

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la vida

Diseño de un método de metabolómica para la determinación del estado de salud de *Chelonia mydas* como referencia para plan de conservación

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Katrin Elizabeth Krauth Guillén

Emily Sulay Saltos Montalvo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020 - 2021

DEDICATORIA

El proyecto es dedicado a mi hermana Melanie, quien siempre me ha brindado apoyo y fuerzas para cumplir mis sueños. También es dedicado a mis abuelitos Germán y María Luisa, a quienes este logro los llena de alegría.

Katrin Krauth Guillén

Dedicado a toda mi familia, quienes han estado pendientes de cada uno de mis pasos, me han apoyado y me han inspirado a seguir adelante. Los amo tanto, todos mis logros serán por y para ustedes.

Emily Saltos Montalvo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por iluminar siempre mi camino, también a mis padres Manfred y Diana por su apoyo, paciencia y por enseñarme que con trabajo constante y esfuerzo se pueden cumplir todos los sueños; su ejemplo me inspiró a cumplir este logro. Finalmente agradezco a mi tutora Fernanda Bertuccez por su apoyo incondicional y contribuir en mi crecimiento tanto profesional como personal.

Katrin Krauth Guillén

Agradezco a Dios por la sabiduría que me ha brindado, también a mi tutora Fernanda B. por su paciencia y conocimientos transmitidos para llevar a cabo este proyecto. A mis amigas por hacer este camino más fácil y finalmente agradezco a mi mami María, mi hermano Kevin, mis abuelitos Carmen y Gonzalo quienes son los pilares fundamentales en mi vida. Gracias por tanto amor y entrega.

Emily Saltos Montalvo

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponden conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Katrin Elizabeth Krauth Guillén, Emily Sulay Saltos Montalvo* y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Katrin Krauth

Katrin Elizabeth Krauth Guillén

Emily Saltos M

Emily Sulay Saltos Montalvo

EVALUADORES

Diego Gallardo Polit
PROFESOR DE LA MATERIA

Fernanda Bertuccez Cordeiro
PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Aunque la contaminación y/o degradación del hábitat contribuyen a la acelerada pérdida de especies, se ha demostrado que patógenos como los virus también logran afectar el éxito de las poblaciones de vida silvestre. *Chelonia mydas*, también conocida como tortuga verde, se encuentra catalogada en peligro de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y una de las razones son las enfermedades causadas por herpesvirus (HV). Sin embargo, las técnicas usadas para su diagnóstico no son las más adecuadas, por lo que en este trabajo se propone el diseño de un método de metabolómica que permita el diagnóstico de enfermedades asociadas a HV. Para ello se capturaron y tomaron muestras de sangre de individuos afectados; luego se procedió a la preparación de las muestras para su evaluación molecular, en la cual se confirmó la presencia del virus por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Posteriormente se identificaron los perfiles metabolómicos usando la técnica de ionización por desorción láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-ToF) y finalmente se obtuvo el diagnóstico del individuo. Los metabolitos obtenidos mediante la técnica analítica se identificaron como biomarcadores relacionados a procesos fisiopatológicos de las siguientes enfermedades: fibropapilomatosis (FP), parche gris (GP) y pulmón-ojos-tráquea (LETD). Finalmente se identifica como biomarcadores de enfermedades asociadas a HV a los siguientes lípidos: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfadiletanolamina, prostoglandinas y glicerofosfocolinas. El uso de la metabolómica permite el diagnóstico de estas tres enfermedades, aportando a la conservación de esta especie.

Palabras clave: *Chelonia mydas*, herpesvirus, diagnóstico, MALDI-ToF, biomarcadores

ABSTRACT

Although pollution and habitat degradation are the mainly causes of wildlife loss, it has been shown in studies that pathogens such as viruses also affect the success of wildlife populations. Chelonia mydas, also known as Green turtle, is listed as endangered according to the IUCN, and one of the reasons are diseases caused by HV. However, the techniques used nowadays for the diagnosis aren't the most suitable, therefore the aim of this project is to design a method using metabolomics, that allows the diagnosis of HV associated diseases in C. mydas. For the making of this method, turtles affected by these diseases were captured and blood samples were taken; then, the samples were prepared for molecular evaluation, in which the presence of the virus was confirmed by RT-PCR. Subsequently, the metabolomic profiles were identified using MALDI-ToF and finally the diagnosis of the individual was obtained. The metabolites obtained through the analytical technique were identified as biomarkers related to pathophysiological processes of the following diseases: fibropapillomatosis (FP), gray patch (GP) and lung-eyes-trachea (LETD). Finally, the following lipids are identified as biomarkers of HV-associated diseases: phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphedylethanolamine, prostoglandins and glycerophosphocholins. The use of metabolomics allows the diagnosis of these three diseases, contributing to the conservation of this species.

Key words: *Chelonia mydas, herpesvirus, diagnosis, MALDI-ToF, biomarkers*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ABREVIATURAS.....	v
SIMBOLOGÍA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2. Justificación del problema	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Marco teórico.....	3
1.4.1 <i>Chelonia mydas</i>	3
1.4.2 Plan de Conservación de Tortugas Marinas existente en Ecuador.....	4
1.4.3 Herpesvirus en tortugas verdes	5
1.4.4 Metabolómica.....	8
1.4.5 MALDI-ToF MS	9
CAPÍTULO 2.....	11
2. METODOLOGÍA.....	11
2.1 Lugar de estudio.....	11
2.1.1 Playa la Lobería	11
2.1.2 Centro de rehabilitación de fauna marina del Parque Nacional Machalilla	12
2.2 Captura de los individuos y toma de muestras.....	13
2.2.1 Playa la Lobería	13
2.2.2 Centro de rehabilitación de fauna marina del Parque Nacional Machalilla	14
2.3 Preparación de la muestra	14
2.4 Identificación del grupo de estudio	14
2.5 Extracción de metabolitos	15

2.6	Obtención de datos por MALDI – ToF MS	15
2.7	Análisis de datos	16
<i>CAPÍTULO 3.....</i>		<i>17</i>
3.	<i>RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</i>	<i>17</i>
3.1	Análisis de muestras de sangre	17
3.1.1	Fibropapilomatosis	18
3.1.2	Enfermedad de parche Gris	19
3.1.3	Enfermedad de pulmón-ojos-tráquea.....	20
3.2	Aportación del método en la conservación de C. mydas en el Ecuador.....	21
<i>CAPÍTULO 4.....</i>		<i>22</i>
4.	<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</i>	<i>22</i>
4.1	Conclusiones.....	22
4.2	Recomendaciones.....	23
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>		<i>24</i>

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
<i>C. mydas</i>	<i>Chelonia mydas</i>
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
HV	Herpesvirus
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
MALDI-ToF	Ionización por desorción láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
FP	Fibropapilomatosis
GP	Enfermedad del parche gris
LETD	Enfermedad de pulmón-ojos-tráquea
ChHV5	Chelonid herpesvirus 5
ChHV1	Chelonid herpesvirus 1
ChHV6	Chelonid herpesvirus 6
MS	Espectrometría de masas
NMR	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
<i>C. caretta</i>	<i>Caretta caretta</i>
MALDI	Ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI)
ToF	Tiempo de vuelo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CRFM	Centro Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla
S	South
W	West
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
PCA	Análisis de componentes principales
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina

PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PG	Prostaglandinas
GPC	Glicerofosfocolinas
PGPC	1-palmitoil-2-glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina
POVPC	1-palmitoil-2- (5'-oxo-valeroil) sn- glicero-3-fosfocolina

SIMBOLOGÍA

°	Grados
mL	Mililitro
°C	Grados Celsius
g	Gravedad
μL	Microlitro
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Cloroformo
RCF	Fuerza centrífuga relativa
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
<i>m/z</i>	Relación masa carga

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>C. mydas</i> con presencia de FP.....	6
Figura 1.2. <i>C. mydas</i> con presencia de GP.....	7
Figura 1.3. <i>C. mydas</i> con conjuntivitis asociada a LETD.....	7
Figura 1.4. Esquematación del mecanismo de ionización suave del metabolito.....	9
Figura 1.5. Representación esquemática del mecanismo de MALDI-Tof.....	10
Figura 2.6. Mapa del sitio de estudio “playa La Lobería”.....	12
Figura 2.7. Mapa del sitio de estudio “Centro de Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla”.....	13
Figura 3.8. Score Plot del análisis de componentes principales (PCA).	17
Figura 3.9. Análisis por Heatmap.	18

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las especies tanto de fauna como flora son de gran importancia para la vida humana en la Tierra; ya que de ellas obtenemos compuestos medicinales, mejor calidad de suelo y agua, protección ambiental y seguridad alimentaria. Sin embargo, en los últimos cincuenta años nuestro planeta ha perdido alrededor del 50% de su fauna silvestre. Las especies marinas no son excepción, su población ha disminuido en un 39%, esto se debe principalmente a la explotación no regulada y a la degradación del hábitat (WWF, 2020b).

Entre las especies afectadas se encuentra *C. mydas*, esta tortuga marina está catalogada en peligro por la IUCN (WWF, 2020a). Al igual que en otras especies de réptiles, para *C. mydas* las enfermedades infecciosas representan la principal causa de muerte de origen no antropogénico. Esta especie se ve afectada mayormente por tres enfermedades: FP, GP y LETD (Alfaro et al., 2008). A pesar de que en el 2015 en la costa ecuatoriana se detectaron individuos de *C. mydas* con tumores posiblemente relacionados a FP (Cárdenas et al., 2019); hasta la actualidad en la parte continental del país no se han realizado estudios acerca del estado de salud de la población de esta especie y en las islas Galápagos solo se ha realizado uno (Lewbart et al., 2014).

Debido a esto, se decidió como proyecto el diseño de un método de metabolómica que permita determinar el estado de salud de *C. mydas* en poco tiempo y de manera no invasiva para la especie. Por lo cual se decidió realizarlo mediante la aplicación de la técnica de MALDI –ToF, la cual permite la detección de biomarcadores relacionados a alteraciones metabólicas causadas por enfermedades (Pusch & Kostrzewa, 2005). Con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de la enfermedad y de esta manera contribuir a la protección de esta especie.

1.1 Descripción del problema

El estado de salud de una población de fauna silvestre se define como el resultado de la interacción de factores ambientales, biológicos y sociales que pueden afectar la capacidad de resiliencia (Stephen, 2014). Dentro de estos factores se encuentra la resistencia ambiental donde se involucran las enfermedades. En la población de *C. mydas* se han descrito tres, causadas por HV, y en los últimos diez años se ha detectado un incremento en la cantidad de tortugas afectadas (Schock et al., 2013).

Sin embargo, debido a desafíos en el muestreo, logística o el uso de técnicas invasivas, la incidencia de estas enfermedades no se estudia o documenta de manera adecuada y la población de esta especie sigue decreciendo (Mashkour et al., 2020). Si esta especie llegara a desaparecer, se produciría un impacto en la estructura, composición y funcionamiento del ecosistema marino (IAC Secretariat, 2006). La industria pesquera sería una de las más afectadas, debido a que *C. mydas* mantiene un control de la población de depredadores de larvas de importancia comercial.

1.2 Justificación del problema

Se escogió a *C. mydas* como especie de estudio debido a que actualmente el archipiélago de Galápagos representa más del 40% de la población del océano Pacífico Oriental, siendo considerado el segundo lugar con mayor importancia para la anidación de esta especie en dicha región (DPNG, 2019). Además, es la única especie de tortuga marina en la que la enfermedad de FP ha alcanzado un nivel panzootico (Alfaro et al., 2008). Sin embargo, el Plan Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas del Ecuador no considera las enfermedades como parte de las amenazas, por tal motivo es de vital importancia poder aportar con información a este plan para que las autoridades tomen las acciones debidas. Para ello se decidió usar la metabolómica, dado que esta técnica permite el estudio de la especie con poca cantidad de muestra, sin un tratamiento previo extensivo y un lapso corto. Así mismo, los estudios metabolómicos permiten obtener conocimiento importante a pesar de la ausencia de información previa (Schock et al., 2013).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diseñar un método de metabolómica mediante el uso de la técnica de MALDI-ToF para el diagnóstico de enfermedades asociadas a HV en la población de *C. mydas* tanto en cautiverio como en libertad.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar biomarcadores metabólicos en muestras de sangre de *C. mydas* para la determinación de procesos fisiopatológicos relacionados a enfermedades preexistentes.
2. Aportar información al Plan Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas del Ecuador mediante la identificación de enfermedades como medida para la protección de la especie.

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Chelonia mydas*

C. mydas es conocida también con el nombre de tortuga verde, debido al color verde característico de su grasa y cartílagos. Esta especie de tortuga marina puede ser encontrada en la costa de más de 140 países y anida en un aproximado de 80 playas alrededor del mundo (NOAA, n.d.). Uno de estos países es Ecuador, donde posee tanto en su parte continental como en las islas Galápagos sitios de anidación y alimentación (Chaves et al., 2017). La esperanza de vida de *C. mydas* es de aproximadamente 70 años; debido a esto y a que desempeña un papel importante en el equilibrio de las redes tróficas marinas y en la transferencia de nutrientes del agua a la tierra, son catalogadas como especies centinelas del océano (Wilson et al., 2020).

1.4.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de la especie se encuentra compuesto por dos fases, primero por una fase pelágica durante su etapa juvenil, la cual puede tener una duración de 7 años. La segunda fase se encuentra asociada a hábitats cerca de la costa, por lo cual su alimentación cambia de medusas, esponjas y algas a principalmente ser herbívoras. Entre los 25 y 35 años *C. mydas* alcanza su madurez sexual, las hembras migran de cientos a miles de kilómetros cada 2 a 5 años para dirigirse a las playas de anidación y colocar sus huevos (NOAA, N.D.).

1.4.1.2. Amenazas

La principal amenaza para la población de tortuga verde es la captura incidental, los anzuelos pueden causar su muerte por ahogamiento o producir heridas que terminan en infecciones letales (NOAA, N.D.). Al igual que para otras especies la degradación o pérdida del hábitat causa la disminución de su población, esto se debe a que durante su etapa adulta viven cerca a zonas costeras, lo que las hace susceptibles a heridas producidas por botes y a la contaminación tanto por desechos plásticos como químicos (Jones et al., 2015).

A pesar de que la comercialización de esta especie y sus huevos es prohibida en muchos países, su tráfico ilegal sigue siendo una amenaza para la conservación de la especie. *C. mydas* también se enfrenta a amenazas de origen no antropogénico como la depredación principalmente por tiburones y las infecciones causadas por patógenos y parásitos (Alfaro et al., 2008).

1.4.2 Plan de Conservación de Tortugas Marinas existente en Ecuador

En Ecuador existe un plan de conservación para tortugas marinas con el objetivo de monitorear y conservar las 5 especies que se han observado en el país. Dentro del plan se encuentran los siguientes programas (Ministerio del Ambiente, 2014):

- Monitoreo y conservación de tortugas marinas en la Reserva de Producción Faunística Marino Costera Puntilla de Santa Elena.
- Monitoreo de anidación de *C. mydas* en Galápagos.

- Demografía, rango de vida y uso de hábitat de *C. mydas* y *Eretmochelys imbricata* en áreas de descanso y alimentación cercanas a zonas urbanas de la Isla San Cristóbal – Galápagos.
- Captura y marcaje de individuos.

Adicionalmente dentro del plan de conservación se encuentra el programa “Red de Acción ante el cambio climático” que estudia los efectos del mismo en esta especie en las islas Galápagos (Ministerio del Ambiente, 2014).

El plan de conservación también se enfoca en el impacto que tienen las industrias pesqueras sobre las tortugas marinas, por lo cual se implementó la presencia de observadores pesqueros en las flotas tanto continentales como de las islas Galápagos. (Ministerio del Ambiente, 2014).

1.4.3 Herpesvirus en tortugas verdes

Los HV de la familia herpesviridae son virus de ADN, icosaédricos, envueltos y bicatenarios (Kane et al., 2016), tienen un diámetro de entre 150 a 200 nm (Sadie S Coberley et al., 2001); estos se han vuelto patógenos que amenazan a los quelonios tanto en vida silvestre como en cautiverio. Aquellos que se han descrito pertenecen al género *Scutavirus* y subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Cuando se encuentran dentro del huésped producen una infección; mientras que fuera de ellos no sobreviven. La subfamilia tiene éxito en condiciones húmedas y frías, que generalmente se presentan en la piel, mucosa oral y tracto respiratorio (Engel et al., 2020). Estos patógenos se asocian a 3 enfermedades: FP, GP y LETD.

1.4.3.1 Fibropapilomatosis

Es la enfermedad infecciosa más estudiada en tortugas verdes, asociada a Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) (Ackermann et al., 2020) siendo causa de morbilidad y mortalidad. Se describió por primera vez en Florida en el año 1930. Actualmente ha incrementado la prevalencia de esta enfermedad y se estima que alrededor del 50% de *C. mydas* del mundo se encuentran afectadas por la misma; por lo que ha pasado a ser una pandemia global. En ciertas poblaciones ha alcanzado un rango de infección del 90%. Esta enfermedad se presenta en forma de tumores de fibropapiloma externos e

internos; siendo los más frecuentes en el cuello, las aletas, el caparazón, el plastrón, la córnea, los tejidos perioculares, el hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal y los riñones (Fig.1.1). Dando como resultado obstrucción de la visión, dificultad de alimentación, movilidad limitada y reducción de la capacidad respiratoria. Se reporta la enfermedad en individuos adultos que se encuentran en aguas poco profundas (Alfaro et al., 2008).



Figura 1.1. *C. mydas* con presencia de FP.

1.4.3.2 Enfermedad del parche gris

Afecta generalmente a las tortugas verdes en cautiverio de 56 días de nacidos hasta 1 año. Se presenta como dermatitis necrosante, desarrollando lesiones circulares en la piel, pudiendo observarse manchas diseminadas y pápulas no diseminadas (Fig.1.2). La primera vez que se reportó un brote, las tortugas afectadas se encontraban en un rango de edad de entre 8 a 10 semanas (Alfaro et al., 2008). Esta enfermedad tiene una tasa de mortalidad del 38% y está asociada a Chelonid herpesvirus 1 (ChHV1) (Kane et al., 2016).



Figura 1.2. *C. mydas* con presencia de GP.

1.4.3.3 Enfermedad de pulmón-ojos-tráquea

Se ha observado la enfermedad en tortugas verdes silvestres y en cautiverio, sin embargo, no se ha evaluado el impacto que produce esta enfermedad (Coberley, 2002). Se asocia a Chelonid herpesvirus 6 (ChHV6) (Kane et al., 2016), causa faringitis, conjuntivitis, neumonía y traqueítis (Fig.1.3). Se ha documentado que la mortalidad de tortugas jóvenes que padecen la enfermedad puede alcanzar el 70% (Alfaro et al., 2008).



Figura 1.3. *C. mydas* con conjuntivitis asociada a LETD.

1.4.4 Metabolómica

Metabolómica es un campo emergente de las ciencias ómicas, que se centra en la detección y cuantificación de metabolitos y pequeñas moléculas en especies biológicas. El análisis de metabolitos como aminoácidos, azúcares, nucleótidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos y moléculas pequeñas exógenas como pesticidas y medicamentos permiten conocer información importante sobre el estado metabólico y fisiológico de un organismo en el momento de la toma de la muestra. La metabolómica ha sido aplicada en diversas áreas, por ejemplo, en análisis ambientales, toxicología, estudio de sistemas biológicos y en biomedicina. Las técnicas de metabolómica más empleadas en la actualidad son espectrometría de masas (MS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) (Tran et al., 2020).

1.4.4.1 Metabolómica en el estudio del estado de salud de animales

La metabolómica puede ser empleada como herramienta de diagnóstico de enfermedades en animales tanto domésticos como salvajes. Esta ha sido utilizada en el estudio y diagnóstico de enfermedades del sistema digestivo, reproductivo y músculo-esquelético (Tran et al., 2020). La mayor dificultad presente en estudios de estado de salud de fauna silvestre es la falta de información previa, sin embargo, la metabolómica permite definir perfiles metabolómicos en la población de una especie e identificar la desviación metabólica existente en individuos enfermos sin necesidad de información previa. Esta técnica es la adecuada para el estudio de especies amenazadas, ya que permite conocer el estado de salud del individuo mediante muestras de sangre, orina, heces, saliva o tejido de manera rápida, no invasiva y sin un tratamiento previo extensivo (Dove, 2018).

1.4.4.2 Metabolómica y las tortugas marinas

Durante los últimos 10 años se han empleado técnicas de metabolómica en estudios relacionados al estado de salud de tortugas marinas. Entre estos se encuentra un estudio realizado en 2013 en Hawái mediante la técnica de NMR en muestras de sangre de *C. mydas*. Mediante el cual se logró identificar 55 metabolitos, las muestras

fueron tomadas tanto de tortugas con presencia de tumores relacionados a FP como sin tumores (Schock et al., 2013). En el 2017, un estudio realizado en Australia uso la misma técnica en muestras de sangre de neonatos de *Caretta caretta* (*C. caretta*) expuestos a contaminación por petróleo e identificaron 18 metabolitos (Bailey et al., 2017). Adicionalmente, en el 2019 un estudio identificó 5 biomarcadores y diferencias en perfiles metabolómicos en muestras de lágrimas de *C. caretta*, *C. mydas* y *Lepidochelus kempii* afectadas y no afectadas por cambios drásticos de temperatura del agua también usando la técnica de NMR (Niemuth et al., 2019).

1.4.5 MALDI-ToF MS

La MS es una técnica analítica que se basa en medir la relación masa-carga de las muestras analizadas con el fin de identificar la cantidad y tipo de compuestos químicos presentes en esas moléculas. Las primeras técnicas de MS se basaban en la ionización de la muestra mediante el bombardeo del analito con haces de electrones, pero esto resultaba en la separación de la muestra en mil fragmentos cargados. En 1985 dos científicos alemanes, Hillenkamp y Karas, descubrieron una técnica en la que las moléculas se encontraban protegidas de la fragmentación durante el proceso de ionización por una matriz, este procedimiento fue llamado ionización suave (Fig.1.4.) y mejorada hasta que en 1990 el primer instrumento de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) fue comercializado (Hosseini & Martinez, 2017).

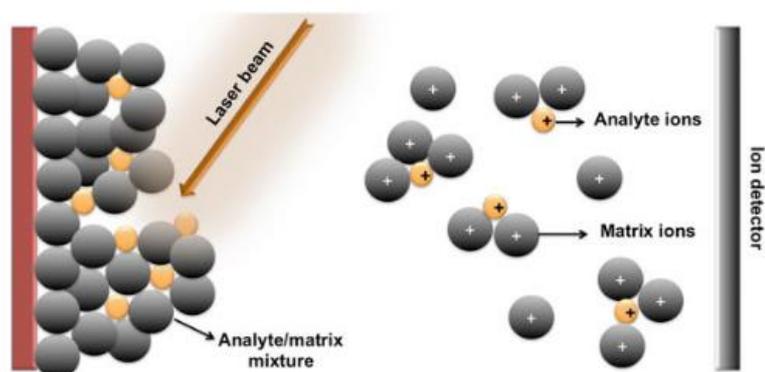


Figura 1.4. Esquematación del mecanismo de ionización suave del metabolito.

La tecnología de tiempo de vuelo (ToF) que es utilizada junto a MALDI, fue inventada en 1950 (Fig.1.5). En esta técnica los iones cargados son forzados a volar desde la fuente hasta el detector, de esta manera pueden ser identificados basándose su tiempo de vuelo hasta el detector (Hosseini & Martinez, 2017).

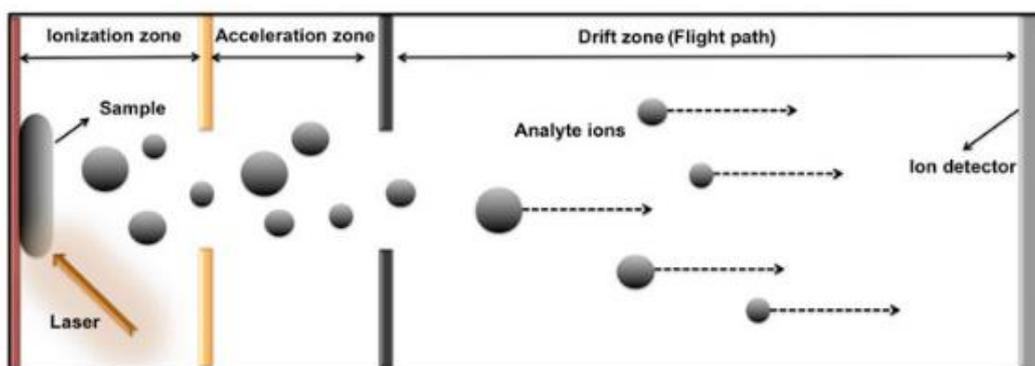


Figura 1.5. Representación esquemática del mecanismo de MALDI-ToF.

En la actualidad una de las aplicaciones de MALDI-ToF es la elaboración de perfiles metabolómicos que permitan diagnosticar enfermedades. La mayor cantidad de estudios han sido realizados en organismos modelo y en humanos, pero también puede ser aplicado para la detección de enfermedades en animales. Se ha descubierto que esta técnica permite un diagnóstico más específico, más eficiente y rápido de enfermedades que herramientas clásicas como el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); sobre todo en fauna silvestre ya que se posee menor cantidad de información previa o en caso de ELISA los anticuerpos necesarios (Pusch & Kostrzewa, 2005).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Para este estudio las muestras de sangre fueron tomadas fuera de la temporada de anidación. Las muestras provienen de tortugas juveniles y adultas en libertad como en cautiverio, debido a que la enfermedad de GP solo ha sido observada en tortugas en cautiverio (Sadie Shea Coberley, 2002).

2.1 Lugar de estudio

Se escogieron dos sitios de estudio para abarcar las 3 enfermedades mencionadas. En las islas Galápagos se recolectaron muestras de sangre de tortugas posiblemente afectadas por LETD y FP. Las islas al no poseer un refugio o centro de rehabilitación de vida silvestre, limitan la recolección de muestras de tortugas verdes que presenten la enfermedad del GP, ya que esta enfermedad principalmente se la ha registrado en individuos en cautiverio (Alfaro et al., 2008). Por tal motivo se eligió segundo lugar de estudio al Centro de rehabilitación de fauna marina del Parque Nacional Machalilla (CRFM).

2.1.1 Playa la Lobería

Se encuentra ubicada en la isla San Cristóbal (Galápagos, Ecuador). Su nombre se debe a la presencia de abundantes lobos marinos que pueden observarse en las rocas y en la arena. Las coordenadas del lugar de captura son las siguiente: 0° 55 400 S, 89° 369 430 W, siendo una bahía poco profunda y calmada con respecto a la presencia de olas (Fig.2.6). Esta área es considerada lugar significativo de forrajeo y descanso de tortugas verdes, mostrando fidelidad por parte de los individuos (Lewbart et al., 2014).

Playa la Lobería, San Cristobal



Figura 2.6. Mapa del sitio de estudio “playa La Lobería”.

2.1.2 Centro de rehabilitación de fauna marina del Parque Nacional Machalilla

CRFM se encuentra localizado en Puerto López (Manabí, Ecuador) siendo el único centro de rehabilitación de la costa del país que acoge fauna marina (Ministerio del ambiente y agua, n.d.). Se especializa en tortugas marinas y las coordenadas del área son las siguientes: $1^{\circ} 33' 32.2344''$ S, $80^{\circ} 48' 39.3624''$ W (Noboa, 2019). El mapa de la zona de estudio puede ser observado a continuación en la figura 2.7.

Zona de estudio del Centro de Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla



Figura 2.7. Mapa del sitio de estudio “Centro de Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla”.

2.2 Captura de los individuos y toma de muestras

2.2.1 Playa la Lobería

El muestreo fue realizado por 7 días consecutivos, de 7 de la mañana a 5 de la tarde. Para la toma de muestras se realizó vigilancia en bote, los individuos que se encontraron durante la vigilancia fueron atrapados con ayuda de una red de aro y subidos al bote (Schock et al., 2013). Una vez en el bote, la cabeza y aletas del individuo fueron sujetadas por dos investigadores mientras que otro tomaba con ayuda de una jeringa y un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, United States) 1 mL de sangre de la vena dorsal yugular. Posteriormente a la toma de la muestra el individuo fue marcado en el caparazón con un ungüento blanco de óxido de zinc, la marca permaneció en el caparazón del animal por aproximadamente una semana, lo que evitó que sea capturado nuevamente. La toma de muestras por individuo tuvo una duración máxima de 5 minutos. Todas las muestras fueron posterior a su obtención rotuladas y colocadas en una caja térmica a 4 °C. Se tomaron 85 muestras para identificar posteriormente la presencia de FP o LETD (Lewbart et al., 2014).

2.2.2 Centro de rehabilitación de fauna marina del Parque Nacional Machalilla

En CRFM el muestreo fue realizado también por 7 días consecutivos, en los que se tomó muestras solo de tortugas con lesiones en la piel posiblemente relacionadas a GP. Para capturar el individuo se procedió a colocar una red de carga en el borde la piscina, la cual fue levantada por dos investigadoras cuando el individuo se encontraba encima de esta. Una vez fuera de la piscina, la tortuga fue colocada sobre una superficie plana y restringido su movimiento por dos investigadores. Mientras que un tercer investigador buscaba la presencia de lesiones en la piel. En el caso de poseer lesiones se tomó con ayuda de una jeringa y un tubo con EDTA 1 ml de sangre de la vena dorsal yugular. Todas las tortugas revisadas por presencia de lesiones fueron marcadas en el caparazón con un ungüento blanco de óxido de zinc y se llevó registro de las tortugas que se tomó muestra de sangre. Posteriormente se levantó la red y la tortuga fue devuelta a la piscina. Se tomaron un total de 15 muestras, todas fueron posterior a su obtención rotuladas y colocadas en una caja térmica a 4 °C (Bluvias & Eckert, 2010).

2.3 Preparación de la muestra

Para las dos zonas de estudio las muestras obtenidas fueron centrifugadas, por 15 minutos a 1500 \times g, al terminar el trabajo de campo. Posterior a la centrifugación se extrajo el plasma de la muestra, este fue separado en dos partes. Una parte del plasma fue usado para la identificación de la enfermedad mediante la técnica RT-PCR y otra parte para el análisis por MALDI-ToF (Turkish biochemical society, 2017). Las muestras para identificación de la enfermedad por RT-PCR fueron refrigeradas a – 20 °C, mientras que las usadas para MALDI-ToF a – 80 °C hasta su análisis (Schock et al., 2013).

2.4 Identificación del grupo de estudio

Mediante el análisis por la técnica de RT-PCR se comprobó la presencia de FP, GP o LETD en la muestra analizada (Sadie Shea Coberley, 2002). En total se analizaron por RT-PCR 100 muestras, de las cuales se escogió para cada enfermedad 10 muestras positivas y adicionalmente 10 muestras con ausencia de las tres enfermedades como grupo control. Las 40 muestras fueron analizadas por la técnica de MALDI-ToF, mediante

la cual se pudo identificar los biomarcadores y perfiles metabólicos relacionados a cada enfermedad (Pusch & Kostrzewa, 2005).

2.5 Extracción de metabolitos

Se empleó el método de Bligh & Dyer para la extracción de lípidos. Para lo cual se empezó con la mezcla en un tubo Eppendorf (capacidad 2 mL) (3810X, Eppendorf, Alemania) de 75 μL de plasma y 562 μL de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (en proporción de 2:1), esta mezcla se homogenizó por 20 segundos y se la incubó por 1 hora en un agitador a 900 RCF. Posteriormente se agregó 156,2 μL de H_2O con el objetivo de inducir la separación de fases. Se centrifugó la muestra a 17.500 RCF por un tiempo de 10 minutos a 20 °C, por lo que se pudo recoger 150 μL de la fase inferior de CHCl_3 . Se realizó la segunda etapa de extracción en la fase acuosa superior con $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$. Dichas fases orgánicas se juntaron y se centrifugaron al vacío por 1 hora a 20 °C. Los lípidos extraídos se resuspendieron en 10 μL de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (en proporción 60:30:4.5) (Gil et al., 2018), seguido de aplicación de 2 μL del extracto a la placa de MALDI-ToF (Montani et al., 2012).

2.6 Obtención de datos por MALDI – ToF MS

Para el análisis de MALDI-ToF se colocó 2 μL del extracto, obtenido en el proceso anterior, en la placa objetivo de metal y se cubrió esto con 1 μL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB 0,5 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States), que previamente había sido disuelto en metanol al 90% (Montani et al., 2012). El DHB 0,5 M actúa como matriz y absorbe la mayor parte de la energía emitida por el láser; esto ayuda en la ionización de las moléculas de lípidos y metabolitos de masa baja (Fuchs & Schiller, 2008). Una vez la muestra se encontraba seca, la placa de metal fue insertado en el analizador MALDI-ToF. El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas Q-TOF (Synapt HDMS, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Mediante el cual se obtuvieron espectros de masas en modo de iones positivos, los cuales fueron generados por desorción de láser de 200 Hz en estado sólido en un rango de 100 a 1000 m/z en el modo de reflector (Montani et al., 2012).

2.7 Análisis de datos

Se utilizó el software Flexanalysis (Bruker Daltonics-Alemania) en el cual se pudieron observar una lista de iones y sus intensidades que posteriormente fueron exportadas a una hoja de cálculo Excel (Microsoft, Redmond, Washington, United States) (los datos usados fueron hipotéticos). El software MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) fue utilizado para procesar los datos, posteriormente se realiza el análisis de estadística multivariada, mediante análisis de componentes principales (PCA), el cual permite identificar grupos de metabolitos responsables de alguna característica que cause alteración metabólica significativa en la muestra del individuo afectado. Para este proyecto, buscamos la asociación entre las enfermedades y sus respectivos perfiles metabólicos. Por medio del software Simlipid 4 (Premier Biosoft-EE.UU.) y la base de datos Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>), los iones pudieron ser identificados por subclases de metabolitos; el programa y la base de datos en línea ofrecen registros para poder identificar los diferentes metabolitos encontrados en cada muestra asociados a sus enfermedades (Valeria et al., 2019).

Con el objetivo de identificar la abundancia relativa de los metabolitos encontrados, se realizó el análisis por heatmap.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Análisis de muestras de sangre

El análisis de las muestras de sangre de tortugas afectadas por las tres enfermedades estudiadas y las del grupo control permitió identificar la formación de grupos en base a los perfiles de metabolitos encontrados mediante MALDI-ToF, como puede ser observado en la figura 3.8. Se obtuvieron 7 metabolitos a partir del PCA que presentaron potencial como biomarcadores, el gráfico obtenido (Fig. 3.8) indica que los metabolitos encontrados son responsables por diferencias fisiopatológicas entre los grupos de tortugas afectadas por diferentes enfermedades. Cada punto de la gráfica indica una muestra y cada color corresponde a un grupo. Cada componente principal corresponde a un conjunto de metabolitos que explica la diferencia entre los grupos.

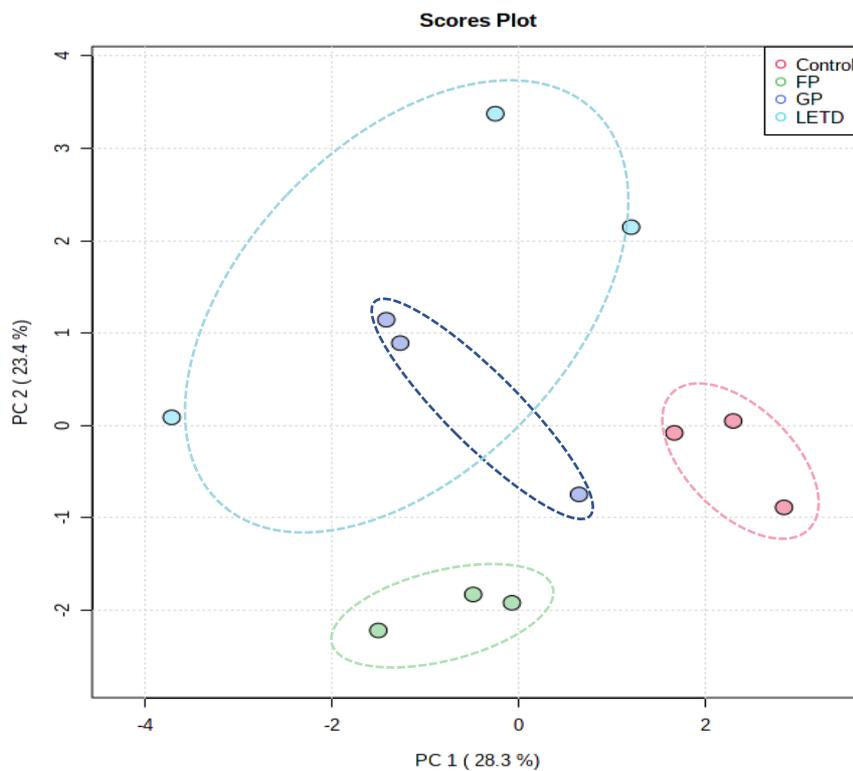


Figura 3.8. Score Plot del análisis de componentes principales (PCA).

Además, se aplicó el análisis por heatmap para estudiar las abundancias relativas de cada metabolito en cada muestra de este conjunto de datos hipotéticos (que representan los hechos científicos encontrados en la literatura). Esta imagen (Fig. 3.9) indica que las diferencias observadas por el PCA corresponden a las diferencias de intensidades de los metabolitos en diferentes enfermedades. Este dato sugiere que metabolitos son importantes para la detección de condiciones fisiopatológicas antes mismo de la presentación de síntomas.

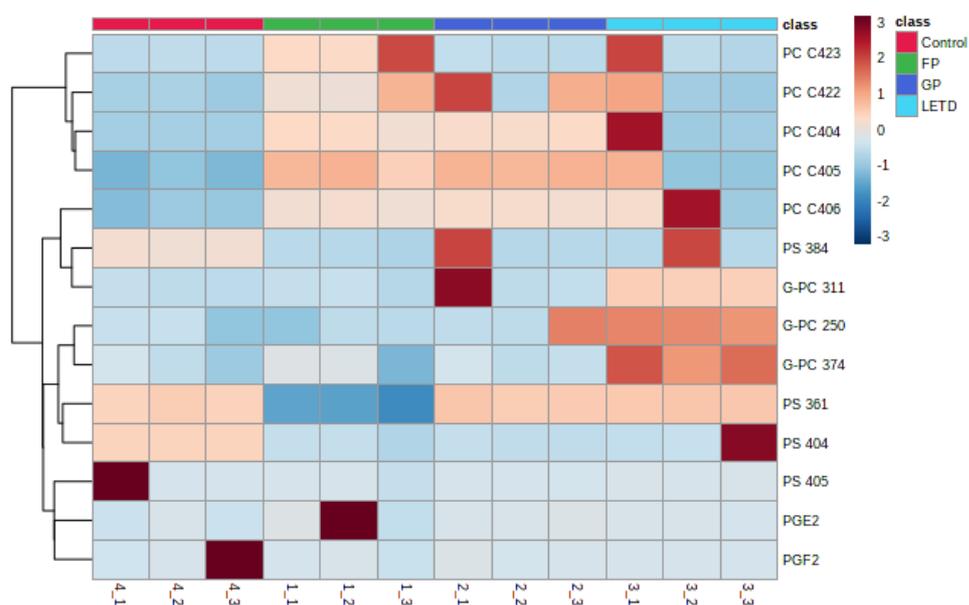


Figura 3.9. Análisis por Heatmap.

3.1.1 Fibropapilomatosis

Como resultado del análisis de muestras de sangre de individuos de *C. mydas* que padecen de FP se obtuvo niveles altos de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), además de niveles bajos de fosfatidilserina (PS), como puede ser observado en la figura del heatmap (Fig. 3.9). Estos tres fosfolípidos se encuentran en la membrana celular y se determinó en estudios del desarrollo de tumores que a medida que el tumor crece las concentraciones tanto de PC como PE en el organismo aumentan. Adicionalmente, se conoce que PC posee un rol importante en la proliferación celular (Glunde, 2016). Mientras que PS ha sido identificado como un marcador de apoptosis (Montani et al., 2012).

En un caso de estudio similar en el que se analizó biopsias de individuos de *C. mydas* en cautiverio y en libertad, se identificó como signos relacionados al desarrollo temprano de FP: la proliferación de fibroblastos en la capa papilar de la dermis y la leve proliferación de queratinocitos en el estrato germinativo. La epidermis normal tiene un grosor de 4 a 7 células, mientras que los tumores poseen un grosor de hasta 30 células (Gerl & Vaux, 2005). Adicionalmente, se identificó como signo del desarrollo temprano de tumores viscerales, relacionados a FP, la proliferación extensiva de fibroblastos (Herbst et al., 1999).

Los tres fosfolípidos encontrados en las muestras analizadas se encuentran relacionados a procesos de proliferación celular y apoptosis que ocurren en el desarrollo temprano de FP, debido a esto se determinó niveles anormales a PC, PE y PS como posibles biomarcadores de la enfermedad.

3.1.2 Enfermedad de parche Gris

Por medio de los resultados de las muestras de sangre de tortugas que padecen esta enfermedad se obtuvieron niveles altos de prostaglandina E2 (PGE2) y prostaglandina F2 (PGF2), esto puede ser observado en la figura del heatmap (Fig. 3.9). Las prostaglandinas (PG) son lípidos derivados del ácido araquidónico que se encuentran involucrados en la respuesta inflamatoria. En condiciones normales su producción en los tejidos es baja, pero en tejidos inflamados la producción incrementa de forma muy rápida (Ricciotti et al., 2011).

Entre los signos clínicos de GP se encuentra las manchas o parches grises irregulares en el caparazón, la piel, la superficie conjuntival del ojo y/o el párpado, adicionalmente en algunos casos se presentan pápulas (Calvache & Gómez, 2006). A nivel histopatológico, estas pápulas y parches grises presentan acantosis e hiperqueratosis de la epidermis (Lutz & John, 1997). La epidermis de estos quelonios se encuentra formada por tres capas: la capa cornea, la cual está altamente queratinizada, la capa intermedia rica en lípidos conformada a su vez por el estrato lucido, estrato granuloso y estrato espinoso, y finalmente se encuentra el estrato germinativo conformado por células cuboides que fabrican queratina (Calvache & Gómez, 2006).

Cuando se lleva a cabo el proceso de acantosis se produce un engrosamiento del estrato espinoso, esto generalmente se debe a una hipertrofia de las células o un aumento significativo de las mismas; por lo general se asocia con la hiperqueratosis, siendo esta un engrosamiento del estrato corneo (Guido & Aleman, 2011). Al presentarse estas anomalías, se observa que las células de ambas capas contienen cromatina marginada y núcleos con cuerpos de inclusión basofílicos.

Las pápulas y parches grises característicos de GP se encuentran involucrados con procesos de acantosis e hiperqueratosis de la epidermis, estos procesos suelen estar acompañados de inflamación. Debido a esto y a los resultados obtenidos se determinó niveles altos de PGE2 y PGF2 como posibles biomarcadores de la enfermedad.

3.1.3 Enfermedad de pulmón-ojos-tráquea

Del análisis de muestras de sangre de individuos de *C. mydas* positivos para la enfermedad de LETD se obtuvo niveles altos de PG y glicerofosfolinas (GPC), esto puede ser observado de forma gráfica en el heatmap (Fig. 3.9). Como se mencionó en los resultados obtenidos para GP, las prostaglandinas se encuentran involucradas en la respuesta inflamatoria. Estos lípidos contribuyen al desarrollo de los signos principales de inflamación, estos son: enrojecimiento, dolor, aumento de la temperatura e hinchazón (Ricciotti et al., 2011). Con respecto a las glicerofosfolinas se obtuvo niveles altos de 1-palmitoil-2-glutaril-sn-glicero-3-fosfolina (PGPC) y 1-palmitoil-2-(5'-oxo-valeroil) sn-glicero-3-fosfolina (POVPC), estos lípidos inflamatorios se encuentran involucrados en procesos de necrosis (Dempsey, 2017).

En un estudio realizado por el instituto de medio ambiente e higiene animal de la ciudad Stuttgart en Alemania se identificó como signos clínicos característicos de LETD: conjuntivitis, traqueítis, estomatitis, faringitis y neumonía (Marschang et al., 2009). Estos signos clínicos se encuentran involucrados con un proceso inflamatorio, por ejemplo: la conjuntivitis se refiere a la inflamación de la conjuntiva, esta es una membrana mucosa que se encuentra sobre la superficie externa del ojo (Benson, 2020). Mientras que faringitis es la inflamación de las membranas mucosas de la orofaringe (Schaefer., 2020), la traqueítis es la inflamación de la tráquea, la cual puede afectar

órganos circundantes como la laringe y los tubos bronquiales (Blot et al., 2017) y estomatitis se refiere a la inflamación y presencia de úlceras en las estructuras que conforman la boca como las encías, lengua, labios, paladar y mucosas de las mejillas (O'Brien, 2009). En cambio, la neumonía es una respuesta inflamatoria por parte de los alvéolos cuando el tejido se encuentra infectado (Boston University, 2020). Adicionalmente el instituto de medio ambiente e higiene animal de la ciudad Stuttgart determinó la presencia de material necrótico en los ojos, glotis y tráquea de tortugas que padecen de LETD (Marschang et al., 2009).

Por lo tanto, los altos niveles de PG y GPC obtenidos en las muestras de *C. mydas* que padecen de LETD se encuentran relacionados a los procesos inflamatorios y de necrosis que se llevan a cabo en esta enfermedad y se los identificó como posibles biomarcadores.

3.2 Aportación del método en la conservación de *C. mydas* en el Ecuador

El método diseñado combina la bioinformática con técnicas de análisis de alto rendimiento, con el objetivo de analizar de manera rápida y completa los metabolitos de una muestra biológica. Adicionalmente se debe mencionar que posee una alta sensibilidad, permite un diagnóstico temprano, requiere poca cantidad de muestra y no es indispensable muestrear gran cantidad de individuos para obtener resultados certeros (Zhang et al., 2020).

Estas características permiten que el método sea ideal para ser implementado en un monitoreo del estado de salud de *C. mydas*, permitiendo conocer en un futuro próximo la incidencia de FP, GP y LETD en la población de tortuga verde del Ecuador continental y de las islas Galápagos. El diagnóstico de estas enfermedades permite que sean consideradas como amenazas en Plan Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas del Ecuador y su estudio el desarrollo de tratamientos más efectivos, permitiendo aumentar las probabilidades de supervivencia de los individuos afectados.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Para poder contribuir a la conservación de *C. mydas* se diseñó un método de metabolómica que proporciona el diagnóstico de enfermedades asociadas a HV, mediante la técnica analítica de espectrometría de masas MALDI-ToF, pudiendo detectar eficazmente metabolitos asociados en el proceso de apoptosis, necrosis o respuesta inflamatoria. Para ello se realizó una revisión bibliográfica pudiendo diseñar dicho método que consistió en: captura y toma de muestra, preparación de las mismas, evaluación molecular para poder confirmar la presencia del virus por RT-PCR y determinación de perfiles metabolómicos mediante gráficos para obtención de biomarcadores; de manera tal que se obtienen resultados rápidos y con alta sensibilidad. Así, se concluye que:

1. El diseño del método de metabolómica permitió descubrir biomarcadores; siendo eficaz para el diagnóstico de enfermedades tales como FP, GP y LETD, que se desarrollan en *C. mydas* encontradas tanto en cautiverio como en libertad, pudiendo reducir el porcentaje de mortalidad de esta especie. Por medio de la técnica MALDI-ToF se logró tener espectros reflejados en gráficos que se introdujeron en bases de datos para identificar los metabolitos asociados
2. Se identificaron biomarcadores metabólicos en muestras de sangre de *C. mydas* asociados a procesos fisiopatológicos para cada enfermedad. Para FP se encontró niveles altos de fosfatidilcolina y fosfadiletanolamina además de niveles bajos de fosfatidilserina, metabolitos involucrados en el proceso proliferación celular y de apoptosis. La enfermedad de GP está implicada en procesos inflamatorios por lo que se obtuvo niveles altos de prostaglandinas PGE2 y PGF2, de la misma manera para la enfermedad de LETD se obtuvo niveles altos de

prostaglandinas además de glicerofosfolinas tales como PGPC y POVPC, en respuesta a procesos de necrosis.

3. El método diseñado aporta con información al Plan Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas del Ecuador, permitiendo incluir a las enfermedades identificadas como parte de las amenazas de la especie *C. mydas*, de manera tal que los individuos afectados puedan ser tratados y así aumentar las probabilidades de supervivencia de esta especie que se encuentra en peligro de extinción.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda:

1. Realizar el muestreo en caso de que sea posible en el agua y en un tiempo menor a 5 min, de manera tal que las tortugas no se vean afectadas por el procedimiento.
2. Colocar las muestras de sangre inmediatamente posterior a su obtención en una caja térmica, evitando su alteración por las altas temperaturas ambientales.
3. Considerar los resultados del estudio para el desarrollo de tratamientos más efectivos para combatir estas tres enfermedades.
4. Implementar en el Plan Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas del Ecuador un monitoreo anual del estado de salud de *C. mydas*, permitiendo conocer la incidencia de FP, GP y LETD en la población de esta especie en el Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, M., Balazs, G., Work, T., Dagenais, J., & Willmann, A. (2020). *Differences in Antibody Responses against Chelonid Alphaherpesvirus 5 (ChHV5) Suggest Differences in Virus Biology in ChHV5-Seropositive Green Turtles from Hawaii and ChHV5-Seropositive Green Turtles from Florida*. 5(January), 1–15.
- Alfaro, A., Rees, A. F., Frick, M., Panagopoulou, A., & Williams, K. (2008). Synopsis of infections in sea turtles caused by virus, bacteria and parasites: an ecological review. *NOAA Technical Memorandum*, 569, 5.
- Bailey, S. A. B., Niemuth, N., McClellan-green, P. D., Godfrey, M. H., Harms, C. A., & Stoskopf, M. K. (2017). *1 H-NMR metabolomic study of whole blood from hatchling loggerhead sea turtles (Caretta caretta) exposed to crude oil and / or Corexit Subject Category : Subject Areas :*
- Benson, E. C. R. S. (2020). *Conjunctivitis*. Statpearls.
- Blot, M., Favrolt, N., Bonniaud, P., Chavanet, P., & Piroth, L. (2017). Update on childhood and adult infectious tracheitis. *Medecine et Maladies Infectieuses*. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.06.006>
- Bluvias, J. E., & Eckert, K. L. (2010). *Marine Turtle Trauma Response Procedures : A Husbandry Manual* (Issue 10).
- Boston University. (2020). *Pneumonia*.
- Calvache, A., & Gómez, P. (2006). *IDENTIFICACIÓN DE LOS PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS DE LAS TORTUGAS CAREY (Eretmochelys imbricata) EN EL ACUARIO CEINER*. UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA BOGOTÁ, D.C.
- Cárdenas, D. M., Cucalón, R. V., Medina-Magües, L. G., Jones, K., Alemán, R. A., Alfaro-Núñez, A., & Cárdenas, W. B. (2019). Fibropapillomatosis in a green sea turtle (*Chelonia mydas*) from the southeastern Pacific. *Journal of Wildlife Diseases*, 55(1), 169–173. <https://doi.org/10.7589/2017-12-295>
- Chaves, J. A., Peña, M., & Valdés-uribe, J. A. (2017). Connectivity , population structure , and conservation of Ecuadorian green sea turtles. *Endangered Species Research*, 32(May), 251–264. <https://doi.org/10.3354/esr00809>
- Coberley, Sadie S, Herbst, L. H., Brown, D. R., Ehrhart, L. M., Bagley, D. A., Schaf, S. A., Moretti, R. H., Jacobson, E. R., & Klein, P. A. (2001). *Detection of Antibodies to a Disease-Associated Herpesvirus of the Green Turtle , Chelonia mydas*. 39(10),

- 3572–3577. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3572>
- Coberley, Sadie Shea. (2002). *The role of herpesviruses in marine turtles disease*. University of Florida.
- Dempsey, L. A. (2017). Modulation of CD46 in T cells Tumor control Interferons control fungus Epithelial stem cell memory Inflammatory lipids. *Nature Publishing Group*, 18(12), 2017. <https://doi.org/10.1038/ni.3876>
- Dove, A. D. M. (2018). *Metabolomics Has Great Potential for Clinical and Nutritional Care and Research with Exotic Animals*. July. <https://doi.org/10.1002/zoo.21024>
- DPNG. (2019). *MONITOREO DE ANIDACIÓN DE LA TORTUGA VERDE (CHELONIA MYDAS) EN LAS ISLAS GALÁPAGOS - TEMPORADA 2019*.
- Engel, A. I., Adamovicz, L., Wellehan, J. F. X., & Allender, M. C. (2020). Development and validation of a quantitative PCR assay for detection of Terrapene herpesvirus 2 in eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Virological Methods*, 286(May), 113968. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113968>
- Fuchs, B., & Schiller, J. (2008). MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 49). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_21
- Gerl, R., & Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 263–270. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh283>
- Gil, A., Zhang, W., Wolters, J. C., Permentier, H., Boer, T., Horvatovich, P., Heiner-Fokkema, M. R., Reijngoud, D. J., & Bischoff, R. (2018). One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(23), 5859–5870. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1200-x>
- Glunde, K. (2016). Targeting Phospholipid Metabolism in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00266>
- Guido, T., & Aleman, E. (2011). *Evaluación de la efectividad terapéutica de dos tratamientos contra papilomatosis cutánea en ganado bovino*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN- LEON.
- Herbst, L. H., Jacobson, E. R., Klein, P. A., Balazs, G. H., Moretti, R., Brown, T., & Sundberg, J. P. (1999). Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 36(6), 551–564. <https://doi.org/10.1354/vp.36-6-551>
- Hosseini, S., & Martinez, S. (2017). *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis*

- Applications in Bio- diagnosis , Tissue Engineering and Drug Delivery* (Issue March 2018). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2356-9>
- IAC Secretariat. (2006). *Sea Turtles and Fisheries*. 1–9.
- Jones, K., Ariel, E., Burgess, G., & Read, M. (2015). A review of fibropapillomatosis in green turtles. *The Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.041>
- Kane, L. P., Bunick, D., Abd-eldaim, M., Dzhaman, E., & Allender, M. C. (2016). Development and validation of quantitative PCR for detection of *Terrapene herpesvirus 1* utilizing free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Virological Methods*, 232, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.002>
- Lewbart, G. A., Hirschfeld, M., Denking, J., Vasco, K., Guevara, N., García, J., Muñoz, J., & Lohmann, K. J. (2014). Blood gases, biochemistry, and hematology of galapagos green turtles (*Chelonia mydas*). *PLoS ONE*, 9(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096487>
- Lutz, P., & John, M. (1997). *The Biology of sea turtles*.
- Marschang, R. E., Blahak, S., Wellehan, J. F. X., & Service, Z. M. (2009). *Transmissible Disease* (Issue 40).
- Mashkour, N., Jones, K., Hipolito, T. V., Kophamel, S., & Ahasan, S. (2020). *Disease Risk Analysis in sea turtles : A baseline study to inform conservation efforts*.
- Ministerio del Ambiente. (2014). *Plan nacional para la conservación de las tortugas marinas*.
- Ministerio del ambiente y agua. (n.d.). *Tortugas marinas se rehabilitan en Machalilla*. <https://www.ambiente.gob.ec/tortugas-marinas-se-rehabilitan-en-machalilla/>
- Montani, D. A., Cordeiro, F. B., Regiani, T., Victorino, A. B., Pilau, E. J., Gozzo, F. C., Ferreira, C. R., Fraietta, R., & Lo Turco, E. G. (2012). The follicular microenvironment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile in cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(11), 1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9859-y>
- Niemuth, J., Harms, C. A., & Stoskopf, M. K. (2019). Minimally Invasive Sampling Method for ¹H-NMR Metabolomics Investigations with Cold Stun Syndrome as a Case Study. *Journal of Wildlife Diseases*, 868–873.
- NOAA. (n.d.). *Green Turtle*.
- O'Brien, C. (2009). Management of stomatitis. *Canadian Family Physician*, 55, 891–892.
- Pusch, W., & Kostrzewa, M. (2005). Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in

- Screening and Diagnostic Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Screening and Diagnostic Research. *Current Pharmaceutical Design*, May. <https://doi.org/10.2174/1381612054546932>
- Ricciotti, E., Fitzgerald, G. A., Ricciotti, E., & Fitzgerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Journal of the American Heart Association*, 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
- Schaefer., R. W. W. A. G. S. Y. B. S. T. J. (2020). *Pharyngitis*. Statpearls.
- Schock, T. B., Keller, J. M., Rice, M., Balazs, G. H., & Bearden, D. W. (2013). *Metabotyping of a Protected Non-Model Organism , Green Sea Turtle (Chelonia mydas), using 1 H NMR Spectroscopy and Optimized Plasma Methods for Metabolomics*. 279–290.
- Stephen, C. (2014). Toward a modernized definition of wildlife health. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 427–430. <https://doi.org/10.7589/2013-11-305>
- Tran, H., McConville, M., & Loukopoulos, P. (2020). Metabolomics in the study of spontaneous animal diseases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(5), 635–647. <https://doi.org/10.1177/1040638720948505>
- Turkish biochemichal society. (2017). *Guideline for centrifuge use in medical laboratories*.
- Valeria, P., Serafim, P., Goes, A., Jr, D. F., Felipe, A. V., Guimaraes, E., Turco, L., Dale, I., Guerreiro, C., & Forones, N. M. (2019). *ORIGINAL Study of lipid biomarkers of patients with polyps and colorectal cancer*. 399–404.
- Wilson, E. ., Miller, K. ., Allison, D., & Magliocca, M. (2020). *Why healthy oceans need sea turtles: The importance of sea turtles to maryne ecosystems*.
- WWF. (2020a). *Green turtles*.
- WWF. (2020b). *Living Planet Report 2020: Bending the Curve of Biodiversity Loss*.
- Zhang, X., Li, Q., Xu, Z., & Dou, J. (2020). Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. *RSC Advances*.