

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ADN DE
HERPESVIRUS EN MUESTRAS DE FIBROPAPILOMA DE
TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*), DEL CAMPAMENTO
TORTUGUERO LA "ESCOBILLA", OAXACA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JUAN FRANCISCO MUÑOZ GUTIÉRREZ

ASESORES:
MC José Ramírez Lezama
Dr. Daniel Martínez Gómez
MVZ Ángel García Hernández

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mamá, papá y Ale. Tres columnas inquebrantables en mi formación como ser humano y profesional. Su amor, apoyo, dedicación y comprensión han logrado que hoy pueda disfrutar de todo lo que tengo. Sé que han hecho un esfuerzo muy grande para que yo haya tenido los mejores momentos en mi vida, la mejor educación y las mejores herramientas para que pueda estar aquí. Espero que algún día yo llegue a hacer algo con tanta pasión como lo hacen ustedes al amar y cuidar a su familia.

A Gretel. Tu amor, cariño, ternura, apoyo, ejemplo, confianza y admiración han sido mi luz durante los últimos años. Gracias por lo que haces día con día. Sigue estando conmigo y veremos qué pasa mañana, estoy seguro de que estamos juntos.

A Marina, Cachi, Není, Coco, Juan Martín, Jacinto y José Luis. El mejor tesoro que uno puede llegar a tener en la vida es una familia estable, cálida y unida.

A mis abuelos Aurora, Lupita, Paco y Juan. Hoy muchos pueden decir que sólo mi abue Lupita puede apreciar lo que ha logrado formar como familia, sin embargo, creo que los demás siempre lo han estado viendo desde otro lado.

A Silvia, Horacio, Rosa, Paty, Arturo, Tere, Mary, Germán, Irma, José Luis, Laura, Mary. Gracias por compartir momentos tan agradables y por formar y cuidar una familia tan grande en todos los aspectos.

A Chucho, Jeka, Laura, Paulina, Midori, Natalia, Regina. Su amistad, apoyo y diversión durante mucho tiempo en la carrera es uno de los mejores recuerdos que puedo tener al caminar dentro de la facultad.

A la FMVZ-UNAM por darme la oportunidad de demostrar mi capacidad y habilidades.

AGRADECIMIENTOS

A Pepetón. Quién poco después de mi entrevista para servicio social confió en mí y me ofreció realizar este trabajo. Gracias por tu amistad y confianza.

A Daniel. Gracias por todo tu apoyo y amistad durante la realización de este trabajo. Eres uno de los doctores más subestimados en esta facultad.

A Ángel. Gracias por tu apoyo para la obtención de los permisos necesarios para el muestreo de esta tesis y por tu paciencia.

A Laura, Enrique, Gisela, Gerardo, Nuria, Elizabeth, Luis, Luis Enrique, Bety, Jaime, Danilo, Eugenia, Gilberto. Patólogos que al compartirme sus conocimientos me han enseñado lo hermoso y complejo que es la patología. Espero que algún día llegue a ser aunque sea una pequeña parte de lo que hoy son ustedes.

A los doctores Antonio Verdugo y Alfredo Castañeda por su apoyo y préstamo de la gran parte del material y equipo que utilice para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A Estelita, Nora y el resto del personal del laboratorio de Microbiología y Leptospira de la UAM. La construcción del control interno la logré gracias a sus consejos e infraestructura.

A Móni, Javi, Coral, Chachita, Addis, Lucy, Adrianita, Quique, Isaco, Regil, Ayín, Blanca, Fany, Dianita, Blanca, Edna, Mayito, Saúl. Muchas gracias por su amistad, enseñanzas y diversión en Patología. Nada de lo que he adquirido gracias a la Patología sería lo mismo sin ustedes.

A Jimena. Durante la realización de este trabajo tuve la oportunidad de conocerla y recibir mucho apoyo tanto moral como laboral e incluso al final pude obtener tu amistad.

A Wako, Mauricio, Adolfo, Emilio, Ileana, Gaby, Edith. Gracias por su ayuda, consejos y diversión en el LMM.

A Don Luis, Lupita y sus "chiminos". Agradezco los cortes que realizaron de las biopsias de mi tesis y de todos los casos que he visto en Patología, su trabajo es uno de los mejores.

A Eugenio por su apoyo en el arreglo de las fotos de mi tesis y presentaciones de clase y congresos.

A Orion, Flaca, Albina, Lolo, Bailey, Chelo, Piolín, Kodiak, Cash, Robin, Budy, Wanda. Por ser la mejor compañía en los peores momentos.

**ESTE TRABAJO ESTUVO FINANCIADO POR EL PROYECTO
PAPIT No. IN222307**

CONTENIDO

	Páginas
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVO GENERAL	9
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
6. MATERIAL Y MÉTODOS	10
6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	10
6-2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN POL DEL GTHV	10
6.3 DISEÑO DEL CONTROL INTERNO	14
6.4 CLONACIÓN DEL CONTROL INTERNO	16
7. RESULTADOS	20
7.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS	20
7.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	22
7.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	25
7.4 PCR	27
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIONES	35
10. PERSPECTIVAS	36
11. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

MUÑOZ GUTIÉRREZ JUAN FRANCISCO. Determinación de la presencia de ADN de herpesvirus en muestras de fibropapiloma de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), del campamento tortuguero “La Escobilla”, Oaxaca, México. (Bajo la dirección de MC José Ramírez Lezama, Dr. Daniel Martínez Gómez, MVZ Ángel García Hernández).

El fibropapiloma es una neoplasia que se ha descrito en diferentes especies de tortugas marinas, en la que se incluye la tortuga golfina. Este tumor se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos exofíticos y en ocasiones viscerales blanco-amarillos con superficie multinodular. Microscópicamente, hay acantosis, hiperqueratosis, proliferación fibroblástica e infiltrado inflamatorio mixto en la dermis. La etiología de esta neoplasia es incierta. Actualmente se han reportado hallazgos patológicos y moleculares que permiten relacionar el desarrollo de esta enfermedad en la tortuga verde con una infección viral por el Herpesvirus de la tortuga verde (GTHV). Con el objetivo de demostrar la presencia del GTHV en muestras de fibropapiloma de tortuga golfina, se construyó un control interno utilizando el gen *aph* como molde, en cuyos extremos se adicionaron secuencias específicas de la ADN polimerasa del GTHV. Este control interno fue utilizado para estandarizar una PCR que fue empleada en 31 muestras de fibropapiloma de tortuga golfina, que previamente habían sido diagnosticadas por medio de histopatología, en ninguna de las cuales se logró amplificar el fragmento de 441 pb de la ADN polimerasa del GTHV. Los resultados obtenidos difieren de los estudios publicados en la tortuga verde, en la cual se considera al GTHV como el principal

agente etiológico de fibropapilomas, lo que permite considerar otros factores como etiología de esta neoplasia en la tortuga golfina tales como otros agentes virales, una mutación del GTHV, o bien una etiología multifactorial.

2. INTRODUCCIÓN

El fibropapiloma cutáneo es una neoplasia de comportamiento biológico benigno, que se ha descrito en varias especies de tortugas marinas incluyendo a la tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga caguama o boba (*Caretta caretta*), tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), tortuga lora (*Lepidochelys kempii*), tortuga plana (*Natator depressus*) y la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*)¹.

El primer informe en el mundo de esta neoplasia se realizó en 1938, en una tortuga verde que pertenecía al Acuario de Nueva York, la cual había sido capturada, dos años antes, cerca de Key West, Florida². Ese mismo año, Smith y Coates, observaron 3 fibropapilomas dentro de una población de 200 tortugas verdes silvestres de Key West, Florida². Asimismo, Lucké describió tumores similares al fibropapiloma en la cola, aletas, axilas, cuello, párpados y córneas de una tortuga verde capturada de Cape Sable, Florida³. Además, Lucké y Schlumberger informaron sobre la presencia de fibropapilomas en tres tortugas verdes de Florida, así como numerosos tumores fibrosos en los pulmones de una tortuga⁴.

Posteriormente, en 1958 Hendrickson reportó la presencia de tumores fibrosos en las hembras que anidaban en las playas de Sarawak y Malaya⁵. En Hawaii, el primer caso informado fue en 1958, en una tortuga verde juvenil capturada por un pescador local en la bahía de Kaneohe, Oahu. Previo a este caso, en dicha bahía, Balazs realizó un estudio el cual sugirió que el fibropapiloma era poco frecuente e

incluso inexistente⁶. Desde entonces la frecuencia de fibropapiloma en tortugas marinas, principalmente en la tortuga verde, fue incrementando. En 1980, un brote de fibropapiloma ocurrió en un grupo de tortugas verdes adultas en British West Indies en el Caribe⁷. En 1982, Ehrhart *et al*, documentaron los primeros casos de fibropapiloma en el río Indio en Florida⁸. Curiosamente desde 1977 diversos estudios enfocados a la anidación dentro de la porción norte del río Indio no habían descrito alguna tortuga con fibropapiloma; pero cuando dicho estudio se dirigió hacia la porción central del río en 1982, se encontraron tortugas con fibropapiloma⁸. Los trabajos continuos en este sitio desde el año de 1982 han revelado una prevalencia de fibropapiloma cercana al 50%, e incluso ha sido hasta del 90% en la bahía de Kaneohe, en Hawaii¹.

En México, durante la quinta arribada de la temporada de anidación de 1997, se realizó un estudio observacional de campo. En este estudio, de una población total de 9,201 tortugas golfinas, sólo en 140 animales (1.5% de la población total), se observó uno o más fibropapilomas de diferentes tamaños⁹.

Macroscópicamente los fibropapilomas pueden presentarse de manera individual o multicéntrica, su diámetro oscila entre 0.1 cm hasta más de 30 cm. Los tumores individuales suelen tener aspecto verrucoso o liso y ser pediculados o sésiles. Los tumores de mayor tamaño frecuentemente están ulcerados y presentan áreas de necrosis¹.

La localización de los fibropapilomas es principalmente la piel de las aletas, el cuello, el mentón, la región inguinal, la región axilar y la base de la cola¹. Otro sitio de presentación es la conjuntiva (principalmente la conjuntiva bulbar); e incluso se han descrito sobre la córnea^{2,3,7}. Este tipo de neoplasias suelen presentar cierta cantidad de pigmento, la cual está relacionada con la pigmentación de la piel de donde se origina ésta¹. Asimismo, se han descrito también nódulos en órganos internos de tortugas verdes con fibropapiloma cutáneo^{4,10} en pulmones, riñones, corazón, tracto gastrointestinal e hígado¹.

Microscópicamente esta neoplasia está compuesta por dos elementos, uno mesenquimatoso y otro epitelial. La porción mesenquimatosa está constituida por la proliferación fibroblástica en la dermis, la cual está acompañada por vasos sanguíneos de nueva formación e infiltrado inflamatorio, compuesto frecuentemente por heterófilos, linfocitos, macrófagos, y con menor frecuencia, células gigantes multinucleadas. El componente epitelial está conformado por el aumento en el número de queratinocitos de la epidermis, principalmente del estrato espinoso (acantosis). Esta hiperplasia frecuentemente presenta proyecciones papilomatosas o pseudopapilomatosas exofíticas y usualmente está acompañada por hiperqueratosis. Además, en el estrato basal y espinoso de la epidermis se pueden observar queratinocitos con degeneración balonoide. Ocasionalmente, en los queratinocitos afectados se pueden observar cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos¹¹.

Aunque se considera una neoplasia de comportamiento biológico benigno, estos tumores pueden ser de gran tamaño e interferir con la locomoción, vista, ingesta y/o respiración, lo cual puede llevar a caquexia y posteriormente culminar en la muerte del animal. Con menor frecuencia, pueden llegar a ocasionar hidronefrosis, falla cardíaca y obstrucción a nivel gastrointestinal¹.

La etiología de esta neoplasia es incierta. No obstante, con base en los hallazgos de patología comparada y epizootiología, se han propuesto algunos factores que pueden intervenir en el desarrollo del fibropapiloma, los cuales incluyen agentes infecciosos, factores ambientales y factores genéticos¹.

Aunque existe una fuerte evidencia de que la etiología de esta neoplasia es de origen viral, hay algunos cofactores que pueden tener una participación adicional, entre los cuales se incluyen parásitos, susceptibilidad genética, químicos carcinogénicos, contaminantes ambientales, biotoxinas, inmunosupresión y radiación ultravioleta¹².

En este punto, se preservan dos principales hipótesis sobre la etiología: 1) la hipótesis “no neoplásica”, que sustenta que estos crecimientos pueden ser el resultado de un tejido de cicatrización o un tejido hiperplásico; y 2) la hipótesis “neoplásica”, que considera estos crecimientos como una neoplasia causada por uno de los diferentes agentes supuestos¹².

Dentro de estas lesiones neoplásicas se han identificado algunos virus, sin embargo, estos agentes no se han aislado en cultivo celular. Estos virus han sido clasificados en dos grupos: el primero de ellos involucra a los virus con envoltura, que son sensibles a factores ambientales, en los que se incluyen al herpesvirus y al retrovirus; el segundo grupo corresponde a los virus sin envoltura que son resistentes al ambiente y en el que se incluyen al papilomavirus y al poliomavirus¹².

Dentro de los estudios realizados en la tortuga verde en Florida, un herpesvirus, asociado al fibropapiloma (GTHV), ha sido identificado en más del 95% de los fibropapilomas de dicha especie¹. Este virus no se ha encontrado en piel o en otros tejidos sanos. En varias regiones de Florida, se han realizado estudios de transmisión en tortugas verde y boba que presentaron fibropapiloma, los cuales demuestran la implicación de un agente filtrable de carácter infeccioso. La inoculación experimental directa en tortugas de este filtrado ha demostrado que existe una transmisión horizontal, ya que se desarrollaron fibropapilomas en los sitios de inoculación en tortugas libres de la enfermedad¹³. Incluso, se han encontrado cantidades variables de ADN en tejidos y órganos de algunos peces limpiadores (*Thalassoma duperrey*), y en sanguijuelas marinas (*Ozabanchus* spp), lo cual sugiere que quizás estos animales actúen como vectores mecánicos del probable agente infeccioso¹⁴. Además existe evidencia ultraestructural de un agente viral con características morfológicas similares a herpesvirus⁷, sin embargo, en fibropapilomas de tortugas de Hawaii se ha identificado también un

papilomavirus¹⁵ y un retrovirus ¹⁶, lo cual ha complicado la determinación del agente infeccioso primario.

Como ya se ha mencionado estas neoplasias si bien no causan la muerte, eventualmente pueden convertirse en un problema grave ya que afectan la locomoción, ingesta, visión y respiración. En México desde 1980 existen programas de conservación de *Lepidochelys olivacea*, dentro estos programas de conservación el monitoreo de la salud de los individuos que se quiere conservar es un proceso básico. En este trabajo de investigación se analizó la presencia de fibropapilomas en tortugas golfinas y su posible correlación con la presencia del probable agente etiológico involucrado, lo cual se justifica debido a la escasa información que existe al respecto. De igual forma los resultados obtenidos impactan en otras áreas de protección pues la detección de GTHV en fibropapilomas implicaría que este virus es capaz de infectar otras especies de tortugas marinas además de la tortuga verde.

3. HIPÓTESIS

Se identificará ADN del GTHV (green turtle herpesvirus) en muestras de fibropapiloma cutáneo obtenidas de tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*).

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de ADN del GTHV en muestras de fibropapilomas cutáneos mediante la técnica de PCR con el fin de correlacionar la presencia de ADN viral y el desarrollo de fibropapiloma cutáneo en tortugas golfinas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar mediante histopatología piel con fibropapiloma de tortuga golfina.
- Extraer ADN de las muestras de fibropapiloma para amplificar regiones específicas del GTHV.
- Analizar los resultados obtenidos para correlacionar la presencia de ADN viral y el desarrollo de fibropapiloma cutáneo en tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio y toma de muestras

La playa que se consideró para la toma de muestras fue el campamento tortuguero “La Escobilla”, el cual pertenece al Centro Mexicano de la Tortuga y se encuentra ubicado en el kilómetro 19 de la carretera Puerto Angel – San Antonio, Mazunte, Sta. María Tonameca, Oaxaca. Este lugar es considerado como uno de los santuarios más importantes de arribada de tortuga golfina en México. La fecha de arribada considerada para el muestreo fue octubre-noviembre de 2006.

De cada una de las muestras recolectadas la mitad fue preservada en formol buferado al 10% para su estudio histopatológico para que posteriormente fueran procesadas con los métodos de rutina y teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E); la otra mitad se mantuvo en congelación para la posterior extracción de ADN.

6.2 Extracción de ADN y amplificación del gen *pol* del GTHV

Con el fin de extraer ADN de cada uno de los tumores se utilizó una adecuación del protocolo de Lu *et al*, que consistió en fragmentar el tejido congelado en pequeñas partes, las cuales fueron depositadas en tubos tipo Falcon de 15 mL. En estos tubos se añadieron 2 mL de buffer de lisis (25Mm Tris HCl pH 8.0, 25 Mm EDTA pH 8.0, 1% SDS) por cada 100 mg de tejido, así como 50 µL de proteinasa k (0.1 mg/mL). Estos tubos fueron mantenidos en baño maría con movimiento a 37°C durante 6 horas. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 4,500 g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se añadió 1 volumen de fenol:

cloroformo y el tubo fue agitado vigorosamente con ayuda de un agitador vórtex, para después centrifugarlo a 9,300 g durante 2 minutos. Luego, el ADN fue precipitado con 1/10 de volumen acetato de sodio (3M, pH 6.0) y 0.6 volúmenes de isopropanol (al 100%) frío. Las muestras se dejaron en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 14,700 g durante 12 minutos. Finalmente, el pellet obtenido se recuperó y se deshidrato en un equipo Savant y después se resuspendió en 12 a 15 μ L de H₂O estéril y congelado hasta su uso.

El ADN fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech[®]) y se observó su pureza mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A las muestras de ADN que presentaron ARN se les añadieron 5 μ L de RNAsa y fueron mantenidas a 37°C durante una hora.

Para la detección específica del GTHV se utilizó un par de iniciadores (GTHVpol) que amplifican un fragmento de 441 pares de bases, el cual está ubicado en la región amino entre los pares de bases 1945 y 2370, del gen que codifica para la polimerasa del GTHV. La secuencia de los iniciadores es la siguiente:

GTHVpol-1 5'-AGCATCATCCAGGCCCAATCT-3'

GTHVpol-2 5'-CCAGTTCCGGCGCGTCG-3'

La homología de este par de iniciadores fue comprobada por medio de la base de datos BLAST del NCBI (National Center of Biotechnology Information), de tal manera que para el iniciador GTHVpol-1 5'-AGCATCATCCAGGCCCAATCT-3' la homología reportada se muestra en la figura 1:

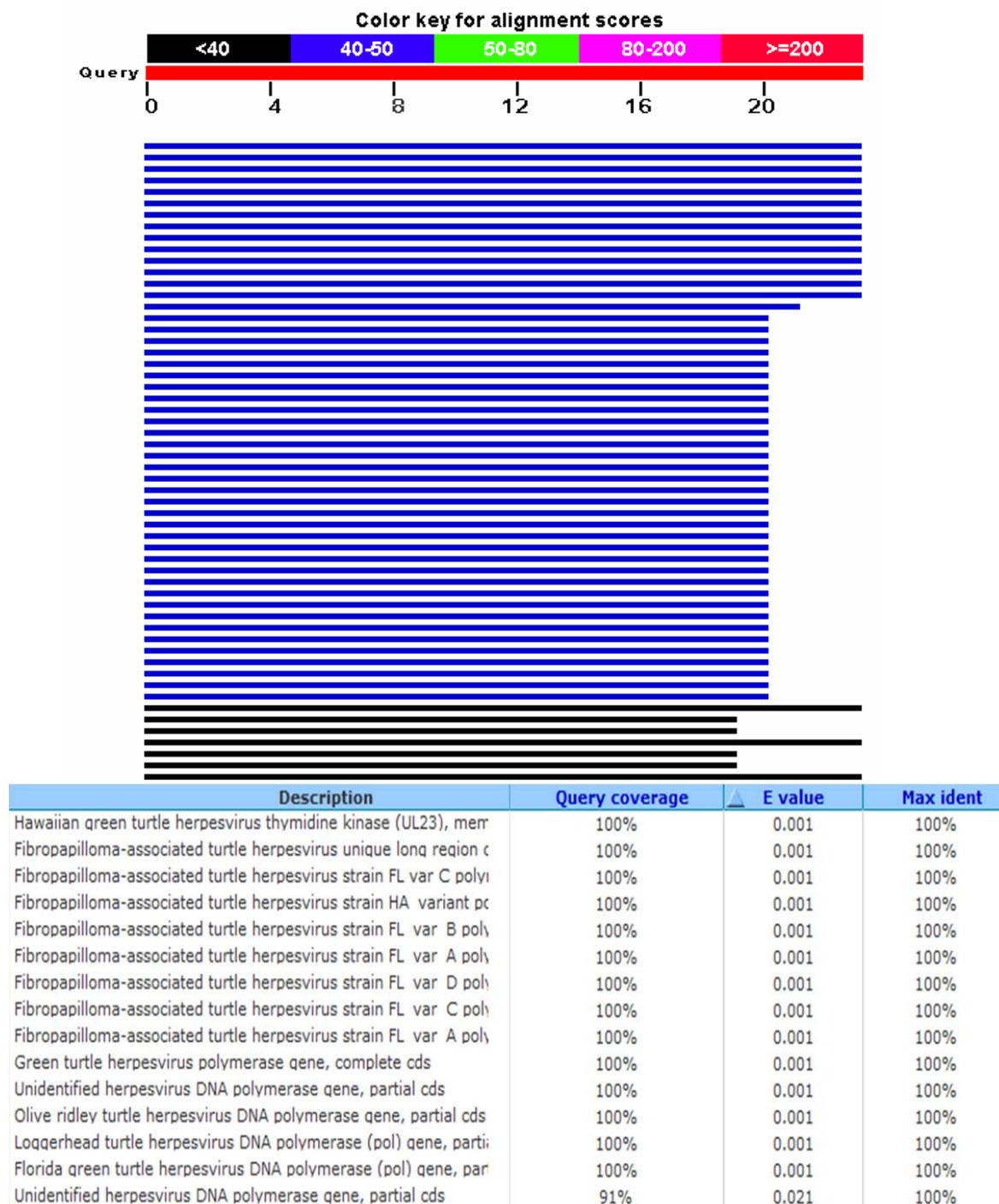


Figura 1. Homología del primer GTHVpol-1 mediante el BLAST del NCBI.

Y para el iniciador GTHVpol-2 5'-CCAGTTCCGGCGCGTCG-3', la homología reportada se muestra en la figura 2.

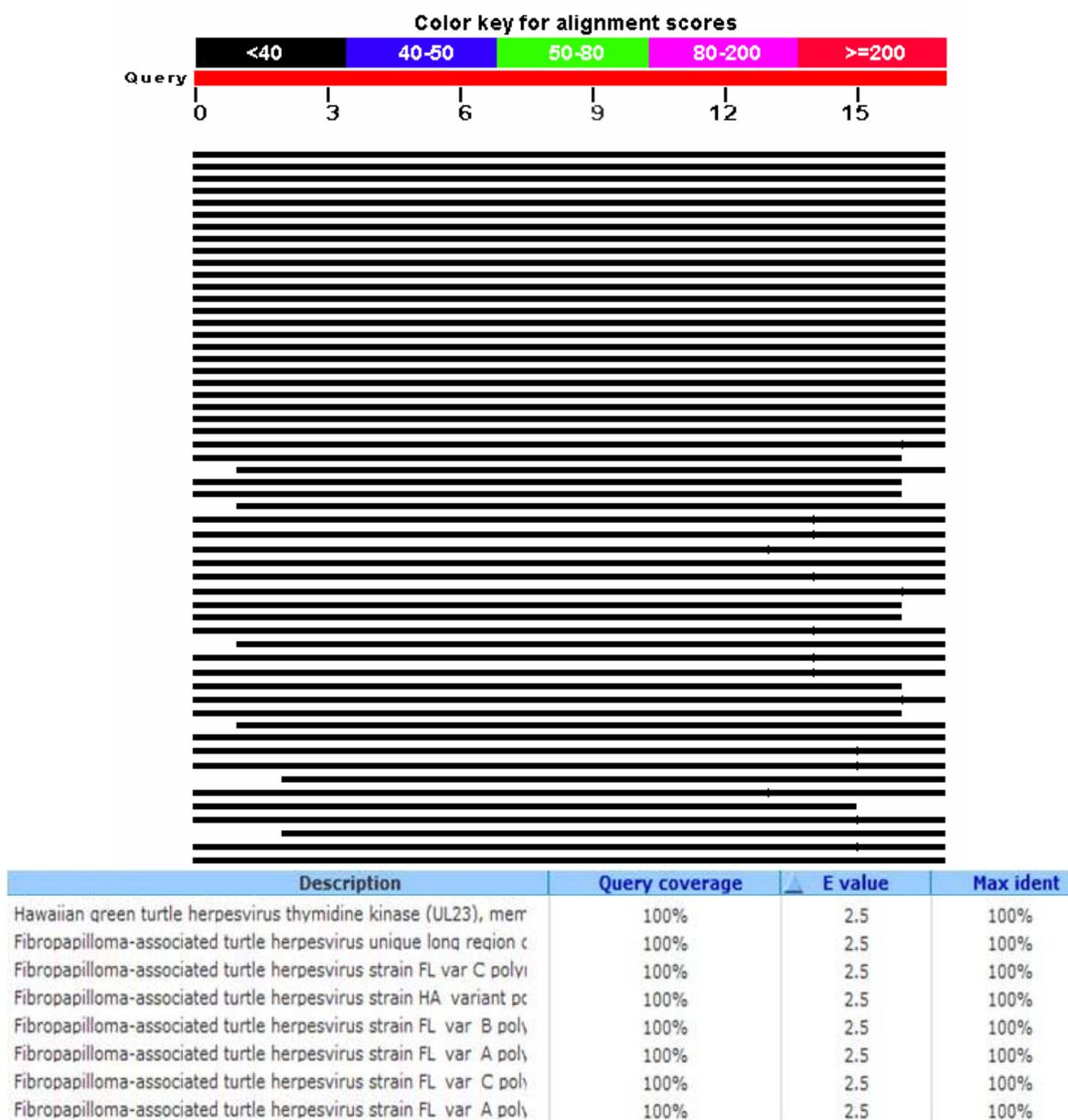


Figura 2. Homología del primer GTHVpol-2 mediante el BLAST del NCBI.

Las condiciones del ciclo fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto, alineamiento a 66°C por 1 minuto y extensión de 72°C por 1 minuto y extensión final de 72°C por 5 minutos.

6.3 Diseño del control interno

Con la finalidad de fortalecer los resultados obtenidos en la PCR se diseñó y construyó un control interno el cual presenta en los extremos secuencias específicas de la ADN polimerasa del GTHV y en el centro el gen *aph*. El gen *aph* (3'-aminoglicósido fosfotransferasa) que se encarga de promover la resistencia a kanamicina fue liberado del vector pUC4K, el cual previamente había sido introducido mediante electroporación en *E. coli* DH5 α , mediante la enzima de corte BamHI.

El fragmento liberado se utilizó como molde para amplificar el control interno empleando un par de iniciadores compuestos. Los iniciadores compuestos estaban constituidos por dos regiones, la primera reconoce secuencias específicas de la ADN polimerasa, y la segunda reconoce secuencias específicas del gen *aph*. Con este par de iniciadores se realizó una PCR, de la cual se obtuvo un producto amplificado de 817 pb, correspondiente al control interno (figura 3).

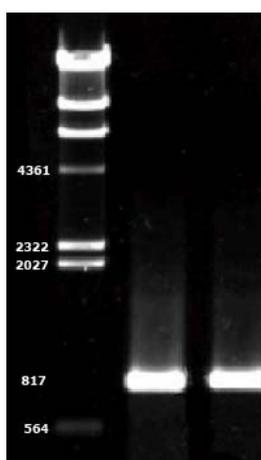


Figura 3. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. PCR 1. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular Lambda HindIII; producto amplificado correspondiente al control interno (817 pb).

Para corroborar que las regiones específicas de la ADN polimerasa del GTHV estuvieran presentes en el control interno se realizó una segunda PCR utilizando únicamente el par de iniciadores que reconocen secuencias específicas de la ADN polimerasa del GTHV (GTHVpol-1 y GTHVpol-2), lo cual se muestra en la figura 4. Asimismo, este control interno fue secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

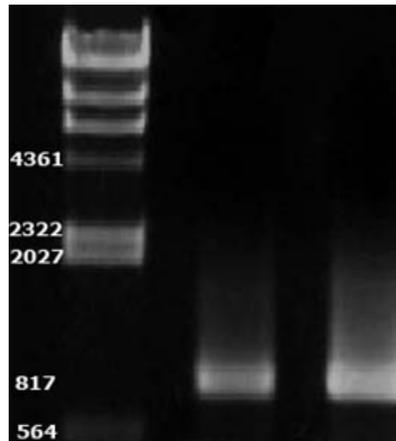


Figura 4. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. PCR 2. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular Lambda HindIII; producto amplificado correspondiente al control interno (817 pb).

Con el objetivo de determinar la concentración mínima de amplificación del control interno, se realizaron diluciones seriadas del mismo, a partir de una concentración inicial de 100 ng/ μ L. En estas diluciones se observó que a una concentración de 0.098 ng/ μ L el control interno se amplifica adecuadamente, y en una concentración de 0.048 ng/ μ L dicho amplificado se vuelve tenue y se pierde a partir de la concentración de 0.024 ng/ μ L (figura 5). Con base en estos resultados se logró determinar el margen de confianza de la amplificación del control interno el cual fue entre la concentración de 3.12 ng/ μ L y 0.098 ng/ μ L. Tomando como referencia estos valores se decidió emplear como la concentración de 1 ng/ μ L para usarlo simultáneamente con las muestras de fibropapiloma.

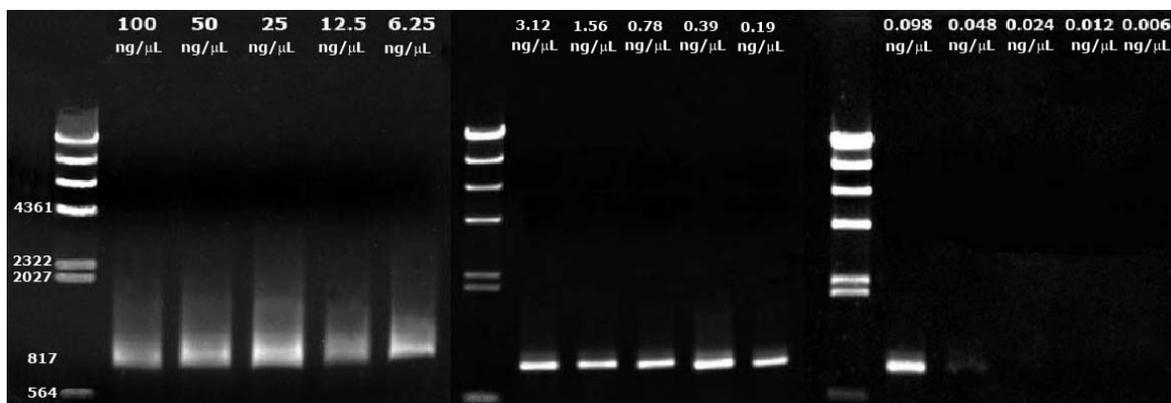


Figura 5. Foto de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Diluciones seriadas. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular Lambda HindIII; diluciones seriadas de 100 ng/μl hasta 0.006 ng/μl.

6.4 Clonación del control interno

El control interno amplificado fue clonado en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]), para lo cual se mezclaron en un tubo eppendorf 4μL del control interno amplificado, 1 μL de la solución de sal (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl₂) y 1 μL del vector. Este tubo se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Con lo anterior se obtuvo el plásmido GTHVKAN, el cual fue utilizado para transformar la cepa de *E. coli* DH5α mediante el protocolo de transformación por SEM.

Los viales de células competentes (*E. coli* DH5α), fueron descongelados a temperatura ambiente. Una vez descongelados, se agregaron los 6 μL de la reacción de ligazón que contenía al plásmido GTHVKAN y este tubo se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicó un choque calórico a 42° C durante 30 segundos y después se incubó en hielo. A este tubo se le agregaron 800 μL del medio YT2X y se incubó con agitación rápida durante 1 hora. Después, se sembraron 100 μL de este tubo en 3 cajas de petri con medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 μg/mL) y kanamicina (75 μg/mL), las cuales fueron

incubadas durante la noche a 37° C. Después, se eligieron al azar las colonias transformadas y a éstas se les realizó una extracción de plásmido mediante lisis alcalina utilizando el protocolo de minipreparación descrito por Sambrook¹⁷. El plásmido extraído de 3 colonias se utilizó para realizar una PCR con los iniciadores GTHVpol-1 y GTHVpol-2. En una de estas colonias se observó un amplificado con peso molecular similar al control interno (figura 6).

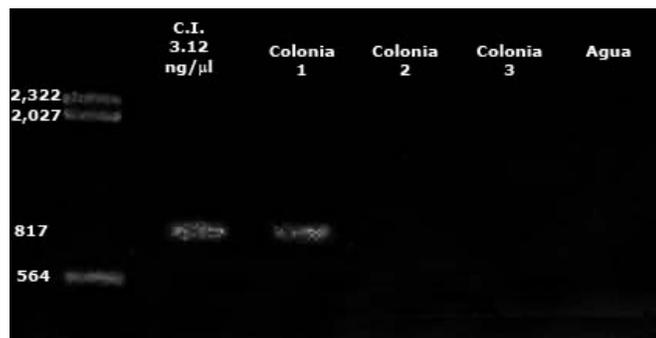


Figura 6. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Clonación del control interno. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular Lambda HindIII; dilución 3.12 ng/μL del control interno (control positivo); colonia 1 transformada; colonia 2 transformada; colonia 3 transformada; agua (control negativo).

Del tubo que contenía a la colonia 1, que presenta un amplificado de 817 pb correspondiente al control interno, se tomaron 50 μl para resembrarlos en 200 mL de medio LB adicionado con 200 μL de ampicilina (100 μg/mL) y 150 μL de kanamicina (75 μg/mL). Asimismo, se utilizaron 100 μL para sembrarlos en cajas de petri con medio LB sólido con los mismos antibióticos. Los frascos con LB líquido se incubaron a 37° C con agitación rápida y las cajas de petri a 37° C durante 24 horas. Después, se realizó la extracción de lisis alcalina, de la colonia 1 resembrada, utilizando el protocolo de maxipreparación descrito por Sambrook¹⁸. El plásmido extraído se diluyó 1/20 en agua, dicha dilución correspondió a una

concentración de ADN de 12.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De esta concentración de plásmido se realizó una PCR con los iniciadores GTHVpol-1 y GTHVpol-2 (figura 7).

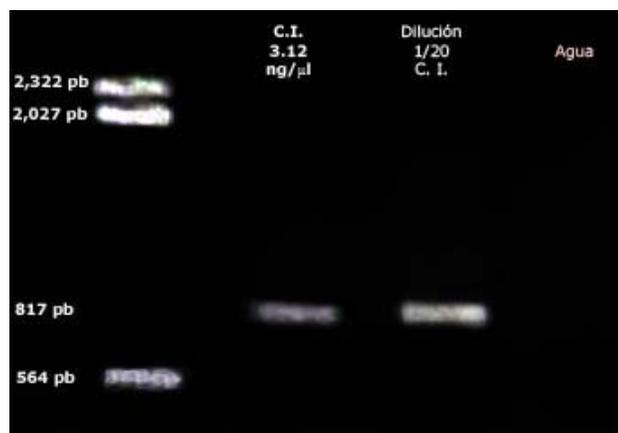


Figura 7. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular Lambda HindIII; dilución 3.12 $\text{ng}/\mu\text{L}$ del control interno; dilución 1/20 del control interno clonado; agua como control negativo.

A partir de esta dilución 1/20 (12.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta alcanzar la concentración de ADN considerada para amplificar el control interno en conjunto con las muestras, que correspondía a 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, para lo cual se requirieron 4 diluciones: 1) 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2) 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3) 12 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 4) 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (figura 8).

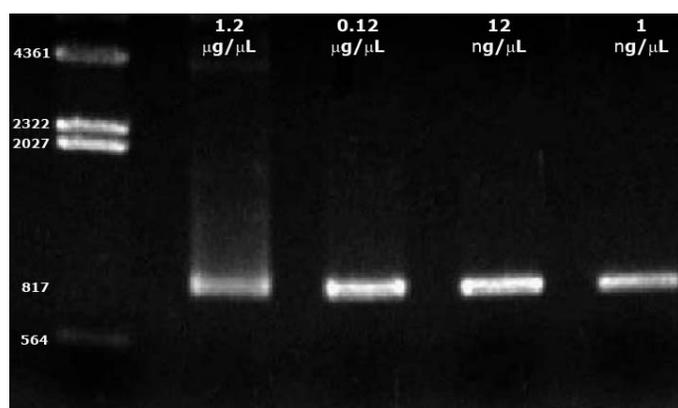


Figura 8. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Diluciones del control interno clonado. De izquierda a derecha: marcador Lambda HindIII; dilución 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; dilución 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; dilución 12 $\text{ng}/\mu\text{L}$; dilución 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Con base en lo anterior, la concentración de 1 ng/ μ L del control interno, que siguió mostrando un producto amplificado adecuado, fue elegida para utilizarla simultáneamente con el ADN de las muestras de fibropapiloma, como ya se ha mencionado anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1 Colección de muestras

La playa del campamento tortuguero “La Escobilla”, se encuentra dividida en 73 estaciones, cada una de las cuales tiene una longitud de 100 metros.

Con el fin de encontrar animales que presentaran fibropapiloma cutáneo, se realizaron recorridos entre las 23:00 y las 04:00 de los días 9 al 13 de octubre de 2006. Estos recorridos se llevaron a cabo en las estaciones donde estuviera concentrada la mayor cantidad de tortugas durante cada noche.

Tomando en cuenta que el tiempo en que las tortugas desovan es de aproximadamente una hora, se caminó un kilómetro durante una hora y se regresó a la posición de inicio durante la siguiente hora.

La técnica de muestreo empleada fue la siguiente:

1. Identificar el fibropapiloma (figura 9).
2. Realizar la asepsia de la zona a muestrear con una torunda mojada con alcohol al 96%.
3. Inocular de 2.5 a 3 mL. de lidocaína al 10% en diferentes puntos del tumor y colocar la pinza de hemostasis para disminuir la irrigación.
4. Después de 5 minutos, realizar la disección del tumor con bisturí, tomando como guía la pinza de hemostasis.

5. Colocar algunas gotas de violeta de genciana en la zona incidida y quitar la pinza de hemostasis.

Las 31 muestras fueron recolectadas, identificadas y guardadas individualmente dentro de una bolsa hermética y mantenidas en refrigeración dentro de una hielera con geles refrigerantes hasta la llegada al campamento.



Figura 9. Fotografía de un fibropapiloma en la región cervical dorsal de un ejemplar de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*).

De regreso al campamento, se realizó la división de cada una de las muestras recolectadas. Con lo anterior, una mitad fue guardada en una bolsa hermética y almacenada en el congelador de un refrigerador del campamento; la otra mitad se introdujo en un recipiente de plástico que contenía formalina al 10% amortiguado a pH 7.4, con una relación de 1:10 (tumor:formalina). Cada muestra fue identificada con las siglas FP (FibroPapiloma), y con un número consecutivo. (por ejemplo: FP-1, FP-2, FP-3, etc.).

La distribución de las lesiones fue la siguiente: 42% (13 muestras) en la región de la cervical dorsal, 29% (9 muestras) en la aleta derecha y 29% en la aleta

izquierda. La neoplasia de mayor tamaño presentó como eje mayor 4.5 cm y la de menor tamaño 1 cm.

Macroscópicamente, los especímenes presentaron características morfológicas semejantes y consistieron en masas tisulares exofíticas café claro o blanco-amarillos, con superficie multinodular (aspecto de coliflor) y consistencia firme (figura 10a). En la superficie de corte se observó tejido de neoformación delimitado, no encapsulado, blanco y con aspecto sólido.

7.2 Análisis histopatológico

Las muestras fijadas con formalina al 10% fueron procesadas para su estudio histopatológico, en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM. Cada una de las muestras fue introducida en cápsulas (figura 10b) previamente identificadas y posteriormente procesadas mediante el método histopatológico de rutina, el cual consistió en los procesos de deshidratación, aclaración e infiltración. Después el espécimen fue orientado en bloques de parafina (inclusión) para ser seccionados en el microtomo. Tales cortes, de aproximadamente de 5 μm de grosor, dieron lugar a las cintas de tejido, que fueron sometidas a flotación, y posteriormente se transfirieron a las laminillas y se secaron en una placa caliente. Una vez secas se usó la tinción de rutina hematoxilina y eosina (HE), y posteriormente se observó en un microscopio fotónico para su interpretación histopatológica.

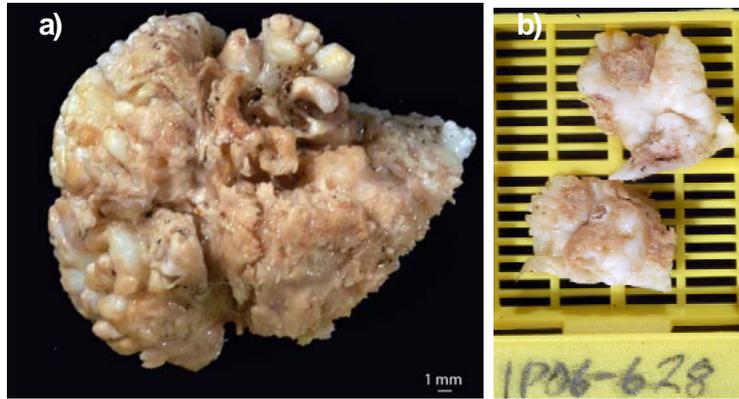


Figura 10. Fotografía de un espécimen de fibropapiloma cutáneo, el cual se caracteriza por una masa tisular exofítica, blanco-amarilla con superficie multinodular (a); inclusión en cápsulas (b).

Microscópicamente, los tumores presentaron cambios similares, aunque en grados variables. Los principales cambios histomorfológicos observados en las muestras colectadas consistieron en:

- Proyecciones papilares exofíticas de la dermis (figura 10).
- Hiperplasia epidermal, principalmente del estrato espinoso (acantosis) e hiperqueratosis ortoqueratósica (figura 11 y 13).
- Proliferación fibroblástica en la dermis, con presencia de vasos sanguíneos de neoformación (figura 14) e infiltrado inflamatorio (figura 15).
- Degeneración balonoide de los estratos basal y espinoso.

En algunos tumores, sobre la epidermis, se observaron estructuras parasitarias compatibles con crustáceos de género indeterminado (figura 16). Asimismo, en dos muestras, en la dermis se observó infiltrado inflamatorio compuesto por células gigantes multinucleadas, lo cual fue consistente con una reacción a cuerpo extraño (figura 17). En otras dos muestras diferentes, en algunos queratinocitos se observaron estructuras intranucleares eosinófilas refringentes compatibles con inclusiones virales (figura 18).

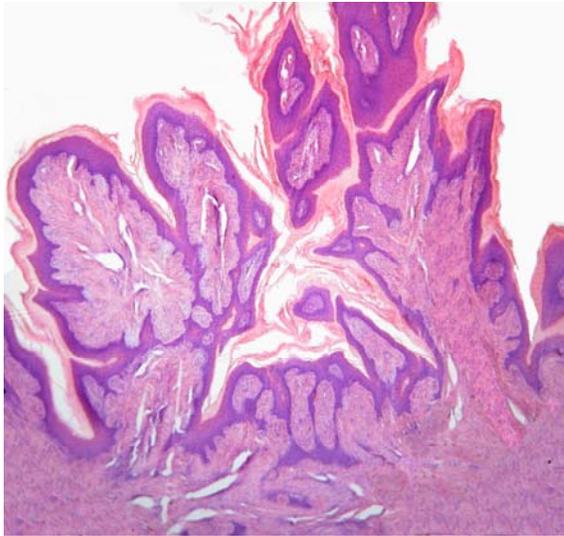


Figura 11. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Proyecciones dérmicas exofíticas delimitadas por células epiteliales y abundante queratina (5x).

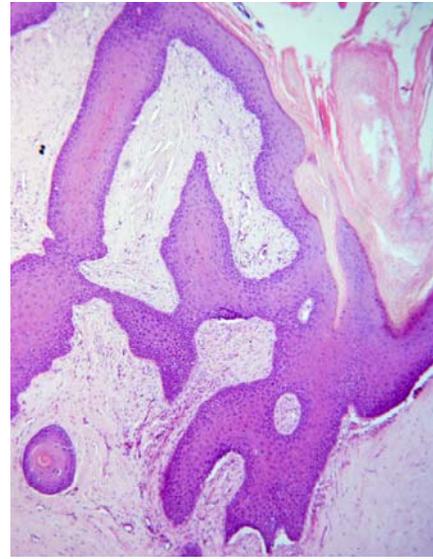


Figura 12. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Acanthosis e hiperqueratosis con hiperplasia irregular epidermal (10x).

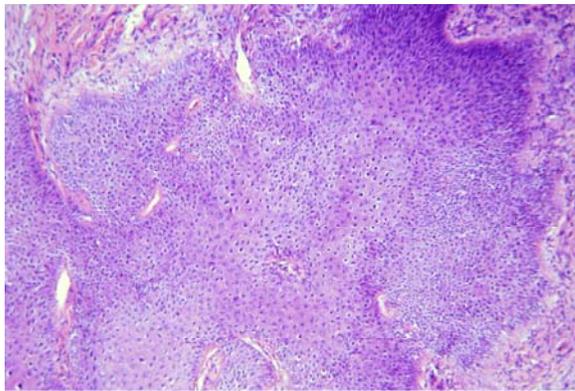


Figura 13. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Hiperplasia epidérmica papilar. Algunos queratinocitos del estrato espinoso y basal exhiben degeneración balonoide (10x)

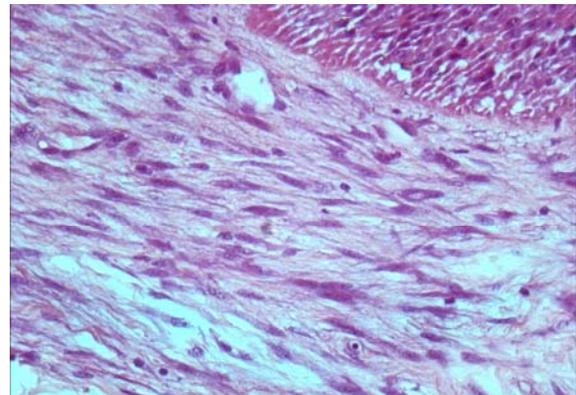


Figura 14. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Proliferación fibroblástica reactiva con algunos vasos sanguíneos de neoformación (40x).

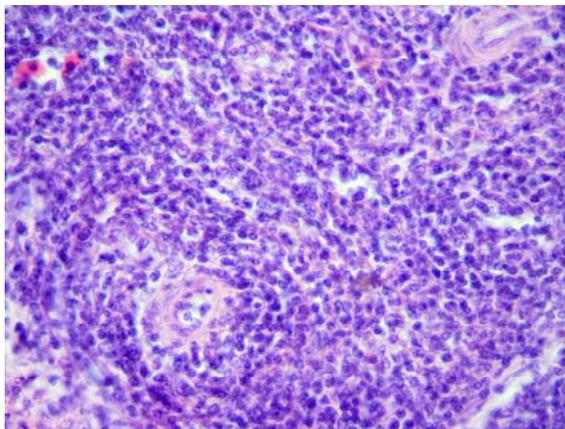


Figura 15. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Abundante infiltrado inflamatorio en dermis compuesto por linfocitos y escasos macrófagos, con distribución perivascular (40x).

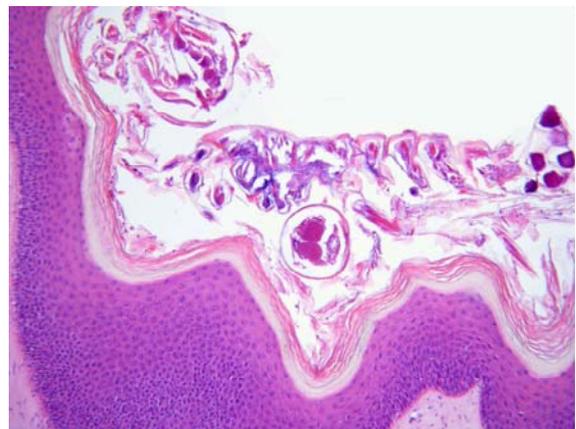


Figura 16. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Estructuras parasitarias sobre el estrato córneo compatibles con crustáceos (10x).

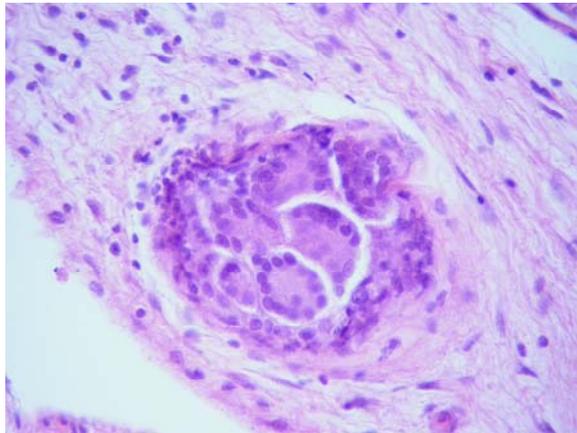


Figura 17. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Células gigantes multinucleadas (reacción a cuerpo extraño) (40x).

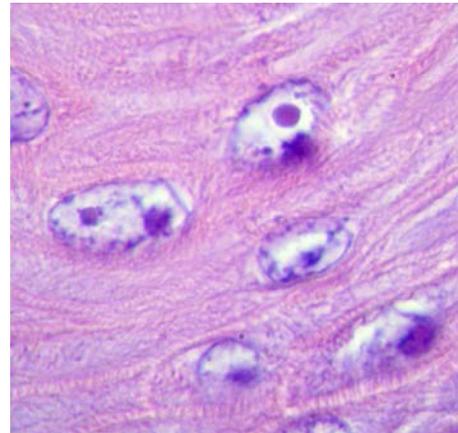


Figura 18. Fotomicrografía de un fibropapiloma. Estructura eosinofílica redonda, intranuclear, con un halo claro periférico (100x).

7.3 Microscopía electrónica.

A las dos muestras que presentaron estructuras compatibles con inclusiones virales intranucleares en queratinocitos, se les realizó microscopía electrónica de transmisión. En el citoplasma de algunos queratinocitos se observaron escasas estructuras con morfología redonda a oval, no envueltas, que medían entre 92 y 150 nm de diámetro, mientras que las que presentaron envoltura midieron entre 173 a 250 nm de diámetro (figura 19, 21 y 22). Dichas estructuras presentaron un centro electrodensito. Los núcleos de los queratinocitos se apreciaron aumentados de tamaño, con escasa heterocromatina, presentaron nucléolos prominentes localizados hacia la periferia nuclear. En la periferia del componente granular de algunos nucléolos se observaron discretos agregados electrodensos compatible con material viral (figura 20). Con base en la morfología y el tamaño, las estructuras icosaédricas fueron compatibles con un herpesvirus.

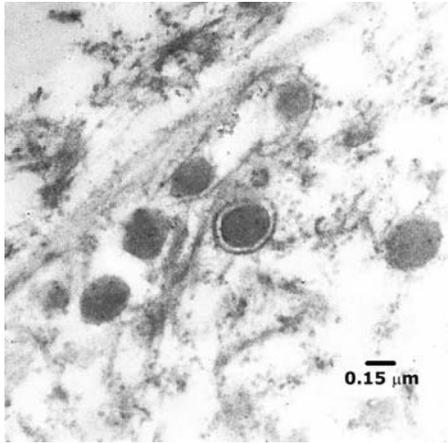


Figura 19. Fotomicrografía electrónica de una célula epitelial de fibropapiloma. En el citoplasma hay escasas estructuras virales con y sin envoltura (50,000x).

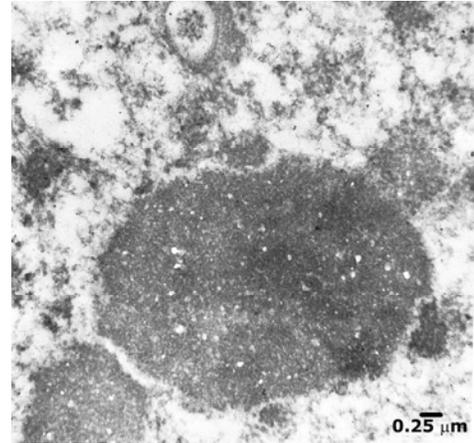


Figura 20. Fotomicrografía electrónica de una célula epitelial de fibropapiloma. Cúmulos de agregados electrodensos a la periferia del nucléolo (30,000x).

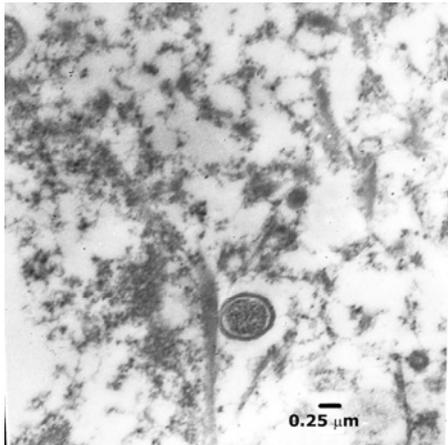


Figura 21. Fotomicrografía electrónica de una célula epitelial de fibropapiloma. En el citoplasma se observa una estructura viral con envoltura (30,000x).

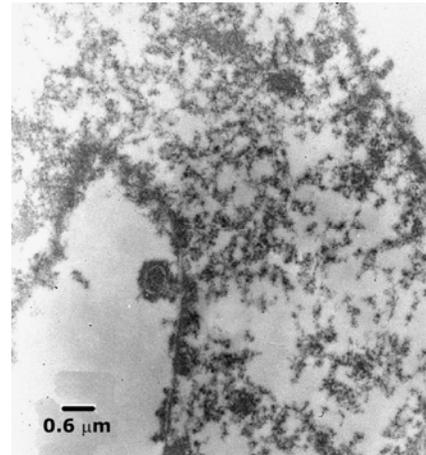


Figura 22. Fotomicrografía electrónica de una célula epitelial. En el citoplasma se observa una estructura viral (12,000x).

7.4 PCR

Al utilizar el control interno dentro de la PCR con las muestras de fibropapiloma y los iniciadores GTHVpol-1 y GTHVpol-2, dicho control debe ser amplificado si las condiciones del PCR (cantidad de iniciadores, temperatura y tiempo) son óptimas. En caso de que la muestra sea positiva al GTHV se observará un amplificado correspondiente al control interno (817 pb) y uno correspondiente a la ADN polimerasa del GTHV (441pb). En caso de que la muestra sea negativa,

únicamente se observará un producto amplificado de 817 pb correspondiente al control interno. Aquella prueba de PCR que no presentó ninguno de los dos productos amplificados mencionados anteriormente, se descartó y se repitió.

Las 31 muestras previamente evaluadas mediante histopatología, con diagnóstico de fibropapiloma fueron negativas en la prueba de PCR para la detección de la ADN polimerasa del GTHV con el uso de los iniciadores GTHVpol-1 y GTHVpol-2 y el control interno (figuras 23, 24 y 25).

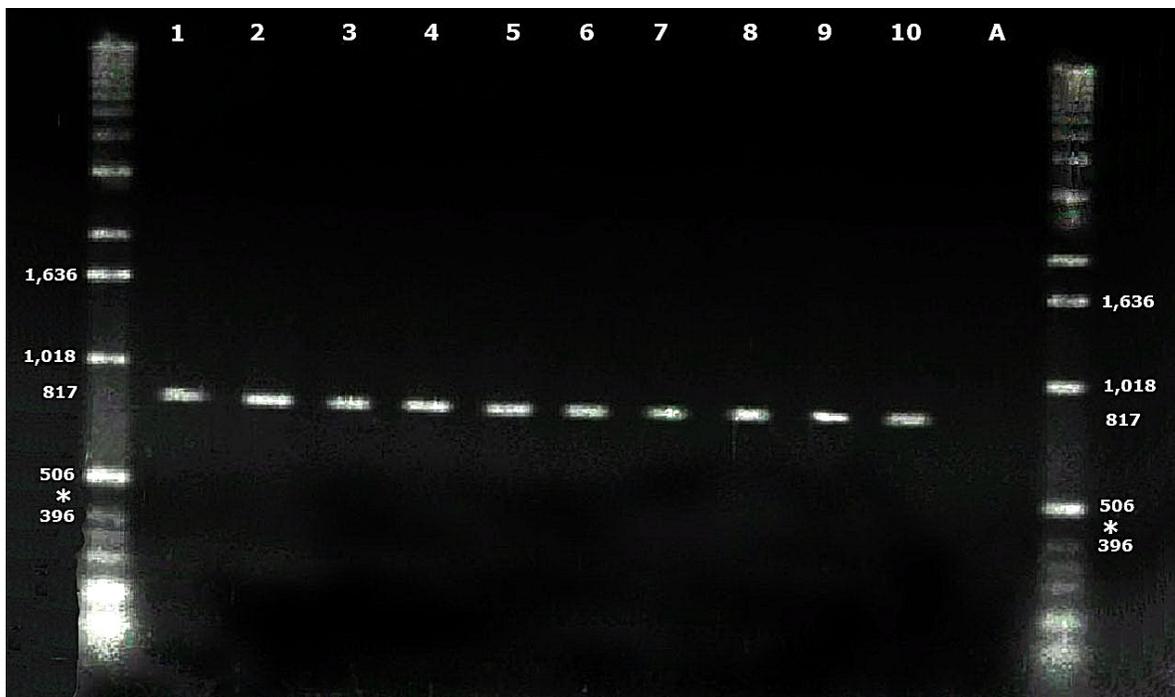


Figura 23. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular 1kb; PCR de las muestras FP-1 al FP-10; agua (control negativo); marcador 1 kb. Los asteriscos señalan el nivel en donde el producto de 441 pb de la ADN polimerasa del GTHV esperaba observarse en casos positivos.



Figura 25. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular 1kb; PCR de las muestras FP-21 al FP-31; agua; marcador de peso molecular 1 kb. Los asteriscos señalan el nivel en donde el producto de 441 pb de la ADN polimerasa del GTHV esperaba observarse en casos positivos.

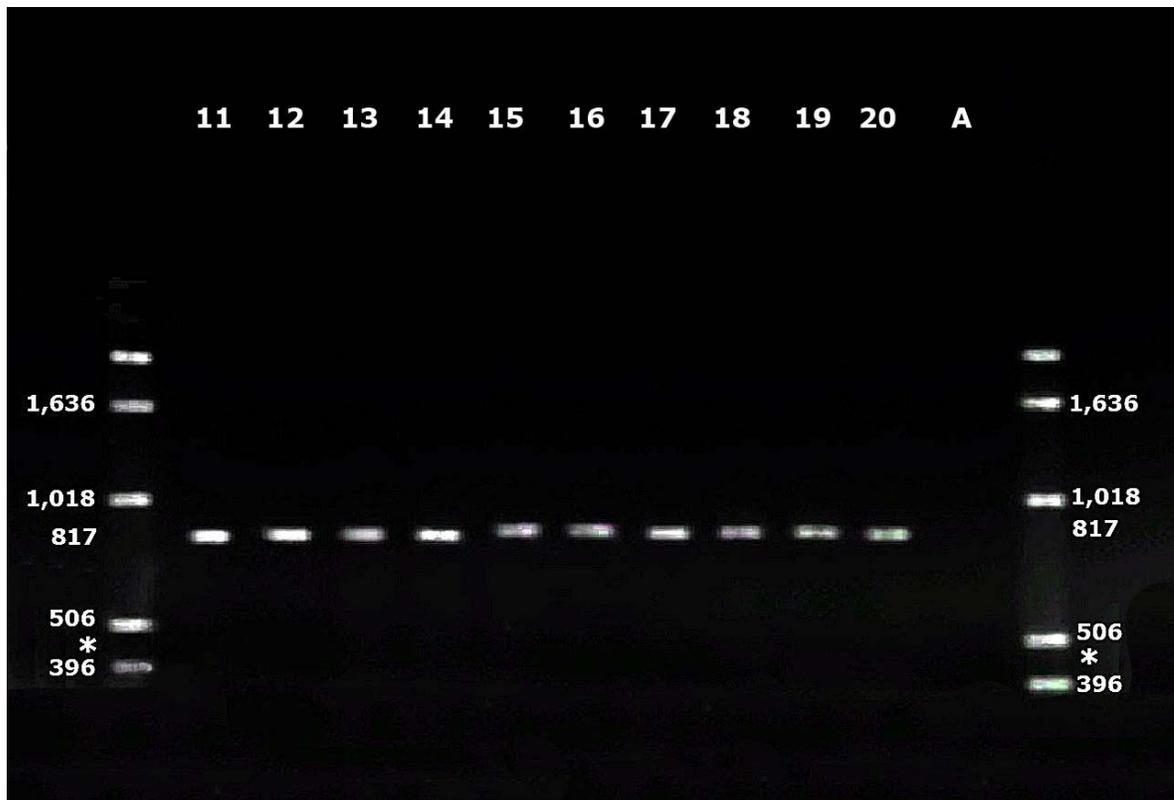


Figura 24. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular 1kb; PCR de las muestras FP-11 al FP-20; agua; marcador de peso molecular 1 kb. Los asteriscos señalan el nivel en donde el producto de 441 pb de la ADN polimerasa del GTHV esperaba observarse en casos positivos.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron 31 muestras de tejido correspondiente a fibropapiloma, cuyo diagnóstico fue realizado mediante el estudio macro y microscópico. En todas las muestras analizadas se observaron cambios histomorfológicos similares a los que anteriormente habían sido descritos por Herbst *et al*¹¹, los cuales consisten principalmente en hiperqueratosis, acantosis, degeneración del estrato basal, proliferación fibroblástica en dermis y cantidades variables de infiltrado inflamatorio.

Por otra parte, también se desarrolló un control interno, el cual permite evaluar la presencia de ADN viral, específicamente del GTHV. Empleando este sistema no se obtuvieron resultados que indiquen la presencia del GTHV en estas muestras. Por lo anterior, la hipótesis supuesta en este trabajo es rechazada. Además, los resultados revelados en este trabajo difieren por completo con la mayoría de los estudios publicados sobre el fibropapiloma en tortuga verde, en los cuales existe evidencia que permite asociar al GTHV con el desarrollo de esta enfermedad. Sobre este punto, es importante destacar que la mayoría de los estudios publicados anteriormente sobre la relación GTHV y el desarrollo del fibropapiloma han sido realizados en otra especie diferente a la tortuga golfina. Asimismo, estos estudios han sido realizados en las costas de Florida, zona que incluye a parte del Golfo de México y del Océano Atlántico, a diferencia de este trabajo, en el cual se incluyeron animales del campamento “La Escobilla”, el cual pertenece al Estado de Oaxaca (en el Océano Pacífico).

Las condiciones del PCR utilizada en este trabajo, así como el uso del control interno en la misma, hacen que los datos revelados en este mismo sean confiables, ya que al tener las condiciones de PCR óptimas para la amplificación del control interno, se asegura que dichas condiciones sean a su vez específicas para la amplificación del fragmento de 441 pb de la ADN polimerasa del GTHV.

Una variable que podría afectar de manera directa a los resultados del PCR consiste en que la mayoría de los trabajos publicados sobre el fibropapiloma y su relación con el GTHV han sido realizados en la tortuga verde. Por lo anterior, la información disponible sobre la secuencia de nucleótidos de algunas proteínas externas y de la ADN polimerasa del GTHV corresponden a secuencias encontradas en las neoplasias de la tortuga verde y no de la tortuga golfina, la cual fue objeto del presente estudio. Sin embargo, Quackenbush *et al*¹⁹, compararon la secuencia de tres herpesvirus asociados al fibropapiloma en tortuga verde, tortuga golfina y tortuga caguama. En los resultados de dicho trabajo, se observó que las secuencias obtenidas de cuatro fibropapilomas de tortuga golfina diferían de la ADN polimerasa del GTHV por sólo 15 aminoácidos. Esta variación de aminoácidos se considera pequeña, lo cual reduce el margen de probabilidad de error en el diseño de iniciadores, por lo tanto, del control interno utilizado en este trabajo. Sin embargo, no se descarta que una mutación considerable en el GTHV haya ocurrido, generando otro herpesvirus y que esto, sea la causa de los resultados negativos observados en este trabajo.

Hasta el momento, se ha considerado al GTHV como el candidato principal para ser el agente causal del fibropapiloma ya que existen estudios cuyos resultados incluyen: 1) la identificación de ADN específico del GTHV en más del 90% de los fibropapilomas cutáneos mediante PCR, así como su ausencia en muestras de piel sin fibropapiloma; 2) presencia de partículas virales con características ultraestructurales compatibles con un herpesvirus en tumores espontáneos y tumores inducidos experimentalmente; y 3) el desarrollo del fibropapiloma en animales ausentes del mismo mediante la transmisión experimental con inóculos de homogeneizados de fibropapiloma libres de células neoplásicas¹³.

Sin embargo, para descartar o confirmar que el GTHV sea el agente etiológico causante del fibropapiloma se requiere realizar el aislamiento del GTHV, lo cual hasta el momento ha sido fallido en cultivo celular, hecho que impide el cumplimiento completo de los postulados de Koch²⁰.

La ausencia del GTHV en todas las muestras analizadas en este trabajo permite que otras teorías sobre la etiología del fibropapiloma sean consideradas. Algunos autores han contemplado otras hipótesis sobre la causa del fibropapiloma, una de las cuales consiste en que el desarrollo de la enfermedad está relacionado con la presencia de agentes contaminantes dentro del hábitat de las tortugas afectadas, ya que según los estudios de Balazs⁶ y Ehrart²¹, esta enfermedad es común en costas que tienen contigüidad con áreas con actividad urbana y agricultura. Otra teoría²² considera que esta entidad proliferativa es el resultado de una reacción inflamatoria crónica en respuesta a la presencia de un cuerpo extraño (huevos de

trematodo o queratina), hallazgo que sólo fue observado en 2 de los casos del presente estudio.

Aunque en la mayoría de los casos reportados de fibropapiloma cutáneo se identifica la presencia del GTHV mediante pruebas de biología molecular, puede ser que este virus no sea el agente causal ya que existe otra posibilidad que ha sido propuesta por Herbst²³, el cual menciona que debido a que los herpesvirus tienen una tendencia a colonizar tumores y tejidos de animales debilitados, es posible que la presencia del GTHV en el fibropapiloma represente una infección secundaria, por lo que su papel en el desarrollo de esta neoplasia sea nulo.

En el examen histopatológico de las muestras analizadas en este trabajo, se observó que sólo en dos muestras había estructuras que semejaban cuerpos de inclusión en el núcleo de algunos queratinocitos, este hallazgo de inclusiones virales escasas concuerda con los hallazgos reportados por Herbst *et al*¹¹, en los cuales sólo se observaron cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos en 2 casos (1.7%) de un total de 119 tumores espontáneos. Para confirmar que las estructuras observadas en dichas muestras correspondieran a inclusiones virales, se realizó microscopía electrónica, en la cual se observaron escasas estructuras virales con características ultraestructurales compatibles con herpesvirus.

La presencia de escasas partículas virales en las muestras que presentaron cuerpos de inclusión intranucleares pueden sugerir por una parte, que el virus observado con características compatibles con un Herpesvirus sea sólo un agente

infeccioso secundario o incluso un contaminante y que éste no esté relacionado con el desarrollo de fibropapilomas en tortugas golfinas. Sin embargo, los escasos viriones en las muestras con cuerpos de inclusión intranucleares pudieran también estar relacionados con la patogenia de los Herpesvirus, los cuales son capaces de establecer un periodo de latencia dentro de su replicación y posteriormente activarse para liberar viriones maduros. Si esta teoría fuera cierta, es probable que este virus con características ultraestructurales de Herpesvirus tenga un genoma distinto al del GTHV, por lo que no es amplificado con los iniciadores específicos para el GTHV diseñados para este trabajo.

Aún tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible eliminar definitivamente al GTHV como agente causal ya que otros autores han demostrado que existe una fuerte evidencia (principalmente en fibropapiloma de tortuga verde) de que el virus está presente en las lesiones. La ausencia de ADN del GTHV en las muestras de fibropapiloma recolectadas en tortuga golfina da paso a que otras teorías sobre la etiología de esta enfermedad sean consideradas, tales como agentes carcinogénicos químicos presentes en el mar e incluso otros agentes virales (poxvirus, retrovirus, papovavirus), o bien una mutación considerable del GTHV. Sin embargo, la etiología multifactorial no se descarta.

9. CONCLUSIONES

- a) Todas las muestras cutáneas recolectadas correspondieron histológicamente a fibropapiloma.

- b) En ninguna de las muestras analizadas con la técnica de PCR en conjunto con el control interno se determinó la presencia del GTHV.

- c) El diseño y uso de controles internos puede ser de gran utilidad para enfermedades cuyos agentes etiológicos involucrados no sea posible obtener, ya sea porque su aislamiento complicado, o no existan reportes de su presencia en nuestro país.

10. PERSPECTIVAS

1.- Analizar una mayor cantidad de muestras de esta neoplasia para establecer con mayor precisión la relación del GTHV y el fibropapiloma en Tortugas golfinas.

2.- Emplear en las muestras de ADN de fibropapiloma de este estudio iniciadores degenerados para la detección de un Herpesvirus y un Papilomavirus mediante PCR.

3.- Realizar inoculaciones experimentales de macerados filtrados de fibropapiloma en animales sanos con el fin de determinar la presencia de un agente infeccioso en dichos tumores que pudiera estar relacionado con el desarrollo de los mismos.

4.- Llevar a cabo las mismas evaluaciones en tejido sano.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Herbst LH. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annu Rev Fish Dis* 1994;4: 389-425.
2. Smith GM, Coates CW. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas*. *Zoologica* 1938; 23:93-98.
3. Lucké B. Studies on tumors in cold-blooded vertebrates. Annual Report of the Tortugas Laboratory of the Carnegie Institute, Washington, DC. 1937; 38:92-94.
4. Schlumberger HG, Lucké B. Tumors of fishes, amphibians and reptiles. *Cancer Res* 1948;8: 657-753.
5. Hendrickson JR. The green sea turtle, *Chelonia mydas*, in Malaya and Sarawak. *Proc Zool Soc* 1958; 130: 455-535.
6. Balazs GH. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. In Balazs GH, Pooley SG. Research plan for marine turtle fibropapilloma. US Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156, 1991: 47-57.
7. Jacobson ER *et al.* Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *J Comp Pathol* 1989; 101: 39-52.
8. Ehrhart LM, Sindler RB, Witherington BE. Preliminary investigation of papillomatosis in green turtles: phase I – frequency and effects on turtles in the wild and in captivity. Contract No. 40-GENF-6-00601, Final Report to US Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Miami Laboratory, 46 pp.

9. Aguirre AA. Fibropapilomas en Tortugas Marinas: un Taller del XVIII Simposio Annual sobre la Biología y la Conservación de las Tortugas Marinas. Noticiero de Tortugas Marinas. 1998; 82:10-12.
10. Norton TM, Jacobson ER, Sundberg JP. Cutaneous Fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. J Wildl Dis 1990; 26:265-270.
11. Herbst LH, *et al.* Comparative Pathology and Pathogenesis of Spontaneous and Experimentally Induced Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). Vet Pathol 1999; 36: 551-564.
12. Aguirre AA. Fibropapillomatosis of sea turtles: An etiological perspective. Proceedings of the 7th International Symposium on Pathology and Medicine in Reptiles and Amphibians 2004 April 16-18 ; Berlin, Germany, 2004, 15-29.
13. Herbst LH *et al.* Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. Dis Aquat Organ 1995; 22:1-12.
14. Greenblatt RJ *et al.* The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated herpes virus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). Virology 2004; 321:101-110.
15. Lu Y, *et al.* Identification of a small, naked virus in tumor-like aggregates in cell lines derived from a green turtle, *Chelonia mydas*, with fibropapillomas. J Virology Methods 2000; 86:25-33.
16. Casey RN, *et al.* Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. Dis Aquat Organ 1997; 31:1-7.

17. Sambrook J, Russell DW. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis: Minipreparation. In: Molecular Cloning A Laboratory Manual. Third edition. Cold spring harbor laboratory press. 2001: 1.32-1.34.
18. Sambrook J, Russell DW. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis: Maxipreparation. In: Molecular Cloning A Laboratory Manual. Third edition. Cold spring harbor laboratory press. 2001: 1.38-1.41.
19. Quackenbush *et al.* Three closely related herpesvirus are associated with fibropapilloma in marine turtles. *Virology* 1998; 246: 392-399.
20. Sell S. Koch postulates. In: Immunology, immunopathology, and immunity. Sixth edition. Asm Press. 2001: 456.
21. Ehrhart LM. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River Lagoon, Florida: Distribution over time and area. In Ehrhart LM. Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. US Department of Commerce, NOAA Tech Memo NMFS-SWFSC-156. 1991: 59-61.
22. Harshbarger JC. Pseudoneoplasms in ectothermic animals. *Natn Cancer Inst Monogr* 1984; 65: 251-273.
23. Herst *et al.* Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Dis Aquat Org* 1995; 22: 1-12.