

01674
23



Universidad Nacional Autónoma
de México

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE TORTUGAS
BLANCAS (*Chelonia mydas*) CAUTIVAS
CON DERMATITIS ULCERATIVA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

FERNANDO ALBERTO MUÑOZ TENERÍA

TUTOR: DR. SERGIO ESTRADA PARRA

COMITÉ TUTORAL: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

C.D. UNIVERSITARIA, D.F.

2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi madre, quien con su ejemplo y apoyo incondicional, me ha dado la fuerza para seguir adelante en mi superación personal y profesional, ayudándome así a alcanzar una meta más en mi vida.

A Isabel, que permanece siempre a mi lado, compartiendo sacrificio y esfuerzo, y a quien debo la felicidad de una nueva vida nacida de nuestro amor.

A Paola, quien ha sido una razón de alegría en mi vida.

A todos mis hermanos, siempre presentes en mi pensamiento.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo según:
NOMBRE: Fernando Alberto
Munoz Tenorio
FECHA: 1 Julio 2003
FIRMA: [Firma]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo y colaboración entusiasta de diversas personas pertenecientes a instituciones académicas, privadas y extranjeras, quienes unieron esfuerzos con un solo objetivo: ayudar en la lucha tenaz contra la desaparición de las especies animales, víctimas silenciosas del ser humano.

Al Dr. Sergio Estrada Parra, por su dirección y apoyo incondicional a todo aquel que como yo, buscamos su ayuda y experiencia invaluable.

Al Dr. Andrés Romero Rojas por su codirección y asistencia, sin la cual no habría sido posible concluir este trabajo.

A mis Sinodales, Dr. Abel Ciprian Carrasco, Dra. Susana E. Mendoza Elvira y Dr. Fernando García Tamayo, por su valiosa asesoría y comentarios para llevar a buen término este trabajo.

Al Dr. Thierry Martin Work, quien con su gran experiencia en tortugas marinas, me ha brindado ayuda incondicional y apoyo en todo momento, para continuar mi desarrollo personal y profesional.

A la MVZ Adriana D'amiano por su apoyo fundamental en el trabajo de campo y su valiosa amistad

Al MVZ Erik González Ballesteros, persona insustituible en este trabajo y amigo incondicional

Al QFB Juan Carlos Flores por su asesoría técnica en purificación de anticuerpos y valioso apoyo en el trabajo de laboratorio

Al Tec. Alejandro Arenas Martínez, por su valiosa amistad y las facilidades otorgadas dentro del parque Xcaret

Al MVZ Héctor Villaseñor Gaona por su amistad sincera y asistencia técnica en el trabajo histológico

Al MVZ Eduardo Cárdenas Pérez, mi mejor amigo y persona fundamental en mi vida personal y profesional

Al parque Xcaret por su apoyo logístico en el trabajo de campo, especialmente al personal de tortugas marinas y campamentos tortugeros

A todo el personal del laboratorio 8 que de una u otra manera colaboró para la realización de este trabajo

Contenido

	Página
Resumen	I
1. Introducción	1
1.1 Evolución y Clasificación actual de las tortugas marinas	1
1.2 Estatus Legal	1
1.3 Tortuga Blanca (<i>Chelonia mydas</i>)	3
1.3.1 Biología General	3
1.3.2 Inmunología	5
1.3.2.1 Antecedentes	5
1.3.2.2 Estructura del sistema inmune	6
1.3.2.3 Factores que modulan la respuesta inmune	14
1.4 Antecedentes	17
1.4.1 Estrategias de conservación	17
1.4.2 Sistemas de cría en cautiverio	18
1.4.3 Enfermedades asociadas a la cría en cautiverio	19
1.4.4 Programa de conservación de tortugas marinas de Xcaret	22
1.5 Justificación	24
1.6 Hipótesis	24
2. Objetivo General	25
2.1 Objetivos Particulares	25
3. Material y Métodos	26
3.1 Sitio de estudio	26
3.2 Animales de estudio	26
3.3 Histopatología	28
3.4 Hemograma	28
3.5 Cuantificación de inmunoglobulinas (Igs) totales por ELISA indirecta	29
3.5.1 Purificación de Inmunoglobulinas de tortuga <i>Chelonia mydas</i>	29
3.5.1.1 Precipitación de inmunoglobulinas	29
3.5.1.2 Purificación de Igs por cromatografía líquida	29
3.5.1.3 Preparación de anticuerpos IgG anti-Ig de tortuga	30
3.5.1.4 Titulación de anticuerpos IgG de cabra anti-Ig de tortuga	31
3.5.2 Cuantificación de Igs totales de tortugas <i>Chelonia mydas</i>	31
3.5.2.1 Optimización de reactivos	31
3.5.2.2 Optimización de conjugado	31
3.5.2.3 Optimización de plasma de tortuga e IgG anti-Ig de tortuga	32

4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.5.2.4 Cuantificación de Ig totales de tortuga en plasma por ELISA indirecta	32
3.6 Medición de la inmunidad celular por pruebas de hipersensibilidad retardada	33
3.6.1 Estandarización de la técnica	33
3.6.2 Medición basal de la piel	33
3.6.3 Inoculación	34
3.6.4 Medición de la reacción intradérmica	34
3.6.5 Histología de la prueba de hipersensibilidad retardada	34
3.7 Cuantificación de corticosterona plasmática	36
3.8 Análisis estadístico	36
4. Resultados	37
4.1 Animales de estudio	37
4.2 Histopatología	37
4.3 Hemograma	37
4.4 Cuantificación de Ig totales de tortuga utilizando la técnica de ELISA indirecta	43
4.5 Medición de la inmunidad celular por pruebas de hipersensibilidad retardada	47
4.6 Cuantificación de Corticosterona plasmática	47
5. Discusión	51
6. Conclusiones	57
7. Literatura citada	58

	Página
Lista de cuadros	
Cuadro 1. Posición de las tortugas marinas dentro de los reptiles	2
Cuadro 2. Distribución actual de las tortugas marinas en México	2
Cuadro 3. Comparación de pesos y medidas	38
Cuadro 4. Comparación de leucocitos totales y relación heterófilo linfocito	42
Cuadro 5. Comparación de microgramos/ml de Ig totales detectadas en plasma por ELISA Indirecta	42
Cuadro 6. ng/ml de corticosterona medidos por ELISA de competición	49

Lista de figuras	
Figura 1. Ciclo de vida de la tortuga blanca	4
Figura 2. Comparación estructural de IgY e IgY 5.7S con la IgG	4
Figura 3. Localización geográfica del parque Xcaret en el estado de Quintana Roo	27
Figura 4. Dermatitis ulcerativa en región del cuello.	27
Figura 5. Estanque de concreto con flujo continuo de agua	35
Figura 6. Inoculación intradérmica de PHA en la región de la cloaca	35
Figura 7. Histopatología tinción hematoxilina – eosina	40
Figura 8. Histopatología tinción de Gram	40
Figura 9. Morfología de leucocitos de sangre periférica	41
Figura 10. SDS-PAGE de inmunoglobulinas de tortuga <i>Chelonia mydas</i>	44
Figura 11A y 11B. Histología de biopsias inoculadas con PHA tinción Hematoxilina–Eosina	50
Figura 12. Histología de biopsias inoculadas con PHA tinción de Giemsa	50

Lista de Gráficas	
Gráfica 1. Comparación morfométrica entre sanas y enfermas	38
Gráfica 2. Comparación de pesos entre sanas y enfermas	39
Gráfica 3. Comparación de leucocitos totales entre sanas y enfermas	39
Gráfica 4. Comparación de la relación heterófilo/linfocito	42
Gráfica 5. Purificación en cromatografía líquida de anticuerpos de tortuga <i>Chelonia mydas</i>	44
Gráfica 6. Purificación en cromatografía líquida de anticuerpos de cabra	45
Gráfica 7. Titulación de IgG de cabra anti-Ig de tortuga	45
Gráfica 8. Curva estándar de Inmunoglobulinas purificadas de tortuga <i>Chelonia mydas</i>	46
Gráfica 9. Comparación de inmunoglobulinas totales	46
Gráfica 10. Estandarización de la prueba de hipersensibilidad retardada	48
Gráfica 5. Comparación de respuesta a la fitohemaglutinina	49

6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

Actualmente existen 6 géneros y 8 especies de tortugas marinas, 7 de las cuales anidan en México y todas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. La dermatitis ulcerativa es muy común y altamente prevalente en las tortugas marinas mantenidas en cautiverio. Para evaluar el funcionamiento del sistema inmune de tortugas blancas (*Chelonia mydas*) cautivas, enfermas con dermatitis ulcerativa, fueron seleccionadas 15 tortugas pertenecientes al programa de conservación de Xcaret de esta especie. Ambos grupos de tortugas de 13 meses de edad y sexo indeterminado, fueron marcadas con placa metálica, pesadas, medidas y divididas en 2 grupos: siete tortugas clínicamente sanas y ocho tortugas con dermatitis ulcerativa evidente. En cada grupo se determinó el perfil inmunológico analizando los cambios histopatológicos, el leucograma con diferencial, la relación heterófilo/linfocito, la cuantificación de anticuerpos totales, la inmunidad celular por respuesta de hipersensibilidad retardada a la fitohemaglutinina (PHA) y la cuantificación de corticosterona plasmática. De acuerdo a los resultados obtenidos, las tortugas afectadas con dermatitis ulcerativa están crónicamente estresadas e inmunosuprimidas a nivel de inmunidad celular, la cual al parecer es debida, a un estado de anérgia en los linfocitos T de la piel. Esta inmunosupresión y la gran prevalencia de la dermatitis ulcerativa puede ser un factor desencadenante de los grandes brotes de mortalidades agudas, como los observados a lo largo de los ciclos del programa de conservación de Xcaret, por lo que un campo para la aplicación de la inmunoterapia como tratamiento alternativo, queda abierto con grandes posibilidades de éxito. Aun es necesario estudiar con mayor profundidad otros aspectos inmunológicos de las tortugas marinas y desarrollar mejores técnicas de laboratorio, que superen las dificultades que presentan las especies silvestres no mamíferas.

Palabras claves: *Chelonia mydas*, dermatitis ulcerativa, cautiverio, hipersensibilidad retardada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Evolución y clasificación actual de las tortugas marinas.

Los reptiles son vertebrados poiquilotermos, es decir, carecen de la habilidad para regular la producción sostenida de calor metabólico y por lo tanto de una temperatura constante. Debido a esto, su temperatura cambia con la temperatura de su medio ambiente, dependiendo así de una fuente de calor externo. Entre las especies reptilianas amenazadas de extinción más importantes se encuentran las tortugas marinas (Cuadro 1).

Las tortugas marinas tienen una larga historia evolutiva de aproximadamente 200 millones de años, apareciendo y diversificándose en el periodo Triásico de la era Mesozoica. Las primeras tortugas tuvieron un origen terrestre y posteriormente se extendieron al medio acuático y marino. Actualmente existen alrededor de 75 Géneros y aproximadamente 250 especies de tortugas marinas, terrestres y acuáticas de las cuales solo 6 Géneros y 8 especies son marinas, 7 de las cuales anidan en México y todas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Cuadro 2) (Pritchard, 1997; Hirayam, 1998; Marquez, 1996).

1.2 Estatus Legal

El departamento del interior de los Estados Unidos, bajo la autoridad del Acta de las Especies Amenazadas (aplicada de manera internacional) actualmente incluye a las especies *Chelonia mydas* (en peligro de extinción en Florida y el pacífico mexicano) y *Caretta caretta* como amenazadas. Las especies *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempi* y *Dermochelys coriacea* son listadas como especies en peligro de extinción.

La Convención de Comercio Internacional sobre Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna (Convention International Trade Endangerous Species, CITES, por sus siglas en inglés) incluye a todas las tortugas marinas en su Apéndice I (Prohibición del comercio internacional de o para los países firmantes).

Cuadro 1. Posición de las tortugas marinas dentro de los reptiles

CLASE REPTILIA	
ORDEN	Especies representativas
Squamata	Serpientes y lagartos
Chelonia	Tortugas marinas, terrestres y acuáticas
Sphenodontia	Tuatara
Crocodylia	Cocodrilos, caimanes y gaviales

Cuadro 2. Distribución actual de las tortugas marinas en México (tomado de Márquez, 1996).

Género	Especie	Subespecies	Nombre común	Distribución
<i>Carreta</i>	<i>Carreta</i>	<i>Carreta</i>	Caguama	Golfo de México, Mar Caribe
<i>Carreta</i>	<i>Carreta</i>	<i>Gigas</i>	Perica	Océano Pacífico
<i>Chelonia</i>	<i>Mydas</i>	-	Blanca	Golfo de México y Mar Caribe
<i>Chelonia</i>	<i>agassizzi</i>	-	Prieta	Océano Pacífico
<i>Eretmochelys</i>	<i>imbricata</i>	<i>Imbricata</i>	Carey	Golfo de México y Mar Caribe
<i>Eretmochelys</i>	<i>imbricata</i>	<i>Bissa</i>	Carey	Océano Pacífico
<i>Lepidochelys</i>	<i>Kempii</i>	-	Lora	Golfo de México y Mar Caribe
<i>Lepidochelys</i>	<i>Olivacea</i>	-	Golfina	Océano Pacífico
<i>Dermochelys</i>	<i>Coriacea</i>	-	Laúd	Océano Pacífico

En México, todas las especies de tortugas marinas fueron declaradas en veda total y permanente por medio del decreto presidencial publicado en el Diario Oficial de la Federación el 31 de Mayo de 1990.

1.3 Tortuga Blanca (*Chelonia mydas*).

1.3.1 Biología general

La Tortuga Blanca (*Chelonia mydas*) se distribuye por todos los mares tropicales y subtropicales del mundo, habitando principalmente en aguas someras continentales e insulares y es una de las 7 especies que anidan en las playas mexicanas.

Las crías son de color café oscuro o casi negro en el carapacho y ventralmente son blancas. Los adultos tienen el carapacho en forma oval, la cabeza relativamente pequeña y chata. Presenta pico aserrado. Cada aleta tiene una uña visible. Es la más grande de las tortugas marinas de concha dura. Los adultos dorsalmente varían del verde al gris y café, y ventralmente son color crema o blancas. La tortuga blanca alcanza casi un metro de longitud promedio del carapacho y llega a pesar entre 70 y 230 kg, alcanzando su madurez sexual entre los 16 y los 20 años.

En su etapa de cría y juvenil son de hábitos alimenticios carnívoros, pero al llegar a su etapa adulta, cambian a hábitos herbívoros, alimentándose durante el día, principalmente de algas y pasto marino, aunque un pequeño porcentaje (2%) de su dieta consiste de crustáceos y moluscos. Las hembras adultas regresan a su playa de origen y salen a depositar sus huevos. La temporada de anidación en el golfo de México y mar Caribe ocurre entre los meses de mayo a octubre. El periodo de mayor abundancia es entre junio y septiembre, el ciclo reproductivo individual se repite generalmente cada dos o tres años. El arribo de las tortugas a las playas de anidación ocurre durante la noche, pueden anidar de una a tres veces en la misma temporada con intervalos de 12 a 14 días, poniendo en cada ocasión, alrededor de 100 huevos, los cuales eclosionan a partir de los 45 días. Solo una de cada 200 tortuguitas alcanzará la edad adulta y probablemente se reproducirá (Figura 1) (Pritchard, 1997; Márquez, 1996; Bowen *et al*, 1992).

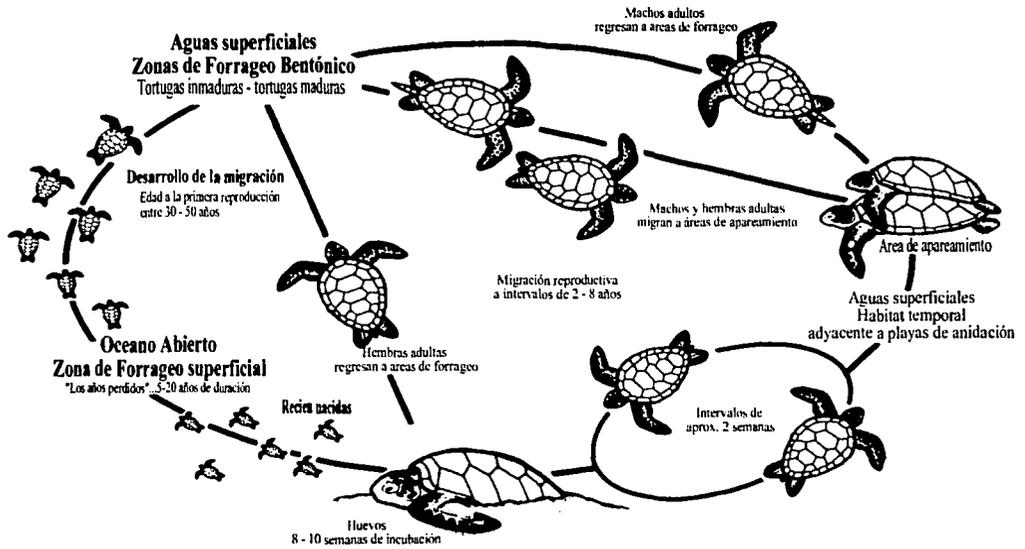


Figura 1. Ciclo de vida de la tortuga blanca (tomado de Meter L. Lutz, *Biology of sea turtle*, 1997).

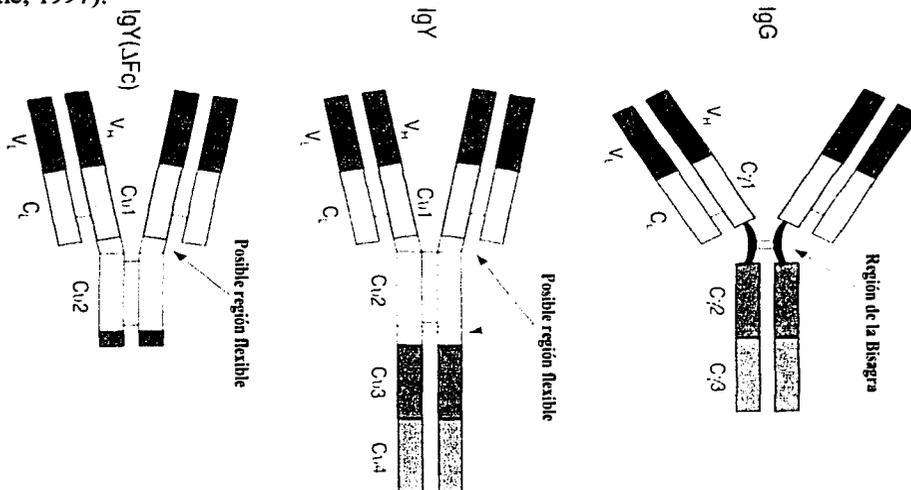


Figura 2. Comparación estructural de IgY e IgY 5.7S con la IgG (tomado de Warr *et al*, 1995).

En México la anidación se distribuye desde Tamaulipas hasta Quintana Roo. Entre estas se incluyen Rancho nuevo y Tampico el alto, Tamaulipas; Tuxpan, Veracruz; Cayo Arenas, Cayo Arcas y Arrecife triángulos entre Isla Aguada y Sabancuy, en Campeche; Ria Lagartos y Coloradas en Yucatán e Isla Mujeres, Cozumel y las playas que van desde Tulum hasta Chetumal, en Quintana Roo.

Las más importantes zonas de anidación se encuentran en el Caribe. Algunas playas importantes son isla Aguada, Ría Lagartos, Cozumel, Xcacel y Mahahual, aunque las áreas de mayor abundancia son las tres primeras. Las tortugas adultas son depredadas principalmente por los tiburones. Los huevos por zorrillos, puercos, perros, cangrejos, hormigas, larvas de mosca y humanos; y las crías son depredadas por zorrillos, perros, cangrejos, aves y peces (Márquez, 1996).

1.3.2 Inmunología

1.3.2.1 Antecedentes.

La tortuga blanca por ser poiquiloterma, cambia su temperatura con la temperatura de su medio ambiente, y consecuentemente, la estructura y actividad funcional de su sistema inmune es ampliamente modulado por el medio ambiente (El Ridi, 1994; Zapata y Torroba, 1994; Jones *et al*, 2000). La inmunología de esta especie no ha sido estudiada en profundidad, sin embargo, actualmente existe factores muy importantes que han impulsado la investigación en esta área. Entre tales factores se encuentra la cría en cautiverio, que forma parte de las diversas estrategias de conservación, la cual se ha visto complicada con la aparición de enfermedades y el poco conocimiento de su sistema inmune provoca grandes mortalidades, incrementando la necesidad de un mejor conocimiento en este campo (Jones *et al*, 2000; Glazebrook y Campbell, 1990). Pero sin lugar a dudas el factor que ha impulsado los máximos avances en la inmunología de la especie ha sido la fibropapilomatosis (FP), una enfermedad de etiología desconocida, caracterizada por tumores fibroepiteliales y fibromas en los ojos, la boca, la piel, y en varios órganos internos en una amplia variedad de especies de tortugas marinas, la cual esta convirtiéndose en una pandemia. Las especies donde la enfermedad es más severa incluyen tortugas blancas (*Chelonia mydas*), loras (*Lepidochelys olivacea*), y caguamas (*Carreta carreta*) (Aguirre *et*

al, 1999; Herbst, 1994). La FP afecta a tortugas jóvenes principalmente, y debido a que este estado es el más importante para la supervivencia de las especies, existe la gran preocupación de que la FP podría tener graves implicaciones a largo plazo para las poblaciones de tortugas marinas (Crouse *et al*, 1987).

1.3.2.2 Estructura del sistema inmune.

El sistema inmune de la tortuga marina, y de los reptiles en general, ha sido poco estudiado, pero básicamente se puede hablar de que está conformado de órganos, células y moléculas, que en forma general se parece al de los mamíferos, pero con particularidades importantes.

A. Organos linfoides.

i) Timo. El timo es un órgano linfoide bilateral situado en posición craneal al corazón en tortugas marinas. Cada lado del timo consiste en dos pequeños lóbulos, completamente separados en los quelónidos. Este es el primer órgano linfoide en desarrollarse y al igual que los mamíferos es la fuente de linfocitos T que controlan la cinética y la magnitud de la respuesta inmune humoral y celular.

El timo aparece bien desarrollado únicamente en temporadas con condiciones óptimas específicas de especie o mantenidas en cautiverio con condiciones apropiadas de temperatura, fotoperiodo, alimentación, etc. De otra manera el timo muestra varios grados de involución. Esta involución continúa con persistencia en las condiciones medioambientales adversas (temperatura, fotoperiodo, etc) hasta que el timo es transformado en tejido fibroso y llega a ser difícilmente detectable. Esta involución es, sin embargo totalmente reversible y en temporadas apropiadas o con el mejoramiento de las condiciones ambientales, la regeneración del timo comienza progresivamente hasta alcanzar nuevamente su desarrollo óptimo. De esta forma la estructura del timo está bajo la influencia directa de las condiciones medioambientales (El Ridi, 1994; Frye, 1991).

ii) Bazo. El bazo en las tortugas es esférico, oval ó triangularmente elongado y esta rodeado de una cápsula de tejido conectivo denso. Este consiste de pulpa roja formada por cordones

celulares esplénicos y sinusoides sanguíneos y una pulpa blanca formada por diversos agregados de celulares localizados predominantemente en la periferia y numerosos agregados densos de linfocitos. Alrededor del 50 al 70% de los linfocitos esplénicos son derivados del timo y están localizados en las áreas yuxta-arteriolar timo-dependiente.

La involución del bazo también es provocada por elevación en los niveles de testosterona, pero el efecto es menos drástico que en el timo. Así como sucede en el timo, la arquitectura normal del bazo solo se observa bajo condiciones óptimas (El Ridi, 1994; Frye, 1991; Saad *et al.*, 1991; Jurd, 1994).

B. Células del Sistema Inmune.

i) **Linfocitos.** Los linfocitos son las células en circulación más predominantes, representando el 50 % de los leucocitos de sangre periférica en otoño e invierno y alcanzando hasta el 80% en primavera y verano. Diversos trabajos en tortugas marinas y otros reptiles, han evidenciado la existencia de subpoblaciones básicas, por lo que, en base a sus antígenos de superficie y pruebas funcionales (respuestas a mitógenos y citotoxicidad), pueden ser divididos en linfocitos B, linfocitos T y probablemente células Natural Killer (NK) (El Deeb *et al.* 1986; Cuches y Clem, 1979; Mansour *et al.*, 1980; Work *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2000). Los linfocitos T parecen ser las células predominantes en timo, bazo y circulación sanguínea pero también son los que presentan mayores fluctuaciones en sus números totales de sangre periférica a lo largo de las estaciones del año, teniendo su máximo número y actividad en primavera (Zapata y Torroba, 1994; Work *et al.*, 2000). Los linfocitos B presentan inmunoglobulinas IgM e IgY de membrana y al parecer se mantienen más o menos constantes a lo largo del año (Negm y Mansour, 1982; Negm y Mansour, 1983). Las células NK al parecer han sido evidenciadas en la tortuga *Mauremys caspica* por pruebas de citotoxicidad inespecífica, utilizando líneas celulares de linfoma murino YAC-1 (Muñoz *et al.* 2000; Muñoz *et al.* 2001).

Morfológicamente los linfocitos de todos los reptiles estudiados no se distinguen en T, B ó NK, y básicamente son muy semejantes a los de los mamíferos. En la tortuga blanca son de forma esférica, miden entre 6 y 14 μ m de diámetro, presentan núcleo redondo u

oval, frecuentemente indentado, con escaso citoplasma y gránulos pequeños y densos. Se observan 2 tipos: 1) El mas predominante es uno pequeño con muy escaso citoplasma y sin gránulos aparentes a la microscopia óptica y 2) Linfocitos grandes con gránulos y citoplasma mas aparentes son ocasionalmente vistos, los cuales podrían ser células NK (Work *et al*, 1998; Bounous *et al*, 1996; Alleman, 1999).

ii) Monocitos. Los monocitos de los reptiles parecen tener poca variación estacional y su número y porcentaje relativo permanecen aparentemente constantes (0.5-5 %). No se han documentado su existencia en especies del orden *Squamata* (principalmente serpientes). Los monocitos de la tortuga blanca fueron recientemente documentados, describiéndose como más grandes que los linfocitos, miden entre 11 y 26 :m y son de forma redonda ó amiboidea, con núcleo redondo, oval ó indentado, citoplasma abundante y con gránulos y vacuolas de tamaños diversos (Frye, 1991; Work *et al*, 1998).

iii) Heterófilos. Los heterófilos son los granulocitos más numerosos en los quelonidos, y los segundos en las serpientes, después de los azurófilos. Los heterófilos juegan un papel muy importante en la respuesta inmune a las infecciones bacterianas, respuesta inflamatoria y/o necrosis tisular, de forma muy similar a la que lo hacen los neutrófilos de los mamíferos, pero a diferencia de éstos, no parecen ser la línea dominante en los inicios de la respuesta inflamatoria, ya que ha sido reportado que los monocitos/macrófagos son las células que dominan y resuelven todo el proceso inflamatorio. Los heterófilos aparecen en menor número que los monocitos macrófagos desde el inicio de la respuesta y pueden perdurar en números bajos durante todo el proceso inflamatorio hasta su resolución. Sin embargo esto ha sido documentado únicamente en serpientes, y no existe un reporte de lo que sucede en tortugas, por lo que solo se puede suponer que el proceso es similar (Frye, 1991, Alleman *et al*, 1998; Tucunduva *et al*, 2001). Morfológicamente, son los más grandes de los granulocitos y la forma de sus gránulos varían entre las especies de reptiles. Los gránulos tienden a ser más grandes, ovals y menos numerosos en los cocodrilos y algo más pequeños, alargados y más numerosos en serpientes y lagartos. En los quelónidos son tan numerosos que desplazan el núcleo hacia la periferia. En la tortuga blanca

específicamente, miden de 10 a 18 :m, el núcleo es denso, oval o redondo y generalmente en posición excéntrica. Los gránulos son fusiformes, pequeños y muy numerosos, observándose de un color rojo-naranja brillante con tinciones tipo Romanowsky (Frye, 1991; Work *et al*, 1998).

iv) Eosinófilos. Los Eosinófilos son muy similares entre los reptiles, con excepción del orden *Squamata*, particularmente en las serpientes, donde se duda de su existencia. En la tortuga blanca se han reportado 2 tipos: uno pequeño, de 12 a 16 :m con núcleo redondo, denso y bien definido que se observa de color azul-púrpura con tinciones tipo Romanowsky y un citoplasma azul, con gránulos redondos bien definidos naranja claro. El segundo tipo es una célula grande, de 14 a 22 :m que tiene núcleo amorfo, color azul-púrpura y posición excéntrica, su citoplasma es abundante, claro y ligeramente granular con sus gránulos redondos y grandes. Estos gránulos tienen un brillo naranja y están rodados por un ligero halo refringente azul-naranja. Al parecer estos grande eosinófilos son células degranuladas por algún estímulo, probablemente parasitario, ya que en estos procesos juegan un papel muy importante en las tortugas marinas (Work *et al*, 1998; Allegan *et al*, 1999, Aguirre *et al*, 1998).

v) Basófilos. Los basófilos son los granulocitos más fácilmente identificables por observarse intensamente basofílicos. Son células más pequeñas que los heterófilos y su núcleo se observa azul-púrpura con un citoplasma bien definido con gránulos basofílicos pequeños con tinciones tipo Romanowsky. Sin embargo son células muy escasas tanto en tortugas blancas como en otros reptiles (Work *et al*, 1998; Bounous *et al*, 1996; Allegan *et al*, 1999).

vi) Trombocitos. Los trombocitos son homólogos a las plaquetas de los mamíferos, pero tienen núcleo y actividad fagocítica. En la tortuga blanca, así como en todos los reptiles estudiados, tienden a ser elipsoidales y relativamente pequeños ó con forma de uso, con núcleo grande basofílico, localizado centralmente. Su citoplasma se tiñe azul muy pálido, casi sin color y casi agranular con tinciones tipo Romanowsky y, en algunas ocasiones

pueden confundirse con linfocitos pequeños. Los trombocitos binucleados se pueden observar ocasionalmente en animales anémicos (Frye, 1991; Jurd, 1994; Work *et al*, 1998; Bounous *et al*, 1996; Allegan *et al*, 1999).

C. Inmunoglobulinas

En la tortuga blanca existen 3 clases de inmunoglobulinas. Un anticuerpo de peso molecular elevado denominado IgM, como en mamíferos, de 850-900 kDa cuando 5 moléculas se unen en forma de pentámero y 200 kDa en su forma de monómero. Esta inmunoglobulina se encuentra en pequeña cantidad, aun en animales inmunizados y su cinética es inconstante (Benedict y Pollard, 1972; Benedict y Pollard, 1977; Herbs y Klein, 1995). La segunda clase de anticuerpo es una inmunoglobulina denominada IgY. Con excepción de los peces, la IgY se encuentra ampliamente distribuida entre todos los vertebrados no mamíferos y puede ser considerada no únicamente el ancestro de la IgG, sino también de la IgE (Warr *et al*, 1995) (Figura 2).

La IgY tiene un peso molecular de aproximadamente 180 kDa y se encuentra en forma de monómero y probablemente en forma de dímero en mucosas. El corrimiento electroforético en condiciones reducidas, muestra que posee 2 cadenas pesadas (63-68 kDa) y 2 cadenas ligeras (22.5 a 23 kDa). Esta inmunoglobulina carece de la región de la bisagra, la cual parece ser exclusiva de los mamíferos, y únicamente presenta una región rica en residuos de prolina y glicina que potencialmente pueden proporcionar flexibilidad limitada. Es difícil generalizar acerca de las funciones de la IgY por su amplia distribución en una enorme cantidad de especies, pero aparentemente es muy versátil, encontrándose de manera sérica y secretoria en diferentes especies, así como su participación en la transferencia pasiva de madre a hijo a través de la yema de huevo.

Solamente en tortugas, aves anseriformes y algunos peces pulmonados se ha identificado un tipo más de anticuerpo de menor peso molecular, una IgY 5.7S que tiene un peso molecular de 120 kDa. Esta inmunoglobulina es una IgY truncada que carece de 2 dominios terminales de las cadenas pesadas (H), por lo que esta molécula es un equivalente estructural de un fragmento $F(ab')_2$. La función de este anticuerpo no está clara, pero puede

considerarse como una isoforma de la IgY, debido a que ambas son codificadas por un mismo gen sencillo (Benedict y Pollard, 1972; Benedict y Pollard, 1977; Herbs y Klein, 1995; Warr *et al*, 1995; Ambrosius, 1976; Turchin y Hsu, 1996). Algunas evidencias indican que es el anticuerpo que predomina en respuestas crónicas de las tortugas marinas (Benedict y Pollard, 1972). Todas las inmunoglobulinas de la tortuga pueden precipitar y aglutinar antígenos, opsonizar y fijar el complemento, pero solamente la IgY truncada tiene una muy pobre capacidad de opsonización y fijación del complemento, lo cual no es sorprendente debido a su carencia de región Fc, aunque hay datos que indican su posible mediación en procesos anafilácticos, en algunas especies de aves (Warr *et al*, 1995).

D. Inmunidad humoral

Las tortugas son capaces de desarrollar una respuesta efectiva, específica y anamnésica de anticuerpos a diferentes antígenos que es dependiente de temperatura (el aumento en la producción de anticuerpos es directamente proporcional al aumento de la temperatura, alcanzando su máximo en la temperatura óptima de acuerdo a cada especie). También son capaces de producir una respuesta primaria y secundaria, aunque con variabilidad en la cinética de la IgM (Work *et al*, 2000; Herbs y Klein, 1995; Ambrosius, 1976).

Sin embargo, de manera consistente se ha reportado que en las especies poiquilothermas, la heterogenicidad y maduración de la afinidad de los anticuerpos producidos es mucho menor, casi inexistente en algunas especies, aun en la respuesta secundaria y bajo repetidas inmunizaciones, sin un incremento muy alto en los títulos de anticuerpos, los cuales, a pesar de repetidas inmunizaciones, pueden permanecer con títulos constantes, aunque ese título persiste por muy largo tiempo (Ambrosius, 1976; Hsu, 1998). La cinética de los Isotipos producidos ante una inmunización, generalmente es consistente y establece que la IgM puede aparecer de manera inconstante y en baja cantidad, sin ser necesariamente el primer isotipo producido, como sucede en mamíferos. La IgY fue reportada como la primera inmunoglobulina detectada en tortugas blancas inmunizadas durante varios años, seguida mas tardíamente por la IgY 5.7S, la cual persistió por muy largo tiempo. La respuesta inmune primaria detectable, de manera menor a la de aves y

mamíferos, después de un periodo que va de 7 a 15 días, alcanzando su máximo pico entre los 20 y los 60 días posinmunización, variando con el tipo de antígeno, vía de administración y dosis, temporada del año etc. La respuesta secundaria es evidente, aunque no muy vigorosa, de baja afinidad similar a la respuesta primaria y elevación moderada del título (Work *et al*, 2000; Benedict y Pollard, 1977; Ambrosius, 1976).

La lentitud con que se produce la respuesta y el poco incremento del título es probablemente debido al lento metabolismo de los reptiles, sin embargo, la poca maduración de afinidad que no mejora mucho con repetidas inmunizaciones, no se ha comprendido del todo. La diversidad del sistema de genes de inmunoglobulinas y la hipermutación somática son fundamentales en la maduración de la afinidad, y estos han sido demostrados en una amplia variedad de vertebrados poiquiloterms, desde los peces cartilaginosos hasta las tortugas acuáticas.

El sistema de genes de inmunoglobulinas en todas las especies poiquiloterms estudiadas, poseen segmentos de genes V, D y J que en número y diversidad de secuencia rivaliza con el de los mamíferos. La hipermutación somática también ocurre de manera muy semejante a los mamíferos y las aves. Sin embargo, existe un factor que puede ser el responsable de esta falta de maduración de afinidad, y es el hecho de que los poiquiloterms no presentan centros germinales a pesar de que se han reconocido células parecidas a las células dendríticas foliculares (El Ridi, 1994; Tanaka y Elsey, 1997). Los centros germinales son los sitios de selección mediada por las células dendríticas foliculares, de células B mutantes con receptores de alta afinidad, por lo que existe la probabilidad de que no se lleve a cabo esta selección de estos mutantes, dando por resultado la pobre maduración de afinidad observada (Turchin y Hsu, 1996; Hsu, 1998).

E. Inmunidad celular.

La respuesta celular ha sido menos estudiada que la respuesta humoral, por lo que existen grandes vacíos de conocimiento en su cinética. Los ensayos de proliferación celular han sido los medios mas utilizados en la tortuga blanca y otras especies de reptiles, así como la capacidad de rechazo de injertos y la reacción a la mezcla de linfocitos en lagartijas y serpientes, principalmente. Diversas especies investigadas son capaces de

responder de manera aguda (en menos de 2 semanas) a aloinjertos de piel, y responder *in vitro* a linfocitos purificados del donador provocándoles linfólisis, lo cual induce a pensar que existen moléculas de superficie del tipo del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Así mismo, se ha observado que las células adherentes (macrófagos), son indispensables para estas reacciones.

Una reacción de memoria ha sido evidenciada al ser aun más rápidamente destruido un nuevo aloinjerto en reptiles previamente sensibilizados (Cuchens y Clem, 1979; El Deeb y Saad, 1987). Los Linfocitos T de la tortuga blanca responden poderosamente a la estimulación con mitógenos *in vitro* tales como la Concanavalina A (Con A) y Fitohemaglutinina (PHA), así como a antígenos específicos, lo cual es dependiente de la temporada del año y las condiciones climatológicas. Ninguna subpoblación de linfocitos T ha sido caracterizada, así como ningún marcador de superficie claramente identificado (Work *et al*, 2000; McKinney y Bentley, 1985).

Las citocinas, elementos básicos en los estudios inmunológicos, tampoco han sido identificadas, únicamente se ha demostrado una molécula soluble que concuerda con la Interleucina 2 (IL-2), la cual ha sido aislada e identificada por electroforesis de líquido sobrenadante, en ensayos de proliferación celular (El Ridi *et al*, 1987).

La identificación de células NK en Tortuga blanca no fue posible por métodos funcionales (Citotoxicidad inespecífica) (McKinney y Bentley, 1985) aunque otros investigadores si lo han hecho por los mismos métodos en leucocitos de sangre periférica y timocitos de tortuga terrestre *Mauremis caspica*, por lo que se requieren mayores investigaciones para aclarar este tema (Muñoz *et al*, 2000; Muñoz *et al*, 2001). Las células de Langerhans, fundamentales para la respuesta inmune mediada por células en la piel, han sido identificadas y caracterizadas histoquímica y ultraestructuralmente en la tortuga terrestre, *Kinosternum integrum*, aunque ningún ensayo funcional fue realizado (Millan, 1996).

1.3.2.3 Factores que modulan la respuesta inmune.

El medio ambiente ha provocado que todas las especies sufran adaptaciones en su fisiología, permitiendo que las más aptas con mayores ventajas selectivas permanezcan y evolucionen. El sistema inmunológico es afectado por el medio ambiente, pero este efecto es enormemente menor en las especies homeotermas (sangre caliente) que en las especies Poiquilotermas (sangre fría). Por lo tanto el sistema inmunológico de los reptiles, y por consiguiente, el de la tortuga blanca, es fuertemente modulado por las condiciones medioambientales y la temporada del año (Nelson y Demas, 1996).

En un principio se supuso que las condiciones climáticas influenciaban el sistema inmune, pero aún manteniendo las condiciones óptimas específicas de especie, el efecto en los órganos inmunes se mantenía. De esta forma se sospechó que existía un control neuroendocrino dependiente de los ciclos naturales del año (El Ridi, 1994; Zapata *et al*, 1992; Saad, 1991). Los cambios en la estructura de los tejidos linfoides y las características morfológicas de las células sanguíneas han sido más profundamente estudiados que su función, sin embargo, hay evidencia sólida de la forma en que el medioambiente las controla. El timo es el órgano linfoide más fuertemente afectado, mostrando una arquitectura bien definida a finales de la primavera e involucionando gradualmente hasta el invierno. Este órgano sufre varios grados de "degeneración", donde el número de linfocitos en la corteza y la médula decrecen grandemente y numerosas células mioides y células quísticas epiteliales son observadas. La involución continúa con la persistencia de las condiciones medioambientales adversas (temperatura, fotoperiodo, etc.) hasta que el timo es transformado en tejido fibroso y llega a ser difícilmente detectable. Esta involución es, sin embargo totalmente reversible y en temporadas apropiadas, la reconstrucción del timo comienza y, progresivamente, procede a tomar una imagen y organización parecida a la de los mamíferos (Zapata *et al*, 1992; Nelson y Demas, 1996).

Durante el máximo desarrollo del timo se observan óptimas funciones en algunos grupos de células linfoides. Los linfocitos T parecen ser las células más fuertemente afectadas por el medioambiente, alcanzado su máximo número en circulación (aproximadamente el 80% de los leucocitos periféricos) y su mínimo en invierno (menos

del 50%). Su función también es afectada y se ha notado una diferencia en la respuesta a mitógenos en los ensayos de proliferación celular, aumentando en primavera y disminuyendo en invierno. La producción de anticuerpos disminuye en invierno, y puede estar relacionado a lo demostrado en otras especies reptilianas, donde el procesamiento y presentación del antígeno no son afectadas, pero la proliferación y diferenciación de los linfocitos B es inhibida (El Ridi, 1994; Zapata *et al*, 1992; Muñoz *et al*, 2000). Se presenta, sin embargo, la duda de cómo se compensan estas fluctuaciones en el sistema inmune, permitiendo que no solo las tortugas, sino todos los reptiles hayan permanecido en la tierra por tantos millones de años. Existe evidencia que apunta a que existen mecanismos inmunológicos compensatorios, y que las diferentes células son más o menos sensibles a los ciclos naturales, dependiendo de las subpoblaciones que se traten. De esta forma, en la tortuga terrestre *Mauremys caspica*, se ha descrito que la proliferación celular de linfocitos disminuye en invierno, pero que la quimiotaxis de leucocitos, la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y la citotoxicidad de células NK están aumentadas y, además, que esto varía entre machos y hembras, siendo el efecto más marcado en los leucocitos de los machos que en las hembras (Muñoz *et al*, 2000; Muñoz *et al*, 2001). Debido a que solo ha sido ensayado en una especie de tortuga terrestre, es difícil generalizarlo, pero es muy probable que mecanismos similares de compensación sucedan en todos los reptiles, incluyendo la tortuga blanca. Los factores que controlan estas fluctuaciones no han sido tajantemente demostrados, pero se han involucrado factores medioambientales (temperatura, humedad, fotoperiodo etc.) y factores endógenos hormonales (corticosterona y testosterona, principalmente) (El Ridi, 1994; Zapata *et al*, 1992; Saad *et al*, 1991; Nelson y Demas, 1996).

La función de los corticosteroides en la regulación de las fluctuaciones de la actividad inmune es sustentada por la correlación entre los niveles séricos de corticosterona y la magnitud de la respuesta inmune. La reducción de los linfocitos circulantes, así como la dificultad para montar una respuesta inmune a los patógenos, se ha visto relacionada a los niveles de corticosterona circulante. También el completo desarrollo de los órganos linfoides y la vigorosa respuesta inmune en primavera y a través de los inicios del otoño coinciden con bajos niveles de esta hormona. En contraste, niveles incrementados de

corticosterona en el otoño tardío y el invierno están asociados con lisis de timocitos y bajos niveles de linfocitos en sangre periférica y bazo, apoyando numerosos estudios que sugieren que el estrés prolongado causa depresión en sangre periférica y en órganos linfoides. Los corticoesteroides producen una amplia gama de efectos en los poiquiloterms, desde abrogaciones de la producción de anticuerpos, redistribución de linfocitos en el tejido linfoide hasta histolisis (Zapata *et al*, 1992; Nelson y Demas, 1996). El efecto del estrés en los leucocitos circulantes y su correlación con los niveles de corticosterona sérica han sido evaluados en la tortuga blanca, observándose una marcada linfopenia y heterofilia con una inversión en la relación heterófilo/linfocito bien correlacionada al aumento de corticosterona (Aguirre *et al*, 1995). Sin embargo, los efectos de los corticoesteroides parecen ser modulados por otras hormonas, principalmente esteroides sexuales, durante las estaciones del año y las etapas reproductivas. Parece ser que las concentraciones plasmáticas de andrógenos, están directamente relacionadas con las de corticosterona, evidenciadas en estudios con tortugas blancas en temporada de apareamiento (Jessop *et al*, 1999).

En todas las especies, incluyendo los reptiles, existe una clara diferencia en la función inmune, lo cual parece ser el resultado de la testosterona y los estrógenos. La testosterona produce involución del timo y el bazo de una manera dependiente de la concentración, y la respuesta humoral y el rechazo a injertos es considerablemente retardado en diversas especies de reptiles. Así mismo, el estradiol produce una depleción marcada de la función y la estructura del sistema inmune, y la progesterona se ha encontrado asociada, en diferentes especies de reptiles, de manera positiva al aumento de corticosterona, probablemente debido a que se produce también en las glándulas adrenales, junto con la corticosterona. Los niveles de hormonas sexuales están relacionados a los ciclos reproductivos y por lo tanto tiene variación estacional, sin embargo, la corticosterona no siempre sigue esa fluctuación y puede relacionarse más al aumento de la actividad general (alimentación, hibernación, territorialidad, etc.), por lo que su fluctuación en temporadas de reproducción al parecer, esta relacionada principalmente a la conducta y varía entre los machos y las hembras, y aun entre las diferentes especies de reptiles (Saad *et al*, 1991; Muñoz *et al*, 2000; Nelson y Demas, 1996; Tyrrel y Cree, 1998).

1.4 Antecedentes

1.4.1 Estrategias de conservación

La pesquería comercial de tortugas marinas se inició en México hasta los años 60's. Anteriormente, la explotación de las tortugas marinas tuvo un escaso desarrollo y se circunscribió a la captura dentro del golfo de México y mar Caribe y a la extracción de huevo, de manera clandestina, en todo el país. En esta situación existía un equilibrio armónico entre los consumidores humanos y el recurso natural. La problemática de sobre explotación surgió cuando disminuyeron las poblaciones de cocodrilos y se descubrió que la piel de la tortuga golfina tenía características apropiadas para la industria peletera. Desde ese momento, la demanda de piel se incrementó de manera exponencial. Posteriormente hubo un aumento en la oferta de la carne de este animal; de esta suerte continuó desarrollándose la distribución y consumo de tortuga marina en México hasta que se declaró a partir del 10 de junio de 1990 la veda total por tiempo indefinido, para todas las especies, productos y subproductos.

Actualmente, la tortuga blanca es afectada por diversos factores que han ocasionado colapsos o declinaciones significativas en sus poblaciones, entre los cuales destacan: la sobre explotación, principalmente de adultos reproductores, la extracción de huevos en zonas de anidación y mar abierto, la pérdida o degradación de *habitats* críticos y la pesca incidental y el desarrollo turístico, entre otros. La extracción de huevos y la captura de tortugas adultas para consumo, así como la utilización de subproductos para la elaboración de artesanía, también son elementos importantes en la reducción de poblaciones de tortuga prieta (*Chelonia agassizi*), carey (*Eretmochelys imbricata*), laúd (*Dermochelys coriacea*) y caguama (*Caretta caretta*).

La política general para la conservación de las tortugas marinas se enfoca en dos categorías generales:

- a) La protección de los animales
- b) La protección de sus *habitats*

La instalación de campamentos tortugueros para la vigilancia de las playas y el cuidado y registro de los nidos, así como la construcción de "viveros" para el traslado y cuidado de los huevos hasta su eclosión, son las estrategias más utilizadas (Pritchard, 1997; Márquez, 1996).

1.4.2 Sistemas de cría en cautiverio

La cría en cautiverio es una opción que puede tener 2 objetivos

1. Conservación.
2. Explotación comercial.

La cría en cautiverio con propósitos de conservación, busca proteger los nidos, manteniéndolos en viveros o corrales dentro de instalaciones con baja o mediana tecnificación, con el objetivo de mantenerlos a salvo de depredadores naturales y comercio ilegal. Las tortuguitas 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. Ambos sistemas buscan el mismo objetivo: acelerar la recuperación de las poblaciones silvestres.

La explotación comercial es una estrategia que se desarrolla a varios niveles. El primer nivel esta basado en ranchos tortugueros, los cuales tienen una producción dependiente de colectas controladas de huevos en la naturaleza y no son sistemas autosuficientes. Este tipo de explotación busca satisfacer las necesidades locales de poblaciones costeras que históricamente han aprovechado el recurso.

Las granjas tortugueras son un sistema que requiere de una infraestructura mucho más tecnificada para satisfacer un comercio regional o incluso mundial, antes de la prohibición internacional del comercio de estas especies. Debe llegar a ser autosuficiente y solamente en su inicio se puede iniciar con organismos tomados de la naturaleza. Para la primera etapa, se toman adultos para formar el grupo de reproductores y la colecta anual de huevos y crías en cantidades adecuadas, que se realizaran en forma decreciente hasta que la granja llegue a ser autosuficiente

La primera y más grande granja tortuguera fue desarrollada en la isla Gran Caimán en las Antillas Mayores, en el año de 1968. La especie explotada fue la tortuga blanca debido al mejor sabor de su carne y mayor facilidad de adaptación al cautiverio. De esta especie se obtenía carne, aceite, piel y subproductos, así como artesanías de los escudos de la concha. Cuando las tortugas marinas fueron consideradas dentro del apéndice I de CITES 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.

A la fecha, la granja produce 45 000 huevos con un porcentaje de eclosión del 15 al 30 %, obteniéndose 8000 crías para su explotación comercial y un excedente que es liberado en sus playas de origen (Márquez, 1996).

1.4.3 Enfermedades asociadas a la cría en cautiverio.

Aunque las tortugas blancas silvestres son afectadas por una amplia gama de patógenos, que incluyen parásitos, virus, bacterias, hongos y protozoarios, las infecciones bacterianas son poco comunes. En contraste, este tipo de infecciones son muy frecuentes en cautiverio, presentando una elevada incidencia, que varían en su porcentaje de mortalidad de acuerdo a las condiciones de cautiverio. Este fenómeno ha sido asociado a factores estresantes del cautiverio, tales como la calidad y temperatura del agua, tipo de alimentación, número de individuos por estanque, etc., los cuales, al parecer, podrían afectar directamente el funcionamiento del sistema inmunológico, debido a la estrecha interrelación con el medio ambiente, anteriormente explicada (Frye, 1991; George, 1997; Aguirre *et al.*, 1994).

Aunque diversas infecciones bacterianas afectan a las tortugas cautivas, son 2 tipos de infecciones que destacan por su elevada prevalencia y mortalidad.

A. Infecciones Dermatológicas. Las infecciones de la piel son muy comunes y altamente prevalentes, siendo descritas en la literatura con diversos nombres. Dermatitis focal erosiva, enfermedad cutánea ulcerativa septicémica y dermatitis papilar, no únicamente identifican

un tipo de infección bacteriana, sino evocan las lesiones clínicas predominantemente observadas, que consisten en una dermatitis ulcerativa con un patrón característico de distribución. Este patrón comprende pústulas y úlceras en dorso del cuello, puntas y bordes de las aletas y la cola. Provocan mortalidades del 20 hasta el 50 % y tienen una prevalencia que puede alcanzar el 100%. Las lesiones aparecen desde las primeras semanas de nacidas y pueden mantenerse en un estado crónico recurrente durante años. Las tortugas que no son tratadas o no responden al mismo, se vuelven letárgicas, anoréxicas y mueren en pocas semanas, dependiendo de la edad de las tortugas, siendo las crías las más vulnerables pudiendo morir en pocos días. A la necropsia, además de las lesiones dermatológicas, se encuentran lesiones clásicas de septicemia (congestión, hemorragia y necrosis generalizada) y 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 (Glazebrook y Campbell, 1990; Frye, 1991; George, 1997).

El primer reporte que describió las características clínicas de este tipo de enfermedad fue hecho en tortugas acuáticas, en la década de los 50's y fue llamada enfermedad cutánea ulcerativa septicémica, en la cual se aisló a *Citrobacter freundii*, al cual se le involucró como el agente etiológico (Kaplan, 1957). En 1970, una epizootia ocurrida en una colonia de tortugas acuáticas presentó las mismas características clínicas descritas en los 50's, pero no sólo se aisló e identificó a *Citrobacter freundii*, sino a una gran variedad de enterobacterias, las cuales se sabe, son parte de la microflora normal de la piel de todos los quelonidos (Crawford y Fulton, 1970).

En la década de los 80's, un estudio bacteriológico de las enfermedades cutáneas en tortugas marinas de las especies *Chelonia mydas* (blanca) y *Eretmochelys imbricata* (carey) fue llevado a cabo por investigadores del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM en una estación piloto para la cría en cautiverio de estas especies. Los géneros bacterianos aislados fueron, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Escherichia*, concluyendo los autores, que estas bacterias se desarrollaban como patógenos debido a la baja calidad de los parámetros fisicoquímicos del agua y el elevado número de tortugas por estanque (Romero-Jarero *et al.*, 1981).

Glazebrook y Campbell (1990a), realizaron un investigación mas profunda para buscar los agentes etiológicos de las principales enfermedades de tortugas marina en granjas y acuarios de Australia. De esta forma, realizaron estudios virológicos, bacteriológicos y parasitológicos. Las enfermedades bacterianas fueron por mucho, las más significativas, y de estas, la dermatitis ulcerativa, atribuida por ellos a las mordidas entre los individuos de un mismo estaque, fue la enfermedad más importante, de la cual se identificó de manera constante a 4 especies: *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hidrófila*, *Pseudomonas sp* y *Flavobacterium sp*, las cuales han sido reportadas en casi todos las enfermedades bacterianas de reptiles cautivos, sin importar los órganos afectados. Estos mismos agentes fueron aislados de la piel de tortugas sanas y del agua de los estanques (Glazebrook y Campbell, 1990b).

B. Complejo Estomatitis ulcerativa-rinitis obstructiva-bronconeumonía.

Este grupo de enfermedades ha sido reportado de manera consistente en diversas especies de reptiles, tanto terrestres como acuáticos y marinos (Frye, 1991). En términos de mortalidad, es la enfermedad mas peligrosa en tortugas marinas cautivas, ya que es una enfermedad esporádica y repentina, de curso agudo que provoca mortalidades muy altas que pueden alcanzar el 70%, afectando casi exclusivamente a crías y en menor grado a juveniles. El primer signo de la enfermedad es pus caseosa en una o ambas narinas y /o en el área faríngea de la cavidad oral. Las tortugas se vuelven anoréxicas, letárgicas y flotan. En caso de que la bronconeumonía este presente, se observa flotabilidad alterada hacia un lado y perdida de la habilidad para mantenerse horizontal o sumergirse. Dependiendo de las enfermedades involucradas, la necropsia puede revelar material caseoso y hemorragias en narinas, cavidad oral, traquea y bronquios. La mucosa oral puede estar inflamada con ulceraciones comúnmente localizadas de manera lateral a la lengua y de manera caudal en el paladar duro. Los pulmones pueden mostrar en su porción craneal, áreas de inflamación focal o difusa. Las especies bacterianas generalmente aisladas son las mismas que en las dermatitis ulcerativas: *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hidrófila*, *Pseudomonas sp* y *Flavobacterium sp* (Glazebrook y Campbell, 1990; Glazebrook y Campbell, 1990B, George, 1997).

1.4.4 Programa de Conservación de Tortugas marinas de Xcaret.

El parque Xcaret, ubicado en el estado de Quintana Roo, cuenta con un programa de Conservación de Tortugas Marinas, donde cada año, al final de la temporada de anidación, se reciben un promedio de 200 tortugas de la especie *Chelonia mydas* recién eclosionadas de huevos colectados en playas regionales, para su inmediato marcaje con la técnica del autoingerto (Márquez, 1996), criándose durante un año y siendo liberadas al termino del mismo. Otras especies que se mantienen en el parque incluyen Tortuga Lora (*Lepidochelys kempfi*) y Tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*). La principal enfermedad en tortuga blanca registrada durante todos los ciclos del programa es la dermatitis ulcerativa ya reportada como una enfermedad presente en tortugas blancas cautivas. La aparición de esta y otras enfermedades, fue inicialmente asociada a deficiencias en el manejo y la calidad del agua principalmente, de acuerdo a reportes de diversos autores (Márquez, 1996; Frye, 1991; Romero-Jarero *et al*, 1981).

Sin embargo, a pesar del estricto control en los parámetros fisicoquímicos del agua, la dieta y el manejo en general, la dermatitis ulcerativa sigue teniendo elevada prevalencia (80%) y elevada mortalidad (30 %) en algunos ciclos del programa, durante los primeros meses de edad y manteniéndose de manera crónica recurrente en los juveniles y aun en los adultos que se mantienen en el parque como futuros reproductores, tanto de la especie *Chelonia mydas* como de las otras especies. A pesar del tratamiento tópico con permanganato de potasio y antibióticos sistémicos, la prevalencia se mantiene elevada y si la suspensión o retraso en el tratamiento se presenta, un aumento en la mortalidad se observa en pocas semanas, por lo que un estado de inmunodepresión es sospechado. La fisiopatología de la enfermedad no ha sido explicada de manera clara, pero se han involucrado traumatismos tales como mordeduras entre las tortugas y lesiones menores en los estanques que rápidamente son colonizados debido a esta probable inmunodepresión que no ha sido demostrada (Glazebrook y Campbell, 1990).

Estudios desarrollados en poblaciones de tortugas blancas de Hawai y Florida, tanto cautivas como silvestres, afectadas por la mas grave de las enfermedades virales, la Fibropapilomatosis, sugiere estados de inmunodepresión como el factor desencadenante de esta enfermedad que esta tomando proporciones de pandemia en las poblaciones de vida

libre en casi todos los mares del mundo. Este problema infeccioso ha propiciado el estudio y el desarrollo de técnicas inmunológicas específicas para quelónidos, los cuales son un punto de partida importante para determinar estados de inmunodepresión en tortugas marinas afectadas por problemas infecciosos y desarrollar estrategias encaminadas a normalizar el estatus inmunológico para prevenir y tratar de manera más eficaz estos procesos (Swimmer, 2000; Work *et al*, 2001).

1.5 Justificación

El principal obstáculo para la conservación, reproducción, y/o explotación racional de las diferentes especies de tortugas marinas en cautiverio, son los altos costos provocados por las enfermedades infecciosas, nutricionales y etológicas. El estudio profundo de la respuesta inmunológica al cautiverio y su probable relación con la aparición de enfermedades infecciosas, contribuye a mejorar de manera importante, el diseño de mejores estrategias de manejo para una factible conservación y/o explotación racional.

1.6 Hipótesis

Si la prevalencia de dermatitis ulcerativa que afectan a las tortugas de la especie *Chelonia mydas* en el parque Xcaret es debida a un estado de inmunodepresión, entonces esta probablemente asociada a factores estresantes del cautiverio.

2. Objetivo General

Evaluar el funcionamiento del sistema inmune de Tortugas Blancas (*Chelonia mydas*) en cautiverio con dermatitis ulcerativa.

2.1 Objetivos Particulares

1. Analizar los cambios histopatológicos en biopsias de lesiones dermatológicas.
2. Determinar los cambios del leucograma con diferencial y relación heterófilo/linfocito entre tortugas sanas y enfermas
3. Cuantificación de anticuerpos totales en tortugas sanas y enfermas.
4. Medir la inmunidad celular por respuesta de hipersensibilidad retardada a la fitohemaglutinina (PHA) en tortugas sanas y enfermas.
5. Determinar los niveles séricos de corticosterona en tortugas sanas y enfermas.

3. Material y Métodos

3.1 Sitio de estudio

El parque Xcaret se localiza a 65 km al sur de la ciudad de Cancún, al noroeste de la Península de Yucatán, en el Estado de Quintana Roo, entre las coordenadas 86° 55' longitud Oeste y 21° 20' latitud norte, frente al mar Caribe y a 8 m sobre el nivel del mar. Presenta un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 27° C con una humedad promedio de 74 % (Figura 3).

3.2 Animales de Estudio

A partir de la población de tortugas pertenecientes al programa de conservación de Xcaret, 15 tortugas marinas de la especie *Chelonia mydas* de 13 meses de edad y de sexo indeterminado fueron seleccionadas utilizando un muestreo aleatorio simple con reemplazo, marcadas con placa metálica, pesadas, medidas por el largo y ancho del carapacho y divididas en 2 grupos:

1. Siete Tortugas clínicamente sanas.
2. Ocho Tortugas con dermatitis ulcerativa evidente (Figura 4).

Cada grupo fue colocado en estanques circulares de cemento de 4.57 m de largo, 4.34 m de ancho y 1.05 m de profundidad con un flujo continuo de agua marina de 0.048 l/seg. (Figura 5). Los 2 grupos fueron alimentados con croqueta comercial para tortuga (Tortugas "AS", Industrias Alicon, Guadalajara, Jal.) proporcionando el 3 % de su peso vivo dividido 2 veces al día, conteniendo el siguiente análisis bromatológico:

Proteína mínima.....	35.0 %
Fibra máxima.....	5.0 %
Grasa mínima.....	3.5 %
Cenizas máximo.....	10.0 %
Humedad máximo.....	12.0 %
E.L.N. mínimo.....	34.5 %

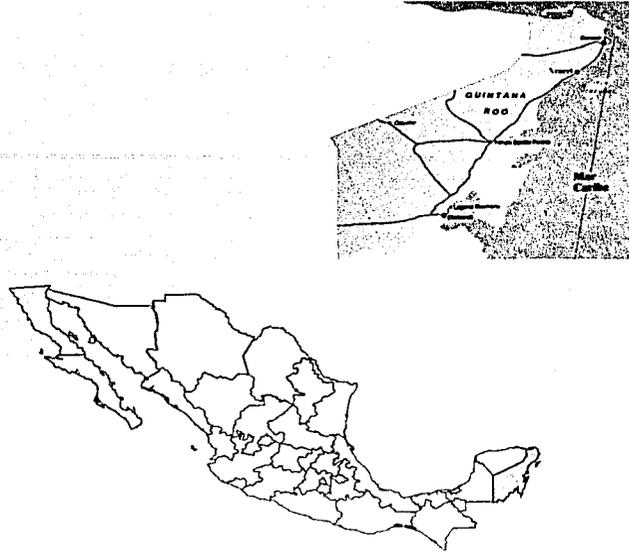


Figura 3. Localización geográfica del parque Xcaret en el estado de Quintana Roo.

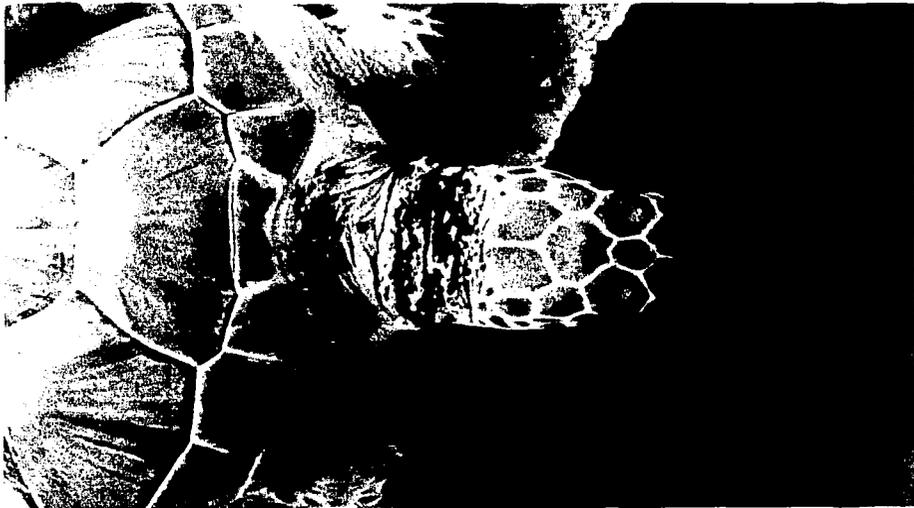


Figura 4. Dermatitis ulcerativa en región del cuello.

La toma de muestras definitivas para todas las pruebas de laboratorio fue realizada en febrero de 2002. Los parámetros fisicoquímicos del agua en el momento de la toma de muestras fueron los siguientes:

1. Temperatura del agua 27° C
2. Salinidad 36 ppm
3. pH 8.4

3.3 Histopatología

Fue tomada una biopsia de piel de una lesión representativa por cada tortuga enferma, utilizando un sacabocado estéril de 6 mm (Acu punch, Acuderm Inc., Ft. Lauderdale FL). Las muestras fueron fijadas en formaldehído amortiguado (PBS) al 10 %, colocadas en contenedores individuales y etiquetadas con el número de placa y fecha.

Las muestras fueron procesadas y teñidas con hematoxilina- eosina y gram, revisadas bajo microscopia de luz y descritas histopatológicamente.

3.4 Hemograma

3 ml de sangre de cada tortuga fueron obtenidas del seno venoso cervical (Owens y Ruiz, 1980) utilizando una aguja vacutainer del No 21 y tubos vacutainer con heparina sódica (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Inmediatamente se prepararon 3 frotis sanguíneos por tortuga, los cuales fueron secados al aire, fijados con metanol absoluto y teñidos con hemocolorante rápido para el conteo diferencial y la determinación de la relación heterófilo/linfocito, de acuerdo a la metodología de Work *et al* (1998). El resto del hemograma fue realizado con sangre fresca utilizando la técnica de Natt y Herrick (1952):

- a) Dilución de la sangre en la solución de Natt-Herrick 1:200
- b) Llenado del hemocitómetro con 20 μ l por cámara.
- c) Se contó el número de leucocitos a 100x en los 4 cuadros de los extremos y el número obtenido fue multiplicado por 500 para obtener el número absoluto de leucocitos.

- d) Se contó el número de eritrocitos a 40x en el cuadro central y multiplicado por 10000 para obtener el número absoluto de eritrocitos.

3.5 Cuantificación de inmunoglobulinas (Igs) totales de tortuga por ELISA indirecta.

3.5.1 Purificación de Igs de tortuga *Chelonia mydas*.

3.5.1.1 Precipitación de Igs. La precipitación de inmunoglobulinas fue realizada de acuerdo a métodos estándar (Cochet *et al*, 1998) con ligeras modificaciones. 100 ml de sangre fueron obtenidos del seno venoso cervical (Owens, 1980) de un macho adulto clínicamente sano, de la especie *Chelonia mydas*, utilizando una aguja vacutainer del No 21 y tubos vacutainer con heparina sódica. La sangre fue centrifugada a 1500 rpm x 15 minutos y el plasma fue separado y alicuotado en tubos de poliestireno de 13 ml (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y congelado a -20° C. Posteriormente, 17.5 ml de plasma fueron precipitados con un volumen igual de solución de sulfato de amonio saturada al 66% a 4° C, colocados en congelación a -20° C por 1 hr, centrifugados a 10000 rpm x 20 minutos a 4° C y resuspendidos en 17 ml de PBS, repitiéndose la misma operación 2 veces más. El 3^{er} precipitado fue resuspendido en 10 ml de PBS y dializado en contra de regulador de Tris 0.1 M-NaCl 0.15 M, pH 8.0, a 4° C toda la noche, alicuotado en volúmenes de 1 ml en tubos ependorff (Axygen Scintific, USA) y almacenado a -20° C hasta su uso.

3.5.1.2 Purificación de Igs en cromatografía líquida. Se realizó una prueba de cromatografía líquida de exclusión por peso molecular utilizando una combinación de un método estándar (Hudson y Hay, 1989) y un método reportado en tortugas *Chelonia mydas* (Herbst y Klein, 1995). Una columna de 2.5 x 100 cm (Pharmacia Fine Chemicals) fue empacada con Sephadex G-200 (Sigma, Chemicals Company, St Louis, MU, USA), equilibrada con regulador de Tris 0.1 M-NaCl 0.15 M y pH 8.0. 5 ml del tercer precipitado de inmunoglobulina fue corrido en la columna y eluidados con regulador de Tris 0.1 M-NaCl 0.15 M, pH 8.0, a un flujo de 50 ml^{hr} y recolectadas utilizando el colector de fracciones (Retiever III Mod. 328, ISCO, Lincoln, Nebraska, USA). Las fracciones fueron

analizadas con luz ultravioleta (UV) a 280 nm en un espectrofotómetro (DV-64 spectrophotometer, Beckman). Las fracciones de proteína seleccionadas fueron reducidas por calentamiento en buffer de muestra con mercaptoetanol y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %, de acuerdo al método de Laemli (1970), en una cámara de minigeles (Hoescht). Una vez identificadas las fracciones que contenían las inmunoglobulinas de tortuga, fueron juntadas, concentradas a 5 ml por medio de diálisis en azúcar glass y dializadas en contra de PBS pH 7.2 a 4° C toda la noche. La muestra fue esterilizada por filtración (0.22 µm), alicuotada en volúmenes de 1 ml y determinada su concentración final de proteínas por el método de Bradford (1986) y congeladas a -20° C.

3.5.1.3 Preparación de anticuerpos IgG anti-Inmunoglobulina (anti-Ig) de tortuga.

Una cabra hembra, adulta, no gestante fue inoculada vía subcutánea con 0.5 ml (3 mg) de Ig-tortuga mezclada con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Chemicals Company, St Louis, MU, USA), previa toma de 5 ml de sangre para determinar los niveles basales del título. 15 días después, 2 dosis de 0.5 ml (3 mg) de Ig de tortuga en PBS pH 7.2 fueron aplicadas vía intravenosa (IV) a intervalos de 8 días, previa toma de 5 ml de sangre para monitoreo del título por precipitación en capilar. Después de alcanzar un título de anticuerpos apropiado, fueron obtenidos 100 ml de sangre de la cabra por punción de la vena yugular por medio de aguja del No 21 y tubos vacutainer sin anticoagulante (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La sangre fue centrifugada a 1500 rpm x 15 minutos y el suero fue separado, alicuotado a volúmenes de 10 ml y congelado a -20° C, utilizándose únicamente 17.5 ml de suero para precipitación con sulfato de amonio como se describió anteriormente. Una muestra de 5 ml de inmunoglobulinas fue corrida en una columna de Sephadex G-200 y las fracciones obtenidas fueron analizadas con luz UV por espectroscopia, identificadas por electroforesis SDS-PAGE, concentradas, dializadas en contra de PBS pH 7.2, alicuotadas y congeladas a -20° C, de la misma forma que se describió anteriormente.

3.5.1.4 Titulación de anticuerpos IgG de cabra anti-Ig de tortuga. Una prueba de ELISA directa fue utilizada para titular las IgG anti-Ig de tortuga obtenidas, de acuerdo a un procedimiento estándar (Crowther, 2001). En una placa de 96 pozos (Maxisorp, Nunc-immunoplate, Naige Nunk Internacional, Dinamarca), 50 μ l/pozo de regulador de carbonatos, pH 9.5, fueron puestas en triplicado en la columna 1 como blanco, de la columna 2 a la 12, 50 μ l/pozo de IgG en regulador de carbonatos, pH 9.5, fueron puestas en diluciones dobles seriadas, iniciando 1:10, e incubadas toda la noche a 4° C. La placa fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 %, bloqueada con 100 μ l/pozo de leche descremada al 5 % (DIFCO), e incubada por 1 hr a 37° C. La placa fue nuevamente lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada con 50 μ l/pozo de IgG de ratón anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa de rábano (RAG, 10-176R28601, NVSL) en leche descremada al 1% e incubada por 1 hr a 37° C. Después de 8 lavados con PBS-Tween al 5 %, 100 μ l/pozo del sustrato (ABTS, Reagents NVSL) fueron adicionados, incubados en la oscuridad a temperatura ambiente y leídos a los 15 minutos en un lector de ELISA (Micro Reader 4 plus, Hyperion Inc, Miami, FL) a 405 nm. Un valor positivo fue considerado a partir del valor del blanco más 2 desviaciones estándar.

3.5.2 Cuantificación de Igs totales de tortugas *Chelonia mydas*.

3.5.2.1 Optimización de reactivos. Una técnica de ELISA estándar de Cross-board (Crowther, 2001) fue utilizada para encontrar las diluciones óptimas de antígeno, IgG anti Ig-tortuga y conjugado.

3.5.2.2 Optimización de conjugado. En una placa de 96 pozos, fueron colocados 50 μ l/pozo de IgG de cabra anti-Ig de tortuga en regulador de carbonatos, pH 9.5, en diluciones dobles seriadas, iniciando en 1:50, de la columna 1 a la 11. En la columna 12, 50 μ l/pozo de regulador de carbonatos, pH 9.5, fueron colocados como blanco. La placa fue incubada a 4° C toda la noche, posteriormente fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 %, bloqueada con 100 μ l/pozo de leche descremada al 5 % (DIFCO), e incubada por 1 hr a 37° C. La placa fue nuevamente lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada de la fila A a la H con 50 μ l/pozo de IgG de ratón anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa de rábano

(RAG, 10-176R28601, NVSL) en leche descremada al 1% en diluciones dobles seriadas, iniciando 1:200, e incubada por 1 hr a 37° C. Después de 8 lavados con PBS-Tween al 5 %, 100 µl/pozo del sustrato (ABTS, Reagents NVSL) fueron adicionados, incubados en la oscuridad a temperatura ambiente y leídos a los 15 minutos en un lector de ELISA (Micro Reader 4 plus, Hyperion Inc, Miami, FL) a 405 nm.

3.5.2.3 Optimización de plasma de tortuga e IgG anti- Ig de tortuga. En una placa de 96 pozos, 50 µl/pozo de plasma en regulador de carbonatos, pH 9.5, en diluciones dobles seriadas, iniciando 1:20, de la columna 1 a la 11, en la columna 12 fueron colocados 50 µl/pozo de buffer de carbonatos como blanco. La placa fue incubada a 4° C toda la noche, posteriormente fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 %, bloqueada con 100 µl/pozo de leche descremada al 5 % (DIFCO), e incubada por 1 hr a 37° C. La placa fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada de la fila A a la G con 50 µl/pozo de IgG anti-Ig de tortuga en leche descremada al 1%. 50 µl/pozo de buffer de carbonatos, pH 9.5, como blanco e incubada 1 hr a 37° C. La placa fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada con 50 µl/pozo de una dilución 1:1000 de IgG de ratón anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa de rábano (RAG, 10-176R28601, NVSL) en leche descremada al 1%. Después de 8 lavados con PBS-Tween al 5 %, 100 µl/pozo del sustrato (ABTS, Reagents NVSL) fueron adicionados, incubados en la oscuridad a temperatura ambiente y leídos a los 15 minutos en un lector de ELISA (Micro Reader 4 plus, Hyperion Inc, Miami, FL) a 405 nm.

3.5.2.4 Cuantificación de Igs totales en plasma de tortuga por ELISA indirecta. En una placa de 96 pozos, 50 µl/pozo de plasma de cada tortuga, diluida 1:20 en regulador de carbonatos, pH 9.5, fue colocada en triplicado. Una curva estándar fue desarrollada colocando 50 µl/pozo de Ig purificada de tortuga (6 mg/ml) diluida en regulador de carbonatos en diluciones dobles seriadas, iniciando en 1:50 y finalizando en 1:3200. 50 µl/pozo de plasma de perro diluido 1:20 en regulador de carbonatos fue colocado en triplicado como control negativo y 50 µl/pozo de regulador de carbonatos fue colocado en triplicado como blanco. La placa fue incubada 2 hr a 37° C, lavada 4 veces con PBS-

Tween al 5 %, bloqueada con 100 μ l/pozo de leche descremada al 5 % (DIFCO), e incubada por 1 hr a 37° C. Después, fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada con 50 μ l/pozo de IgG anti-Ig de tortuga en leche descremada al 1% e incubada 1 hr a 37° C. La placa fue lavada 4 veces con PBS-Tween al 5 % y llenada con 50 μ l/pozo de una dilución 1:1000 de IgG de ratón anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa de rábano (RAG, 10-176R28601, NVSL) en leche descremada al 1%. Después de 8 lavados con PBS-Tween al 5 %, 100 μ l/pozo del sustrato (ABTS, Reagents NVSL) fueron adicionados, incubados en la oscuridad a temperatura ambiente y leídos a los 15 minutos en un lector de ELISA (Micro Reader 4 plus, Hyperion Inc, Miami, FL) a 405 nm. Los valores positivos se consideraron aquellos mayores al valor del blanco más 2 desviaciones estándar. La transformación de unidades de DO a μ g se realizó utilizando el logaritmo en base 10 de cada valor, graficando en las ordenadas el logaritmo (Log) de la DO y en las abscisas los μ g de la curva estándar e interpolando los valores de Log de la DO de cada muestra. El resultado obtenido fue multiplicado por el factor de dilución del plasma (1:20) para obtener los μ g/ml.

3.6 Medición de la inmunidad celular por pruebas de hipersensibilidad retardada.

3.6.1 Estandarización de la técnica. Se realizó una técnica modificada a la descrita por Binns *et al* (1990) y Hong *et al* (2000) de la manera siguiente: 3 tortugas clínicamente sanas de 13 meses de edad fueron inoculadas con 50 μ g de PHA (Sigma Chemicals Company, St Louis, MU, USA) en 100 μ l de PBS, pH 7.2, en el pliegue de la piel ventrolateral izquierdo de la cloaca y, en el pliegue ventrolateral derecho de la cloaca, fueron inoculadas con 100 μ l de PBS como control. La cinética de la respuesta fue medida a las 24, 48 y 72 hrs.

3.6.2 Medición basal de la piel. La piel fue medida antes de las inoculaciones utilizando un micrómetro digital (Mitsutoyo, Tokio, Japón) expresando el grosor de la piel en mm y marcada con tinta indeleble para identificar el sitio exacto de inoculación.

3.6.3 Inoculación. 50 :g de PHA (Sigma Chemicals Company, St Louis, MU, USA) en 100 :l de PBS, pH 7.2, fueron inoculados en ambos grupos en el pliegue ventrolateral izquierdo de la cloaca. 100 :l de PBS, pH 7.2, fueron inoculados en el mismo pliegue del lado derecho como control (Figura 6).

3.6.4 Medición de la reacción intradérmica. La piel fue medida en ambos grupos a las 48 hrs. posinoculación, utilizando un micrómetro digital y expresando el grosor de la piel en mm, de acuerdo a los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica.

3.6.5. Histología de la prueba de hipersensibilidad retardada. Fueron tomadas 1 biopsia por cada tortuga del sitio de inoculación con PHA y 4 biopsias al azar de los sitios inoculados con PBS (control), para caracterizar la histología de la reacción. El proceso fue el siguiente:

- A) Biopsia de las zonas inoculadas con PHA y PBS. Las biopsias fueron tomadas con un sacabocados de 6 mm, previa anestesia local con 0.1 ml de xilocaína al 2 % y fijadas en una solución de formaldehído amortiguado al 10 %.
- B) Tinción de las muestras con Hematoxilina-Eosina y Giemsa (tinción diferencial de leucocitos). Las muestras fueron procesadas, teñidas y revisadas por microscopía óptica.



Figura 5. Estanque de concreto con flujo continuo de agua.



Figura 6. Inoculación intradérmica de PHA en la región de la cloaca.

3.7 Cuantificación de Corticosterona plasmática por Kit de ELISA competitiva.

Un kit comercial para cuantificación de corticosterona (OCTEIA Corticosterone, IDS, UK) fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8 Análisis estadístico.

Se realizaron pruebas de hipótesis para la diferencia de medias utilizando el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS).

4. Resultados

4.1 Animales de estudio

El grupo de tortugas sanas únicamente pudo formarse con 7 organismos de un total de 160, debido a que el resto presentó dermatitis ulcerativa de severidad variable. Esto arrojó una prevalencia del 95.6 % de la enfermedad.

Los pesos y medidas resultantes en ambos grupos se muestran en el Cuadro 3, Gráfica 1 y 2. El grupo de tortugas sanas tuvo un largo del carapacho y peso mayor, estadísticamente significativo ($p < 0.01$).

4.2 Histopatología.

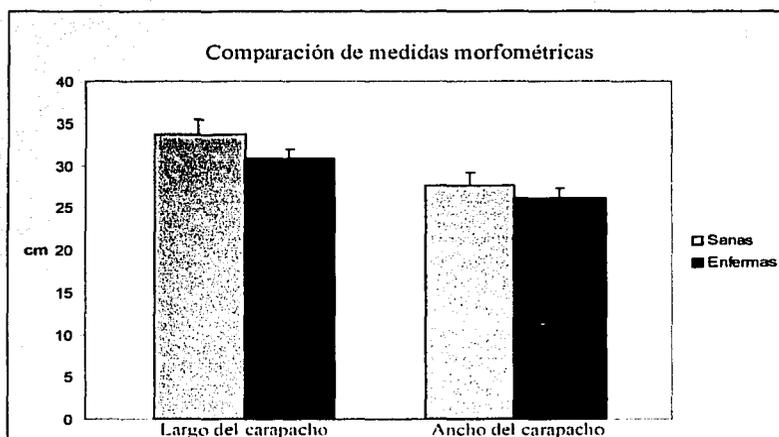
En todas las biopsias teñidas con H-E de tortugas enfermas seleccionadas al azar se observó en epidermis, necrosis coagulativa, acantolisis, pérdida de la queratina y abundante infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por heterófilos, que abarca todas las capas. En la dermis se observa infiltrado inflamatorio por heterófilos y escasos mononucleares (Figura 7). En la tinción de gram se observaron microcolonias de bacterias gram negativas en dermis y epidermis (Figura 8).

4.3 Hemograma.

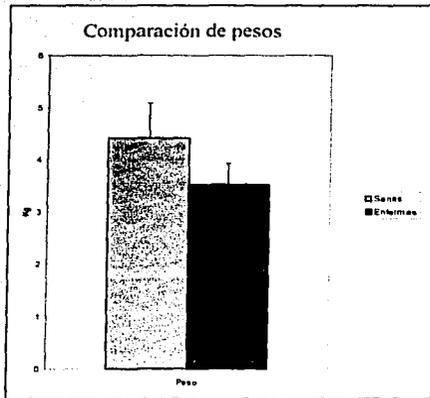
Las diferentes líneas celulares observadas en los frotis sanguíneos teñidos con hemocolorante rápido se muestran en la figura 9. Los resultados de la comparación de leucocitos totales y la relación heterófilo/ linfocito se muestran en el Cuadro 4 , Gráfica 3 y 4 . Las medias de los leucocitos totales no tuvieron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos grupos, pero sí existió una diferencia significativa ($p > 0.0001$) entre las medias de la relación heterófilo/linfocito (H/T).

Cuadro 3. Comparación de pesos y medidas. Existe una diferencia significativa en peso y largo de carapacho en ambos grupos, siendo mayor en las tortugas sanas ($p < 0.01$).

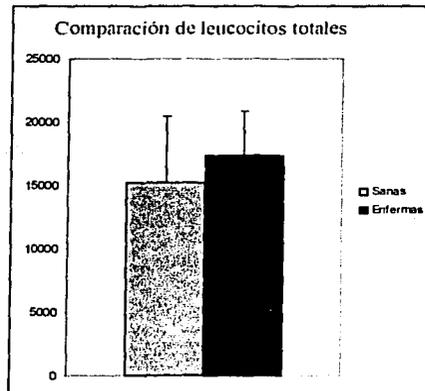
Grupo	Largo del carapacho (cm)			Ancho del carapacho (cm)			Peso (Kg)		
	Media \pm DS	rango		Media \pm DS	rango		Media \pm DS	rango	
Sanas (n=7)	33.67	1.76	30.6-35.8	27.69	1.53	25-29.7	4.41	0.67	3.39-5.32
Enfermas (n=8)	30.76	1.15	29.3-32.4	26.1	1.18	24.9-28	3.52	0.4	2.8-3.96



Grafica 1. Comparación morfométrica entre los 2 grupos, donde se muestra una diferencia significativa en el largo del carapacho, pero no en el ancho ($p < 0.01$)



Grafica 2. Comparación de pesos que muestra una diferencia significativa entre tortugas sanas y enfermas ($p < 0.01$).



Grafica 3. Comparación de leucocitos totales que no muestran diferencia significativa ($p < 0.01$).

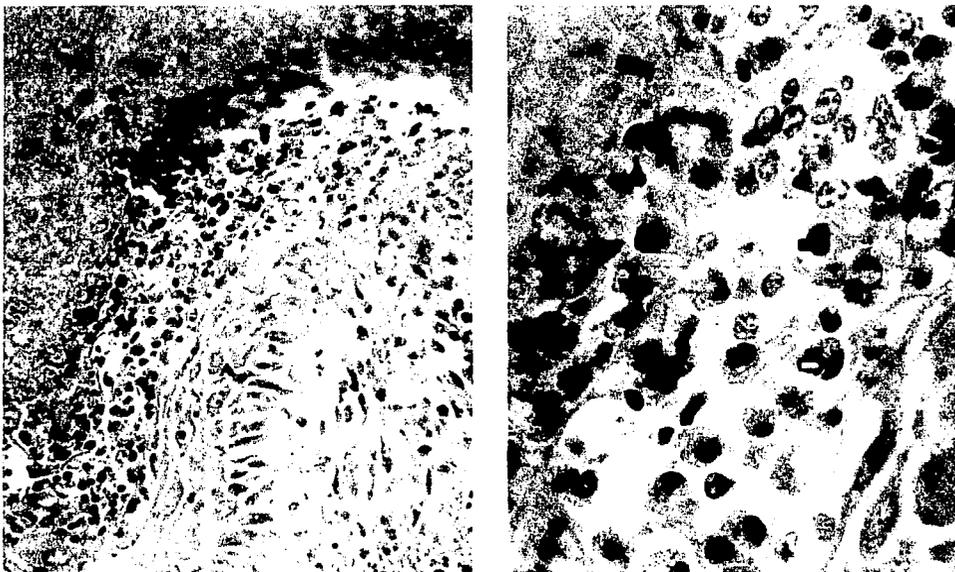


Figura 7. Abundante infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por heterófilos (flecha blanca), con algunos mononucleares (flecha roja) (100x); así como necrosis (N) y acantolisis (A) en epidermis y dermis (40x)

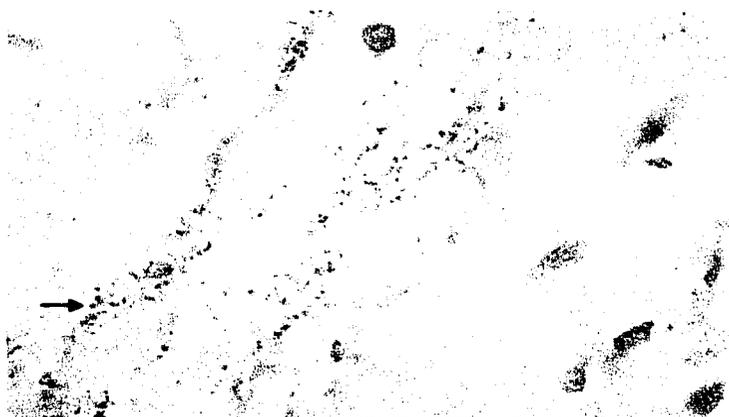


Figura 8. Microcolonias de bacterias gram negativas (flecha) en la dermis (100x).

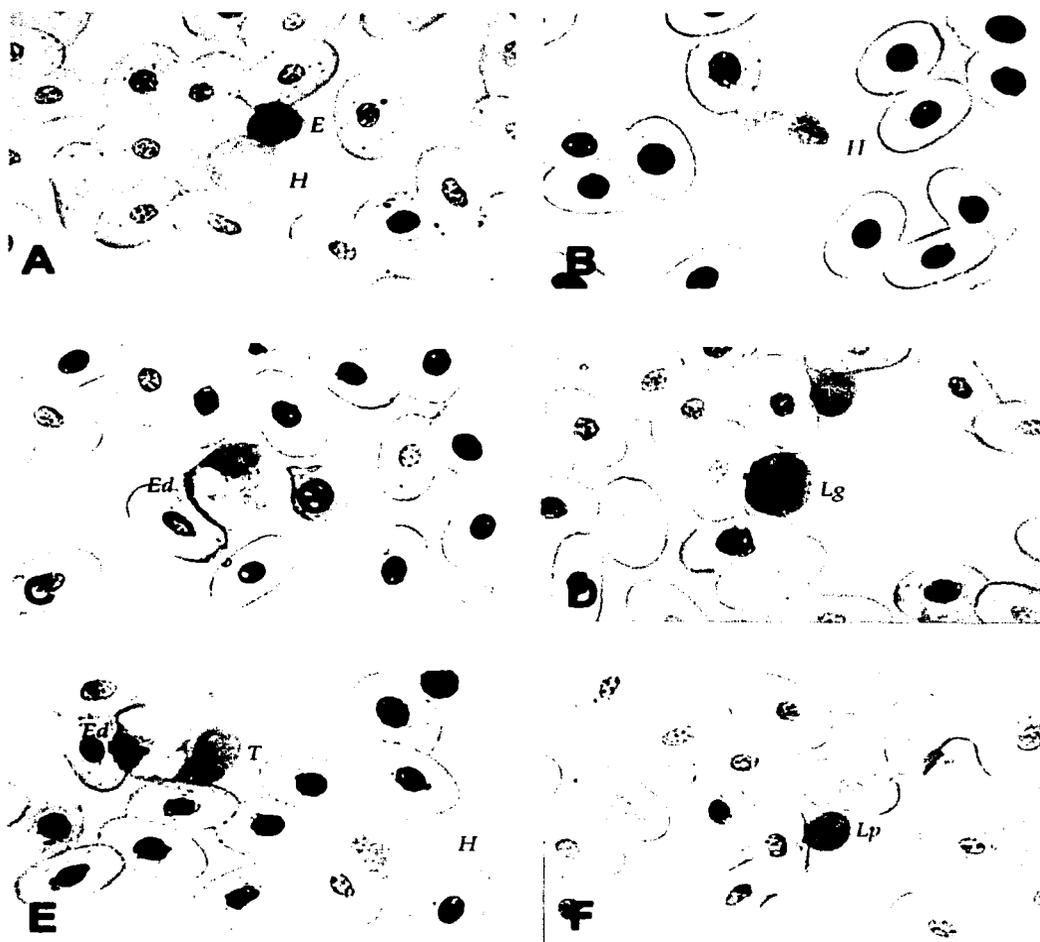
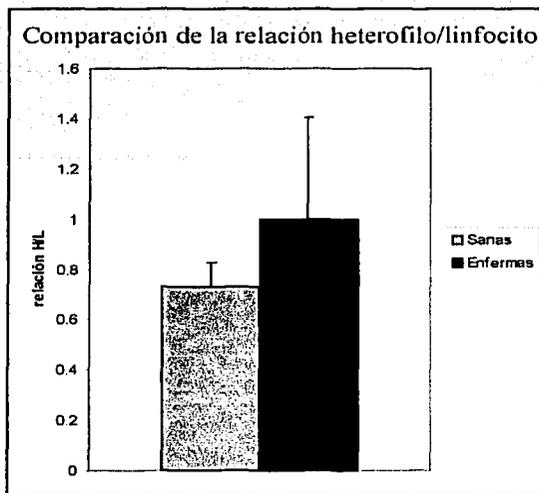


Figura 9. Morfología de leucocitos de sangre periférica teñidos con Hemocolorante rápido (100x). A, Eosinófilo (*E*) con un heterófilo(*H*) abajo; B, Heterófilo (*H*) donde se aprecian los granulos teñidos de color naranja pálido y núcleo azul claro; C, Eosinófilo degranulado (*Ed*) de abundante citoplasma y granulos escasos y refringentes; D, Linfocito grande (*Lg*), con gránulos y citoplasma moderado; E, comparación de un eosinófilo degranulado (*Ed*), un trombocito (*T*) y un heterófilo (*H*); F, Linfocito pequeño con gran núcleo y escaso citoplasma.



Gráfica 4. Existió una diferencia significativa evidente entre tortugas sana y enfermas

Cuadro 4. Comparación de leucocitos totales y relación heterófilo linfocito.

Grupo	Leucocitos totales*			Relación H/T**		
	Media ± DS	rango		Media ± DS	rango	
Sanas (n=7)	15221	5229	8750-21400	0.731	0.095	0.593-0.846
Enfermas (n=8)	17375	3737	11000-21000	1.659	0.43	0.959-2.129

*p<0.05

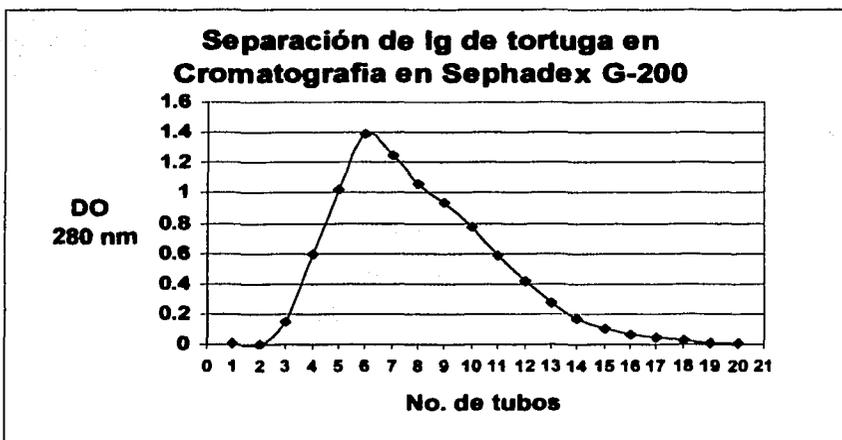
**p<0.0001

4.4 Cuantificación de Ig totales de tortuga utilizando la técnica de ELISA indirecta.

Purificación de Ig de tortuga. La espectrofotometría reveló un pico mayor, que al ser analizado por SDS-PAGE permitió identificar las cadenas ligeras y pesadas de la IgM, IgY 7S e IgY 5.7S, de acuerdo a la literatura (Gráfica 5, Figura 10). Una vez concentrada y dializada la fracción deseada, fueron obtenidos 5 ml de Inmunoglobulinas, conteniendo una concentración de proteína de 6 mg/ml.

Titulación de IgG anti-Ig de tortuga. La fracciones obtenidas por cromatografía a partir de Inmunoglobulinas de cabra precipitadas del suero por sulfato de amonio, mostraron 2 picos principales cuando fueron analizados por espectroscopia, e identificados por SDS-PAGE como IgM e IgG (Gráfica 6) El valor positivo (blanco mas 2 desviaciones estándar) para la ELISA fue de $DO > 0.285$. Los resultados de la ELISA directa para titular IgG anti-Ig tortuga mostraron un título de 1:2560, como se observa en la Gráfica 7.

Cuantificación de Ig totales de tortuga. La Gráfica 8 muestra la curva estándar utilizando Ig de tortuga purificada. Los resultados en μg para la comparación entre los grupos de tortugas enfermas y sanas se observa en el Cuadro 5. Aunque se observó una diferencia aparente en la media de ambos grupos, no existió una diferencia significativa ($p < 0.01$) (Gráfica 9).

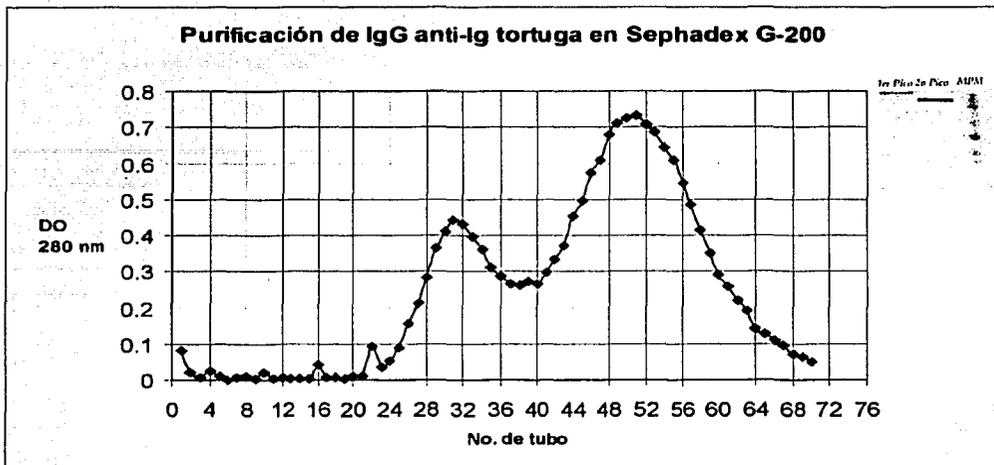


Grafica 5. Purificación en cromatografía líquida del precipitado con sulfato de amonio de plasma de tortuga, donde se observa un pico mayor de absorvancia, con un máximo en el tubo 7.

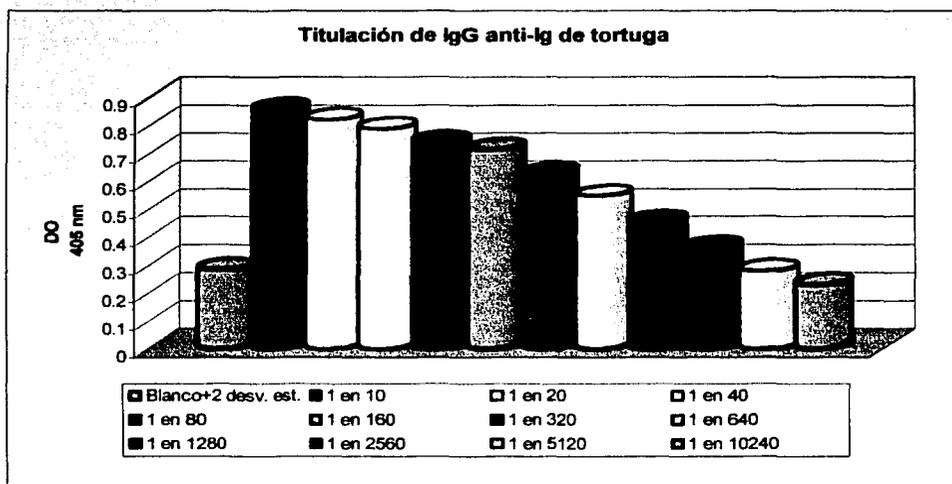


Electroforesis al 12 % con 2-mercaptoetanol

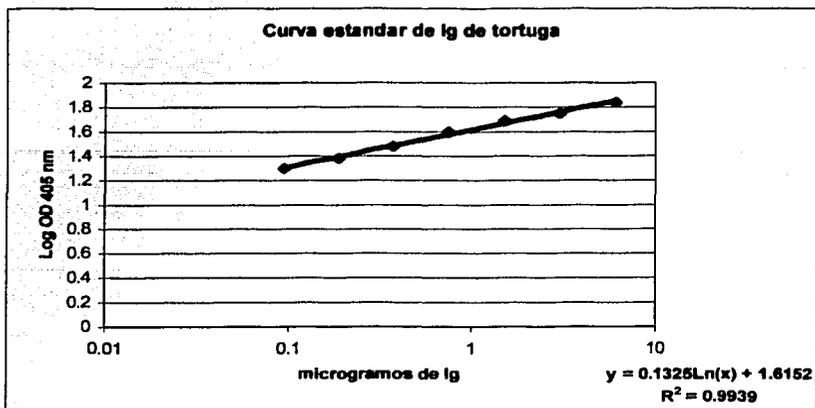
Figura 10. SDS-PAGE en condiciones reducidas que muestra las bandas correspondientes a las cadenas ligeras (23.1 kDa) las cadenas pesadas de IgM (77 kDa), IgY 7S (63 kDa) e IgY 5.7S (33.8 kDa).



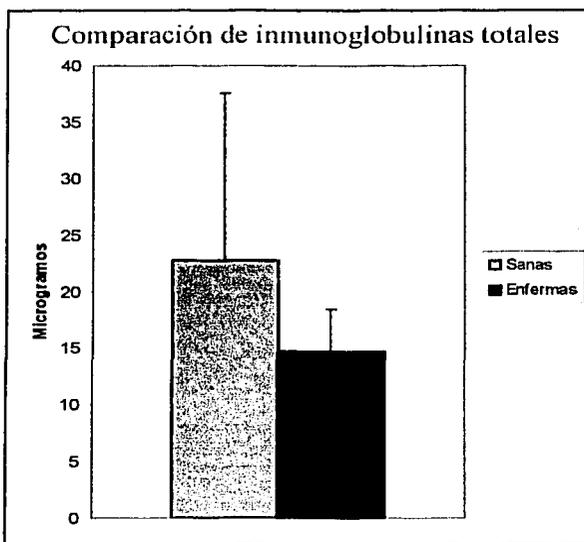
Gráfica 6. Separación en cromatografía líquida de anticuerpos de cabra, donde se observan 2 picos, el primero corresponde a la IgM y el segundo a la IgG.



Gráfica 7. Titulación de IgG de cabra anti-Ig de tortuga, donde un valor positivo es tomado a partir del valor del blanco más 2 desviaciones estándar, obteniéndose un título de 1:2560.



Gráfica 8. Curva estándar de Inmunoglobulinas purificadas de tortuga *Chelonia mydas*.



Gráfica 9. A pesar de una diferencia aparente, esta no fue significativa ($p < 0.01$) entre las medias de inmunoglobulinas totales.

4.5 Medición de la inmunidad celular por pruebas de hipersensibilidad retardada.

1. Estandarización de la técnica.

El tiempo óptimo para medir la máxima respuesta de hipersensibilidad retardada a la fitohemaglutinina fue de 48 hrs, indicando una cinética parecida a la reportada en otras especies (Gráfica 5).

2. Prueba de hipersensibilidad retardada en ambos grupos.

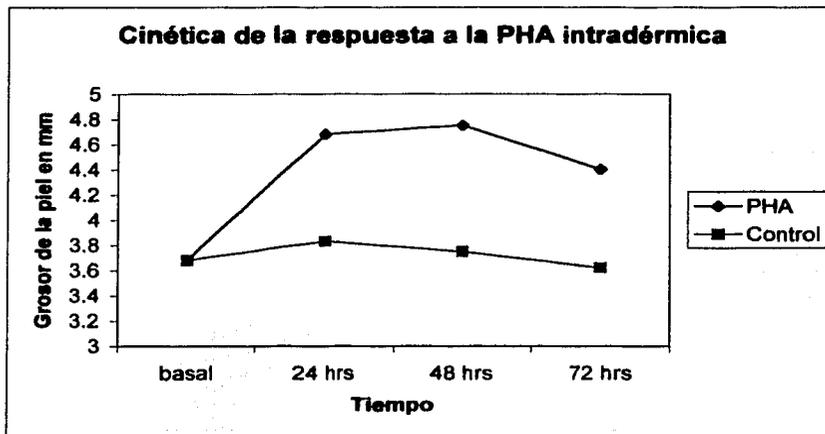
Los resultados de la medición de la piel en ambos grupos se muestran en el cuadro 5. Existió una diferencia significativa entre las medias de los 2 grupos ($p < 0.0008$).

3. Histología

Las biopsias teñidas con H-E demostraron la presencia de un infiltrado perivascular de células mononucleares, observándose mucho más intenso en las biopsias de tortugas sanas que en las enfermas (Figura 11A-11B). La tinción diferencial (Giemsa) demostró que el infiltrado era casi en su totalidad de células mononucleares con muy escasos heterófilos, poniendo de manifiesto que la reacción fue de hipersensibilidad retardada y no de inflamación por granulocitos (Figura 12).

4.6 Cuantificación de Corticosterona plasmática

Con el kit comercial se detectaron los resultados que se observan en el Cuadro 6. En el grupo de tortugas sanas 2 de 7 tortugas mostraron valores superiores a 0, y en el grupo de tortugas enfermas 5 de 8.

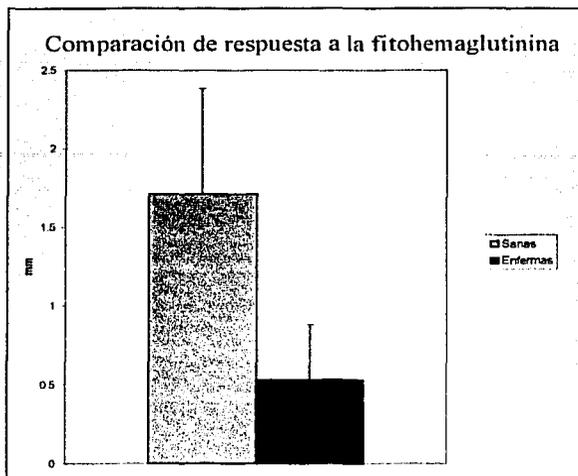


Gráfica 10. Estandarización de la prueba de hipersensibilidad retardada donde se observa que el tiempo óptimo de reacción es a las 48 hrs.

Cuadro 5. Comparación de microgramos/ml de Ig totales detectadas en plasma por ELISA indirecta.

Grupo	IG totales (:g)**		DTH (mm)*		
	Media ± DS	rango	Media ± DS	rango	
Sanas (n=7)	22.74	14.82	11.18-53	1.713	0.67 0.43-2.61
Enfermas (n=8)	14.7	4.01	11-24	0.53	0.12 0.21-1.12

*p<0.0008, **p<0.01



Gráfica 11. El grupo de tortugas sanas mostró una eficiente respuesta a la fitohemaglutinina inoculada intradérmicamente comparada con la pobre respuesta de las tortugas enfermas.

Cuadro 6. Nanogramos/mililitro de corticosterona medidos por ELISA de competición.

Concentración de corticosterona en plasma	
Tortugas sanas	ng/ml
XC807	0
XC808	11
XC809	11
XC810	0
XC811	0
XC820	0
XC821	0
Tortugas enfermas	
XC812	0
XC13	0
XC814	4.5
XC815	17
XC816	0
XC817	13
XC818	3
XC819	1



Figura 11A. Fuerte infiltrado perivascular de células mononucleares en la biopsia de piel de una tortuga sana estimulada con PHA (100x)



Figura 11B. Débil infiltrado perivascular en biopsia de piel de tortuga enferma, a pesar de la estimulación con PHA(100x).



Figura 12. Tinción con Giemsa de biopsia de piel de tortuga sana estimulada con PHA(100x). Nótese un heterófilo (flecha blanca, gránulos naranja) entre la abundante presencia de células mononucleares y algunos eritrocitos (flecha roja).

5. Discusión

La dermatitis ulcerativa es una enfermedad presente en todas las granjas y criaderos de tortuga blanca y aunque ha sido objeto de análisis amplio, este es el primer estudio que aborda el problema desde el punto de vista inmunológico. En las características generales que comprendieron peso y medidas morfométricas, el grupo de tortugas sanas promedió un peso y un largo de carapacho mayor que las tortugas enfermas, a pesar de consumir la misma cantidad de alimento y mostrarse muy activas, sin manifestar letárgia o inapetencia. Esto fue muy probablemente debido a que el estrés y los procesos inflamatorios crónicos presentan una mayor demanda de energía, lo cual se refleja en un menor crecimiento y menores reservas de grasa corporal (Aguirre *et al*, 1995). Glazebrook y Campbell (1990) realizaron un estudio profundo de las enfermedades en granjas tortugueras de Australia, encontrando una prevalencia de casi el 100% de dermatitis ulcerativa, este valor coincide con nuestro resultado de 96.5%, confirmando que es la enfermedad más prevalente, no solo en tortugas blancas cautivas, sino en otros reptiles de granja, en donde se ha reportado, es un factor en común que predispone a brotes agudos de altas mortalidades (Novak y Seigel, 1986). En su trabajo en Australia, Glazebrook y Campbell (1990) concluyeron que debido al cautiverio, el sistema inmunológico de las tortugas estuvo en constante desafío contra bacterias saprófitas, y que debido a la presencia de heridas provocadas por las mordidas, se llevo a cabo un proceso invasivo de las bacterias, provocando la elevada prevalencia de la dermatitis. Sin embargo, no propusieron ningún posible mecanismo inmune que estuviera alterado, que permitiera que el problema se volviera crónico. Aunado a esto, nosotros notamos que los sitios donde las tortugas se mordían no coincidieron completamente con el patrón de distribución de las lesiones, siendo únicamente las puntas de las aletas y la cola los sitios infectados que los animales preferentemente mordían. En la histopatología se revelo que, efectivamente, existió una invasión de bacterias gram negativas en la piel afectada. Sin embargo, también estableció que a pesar de un curso crónico de varios meses, la respuesta inflamatoria fue principalmente de heterófilos, lo cual provocaba daño tisular extenso por degranulación, sin contener la invasión bacteriana. La escasa presencia de células mononucleares no coincide con los hallazgos histopatológicos

en enfermedades crónicas en otras especies de tortugas (Jacobson *et al.*, 1991) y más recientemente, en la descripción de la cinética de inflamación experimental en serpientes (Tucunduva *et al.*, 2001), donde no solo las células mononucleares son ampliamente predominantes en los procesos inflamatorios crónicos, sino que al parecer juegan un papel fundamental desde el inicio de la respuesta. Durante la evolución, la piel de los vertebrados ha desarrollado un mecanismo inmune específico para responder rápidamente a antígenos medioambientales e inicia una respuesta primaria contra antígenos extraños. De esta forma los keratinocitos responden a estímulos inflamatorios inespecíficos, produciendo una amplia variedad de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y factores quimiotácticos que inician la respuesta inmune innata y pueden conducir al desarrollo de inmunidad adaptativa (Bos *et al.*, 1993). De acuerdo a lo anterior, la histopatología evidencia una alteración de la respuesta inflamatoria que involucra a las células mononucleares, ya que la presencia de abundantes heterófilos puede indicar que la respuesta se inicia pero que no existe una conclusión ni regulación del mismo.

El hemograma ha sido ampliamente utilizado como una prueba básica para monitorear el estado de salud de un amplio número de especies. En animales no mamíferos, se ha demostrado que aunque el conteo total de leucocitos y su diferencial es muy útil, la relación que existe entre el número de heterófilos y linfocitos (H/L) es un indicador muy confiable de la percepción del estrés. La tinción de los frotis sanguíneos con hemocolorante rápido permitió una buena técnica para diferenciar las diferentes líneas celulares. Como ha sido reportado en la literatura, únicamente los trombocitos presentaron, en ocasiones, algunas dificultades para diferenciarlos de los linfocitos pequeños. Gross y Siegel (1983) determinaron que la relación H/L puede ser un parámetro más confiable del estrés social que las concentraciones plasmáticas de corticosterona, debido a que, la relación H/L mide un cambio fisiológico, mientras que la corticosterona plasmática es afectada por muchos factores (temporada del año, temperatura, manejo, etc.) antes que los cambios fisiológicos ocurran. De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados muestran una relación H/L muy elevada en el grupo de tortugas enfermas, a pesar de que en el conteo de leucocitos totales no existió diferencia significativa entre ambos grupos, indicando que las tortugas enfermas se encuentran crónicamente estresadas. Estos resultados son reforzados

por los hallazgos de Aguirre (1995) quien demostró que el estrés por captura en *C. mydas* de vida libre, produce un aumento en el conteo total de leucocitos, tanto en tortugas sanas como en enfermas, pero que la linfopenia y la heterofilia, que trae consigo una relación H/L más alta, es significativamente característica de los individuos enfermos. Work (2001) también encontró que no solo la relación H/L esta aumentada en tortugas blancas de vida libre, enfermas de fibropapilomatosis, comparada con el grupo control de tortugas sanas, sino que el incremento en esta relación aumenta con la severidad de la enfermedad, convirtiéndose así en un indicador fisiológico muy importante de la severidad de la enfermedad (Work y Balazs, 1999). En tortuga *Chelonia mydas* cautivas, Varela (1997) encontró que los mismos resultados del incremento en la relación H/L en tortugas de vida libre coincidieron con sus hallazgos en tortugas cautivas.

Las pruebas de hipersensibilidad retardada utilizando mezclas de antígenos o mitógenos, han probado su eficacia para monitorear la inmunidad celular *in vivo*, no solo en humanos, sino en diversas especies de mamíferos y aves (Parmentier *et al* 1998; Hong *et al*, 2000). El presente trabajo reporta la primera prueba de hipersensibilidad retardada realizada en tortuga blanca *C. mydas*, la cual tuvo una cinética y características histológicas concordantes con lo obtenido en mamíferos y aves. El grupo de tortugas sanas respondió vigorosamente a la estimulación con PHA, a excepción de una tortuga (XC821) que tuvo una respuesta muy pobre. En el grupo de tortugas enfermas, estas respondieron débilmente a la estimulación, con excepción también de una tortuga (XC819). Estos dos ejemplares que respondieron de manera contraria a lo esperado, a pesar de encontrarse una clínicamente sana y otra con dermatitis ulcerativa evidente, pudieron estar en una etapa de transición de salud a enfermedad o viceversa (XC819), aunque no se puede descartar una anérgia por idiosincrasia propia del animal o una variación normal de la prueba por el tamaño de muestra pequeño. Debido a que la piel presenta una amplia población de linfocitos T, agrupados en linfocitos intraepiteliales, generalmente 3L, y unidades perivasculares dermales, compuestas de linfocitos T CD4⁺ K2, algunos linfocitos T CD8⁺, macrófagos y células cebadas, en donde los linfocitos presentan una glicoproteína llamada antígeno cutáneo asociado a linfocitos (CLA, por sus siglas en ingles) (Debenedictis *et al*, 2001), la utilización de PHA en pruebas de hipersensibilidad retardada no solo demuestra

que estimula específicamente a los linfocitos T, los cuales son, en un amplio porcentaje, células de memoria que fueron estimulados por antígenos que ingresaron por vía cutánea, sino que también está evaluando la respuesta inmune específica de la piel. De acuerdo con lo anterior, las biopsias de ambos grupos mostraron las características histológicas reportadas en mamíferos (Binns *et al*, 1992; Otto *et al*, 1993; Taura *et al* 1995), donde predominó un infiltrado perivascular de células mononucleares, compuesto principalmente de macrófagos y linfocitos, evidenciados por la tinción de Giemsa, que fue mucho mayor en el grupo de tortugas sanas, lo cual evidencia un estado de anergia de los linfocitos T en el grupo de tortugas enfermas, debido probablemente al estrés del cautiverio, lo cual fue reforzado por la elevada relación H/L mostrada en el Hemograma.

Las inmunoglobulinas desarrollan importantes funciones biológicas contra agentes infecciosos, entre tales funciones, la opsonización para facilitar la fagocitosis y la fijación del complemento es fundamental en contra de bacterias extracelulares (Goldsby *et al*, 2000). Aunque en nuestros resultados, el grupo de tortugas sanas tuvo una concentración media de inmunoglobulinas más elevada que las tortugas enfermas, no hubo una diferencia estadística significativa entre ambos grupos. Esto refuerza la observación de un estado de anergia de linfocitos T ya que, en este estado, existiría un muy bajo nivel de cooperación entre linfocitos T y B, impidiendo el desarrollo de una respuesta humoral vigorosa, a pesar de que podemos suponer que existe presencia de lipopolisacárido (LPS) en los tejidos afectados y que este es un potente estimulador inespecífico de linfocitos B. Work *et al* (2000) confirmó que la tortuga blanca es capaz de producir una adecuada respuesta a antígenos específicos y que en tortugas enfermas, la fracción de gammaglobulinas está disminuida probablemente por inmunosupresión. Sin embargo, al carecer de información acerca del perfil de citocinas y el estado del mecanismo de fagocitosis, es difícil determinar la causa exacta de esta disminución. Aunado a esto, es importante recalcar que los animales sujetos a estrés tienen un mayor gasto metabólico y como consecuencia, son menos eficientes para sintetizar anticuerpos (Aguirre *et al*, 1995). Turton (1997) encontró que la baja temperatura puede provocar un efecto inmunosupresor directo, sin involucrar al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, por disminuir el metabolismo de los reptiles. Esto podría relacionarse al hecho de que el grupo de tortugas enfermas tuvo un bajo porcentaje de grasa

corporal, lo que significaría una mayor pérdida de calor en invierno, temporada en que fue realizado el trabajo, trayendo como consecuencia una disminución en su tasa metabólica, todo esto corroborado por los valores de los pesos de las tortugas enfermas, comparados con las sanas.

Los corticoesteroides producidos por la estimulación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal han sido utilizados extensamente como indicadores del estrés fisiológico. Las elevaciones de corticosticosterona inducidas por el estrés, han sido demostradas en una variedad de reptiles (Cash *et al*, 1997; Tyrrel y Cree, 1998). El método mas utilizado ha sido el radioinmunoensayo (RIA), el cual requiere manejo de material radiactivo, infraestructura y permisos que no siempre están disponibles. Nosotros utilizamos un kit comercial basado en una técnica colorimétrica (ELISA competitiva) que utiliza anticuerpos policlonales, buscando un método alternativo más práctico. En el grupo de tortugas sanas, 2 de 7 organismos (28.6%) presentaron valores detectables y en el grupo de tortugas enfermas, 5 de 8 (62.5%). 5 tortugas sanas y 3 enfermas no mostraron concentraciones detectables. Existen varios puntos para poder explicar estos resultados. El primero es la sensibilidad del kit, el cual tiene una detección mínima de 0.23 ng/ml. Aguirre (1995) reportó valores basales en tortugas blancas sanas de vida libre, de 0.70 ng/ml (DS 0.24ng/ml) y un pico de 2.70 ng/ml (DS 0.88 ng/ml) a las 4 hrs poscaptura, que declino a las 24 hrs. En tortugas enfermas reportó valores basales de 1.49 ng/ml (DS 1.71 ng/ml) y un pico de 6.04 ng/ml (DS 2.31 ng/ml) a las 24 hrs. Sin embargo, Gregory (2001) detecto en tortugas loras (*Lepydochelis kempii*) de vida libre, valores basales de corticosterona de 6.16 ng/ml (DS 2.31 ng/ml), donde algunos valores de su rango fueron tan bajos como 0.03 ng/ml. De acuerdo a los datos anteriores, en nuestro trabajo los valores detectados como 0 ng/ml pudieron estar por debajo del punto de sensibilidad del kit, lo cual es muy factible dado que en otro trabajo con tortugas caguama (*Carreta carreta*) (Gregory *et al*, 1996) se reportó que en el rango de los valores basales de corticosterona existieron niveles casi indetectables utilizando RIA (<0.05 ng/ml). Segundo, puede existir una variabilidad muy alta entre grupos particulares de tortugas, probablemente debida al tiempo de captura y toma de muestras, variabilidad genética y la experiencia en algunos organismos de capturas anteriores, como podría ser el caso de acostumbrarse al manejo o ser muy sensible al

mismo, lo cual es muy probable en tortugas cautivas, que están bajo manejo relativamente constante. Así lo reportó Gregory (1996) donde los valores basales de corticosterona variaron de acuerdo al tamaño de la tortuga y la época del año (pequeñas 4.71 ng/ml, grandes 1.19 ng/ml, en verano; pequeñas 1.26 ng/ml, grandes 1.04 ng/ml, en invierno) así como por el tiempo de captura (0.55 ng/ml en tiempos de 8 min y 2.07 ng/ml a los 37 min). Aguirre (1995) estableció un tiempo máximo de 10 minutos para la toma de muestras sin que existieran alteraciones significativas en las concentraciones de corticosterona. En nuestro trabajo, dos tortugas presentaron dificultades para lograr tomar la muestra sanguínea de manera rápida, debido a su alto porcentaje de grasa corporal que dificultó la localización del seno venoso, lo que se reflejó en un tiempo que superó los 10 minutos establecidos por Aguirre (1995), provocando un mayor estrés por manejo y estímulo doloroso de la venopunción, que se reflejó en valores altos de corticosterona. Aunque los resultados fueron algo variables, las tortugas enfermas tuvieron valores mayores de corticosterona, la cual podría estar participando en la anergia de linfocitos T, ya que entre sus muchos efectos en el sistema inmune, se encuentran la linfolesis y la modificación en el patrón de distribución de los linfocitos. Así mismo, son altamente lipofílicos por lo que pueden atravesar la membrana citoplasmática y unirse a receptores citosólicos, evitando la expresión de diversos genes entre los que se encuentran los involucrados en la activación de linfocitos T y la producción de citosina (Goldsby *et al*, 2000).

6. Conclusiones

- Las tortugas afectadas con dermatitis ulcerativa están crónicamente estresadas e inmunosuprimidas a nivel de inmunidad celular, probablemente desencadenada por el mismo estrés.
- Esta inmunosupresión es probablemente debida, al menos hasta estos resultados, a un estado de anérgia en los linfocitos T de la piel, aunque algún otro factor inmunológico asociado que no fue evaluado (citocinas, subpoblaciones, etc.) no puede aun ser descartados.
- Los resultados de este trabajo también proveen datos valiosos acerca de la inmunidad celular de la piel de las tortugas marinas y ponen de manifiesto la gran similitud con la respuesta caracterizada en mamíferos. También se demuestra que para medir el estrés en estas especies, es necesario la utilización de 2 o más pruebas en diferentes intervalos de tiempo, que den mayor confiabilidad a los resultados.
- Esta inmunosupresión y la gran prevalencia de las dermatitis ulcerativas puede ser un factor desencadenante de los grandes brotes de mortalidades agudas en Xcaret, por lo que un campo para la aplicación de la inmunoterapia como tratamiento alternativo, queda abierto con grandes posibilidades de éxito.
- Finalmente, es necesario estudiar con mayor profundidad otros aspectos inmunológicos, tales como subpoblaciones celulares, fagocitosis, complemento, etc., y desarrollar mejores técnicas de laboratorio, que superen las dificultades que presentan las especies silvestres no mamíferas.

7. Literatura citada

Pritchard P. C. Evolution, Phylogeny and Current Status. En: Peter L. Lutz & John A. Musick, editores. The Biology of Sea Turtle. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997:363-382.

Hirayama R. Oldest know sea turtle. NATURE 1998;392:705-707.

Márquez, R. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de cultura económica. México, D.F., 1996.

Bowen BW, Meylan AB, Ross JP, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC. Global populations structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. Evolution 1992;46:865-881.

El Ridi, R. Reptilian immune system. En: Roitt, editor. Encyclopedia of immunology. USA: Academic Press, 1994:1313-1316.

Zapata AG, Varas A, Torroba M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol. Today 1992;13:142-147.

Jones TT, Salmon M, Wyneken J, Johnson C. Crianza de neonatos de tortuga Laúd: Protocolos, crecimiento y supervivencia. Sea turtle Newsletter 2000(90):3-5.

Glazebrook JS, Campbell RSF. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. Dis. Aquat. Org. 1990; 9:83-95.

Aguirre AA, Spraker TR, Chaves A, du Toit L, Eure W, Balazs GH. Pathology of fibropapillomatosis in olive ridleys turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. J Aquat Anim Health 1999;11:283-289.

Herbst LH. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Ann Rev Fish Dis* 1994;4:389-425

Crouse DT, Crowder LB, Caswell H. A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. *Ecology* 1987;68:1412-1423.

Frye, FL. Biological and surgical aspects of captive reptile husbandry. Editorial Krieger Publishing Company. Malabar, Florida, 1991.

Saad AH, Torroba M, Varas A, Zapata A. Testosterone induces lymphopenia in turtles. *Vet Immunol Immunopathol* 1991;28:173-180.

Jurd, RD. Reptiles and birds. En: Turner, editor. *Immunology: A comparative approach*. New York, USA: John Wiley and Sons, 1994:137-171.

El Deeb S, El Ridi R, Zada S. The development of Lymphocytes with T or B membrane determinants in the lizard embryo. *Dev Com Immunol* 1986;10:353-364.

Cuchens MA, Clem LW. Phylogeny of lymphocytes. IV. Evidence for T-like and B-like cells in reptiles. *Dev Comp Immunol* 1979;3:465-475.

Mansour MH, El Ridi R, Badir N. Surface markers of lymphocytes in the snake, *Spalerosophis diadema*. *Immunology* 1980;40:605-611.

Work TH, Balaz GH, Rameyer RA, Chang SP and Berestecky J. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;74: 179-194.

Muñoz FJ, Galvan A, Lerma M, De la Fuente M. Seasonal Changes in peripheral blood leukocyte functions of the turtle *Mauremys caspica* and their relationship with



corticosterone, 17-beta-estradiol and testosterona serum levels. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;77:27-42.

Negm H, Mansour MH. Phylogenesis of lymphocyte diversity I. Immunoglobulin Determinants on the Lymphocyte surface of the lizard *Agama stellio*. *Dev Comp Immunol* 1982;6:519-532.

Negm H, Mansour MH. Phylogenesis of lymphocyte diversity II. Characterization of *Agama stellio* Ig negative lymphocytes by a heterologous anti-thymocyte serum. *Dev Comp Immunol* 1983;7:507-516.

Muñoz FJ, Galvan A, Lerma M, De la Fuente M. The immune response of thymic cells from the turtle *Mauremys caspica*. *J Comp Physiol B* 2001;

Work TH, Raskin RE, Balaz GH, Whittaker SD. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *Am J Vet Res* 1998;59:1252-1257.

Bounous DI, Dotson TK, Brooks Jr RL, Ramsay EC. Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *Comp Haematol Int* 1996;6:86-91.

Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *Am J Vet Res* 1999;60:507-514.

Aguirre AA, Spraker TR, Balazs GH y Zimmerman B. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles from the hawaiian islands. *J Wildlife Dis* 1998;34:91-98.

Tucunduva M, Borrelli, Silva JRM. Experimental study of induced inflammation in the Brazilian boa (*Boa constrictor constrictor*). J Comp Path 2001;125:174-181.

Benedict AA, Pollard LW. Three Classes of immunoglobulins found in the sea turtle, *Chelonia mydas*. Folia Microbiol 1972;17:75-78.

Benedict AA, Pollard LW. The ontogeny and structure of the sea turtle immunoglobulins. Dev Immunol 1977; 315-323.

Herbst LH, Klein PA. Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody responses in the green turtle, *Chelonia mydas*. Vet Immunol Immunopathol 1995;46:317-335.

Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunology Today 1995;16:392-398.

Ambrosius H. Immunoglobulins and antibody production in reptiles. En: J. J. Merchalonis, editor. Comparative immunology. Oxford: Blackwell Scientific 1976:298-334.

Turchin A, Hsu E. The generation of antibody diversity in the turtle. J Immunol 1996;156:3797-3805.

Hsu E. Mutation, selection, and memory in B lymphocytes of exothermic vertebrates. Immunol Reviews 1998;162:25-36.

Tanaka Y, Elsey RM. Light microscopic study of the Alligator (*Alligator mississippiensis*) spleen with special reference to vascular architecture. J Morphology 1997;233:43-52.

Cuchens MA, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. III. Mitogenic responses of reptilian lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 1979;3:287-297.

El Deeb S, Saad AH. Ontogeny of Con A responsiveness and mixed leucocyte reactivity in the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Dev Comp Immunol* 1987;11:595-604.

McKinney EC, Bentley TB. Cell-Mediated immune response of *Chelonia mydas*. *Dev Comp Immunol* 1985;9:445-452.

El Ridi R, Wahby AF, Saad AH, Soliman MAW. Concanavalin A responsiveness and interleukin 2 production in the snake *Spalerosophis diadema*. *Immunobiol* 1987;174:177-189.

Millan DAA. Caracterización morfológica de las células de Langerhans epidérmicas en la tortuga terrestre *Kinosternum integrum* (tesis de Licenciatura). Ciudad de México (D.F) México: UNAM, 1996.

Nelson RJ, Demas GE. Seasonal changes in immune functions. *Quart Reviews Biol* 1996;71:511-548.

Aguirre AA, Balaz GH, Spraker TR y Gross TS. Adrenal and Hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool* 1995; 68: 831-854.

Jessop TS, Fitzsimmons NN, Colin JL. Interactions between behavior and plasma steroids within scramble mating system of the promiscuous green turtle, *Chelonia mydas*. *Horm Behav* 1999; 36: 86-97.

Tyrrel CL, Cree A. Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in wild reptile (Tuatara, *Sphenodon punctatus*). Gen Comp Endocrinol 1998;110:97-108.

George RH. Health problems and diseases of sea turtle. En: Peter L. Lutz & John A. Musick, editores. The Biology of Sea Turtle. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997:363-382.

Aguirre AA, Balazs GH, Zimmerman B, Spraker T. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. J Wildlife Dis 1994;30:8-15.

Kaplan H. Septicemic Cutaneous Ulcerative Disease of Turtles. Lab Animal Care 1957;7:273-277.

Crawford GJ, Fulton M. A turtle colony epizootic apparently of microbial origin. J Wildlife Dis 1970;6:466-468.

Romero-Jarero J, Montero-Rocha AB, Ferrara-Guerrero MJ, Lizarraga-Partida L, Rodriguez-Santiago H. Estudio de las enfermedades cutáneas en las tortugas marinas bajo condiciones de cautiverio. Memorias del VII Simposium Latinoamericano sobre Oceanografía Biológica; 1981 noviembre 15-19; Acapulco (Guerrero) México.

Glazebrook JS, Campbell RSF. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. Dis. Aquat. Org. 1990B; 9:97-104.

Swimmer JY. Biochemical responses to fibropapillomas and captivity in the green turtle. J Wild Dis 2000; 36(1): 102-110.

Work TM, Rameyer RA, Balazs GH, Cray C, Chang SP. Immune status of free-ranging green turtles from Hawaii with fibropapillomatosis. *J Wildlife Dis* 2001;37:574-581.

Owens DW y Ruiz GJ. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 1980;36:17-20.

Natt MP y Herrick CA. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 1952;31:735-738.

Cochet O. Immunological technicals made easy. John Wiley and Sons, Chichester, England, 1998.

Hudson L y Hay FC. Practical immunology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England, 1989.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254

Crowther JR. The ELISA guidebook. Humana Press. New Jersey, USA, 2001.

Binns RM, Licence ST y Woodding KBP. Phytohemagglutinin induces major short-term protease-sensitive lymphocyte traffic involving high endothelium venule-like blood vessels in acute delayed-type hypersensitivity-like reactions in skin and other tissues. *Eur J Immunol* 1990;20:1067-1071.

Hong WK, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BBC, Byrne KM, Hayek MG y Reinhart GA. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;74:315-327

Novak SS y Scigel RA. Gram-negative septicemia in american alligators (*Alligator mississippiensis*). *J Wildlife Dis* 1986;22:484-487.

Jacobson ER, Gaskin JM, Brown MB, Harris RK, Gardiner CH, Lapointe JL, Adams y Reggiardo C. Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises *Xerobates agassizii*. *J Wildlife Dis* 1991;27:296-316.

Bos JD y Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* 1993;14:75-78

Gross WB y Siegel HS. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis* 1983;27:972-979.

Work TM y Balazs GH. Relating tumor score to haematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J Wildlife Dis* 1999;35:804-807.

Varela RA. The immunology of green turtle fibropapillomatosis (tesis de Maestría). Boca ratón (Florida) USA: Florida atlantic University, 1997.

Parmentier HK, Reiling GDV y Nieuwland MGB. Kinetic and immunohistochemical characteristics of mitogen-induced cutaneous hypersensitivity in chickens selected for antibody responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:367-376.

Debenedictis C, Joubeh S, Zhang G y Ghohestani RF. Immune functions of the skin. *Clinics Dermatol* 2001;19:573-585.

Binns RM, Licence ST, Wooding FB y Duffus WPH. Active lymphocyte traffic induced in the periphery by cytokines and phytohemagglutinin: three different mechanisms?. *Eur J Immunol* 1992;22:2195-2203.

Otto CM, Brown CA, Lindl PA y Dawe D. Delayed hypersensitivity testing as a clinical measure of cell-mediated immunity in the cat. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;39:91-102.

Taura Y, Ishii K, Nagami M, Mikasa N, Nakaichi M y Nakama S. Changes in lymphoproliferation and DTH responses after vaccination immediately before surgery in puppies. *Jvet Med Sci* 1995;57:899-904.

Goldsby RA, Kin TJ y Osborne BA. *Kuby immunology*. W.H Freeman and Company. New York, USA, 2000.

Turton JA, Ladds PW, Manolis SC y Webb GJW. Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight. *Aust Vet J* 1997;75:114-119.

Cash WB, Holberton RL y Knight SS. Corticosterone secretion in response to capture and handling in free-living red-eared slider turtles. *Gen Comp Endocrinol* 1997;108:427-433.

Tyrrell CL y Cree A. Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (Tuatara, *Sphenodon punctatus*). *Gen Comp Endocrinol* 1998;110:97-108.

Gregory LF y Schimid JR. Stress responses and sexing of wild kemp's rydley sea turtles (*Lepidichelys kempii*) in the northeastern gulf of Mexico. *Gen Comp Endocrinol* 2001;124:66-74.

Gregory LF, Gross TS, Bolten A, Bjorndal KA y Guillette Jr J. Plasma corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Gen Comp Endocrinol 1996;104:312-320.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN