA), se identificaron las diferentes subpoblaciones celulares, en base a su granularidad, tamaño y morfología celular y fueron separadas en granulocitos (heterófilos) y mononucleares (linfocitos), obteniéndose un millón de células por población.

7.5. Citocentrifugación (Cytospin).

La citocentrifugación y el registro fotográfico fue realizado en el laboratorio 15 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. De cada tubo de las diferentes subpoblaciones obtenidas por separación celular, se tomaron 200 µl y fueron centrifugadas en la citocentrífuga Thermo Scientific Cytospin 4 (Waltham,MA USA) durante 5 minutos, para que las células se concentraran en una zona limitada de un portaobjetos tratado con poli- L- lisina para favorecer la adherencia. Las preparaciones fueron teñidas con hematoxilina de Harris y eosina (H-E) siendo posteriormente identificadas en base a su morfología en un microscopio óptico observándolas con los objetivos 40X y 100X y realizando el registro fotográfico.

7.6. Preparación de las perlas de látex y OVA - Alexa.

Se elaboró una preparación de OVA - Alexa 647 (ovoalbúmina con Alexa Fluor 647) con un peso de 45,000 daltones, fotoestable, (Molecular Probes, Carlsbad, CA USA) y perlas de látex FluoSpheres carboxylate-modified microspheres, 1.0 μm yellow-green (Molecular Probes, Carlsbad CA USA) diluyendo 1 μl en 1 ml de amortiguador de fosfatos y Albumina 7.2 pH (PBA). Para elaborar el control negativo se utilizaron 100 μl de la preparación celular y estas fueron fijadas en 500 μl de paraformaldehído al 1% en PBS.

7.7 . Ensayo de fagocitosis.

A cada tubo de poliestireno se le adicionaron 100 μl de la preparación de células con 100 μl de OVA - Alexa o perlas de látex y fueron incubadas a 37° C durante 15, 30, 45, y 60 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con 500 μl de solución de Hanks sin Ca^{++} ni Mg^{++} y fijadas en 500 μl de paraformaldehído al 1% en PBS. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Calibur de cuatro colores con el programa Cell Quest 10, (BD Bioscience, San Diego California, USA Dickinson), y analizadas con el programa Flowjo 8.7 para Mac. FACS Calibur

7.8. Análisis estadístico.

Los análisis se realizaron con los datos de cada uno de los ensayos.

La comparación entre los diferentes grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), Los datos fueron considerados significativos a partir de una $p < 0,05$, es decir, el nivel de confianza adoptado fue de 95%. Se realizó la prueba de Bonferroni's de comparación múltiple.

8. Resultados.

8.1. Purificación de granulocitos.

La primera capa en la interfase plasma/Percoll, conteniendo los granulocitos, fue eficientemente separada y el porcentaje de pureza fue mayor al 90% y la viabilidad fue de 89.18 % (SD \pm 3.7).

La muestra de leucocitos totales analizada en el citómetro de flujo se muestra en la Figura 6 A y B , donde el eje X mide el tamaño celular (Foward scatter o FSC), mientras que en el eje Y (Side Scatter ó SSC) representa la complejidad o la granularidad celular. Se definieron las regiones de las poblaciones celulares que serían analizadas, y se utilizó una ventana de análisis o gate en función de FSC y SSC.

El análisis reveló dos regiones en tortuga juvenil (Figura 6A) y tres en tortuga adulta (Figura 6B), claramente identificables: una región bien definida con alta granularidad y tamaño variable y, una segunda región con muy poca granularidad y de tamaño variable. La citometría de flujo mostró que la primera región (R1) de alta granularidad podría ser identificada como región de los granulocitos (heterófilos) y la segunda (R2) y tercera región (R3) debería corresponder a las células mononucleares (linfocitos).

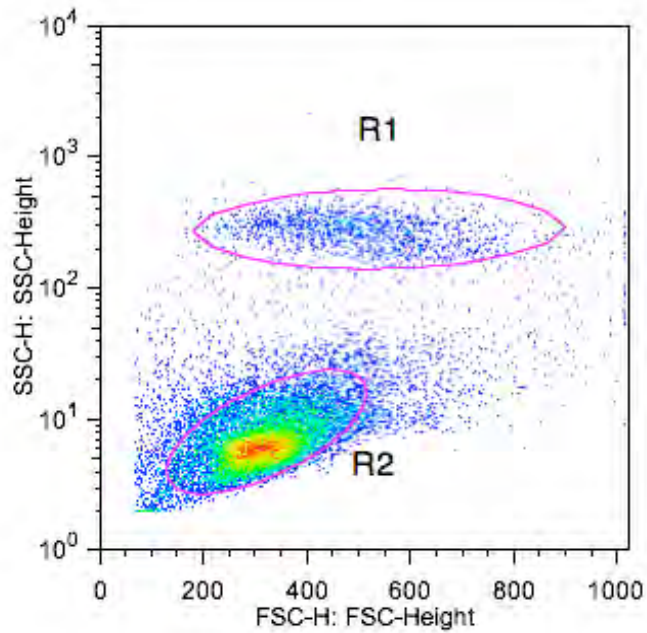


Figura 6A. Regiones de leucocitos analizadas por citometría de flujo de una tortuga juvenil. Se muestran dos regiones en la gráfica de puntos (R1 y R2) que corresponden a una muestra de leucocitos de sangre periférica, donde R1 son granulocitos y R2 linfocitos.

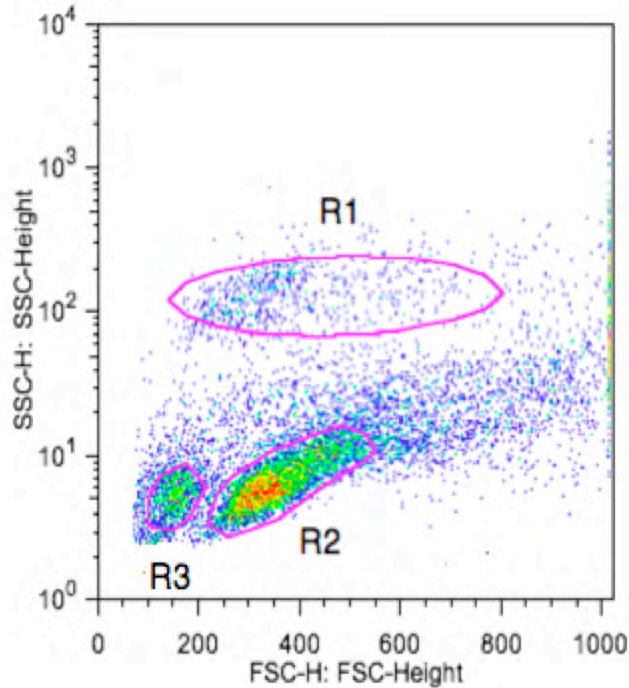


Figura 6B. Regiones de leucocitos analizadas por citometría de flujo de una tortuga de una tortuga adulta. Se muestran tres regiones en la gráfica de puntos (R1,R2,R3) que corresponden a una muestra de leucocitos de sangre periférica donde R1 son granulocitos, R2 y R3 linfocitos.

8.2. Separación celular.

La técnica de separación celular o *cell sorting* permitió separar y recuperar en forma íntegra las células pertenecientes a las regiones R1, R2 y R3, permitiendo aislar las poblaciones de interés como granulocitos (heterófilos) y mononucleares (linfocitos) (Figura 7).

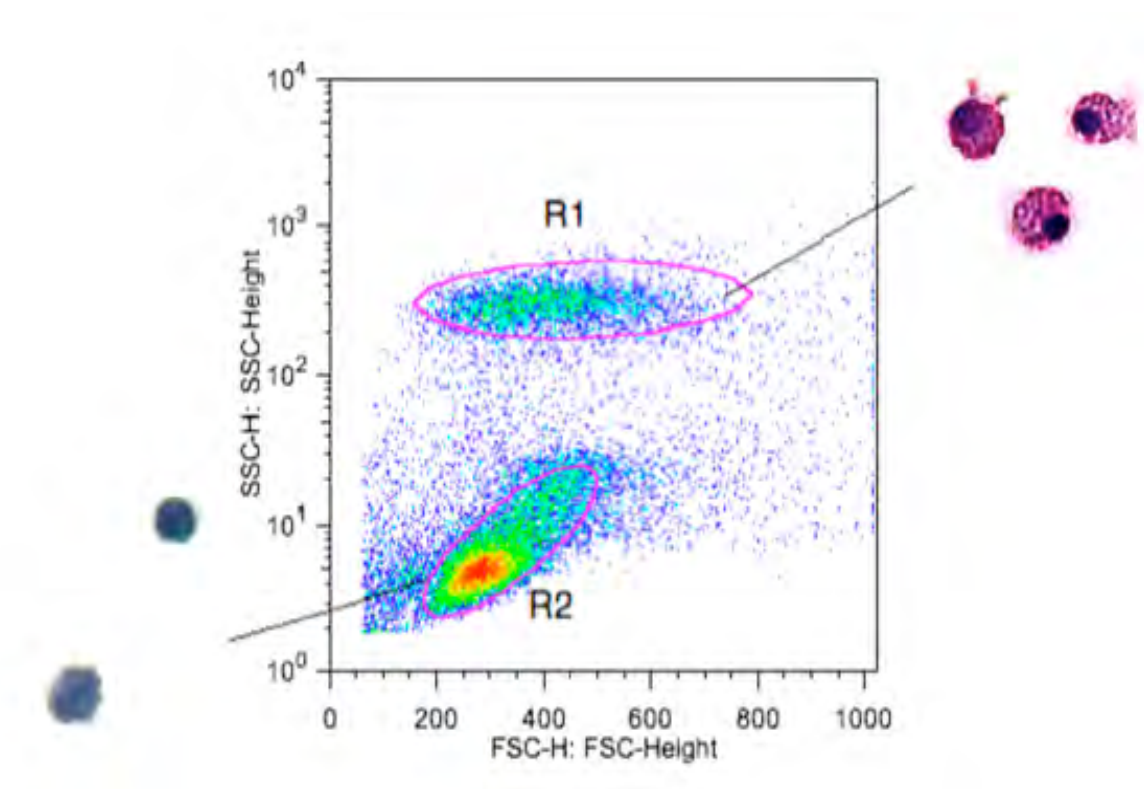


Figura 7. Regiones de leucocitos seleccionadas para el cell Sorting. En la gráfica de puntos se muestran las regiones de leucocitos seleccionadas para el *cell Sorting* y las células obtenidas de la separación correspondientes a las regiones R1 (granulocitos) y R2 (mononucleares).

8.3. Citocentrifugación (*Cytospin*).

La citocentrifugación concentró las células separadas en el citómetro de flujo en una monocapa en una laminilla, permitiendo revisar la morfología celular por medio de la tinción de hematoxilina eosina (H-E). En la Figura 8A y 8B se observa que las células de la región 1, morfológicamente corresponden a los heterófilos, caracterizados por un núcleo azul o morado, con gránulos fusiformes rosados en citoplasma, son células redondas u ovaladas con borde citoplasmático, sus gránulos son muy alargados y son tan numerosos que desplazan el núcleo hacia la periferia²³ en el presente trabajo fueron los granulocitos mas numerosos en la tortuga marina (Figura 8A y 8B).

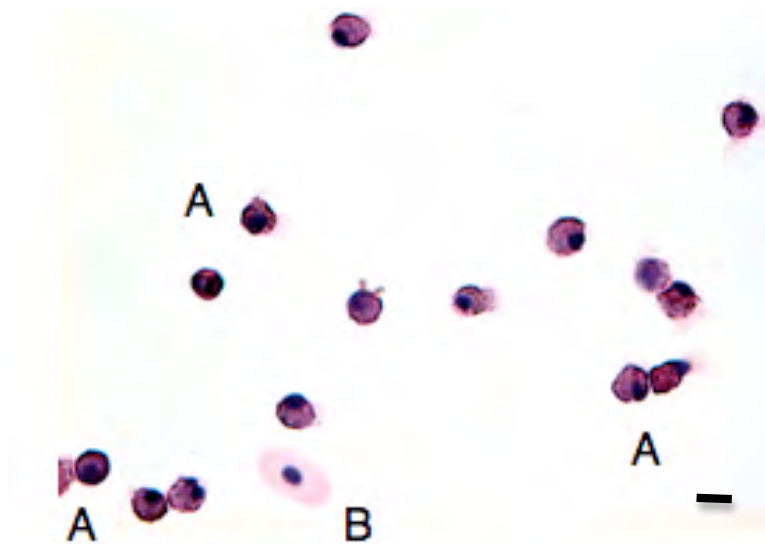


Figura 8A. Granulocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*). Células pertenecientes a la región uno (R1), muestran la morfología característica de los heterófilos. Amplificación 40X tinción H –E. Heterófilos (A), eritrocito (B). Barra = 10 μ m.

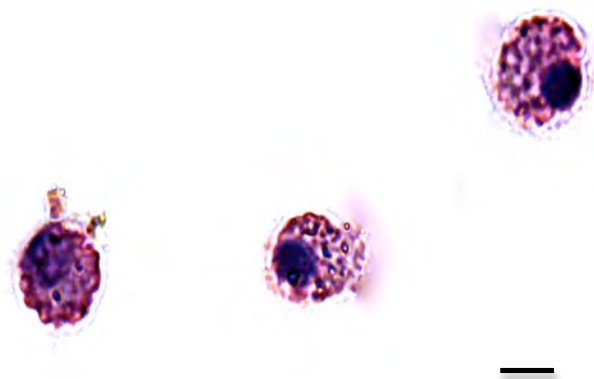


Figura 8B. Heterófilos de tortuga verde (*Chelonia mydas*). Se observan caracterizados por un núcleo azul o morado, con los gránulos fusiformes rosados en citoplasma. Amplificación 100x tinción H-E. Barra = 10 μ m.

Las células de la región 2 y 3 presentaron morfología característica de los linfocitos que, en general, mostraron un tamaño de pequeño a grande y de forma redonda, con un citoplasma generalmente escaso de color azul claro a violeta de acuerdo a lo descrito por Work (1998) (Figura 9A y 9B). Los linfocitos se han reportado como las células más numerosas en la circulación sanguínea de la tortuga verde.⁶



Figura 9A. Mononucleares de tortuga verde (*Chelonia mydas*). Las células muestran la morfología característica de los linfocitos. Amplificación 40X tinción H-E. Barra = 10 μ m.



Figura 9B. Linfocitos de tortuga verde (*Chelonia mydas*). Se observan caracterizados por su forma redondeada y su escaso citoplasma azul o morado; amplificación 100x tinción H-E. Barra = 10 μ m.

8.4. Ensayo de fagocitosis.

8.4.1. Porcentaje de fagocitosis en granulocitos con perlas de látex.

El porcentaje de fagocitosis en tortugas adultas tuvo un rango de 76% a 81% y en juveniles de 71 % a 80%, donde el mayor porcentaje correspondió a las células incubadas durante 15 minutos a 37 °C. La diferencia fue significativa en todos los tiempos en comparación al control, aunque no existió diferencia significativa entre cada uno de los diferentes tiempos de fagocitosis (Figura 10).

8.4.2. Porcentaje de fagocitosis en granulocitos con OVA - Alexa.

El porcentaje de fagocitosis en tortugas adultas tuvo un rango de 29% a 36% , y en juveniles de 61% a 75%, donde el mayor porcentaje correspondió a las células incubadas durante 45 minutos a 37 °C. La diferencia no fue significativa en las tortugas adultas, sin embargo en la grafica se aprecia que si existió fagocitosis en comparación al control. En tortugas juveniles la diferencia fue significativa entre el control y los diferentes tiempos de 15 minutos, 30 minutos, y 45 minutos (Figura 10).

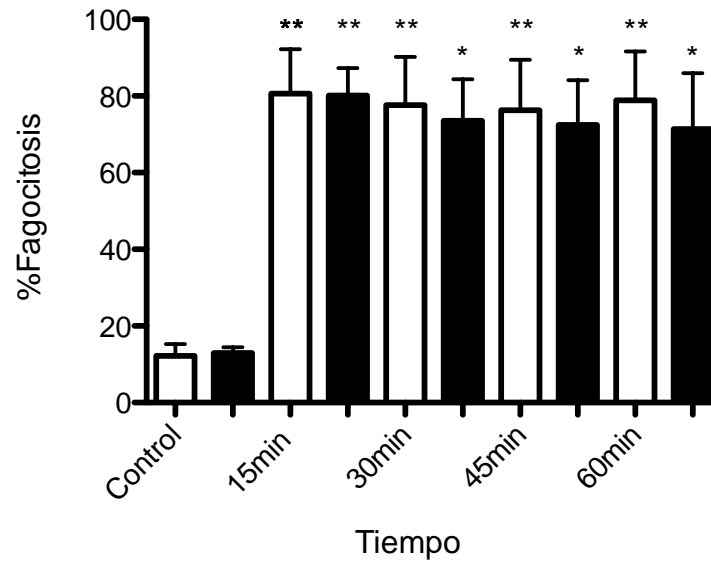
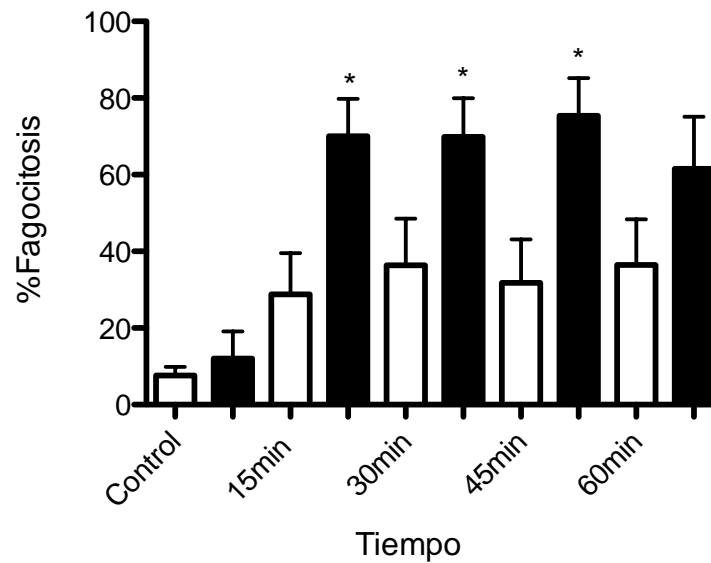
A**B**

Figura 10. Gráficas de barras del porcentaje de fagocitosis en granulocitos. Los resultados se representan como la media \pm error estándar. Porcentajes de fagocitosis de perlas de látex a diferentes tiempos en granulocitos de tortuga, la barra blanca representa a las tortugas adultas N= 8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 *P < 0.05 , ** P < 0.01 (A). Porcentajes de fagocitosis de OVA - Alexa a diferentes tiempos en granulocitos de tortuga, la barra blanca representa a las tortugas adultas N=8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 *P < 0.05 (B).

8.4.3. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos con perlas de látex.

Se compararon los histogramas monoparamétricos que muestran la expresión de la fluorescencia, en ellos podemos observar como existe una diferencia con respecto al control, sin embargo no se observó una marcada diferencia en la intensidad media de fluorescencia entre los diferentes tiempos (Figura 11).

Se observó una diferencia con respecto al control en los diferentes tiempos, aunque solo en tortugas adultas a 60 minutos existió una diferencia significativa en comparación al control (Figura 11).

8.4.4. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos con OVA -Alexa.

Se compararon los histogramas monoparamétricos que muestran la expresión de la fluorescencia, en ellos podemos observar como existe una diferencia con respecto al control, sin embargo no se observó una marcada diferencia en la intensidad media de fluorescencia entre los diferentes tiempos (Figura 11).

En la grafica (Figura 11) se muestra la Intensidad media de fluorescencia, a pesar de que en la grafica se observa una diferencia con respecto al control en los diferentes tiempos en tortugas adultas y juveniles, está no fue significativa.

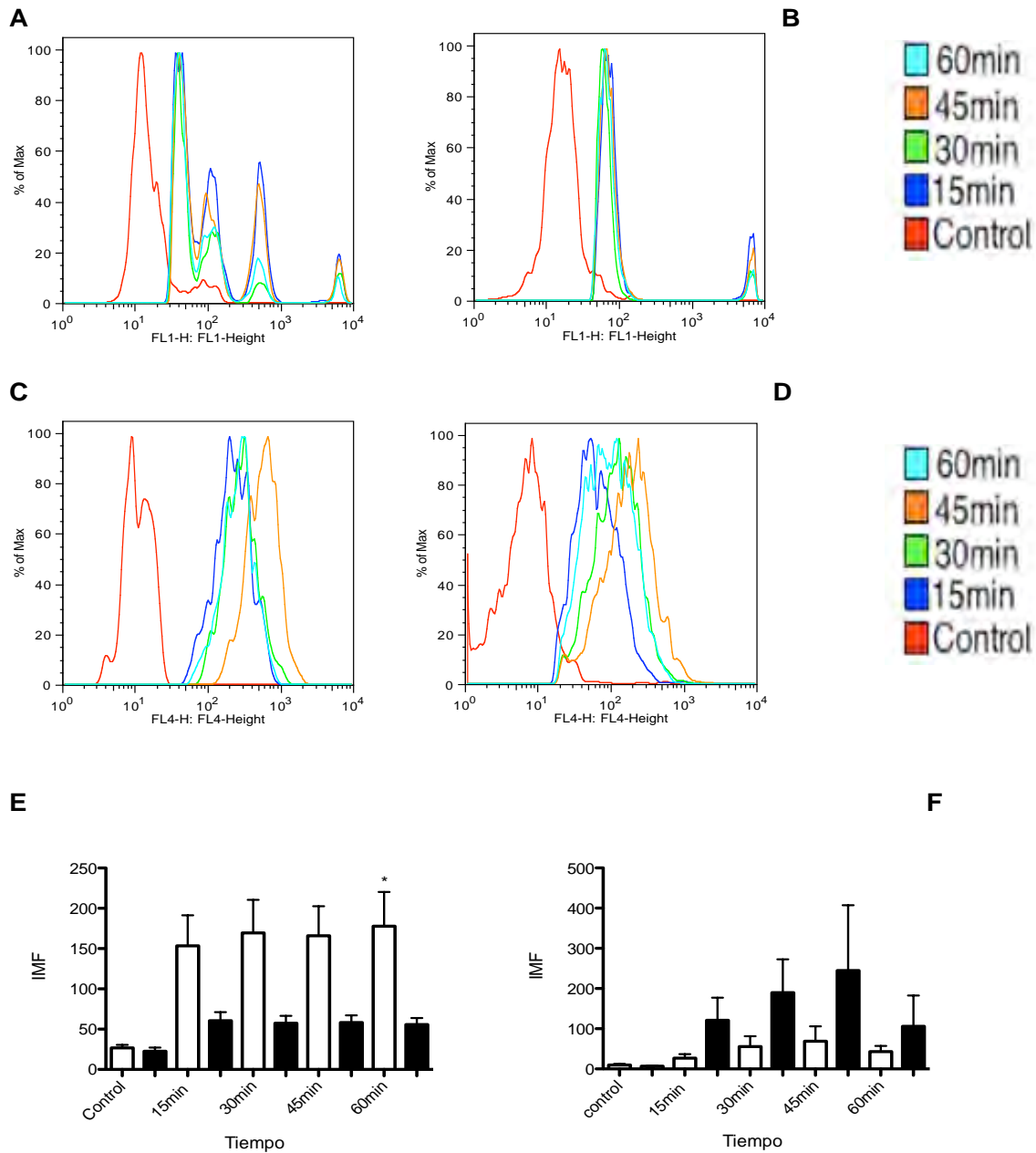


Figura 11. Comparación de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos que fagocitaron perlas de látex y OVA – Alexa. Histogramas que muestran la autofluorescencia, muestra control, (línea roja), fagocitosis a 15minutos (línea azul marino), 30minutos (línea verde), 45minutos (línea naranja) y a 60minutos (línea azul claro) de perlas de látex por granulocitos en tortuga juvenil (A) y tortuga adulta (B) y de OVA-Alexa en tortuga juvenil (C) y tortuga adulta (D). Gráficas de barras que representan los resultados como la media \pm error estándar de la intensidad media de fluorescencia en granulocitos que fagocitaron perlas de látex (E) y OVA-Alexa (F) a diferentes tiempos, la barra blanca representa a las tortugas adultas N=8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 *P< 0.05, **P< 0.01.

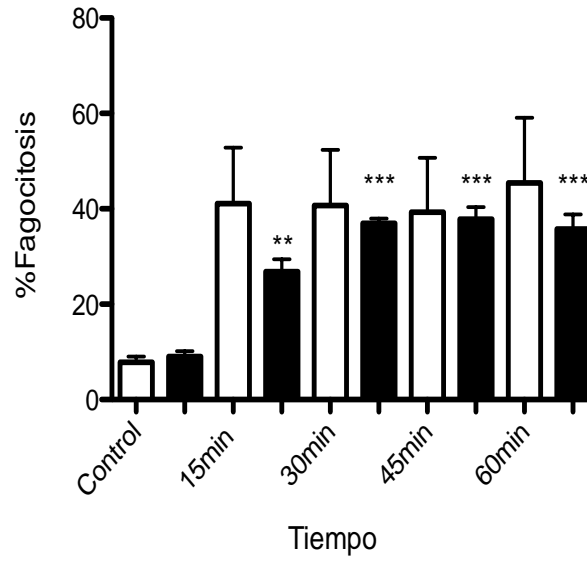
8.4.5. Porcentaje de fagocitosis en mononucleares con perlas de látex.

El porcentaje de fagocitosis en tortugas adultas tuvo un rango de 39% a 45%, donde el mayor porcentaje correspondió a las células incubadas durante 60 minutos a 37 °C, y en juveniles de 27% a 38%, donde el mayor porcentaje correspondió a las células incubadas durante 45 minutos a 37 °C. La diferencia fue significativa en todos los tiempos en comparación al control, aunque no existió diferencia significativa entre cada uno de los diferentes tiempos de fagocitosis, a pesar de que en las tortugas adultas se observó un mayor porcentaje de fagocitosis a los 60 minutos no es significativo comparado con el de 45 minutos (Figura 12).

8.4.6 Porcentaje de fagocitosis en mononucleares con OVA - Alexa.

El porcentaje de fagocitosis en tortugas adultas tuvo un rango de 14% a 22%, y en juveniles de 35 % a 46%, donde el mayor porcentaje correspondió a las células incubadas durante 45 minutos a 37 °C. La diferencia no fue significativa en tortugas adultas, sin embargo se aprecia una diferencia en la grafica con respecto al control, en tortugas juveniles también se aprecia una diferencia en comparación al control, solo que en este caso si hubo diferencia significativa a las 45 minutos (Figura 12).

A



B

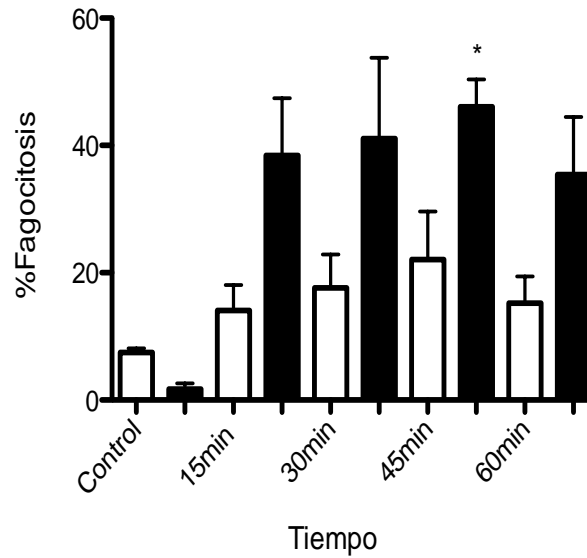


Figura 12. Gráficas de barras del porcentaje de fagocitosis en mononucleares. Los resultados se representan como la media \pm error estándar. Porcentaje de fagocitosis de perlas de látex a diferentes tiempos en mononucleares de tortuga (A), la barra blanca representa a las tortugas adultas N=8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 *P < 0.05. Porcentajes de fagocitosis de OVA - Alexa a diferentes tiempos, en mononucleares de tortuga (B). la barra blanca representa a las tortugas adultas N=8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 **P < 0.01, ***P < 0.001.

8.4.7. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares con perlas de látex.

Se compararon los histogramas monoparamétricos que muestran la expresión de la fluorescencia, en ellos podemos observar como existe una diferencia con respecto al control, sin embargo no se observó una marcada diferencia en la intensidad de fluorescencia entre los diferentes tiempos (Figura 13).

En la gráfica (Figura 13) que muestra la Intensidad media de fluorescencia, se observa una diferencia en los diferentes tiempos, en comparación al control.

8.4.8. Análisis de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares con OVA - Alexa.

En los histogramas podemos observar como existe una diferencia con respecto al control, sin embargo no se no se observó una marcada diferencia en la intensidad de fluorescencia entre los diferentes tiempos (figura13).

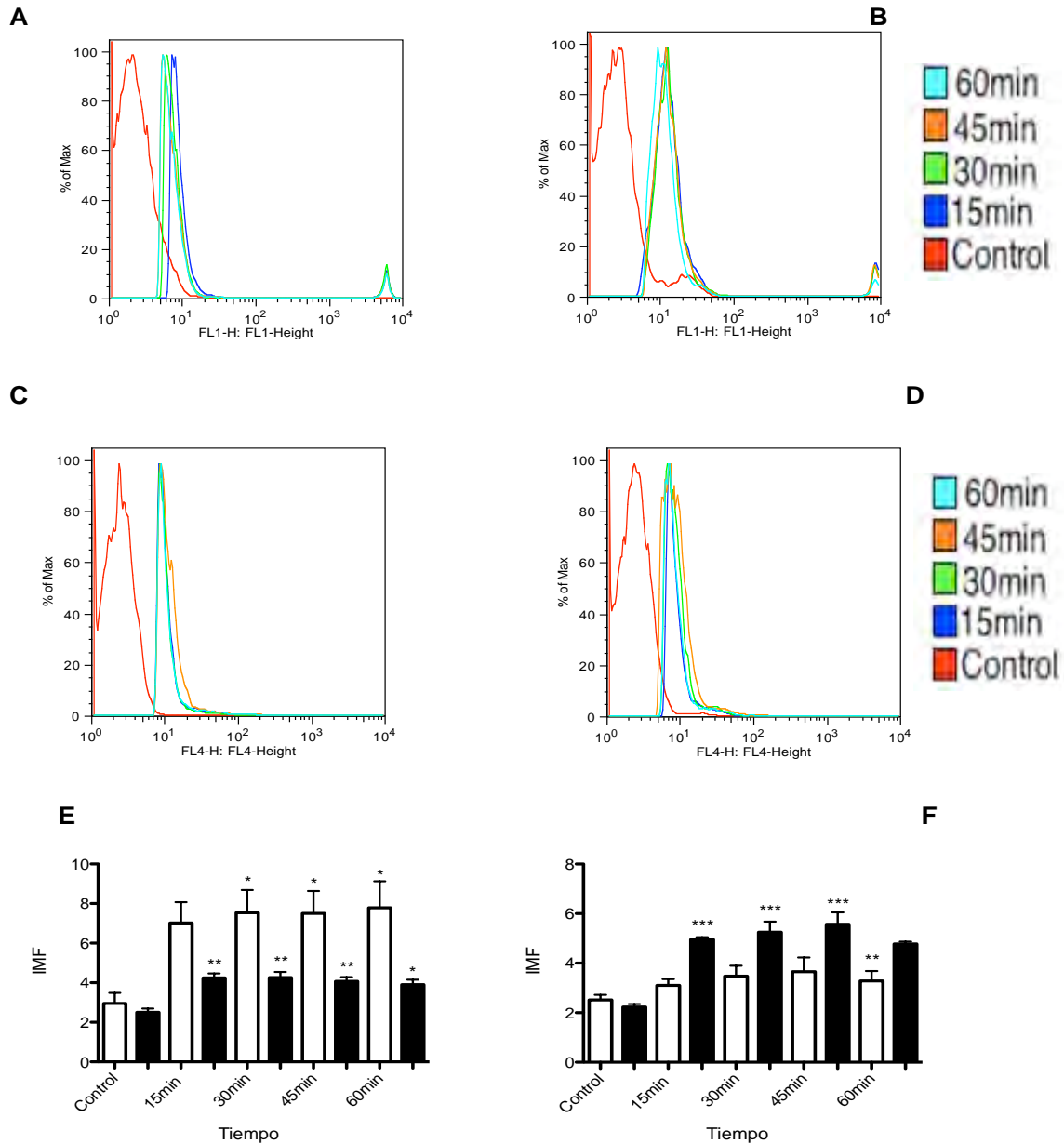


Figura 13. Comparación de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares que fagocitaron perlas de látex y OVA – Alexa. . Histogramas que muestran la autofluorescencia promedio, muestra control, (línea roja), fagocitosis a 15minutos (línea azul marino), 30minutos (línea verde), 45minutos (línea naranja) y a 60minutos (línea azul claro) de perlas de látex por mononucleares en tortuga juvenil (A) y tortuga adulta (B) y de OVA-Alexa en tortuga juvenil (C) y tortuga adulta (D). Gráficas de barras que representan los resultados como la media \pm error estándar de la intensidad media de fluorescencia en mononucleares que fagocitaron perlas de látex (E) y OVA-Alexa (F) a diferentes tiempos, la barra blanca representa a las tortugas adultas N=8 y la barra negra representa a las tortugas juveniles N=3 *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001.

9. Discusión.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran que las subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica de tortuga verde (*Chelonia mydas*), fueron eficientemente separadas mediante el uso de un gradiente de densidad de Percoll. La separación de leucocitos de sangre periférica con Percoll al 57% mostró dos capas, la primera conteniendo los granulocitos, y la segunda mononucleares, obteniéndose una pureza promedio del 90% y una viabilidad del 89.18% . Existen otros estudios donde se han reportado viabilidades mayores al 90% sin embargo, la viabilidad menor que se reporta en este ensayo probablemente se deba a las condiciones de transporte, almacenamiento y tiempo recorrido, desde la toma de muestra hasta la llegada al laboratorio donde fueron procesadas^{6,39,40}.

Por otra parte, el análisis por citometría de flujo reveló dos regiones bien definidas: una con elevada granularidad y tamaño variable y otra, con muy poca granularidad y de menor tamaño; las regiones de granulocitos y mononucleares, pudieron ser fácilmente identificadas en la gráfica de puntos utilizando una escala logarítmica para la granularidad.

Para confirmar que las regiones 1 y 2 identificadas en la grafica de puntos, realmente correspondieran a los granulocitos y mononucleares, se procedió a realizar la separación celular por medio de un citómetro de flujo y la técnica de citocentrifugación; Las características morfológicas de la región 1, caracterizadas por células redondas u ovals con un núcleo azul o morado, con gránulos fusiformes rosados en citoplasma, sus gránulos son muy alargados y son tan numerosos que desplazan el núcleo hacia la periferia, estas células fueron identificadas como heterófilos²⁴. Aunque en tortugas se han identificado diferentes tipos de granulocitos en sangre, además de los heterófilos, como son los eosinófilos y basófilos^{24,41}, los heterófilos son los mas abundantes.

En este estudio solo fueron identificados los heterófilos, posiblemente porque son por mucho, los granulocitos mas numerosos en las tortugas²⁴ y a la técnica utilizada que nos permitió separar las células obteniendo poblaciones con elevada pureza. En la segunda región las células se observaron de tamaño variable y de forma redonda, el

citoplasma se observó de color azul claro a violeta y fueron identificadas como linfocitos. Las células identificadas en cada región concuerdan con las características morfológicas descritas en diversos trabajos para heterófilos y linfocitos en reptiles^{24,28,41}.

Los heterófilos en los reptiles y aves son células con funciones homólogas a los neutrófilos de mamífero²⁸ y estos son de suma importancia en la respuesta inmune, por su participación en el proceso inflamatorio y fagocitosis⁶.

La fagocitosis es el proceso por el cual las células internalizan partículas grandes a partir de 0.5 μm de su entorno a través de vesículas llamadas fagosomas, este mecanismo es utilizado en una variedad de funciones celulares, que van desde la nutrición en la ameba *Dictyostelium discoideum* a la inmunidad innata y adaptativa en mamíferos⁴¹ y reptiles, es un mecanismo fundamental presente en todos los organismos, así que los defectos en este proceso llegan a producir grandes susceptibilidades a bacterias, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas efectivas que permiten evaluar la actividad fagocítica. En reptiles, la evaluación de la actividad fagocítica ha sido estudiada usando macrófagos peritoneales⁶ y melanomacrófagos hepáticos⁴³.

Los estudios de fagocitosis en macrófagos reptilianos han demostrado que los rangos de temperatura en la que hay una buena actividad fagocítica son mucho mayores que la de los macrófagos de mamífero, también mostraron que al rebasarse los 30 °C la función fagocítica disminuye drásticamente⁶.

La temperatura de confort del mar para la tortuga verde se encuentra entre los 28 °C y 30 °C, pero se sabe que puede tolerar temperaturas ambientales cercanas a los 40°C, temperaturas mayores causan estrés en la tortuga blanca².

El porcentaje de fagocitosis en granulocitos con perlas de látex tuvo un comportamiento similar en tortugas adultas y juveniles, a pesar de que no existió una diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fagocitosis, pudimos observar que a los 60 minutos la actividad fagocítica comenzó a decrecer, sin embargo a los 15 minutos se presenta el mayor porcentaje de fagocitosis. La intensidad media de fluorescencia en las tortugas adultas tiene mayor expresión que en las tortugas

juveniles, por lo cual se podría inferir que las tortugas adultas tienen capacidad de ingerir un mayor número de perlas de látex por célula en comparación a los heterófilos de tortugas juveniles que ingieren un menor número de perlas de látex por célula; a pesar de que no existen estudios en reptiles donde se compare la actividad del sistema inmune en individuos juveniles y adultos, es conocido que los animales jóvenes son más susceptibles a las infecciones, debido a la inmadurez del sistema inmune⁴³. En humanos se ha reportado que los neutrófilos de individuos muy jóvenes muestran una disminución en la capacidad de migración y en el número de glicoproteínas de adhesión de superficie, al igual que gran rigidez celular, disminución en la contractilidad de los microfilamentos y menor actividad microbicida en comparación de individuos adultos⁴⁴. Se puede suponer que la diferencia entre la expresión de fluorescencia de tortugas adultas y juveniles represente las diferencias en el grado de madurez en la actividad fagocítica, aunque es necesario hacer más estudios que nos confirmen este hecho.

No existió diferencia significativa entre los diferentes tiempos en la intensidad media de fluorescencia en leucocitos de tortugas juveniles; mientras que en tortugas adultas a los 60 minutos de tiempo de incubación fue significativa la diferencia en comparación al control; sin embargo esta diferencia no es significativa en comparación a 15 minutos de tiempo de incubación, por lo que podemos concluir que el tiempo óptimo de incubación a 37 °C para este ensayo fue de 15 minutos.

La macropinocitosis es un proceso celular clave responsable de la absorción de líquido extracelular y de macromoléculas, está involucrada en numerosos procesos como la absorción de nutrientes y virus⁴⁴.

La OVA (ovoalbúmina) debido a su bajo peso molecular y a su pequeño tamaño es un modelo que se internaliza por macropinocitosis, ésta no requiere la participación de receptores celulares específicos, aunque recientemente se ha demostrado que el receptor de manosa (MR) puede intervenir en la endocitosis de OVA permitiendo su internalización y procesamiento para la presentación en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a linfocitos T CD8 +⁴⁶.

El porcentaje de internalización de OVA-Alexa fue mucho mayor en los granulocitos de tortugas juveniles que en individuos adultos, la intensidad media de fluorescencia en tortugas juveniles fue mayor en todos los tiempos comparada con la de las tortugas adultas, en ambos grupos se aprecia una diferencia entre el control y los diferentes tiempos de incubación siendo 45 minutos el tiempo en el cual se registro la mayor intensidad en ambos grupos, por lo que podemos concluir que el tiempo óptimo de incubación a 37 °C para este ensayo es de 45 minutos.

Se sabe que en mamíferos la fagocitosis es llevada a cabo por células especializadas como macrófagos, monocitos y neutrófilos, en reptiles también sabemos que existen células específicas para este fin como heterófilos, melanomacrófagos, monocitos y macrófagos,^{6,23,42,47} también es conocido que los linfocitos de mamíferos no tienen la habilidad de fagocitar, aunque se ha propuesto que existe una relación de desarrollo entre los linfocitos B-1 y los macrófagos de mamíferos, lo que ha llevado a la hipótesis de que los linfocitos B-1 y macrófagos tienen una relación evolutiva por la cual ambos tipos celulares habrían derivado de una célula ancestral común con propiedades funcionales fagocíticas. Esta idea ha sido apoyada por la reciente identificación de linfocitos B fagocíticos, tanto en peces, como en anfibios y reptiles^{47,48}.

Debido a este fenómeno, se analizó también la actividad fagocítica en la región correspondiente a células mononucleares, que comprende principalmente linfocitos y determinar si existe alguna actividad fagocítica de esta población celular. Los datos obtenidos nos indican que los linfocitos si tuvieron actividad fagocítica y que el porcentaje de fagocitosis en mononucleares con perlas de látex en individuos adultos es mayor que en juveniles, al igual que la intensidad media de fluorescencia, el tiempo óptimo para este ensayo fue de 45 minutos de incubación a 37 °C. En los ensayos realizados con OVA-Alexa el mayor porcentaje de fagocitosis correspondió a las tortugas juveniles, la intensidad media de fluorescencia también fue mayor en tortugas juveniles, lo cual fue similar a la actividad reportada con OVA-Alexa en granulocitos; el tiempo optimo para este ensayo también fue de 45 minutos de incubación a 37 °C.

Los resultados nos sugieren que algunos linfocitos presentan actividad fagocítica en la tortuga verde, sin embargo, queda pendiente determinar si la actividad fagocítica se presenta en los linfocitos en general, o es únicamente en la subpoblación de linfocitos B-1, como Zimmerman (2009) lo ha reportado⁴⁸. Este hecho nos habla de la importancia de la inmunología comparada en estos organismos, una mayor comprensión nos daría pistas importantes sobre la historia evolutiva de la inmunidad de los vertebrados.

Está claro que existe un amplio campo de investigación para una mejor comprensión acerca de los mecanismos de inmunidad en los reptiles y en particular, en la tortuga marina, especie en grave peligro de extinción, no solo por factores ocasionados por el ser humano sino también por la presencia de enfermedades e infecciones las cuales afectan su salud, provocando eventos de elevada mortalidad en vida libre y cautiverio, por esta razón es necesario desarrollar nuevas técnicas que nos permitan un mejor diagnóstico, para implementar mejores estrategias de manejo y conservación para así poder apoyar los esfuerzos de protección de las tortugas marinas.

10. Conclusiones.

1. La separación y purificación de leucocitos de sangre periférica de tortuga *Chelonia mydas* utilizando Percoll al 57% mostró ser eficiente.

2. La identificación de subpoblaciones celulares por medio de un proceso de separación celular en el citómetro de flujo y la identificación por microscopía óptica, mostró ser un método efectivo para confirmar las subpoblaciones seleccionadas en la gráfica de puntos.

3. El análisis por citometría de flujo para evaluar los ensayos de fagocitosis utilizando ovoalbúmina y perlas de látex fluorescentes, demostró ser funcional.

4. El tiempo óptimo para el ensayo de fagocitosis con perlas de látex fluorescentes a 37 °C de incubación fue de 15 minutos y para el ensayo de fagocitosis con OVA-Alexa a 37 °C de incubación fue de 45 minutos.

5. Se mostró la existencia de actividad fagocítica en linfocitos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*).

6. La actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos de tortuga verde (*Chelonia mydas*) si puede ser evaluada adecuadamente por medio de citometría de flujo, quedando pendiente analizar esta misma actividad con microorganismos como podrían ser bacterias.

7. La citometría de flujo demostró ser una herramienta con gran potencial para ser utilizada en futuros estudios para evaluar la respuesta inmune en las tortugas marinas.

11. Perspectivas.

Se sabe que aun falta mucha información con respecto a los mecanismos y células que componen al sistema inmune del reptil, pero con esta investigación se abren amplias perspectivas para el uso de la citometría de flujo en el desarrollo de nuevas técnicas que podrán ser aplicadas no solo en la investigación de las diversas patologías que afectan a la tortuga marina, sino también en la identificación de otras células del sistema inmune. Así mismo es necesario continuar con la investigación para determinar nuevas formas de diagnóstico que nos permitan un mayor conocimiento de los mecanismos de defensa utilizados en esta especie, esto nos permitirá obtener un mayor entendimiento, para así poder lograr la disminución de la morbilidad y mortalidad asociada a las enfermedades prevalentes que afectan no solo a la tortuga marina, sino a todos los reptiles cautivos, lo cual refleja la fragilidad del sistema inmune reptiliano en condiciones diferentes a las de su medio natural. Es necesario y justo que se realicen los máximos esfuerzos para ayudar a la recuperación de estas especies, ya que el ser humano se ha encargado de aniquilar gran cantidad de estas generando así una amenaza a la estabilidad de los ecosistemas del planeta.



12. Referencias bibliográficas.

1. Salinas DC. Inmunología veterinaria aplicada a efectos del cautiverio en el sistema inmune de reptiles (tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM 2003.
2. Pritchard P.C.H. Evolution, phylogeny, and current status. In: P. L. Lutz y J. A. Musick (eds.). *The Biology of Sea Turtles* CRC Press 1997; New York 128.
3. Karl S.A., Bowen B.W. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: Molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology* 1999; 13: 990-999.
4. Ren H. Oldest known sea turtle. *Nature* 1998 ; 392: 705-708.
5. Bowen B. and Karl S.A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* 2007; 16: 4886–4907.
6. Muñoz T.F. Estudios inmunológicos en tortugas blancas cautivas *Chelonia mydas* con dermatitis ulcerativa (tesis doctorado). México DF. México: Instituto Politécnico Nacional 2007.
7. Pleguezuelos J.M, Márquez R., Lizana M. Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España, Editores científicos, Organismo Autónomo de Parques Nacionales 2004; Madrid 347-358.
8. Fanjul M.L, Miriart M., Fernández F.M. *Biología funcional de los animales*. 1a ed. Siglo Veintiuno, 1998; México 517-520.
9. Lutz P.L., Musick J.A., Wyneken J. *The biology of sea turtles volume II*. 2nd ed. CRC Press, 2003; U.S 39-79.
10. Wyneken J. *La Anatomía de las Tortugas Marinas*. NOAA Technical Memorandum, National Marine Fisheries Service, 2004; USA 105-146.
11. Huerta P., Vasconcelos D., Ocampo E., Tavera A., Ángeles M. *Manual de Técnicas de Protección de Tortugas Marinas*. Kutzari, Asociación para el Estudio y Conservación de las Tortugas Marinas, A.C. Fondo Internacional para la Protección de los Animales y su Hábitat (IFAW), World Wildlife Fund (WWF), 2006; México 6-11.

12. Frazier J. Generalidades de la Historia de Vida de las Tortugas Marinas. "Conservación de tortugas marinas en la región del Gran Caribe, un diálogo para el manejo regional efectivo", 1999; Santo Domingo 16-18.
13. Márquez R. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica, 2002; México 147-197.
Disponibile en URL: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/144/html/tortugas.htm>
14. Instituto Nacional de Ecología. Análisis y diagnóstico, 2007 México.
Disponibile en URL: <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/187/03.html>
15. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana -NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental, Especies nativas de México de flora y fauna silvestres, Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio, Lista de especies en riesgo, 3 de julio de 2000; México.
16. Convención sobre el Comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Secretaria de CITES; serie en línea 18 de junio de 2001. Citado el 1 de Septiembre de 2008. Disponible en URL: www.cites.org.
17. Eckert K.L., Bjorndal K.A., Abreu – Grobois F.A., Donnelly M., Perran J.R. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. La crianza y reproducción en cautiverio de tortugas marinas: Una evaluación de su uso como estrategia de conservación, UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación No. 4, U.S 2000; 225-246.
18. Gámez V.S., García M.L.G., Osorio S.D., Vázquez G.J.L., Constantino C.F. Patología de las tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*) que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México. Vet. Méx. 2009; 40-41.
19. Orós J.K., Jacobson E.R., Brown D.R., Torrent A., Tucker S., and Klein P.A. Fibropapilomas cutáneos y fibromas viscerales en una tortuga verde (*Chelonia mydas*) Rev. Esp. Herp. 1999; 13:17-26.

20. Muñoz T.F. Evaluación inmunológica de tortugas blancas (*Chelonia mydas*) cautivas con dermatitis ulcerativa (tesis maestría). México D.F. México:Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM 2003.
21. Haines H.G. A herpesvirus disease of green sea turtles in aquaculture. *Marine Fisheries Review* March 1978: 33-37.
22. Muñoz T.F. Inmunología de los reptiles. *AMMVEPE* 2001;12 (2): 57-60.
23. Work T.M., Raskin R.E., Balazs G.H., Whittaker S.D. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *Am J VetRes.* 1998;59:1252–1257.
24. Montilla A.J.F., Hernández J.L.R., Alvarado M.C.A. Valores Hematológicos de la Tortuga Verde (*Chelonia mydas*) presente en la Alta Guajira. *Rev. Cient. (Maracaibo)* 2006; vol.16, no.3 219-226.
25. Wei Z., et al. Expression of IgM, IgD, and IgY in a reptile, *Anolis carolinensis*. *The Journal of Immunology*, 2009;183: 3858-3864.
26. Xu Z., Wang G.L., Nie P. IgM, IgD and IgY and their expression pattern in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Molecular Immunology* Volume 46, June 2009; 2124-2132.
27. Work T.M., Balazs G.H., Rameyer R.A., Chang S.P., Berestecky J. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2000; 179-194
28. Work T.M., Balazs G.H., Wolcott M., Morris R. Bacteremia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Diseases of aquatic organisms* 2003; 53: 41-46.
29. Rojas W.M. Inmunología 13ªed. Medellín Colombia, Corporación para investigaciones biológicas (CPB) 2004; 67-78.
30. Rojas O.E. Inmunología (de memoria). 3ª ed. México: Editorial Medica Panamericana 2006; 27-47.
31. Delves P., Roitt I.M. The Immune System. *New England Journal Med* 2000; 343: 37-49.

32. Olivera L.W., Moura W.L., Matushima E.R., Egami M.I. Características citoquímicas morfológicas y ultra estructurales de eosinófilos de *Caiman crocodilus yacare*. Rev. Chilena de Anatomía. 1998; 16(2): 245-254.
33. Rojas E.O., Arce P.P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias, segunda parte. Bioquímica 2004; 29: 8-31.
34. Rojas E.O., Arce P.P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias, Primera parte. Bioquímica 2003; 28:19-28.
35. Genova R., Bertotto A., Raimondi A., Colombo A., Gasparoni M. Evaluation of the phagocytic activity of the neutrophil granulocytes (NTB-test) and the blood immunoglobulin level in splenectomized subjects with beta-thalassemia. *Pediatrics (Napoli)*.1975; 83(1):60-9.
36. García M.O.H., Pereira R.N., Flores S.R.M. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. Rev Cubana Investigación Biomédica 1998;17(3):190-7.
37. Barrera L.M.R., Drago M.E.S., Pérez J.L., Zamora A.C., Gómez F.A., Sainz E., Mendoza F.P. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2004; N.1 vol 7, 42-55.
38. Lehmann A.K., Steinar S., Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243: 229-242.
39. Muñoz F.A., et al. Identification of CD3 + T lymphocytes in the green turtle *Chelonia mydas*. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2009; vol 131, 211-217.
40. Rossi S., et al. Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae) 2009; *Braz. J. Biol.*, 69(3): 899-905.
41. Pitol D.L., Issa J. P.M., Caetano F.H., Lunardi L.O. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynos hylarri*). *Int. J. Morphol*, 2007; 25(4):677-682.
42. Desjardins M., Houde M., Gagnon E. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity *Immunological Reviews* 2005; Vol. 207: 158–165 .

43. Johnson J.C., Schwiesow T., Ekwall A.K., Christiansen J.L. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Res* 1999; 12: 376-382.
44. Penagos M.J.P., Pérez R.D.B., García M.L.C., Benítez J.M.Z. El sistema inmune del recién nacido. 2003, Colegio Mexicano de Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica, A.C. Vol. 12, Núm. 2: 63-68.
45. Dubielecka P.M., Cui P., Xiong X., Hossain S., Heck S., et al. Differential Regulation of Macropinocytosis by Abi1/Hssh3bp1 Isoforms. 2010 *PlosOne* 5(5): e10430. doi:10.1371/journal.pone.0010430.
46. Burgdorf, et al. Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in CD4 and CD8 T Cell Activation. 2007; *Science* 612-616.
47. Li J., et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 2006; vol 7, number 10 116-1124.
48. Zimmerman L.M., Vogel L.A., Edwards K.A., Bowden R.M. Phagocytic B cells in a reptile. *Biol. Lett.* 2009; vol 6 120-123.