



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE GLÁNDULAS ANEXAS (HÍGADO,
VESÍCULA BILIAR, PÁNCREAS Y BAZO) DE MUESTRAS TOMADAS A
TORTUGAS CHARAPAS (*Podonecmis unifilis*) PROVENIENTES DE TRES
POBLACIONES DEL PARQUE NACIONAL YASUNÍ

AUTOR

Darien Danilo Rosero Almeida

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE GLÁNDULAS ANEXAS (HÍGADO, VESÍCULA BILIAR, PÁNCREAS Y BAZO) DE MUESTRAS TOMADAS A TORTUGAS CHARAPAS (*Podonecmis unifilis*) PROVENIENTES DE TRES POBLACIONES DEL PARQUE NACIONAL YASUNÍ

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía

Luis Fabián Nuñez Naranjo

Autor

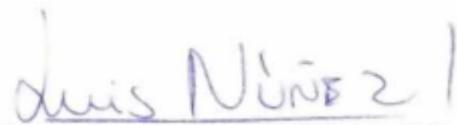
Darien Danilo Rosero Almeida

Año

2020

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, “Análisis histopatológico de glándulas anexas, (Hígado, Vesícula Biliar, Páncreas y Bazo) de muestras tomadas a Tortugas Charapas (*Podonecmis unifilis*) provenientes de tres poblaciones del Parque Nacional Yasuní, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Darien Danilo Rosero Almeida, en el semestre 202010 orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Dr. Luis Fabián Núñez Naranjo

MVZ. MSc. PhD.

CI.: 171282025-5

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado el trabajo, “Análisis histopatológico de glándulas anexas, (Hígado, Vesícula Biliar, Páncreas y Bazo) de muestras tomadas a Tortugas Charapas (*Podonecmis unifilis*) provenientes de tres poblaciones del Parque Nacional Yasuní, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Darien Danilo Rosero Almeida, en el semestre 202010 orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

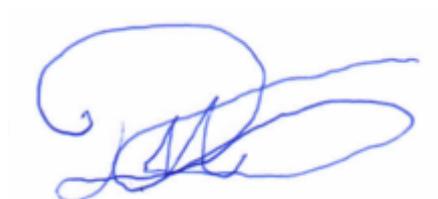


MSc. Carolina Bracho MVZ

C.I. 1716754849

DECLARACIÓN DE LA AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se ha citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'D' followed by several loops and a long horizontal stroke.

Darien Danilo Rosero Almeida

C.I.: 1723438634

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, esta oportunidad que me ha dado en la vida de poder formar parte de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y permitirme ejercerla.

Agradezco a las personas especiales que han formado parte de mi vida, gracias a ellos me he conseguido formarme como ser humano y profesional.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a todas las personas antes mencionadas que de una u otra forma han contribuido a que se haga realidad, especialmente a mi familia, a mis amigos y compañeros, a las personas especiales y a todos que han formado parte de mi vida personal y de mi formación académica.

RESUMEN

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), ha colocado en su lista roja de especies en peligro de extinción a la Tortuga Charapa perteneciente al género *Podonecmis*, clasificándola como especie vulnerable, que esta amenazada por la caza y comercialización indiscriminada de huevos en su hábitat natural, el Parque Nacional Yasuní. Es por ello que la organización internacional “*Wildlife Conservation Society (WCS)*”, monitorea y controla a la población

El objetivo del estudio fue realizar un análisis histopatológico de una población de treinta individuos de tortugas charapas (*Podonecmis unifilis*) pertenecientes a 3 comunidades (Sani Isla, Nueva Providencia e Indillama) que forman parte del programa de conservación de la WCS.

Se analizó a 10 individuos neonatos de cada una de las 3 comunidades, fueron escogidos de manera aleatoria, que posteriormente fueron sacrificados y se les realizó el proceso de necropsia, separando a los diferentes órganos como el hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo, se realizó el almacenamiento en formol tamponado al 10%, posteriormente las placas histológicas fueron obtenidas, colectadas, fijadas y coloreadas con solución de hematoxilina-eosina y posteriormente fueron almacenadas en cajas de cassette para su respectivo análisis microscópico. Entre los resultados relevantes se encontró en el análisis histopatológico determino lesiones en 2 órganos, siendo el hígado el más afectado, donde se observó un proceso congestivo principalmente en la zona adyacente a la vena centrolobulillar y la triada portal en un 36% de las muestras analizadas, se destaca además un proceso de lipidosis en un 18%, y se destacó también lesiones fibróticas focales cerca a la cápsula, en la vena porta y en la

zona lobulillar en un 15%, La comunidad "Sani Isla" presentó mayor número de lesiones asociadas a lipidosis hepática. El páncreas mostro zonas congestivas en la zona acinar en un 10%.

Como conclusión se determinó que los órganos analizados presentan leves alteraciones o hallazgos histopatológicos principalmente en hígado y páncreas, lesiones relacionados con procesos fisiológicos asociados a la nutrición y eutanasia de los animales, y no a procesos infecciosos determinando que los órganos de los animales analizados se muestran aparentemente sanos.

Palabras claves: Tortugas Charapas, histopatología, hígado, páncreas, congestión, lipidosis.

ABSTRACT

Currently, the International Union for the Conservation of Nature (IUCN), has placed on its red list of endangered species the Charapa Turtle belonging to the genus *Podonecmis*, classifying it as a vulnerable species, because it is threatened by indiscriminate hunting and commercialization of eggs in their natural habitat, Yasuni National Park. For this reason, the international organization "Wildlife Conservation Society (WCS)" has been concerned with this species and has developed population monitoring and control programs, however, they currently do not have the advice of a veterinarian who determines that Turtles in protection are healthy before release.

This aspect influenced the need to verify the health status of protected animals, so the objective of this study was to perform a histopathological analysis of a population of thirty individuals of charapa turtles (*Podonecmis unifilis*) belonging to 3 communities (Sani Isla, Nueva Providencia and Indillama) that are part of the WCS conservation program, to determine the health status of the animals prior to their release.

The investigation was carried out using 10 randomly chosen neonatal individuals within each community who were sacrificed and subjected to necropsy, from these animals samples of liver, gallbladder, pancreas and spleen were collected, fixed, stored in 10% buffered formalin, processed to obtain histological sheets, and analyzed by light microscopy. Histopathological analysis determined lesions in 2 organs, the liver being the most affected, where a congestive process was observed mainly in the area adjacent to the centrolobular vein and the portal triad in 36% of the samples analyzed, a process of lipidosi in 18%, and focal fibrotic lesions were also highlighted near the capsule, in the portal vein and in the lobular area in 15%. The "Sani Isla" community presented a greater number of lesions associated with hepatic lipidosi. The pancreas showed congestive areas in the acinar zone by 10%.

In conclusion, it was determined that the organs analyzed have slight alterations or histopathological findings mainly in the liver and pancreas, lesions related to

physiological processes associated with the nutrition and euthanasia of the animals, and there are no infectious processes determining that the organs of the animals analyzed are apparently healthy.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I: Introducción..... | 1 |
| 1.1: Objetivos..... | 4 |
| 1.1.1: Objetivo General..... | 4 |
| 1.1.2: Objetivos Específicos:..... | 4 |
| 1.1.3: Pregunta de Investigación | 5 |
| CAPÍTULO II: Marco Teórico | 6 |
| 2.1: La Especie: Tortugas Charapas (<i>Podonecmis unifilis</i>) | 6 |
| 2.2. Sinonimia y Otros Nombres | 6 |
| 2.3. Hábitat Natural..... | 7 |
| 2.4: Características Físicas..... | 7 |
| 2.5. Alimentación | 9 |
| 2.6. Hábitos Reproductivos..... | 9 |
| 2.7. Principales Amenazas | 10 |
| 2.7.1. Depredación | 10 |
| 2.7.2: Parasitosis y Bacteremias..... | 11 |
| 2.7.3: Comercialización Indiscriminada de Huevos y Venta de los animales como Mascotas..... | 11 |
| 2.8. Hígado | 13 |
| 2.8.1: Histología..... | 13 |
| 2.8.2: Organización Celular | 13 |
| 2.8.3: Patologías Hepáticas | 14 |
| 2.9: Bazo | 19 |
| 2.9.1: Organización Histológica | 20 |
| 2.9.2: Patologías en Bazo..... | 21 |
| 2.10: Páncreas | 24 |
| 2.10.3. Patologías del Páncreas. | 26 |
| 2.11. Vesícula Biliar | 26 |
| 2.11.1: Histología..... | 26 |
| 2.11.2: Principales Patologías de la Vesícula Biliar | 27 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III: Metodología de la Investigación..... | 28 |
| 3.1. Ubicación del estudio:..... | 28 |
| 3.2. Población y muestra: | 29 |
| 3.3. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de la población y del análisis histopatológico. | 29 |
| 3.4. Materiales: | 30 |
| 3.5. Metodología de la Investigación:..... | 30 |
| 3.5.1. Antecedentes y Levantamiento de la Información | 30 |
| 3.5.2. Proceso de Contención Física | 30 |
| 3.5.3. Técnica de Eutanasia | 31 |
| 3.5.4. Almacenamiento y Conservación de los Animales. | 31 |
| 3.5.5: Procesamiento de las Placas de Histología..... | 31 |
| 3.5.6. Lectura de las Placas Histológicas | 32 |
| CAPÍTULO IV: DISEÑO EXPERIMENTAL | 35 |
| 4.1. Descripción del estudio:..... | 35 |
| 4.2. Variables..... | 36 |
| 4.3. Diseño experimental | 36 |
| 4.4. Análisis estadístico | 37 |
| CAPÍTULO V: RESULTADOS | 38 |
| 5.1. Evaluación Microscópica de Hígado | 38 |
| 5.1.1. Congestión Hepática..... | 39 |
| 5.1.2. Fibrosis | 43 |
| 5.1.3. Lipidosis Hepática..... | 45 |
| 5.2. Evaluación Microscópica de Páncreas..... | 48 |
| 5.3. Evaluación Microscópica de Bazo | 50 |
| 5.4. Evaluación Microscópica de Vesícula Biliar | 51 |
| CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN | 54 |
| CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 60 |
| 7.1. Conclusiones | 60 |
| 7.2. Recomendaciones | 63 |

REFERENCIAS..... 64

CAPÍTULO I: Introducción

El Parque Nacional Yasuní es un lugar megadiverso que cuenta con una variedad de especies de 150 anfibios, 121 reptiles, 598 especies de aves entre 169 y 204 especies de mamíferos y en cuanto a su flora se han identificado 2113 especies (MAE, 2016).

En la actualidad el parque cuenta con diversas amenazas que atentan con la preservación de especies y las ponen en peligro tales como el aumento de las actividades agrícolas, la deforestación ilegal excesiva, la destrucción de hábitats naturales por la construcción y apertura de nuevas vías y caminos secundarios, comercio ilegal de vida silvestre, cacería indiscriminada, crecimiento poblacional y asentamientos humanos ilegales en zonas protegidas (WCS, 2016).

Es en esta parte del territorio entre los límites del Parque Nacional Yasuní y las aguas del gran Río Napo se asientan las poblaciones de Tortugas Charapas de sus 2 especies (*Podonecmis expansa*) y (*Podonecmis unifilis*), ambas especies distribuidas desde la zona del Río Orinoco ubicado en Venezuela y Colombia hasta nuestro país (Cuevas, *et al.*, 2010).

Se ha considerado dentro de algunos estudios que han sido realizados y evaluados en el Ecuador, que las tortugas charapas (*Podocnemis unifilis*) son una especie de reptil vulnerable, por la reducción de individuos en las diferentes poblaciones, principalmente debido a la comercialización ilícita e ilegal de los huevos para consumo humano, además que los adultos son capturados y vendidos para ser usados como mascota (WCS, 2016).

Dentro del territorio nacional existen algunas entidades que están dedicadas para la conservación de especies que están en amenaza de peligro de extinción, las cuales han ido desarrollando diversos programas que ayudarían a la conservación de las diferentes especies. Incentivando y recuperando las poblaciones, repoblándolas y en cuanto a las especies susceptibles que están siendo constantemente vigiladas y son mantenidas en medios donde puedan subsistir sin peligro de estar amenazadas (Cuevas *et al.*, 2010).

Entre las entidades encargadas se encuentra la WCS Ecuador, dicha entidad se encarga de proteger y vigilar a la vida silvestre endémica y el biotipo que se encuentra en el Parque Nacional Yasuní, fue fundada en el Ecuador durante el año 2001, con alianza estratégica con el Ministerio del Ambiente y el Gobierno nacional, existen otras entidades encargadas de la conservación de ecosistemas y animales endémicos tales como la Fundación Zoológica del Ecuador, Terra Incógnita, entre algunas otras (WCS, 2016).

La WCS Ecuador es la más importante puesto que esta entidad se dedica a conservar y repoblar las comunidades de Tortugas Charapas de las especies (*P.expansa*) y (*P unifilis*) (WCS, 2016) (Fig. 1).

Otras entidades que se dedican a la conservación de dichas especies como la Universidad San Francisco de Quito y la Estación de la Biodiversidad Tiputini, quienes han ejecutado algunos programas y estudios similares a los de la WSC, muchos de estos programas están orientados en preservar y repoblar a las tortugas charapas para sacarla del peligro que la amenaza y con ello liberarla de la Lista Roja de la UICN (MAE, 2016).

La conservación de la especie suele darse sobre todo durante la época seca en la zona noroccidente de la Amazonía ecuatoriana donde las tortugas charapas

desovan en las playas del río Napo y Tipunini y gracias a los esfuerzos de 9 comunidades que trabajan arduamente desde el año 2008 en programas de conservación y rescate muchas tortugas lograron sobrevivir, y hasta el día de hoy se han liberado y rescatado a más de 15 000 individuos (MAE, 2016).



Figura 1. Estado actual de las tortugas Charapas (WCS, 2016).

El programa de manejo y Conservación de las Tortugas Charapas empezó a desarrollarse en 2008 con la WCS en la provincia de Orellana en las comunidades kichwas de Indillama, Nueva Providencia, Pompeya, Sani Isla, San Roque y Pilchi que están ubicadas en las orillas del Río Napo y en comunidades Kichwas de Mandaripanga ubicadas en las orillas del Río Tiputini (Cuevas *et al.*, 2010).

El presente estudio sirve como una guía para verificar el estado de salud de las tortugas, previa su liberación, siendo una investigación pionera ya que dentro del

territorio nacional no existe información sobre estudios similares realizados en esta especie. Así, la presente investigación tiene como objetivo determinar el estado de salud del hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo de tortugas Charapas criadas en programas de conservación previa su liberación, en el Ecuador, por medio de un análisis microscópico, a fin de implementar un programa de monitoreo y diagnóstico de enfermedades para garantizar que los animales al ser liberados estén sanos (WCS, 2016).

1.1: Objetivos

1.1.1: Objetivo General

- Realizar un estudio histopatológico en las glándulas anexas al sistema digestivo tortugas charapas (*Podonecmis unifilis*) a partir de muestras tomadas a neonatos pertenecientes al programa de manejo para la conservación del Parque Nacional Yasuní auspiciado por WCS, para verificar la integridad de estos órganos.

1.1.2: Objetivos Específicos:

- Describir las alteraciones histopatológicas, mediante la observación microscópica del hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo pertenecientes a neonatos de tortugas charapas (*Podonecmis unifilis*) de tres poblaciones dentro del programa de monitoreo de la WCS en el noroccidente del Parque Nacional Yasuní.
- Determinar las posibles causas de la presentación de las alteraciones histopatológicas observadas en los neonatos de tortugas charapas (*Podonecmis unifilis*).

1.1.3: Pregunta de Investigación

- ¿Los neonatos de tortugas charapas (*Podonecmis unifilis*) dentro del programa de manejo auspiciado por WCS pertenecientes a tres comunidades del noroccidente del Parque Nacional Yasuní presentaron alteraciones histopatológicas destacables en la observación microscópica?

CAPÍTULO II: Marco Teórico

2.1: La Especie: Tortugas Charapas (*Podonecmis unifilis*)

Es una especie de tortuga perteneciente al orden de los *Testudines*, familia *Podocnemididae*, género *Podonecmis* y especie *unifilis*, es endémica de la Amazonía ecuatoriana y principalmente habita los bosques húmedos tropicales de las provincias del Napo, Orellana, Pastaza y Sucumbíos ubicadas en el piso altitudinal tropical oriental (Rhondin *et al.*, 2014) (Fig. 2).



Figura 2. Ejemplar de Tortuga Charapa (*Podonecmis unifilis*) (WCS, 2016).

2.2. Sinonimia y Otros Nombres

Taricayas, Terecayas, Terrecayás, Charapas, Petas de Agua, Jarras, Yellow-Spotter River Turtles, Charapas Pequeñas. (Páez *et al.*, 2012).

2.3. Hábitat Natural

La especie se distribuye desde el norte de Bolivia, Colombia, Ecuador, Brasil, el noreste de Perú, Surinam, Guyana, Guayana Francesa y el sur de Venezuela, también ha sido introducida en el estado de Florida en Estados Unidos. Su localización se da entre los 0 y los 1000 m de altitud. En el territorio nacional ha sido reportada en Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza y en Morona Santiago, entre los 220 y los 394 metros de altitud (Rhondin *et al.*, 2014).

Es principalmente acuática y de hábitos diurnos, que vive en cuerpos de aguas cristalinas, claras, blancas o negras, se le ha visto habitar fuentes de ríos, remansos, caños, pozas, pozos y lagunas. Durante la temporada seca habita los cauces principales de ríos y en la temporada lluviosa migra a lagunas o pozas, donde hay mayor presencia de alimento (Rhondin *et al.*, 2014).

2.4: Características Físicas

La especie es distinguida de otras tortugas del género debido a que posee ciertas características:

Un caparazón unicarenado que posee el borde anterior revertido fuertemente expandido la zona de la región caudal poseyendo una quilla que está ligeramente elevado en los escudos vertebrales a la altura de V2 y V3, además tiene forma convexa y ovalada (Páez *et al.*, 2012) (Fig 2).

La tortuga además posee manchas cefálicas amarillas, una de forma redondeada sobre cada margen lateral de la escama intraparietal, la una está

ubicada sobre el extremo del rostro, la otra mancha sobre el tímpano y 2 sobre la ranfoteca maxilar (Luz & Stringhini, 2003).

Posee una bárbula sobre la zona mentoniana, además de poseer 3 poros axilares en la zona sobre el puente y un poro inguinal, sus patas están completamente palmeadas, el plastrón es mucho más pequeño que el caparazón, siendo que la región anterior es mucho más ancha, larga y redondeada en comparación con la región posterior (Rhondin *et al.*, 2014).

Posee dos escamas parietales frontales grandes, además de un surco interparietal, posee una membrana timpánica grande (Luz & Stringhini, 2003).

El caparazón de los adultos es de coloración café oscuro a negro, su plastrón suele ser amarillento con o sin machas oscuras, sus mandíbulas son de color café oscuras a tono negro, el mentón es de color amarillo, la piel entre gris a negra (Páez *et al.*, 2012).

En el caso de los neonatos y de los juveniles suelen ser mucho más vistosos, sus caparazones son de coloración café a verde grisáceo y delineados en amarillo en especial los neonatos, el plastrón está en un tono gris rosáceo, la cabeza es gris a verde oliva y la cabeza suele tener manchas amarillas a naranjadas (Páez *et al.*, 2012).

Las machas cefálicas suelen desaparecer en los adultos, en el ojo su iris es negruzco en el caso de las hembras, en machos y en juveniles suele ser de color verde amarillento; en cuanto a su tamaño es una de las tortugas provenientes de agua dulce de mayor tamaño, posee una longitud del caparazón que mide entre los 500 y los 518 mm, las hembras son mucho más grandes que el macho, ya

que la longitud de su caparazón mide hasta los 500 mm en relación a los machos que miden 335 mm, su muesca anal en los machos es mucho más pronunciada que en las hembras (Páez *et al.*, 2012).

2.5. Alimentación

De hábitos diurnos, la especie presenta una dieta dependiente de cambios ontogénicos, siendo los neonatos herbívoros y neustófagos donde su alimentación es a base de partículas suspendidas en el agua, mientras que los juveniles son herbívoros, frugívoros y además de consumir una gran variedad de plantas acuáticas como algas, hiervas, tallos de arbustos, semillas, frutos, bejucos, y crustáceos, bivalvos y pequeños moluscos, mientras que los adultos poseen una dieta más amplia, alimento a base de peces y de carroña, las hembras comen más semillas y frutos que los machos, mientras que estos últimos consumen una mayor proporción de tallos (Figueroa-Forero, 2010).

2.6. Hábitos Reproductivos

En esta especie se ha reportado paternidad múltiple, su ovoposición está ligada a la temporada seca, cuando el caudal de los ríos baja causando mayor exposición de las playas y más lugares para anidar, la cópula también se da en la temporada seca, que empieza unos días anteriores al desove y culmina en los primeros días del mismo. Donde las hembras prefieren como lugares para desovar, playas altas que suelen estar a 3 a 60 m del cuerpo de agua y en algunos casos hasta los 200 m, y suelen utilizar una gran variedad de sustratos, tales como arcilla, gravilla y limo, que son usados como material de construcción del nido, los nidos también pueden estar ubicados en superficies horizontales o inclinadas que son de baja vegetación con sombra, incluso suelen anidar en áreas con presión antropogénica es decir en áreas taladas o quemadas (Rhondin *et al.*, 2014).

La anidación ocurre principalmente en las noches y en ocasiones lo hacen de manera solitaria o en grupos grandes de hasta 46 tortugas, desovando en grupo, brindándoles las ventajas adaptativas, es decir reduciendo el riesgo de depredación, la tortuga construye su nido orinado sobre el sustrato, lo cual lo humedece y le permite excavar con mayor facilidad, la hembra puede llegar a desovar de forma variable entre 4 a 52 huevos, pudiendo desovar hasta dos veces por año, el huevo tiene forma elipsoide, de color crema, los mismos que al momento del desove son duros y se vuelven suaves al momento de la eclosión, este proceso está ligado a la absorción de agua (Figuroa-Forero, 2010).

El tiempo de incubación suele ser variable, tardando entre los 66 y los 150 días, siendo directamente relacionado con la temperatura del nido y de otras variables ambientales; al igual que en otros reptiles, la determinación sexual suele estar relacionada directamente con la temperatura ambiental, es decir, si oscila entre los 28 y los 32°C, un 80% de los neonatos serán machos, mientras si la temperatura es mayor a los 32°C serán hembras (Figuroa-Forero, 2010).

2.7. Principales Amenazas

2.7.1. Depredación

Las crías y los huevos son principalmente amenazados por la depredación por aves rapaces, artrópodos, garzas, peces y por caimanes, mientras que los individuos adultos suelen ser depredados por armadillos, serpientes, felinos, lagartijas, aves y caimanes (Figuroa-Forero, 2010).

2.7.2: Parasitosis y Bacteremias

Los parásitos que mayormente afectan a esta especie son:

Parastratis hystrix, *Paraorientatractus semiannulata*, *Buckleyattractus marinkelli* Trematodos pertenecientes a la familia *Diplodiscidae*. presencia de hongos que infectan tanto la cavidad oral, como el plastrón y el caparazón, infecciones bacterianas producidas por *Shigella flexnerii* y *Escherichia coli.*, ectoparásitos como sanguijuelas del género *Bogabdella* (Figueroa-Forero, 2010).

2.7.3: Comercialización Indiscriminada de Huevos y Venta de los animales como Mascotas

Algunas tortugas nunca verán la luz pues caerán bajo el control de los traficantes de huevos o serán víctimas de la cacería indiscriminada, pocas serán las que saldrán de su nido y será cuestión de suerte que no sean atrapadas por depredadores como garzas y otras aves (Alves & Santana, 2008).

Se ha tomado en consideración que desde hace décadas las tortugas charapas están sumamente cotizadas en el mercado negro, por ello se convierten en víctimas del tráfico de huevos y de animales, desde el año 2007, un año antes del inicio del programa de conservación, el biólogo Rubén Cueva y su equipo lograron contabilizar, en tan solo un fin de semana la venta de 7000 huevos de tortugas acuáticas que se encontraban en el mercado de comunidad de Pompeya, en la provincia de Orellana, se estima que el precio por un huevo de tortuga charapa es de aproximadamente \$0.30, sobre todo en la temporada del desove entre Agosto y Diciembre y cuando llega el periodo de temporada baja el precio incrementa hasta \$0.50 centavos por huevo (MAE,2017) (Fig. 3).



Figura 3. Huevos de Tortuga decomisados (WCS, 2016).

Pero pese a los esfuerzos de las comunidades y a un mayor control por parte del Ministerio del Ambiente en Ecuador (MAE) en contra del tráfico de huevos, aún existen lugares donde aún se comercializan los huevos sobre todo entre los meses de agosto y Diciembre, en el año 2016 se lograron registrar hasta 10 000 huevos que estaban siendo comercializadas en los mercados de la comunidad de Pompeya, Puerto Providencia y en la ciudad del Coca (Vargas-Ramírez, Castaño-Mora, & Fritza, 2017).

El MAE reportó al año 2014 como el año que tuvo el menor número de ventas, donde se contabilizaron 400 huevos de las 2 especies de charapas en Orellana, algunos guardabosques del Yasuní han contado que ahora el contrabando de huevos funciona bajo pedido, es decir que no existe un día o un lugar específico

donde los traficantes van a comercializar los huevos y muchas veces esquivan los controles del MAE (MAE, 2017).

2.8. Hígado

2.8.1: Histología

Siendo la víscera o la glándula más voluminosa del organismo animal, se sitúa caudal al diafragma y está protegida por las costillas, su formación histológica se da desde la invaginación producida en el tubo digestivo en el desarrollo embrionario, siendo de origen epitelial (Crawford & Burd, 2016)

.

La cápsula de Glisson de tejido conectivo fibroso lo recubre, además penetra al órgano formando los tabiques que dividen al hígado en lobulillos y lóbulos (Crawford & Burd, 2016).

La sangre en gran parte llega hasta el órgano, proveniente de la vena porta hepática recogiendo las sustancias de desecho provenientes de la digestión (Malarkey, Johnson, Ryan, Boorman G, & Maronpont, 2016).

Su color rojizo intenso se da gracias a la gran irrigación sanguínea, su funcionamiento está ligado estrechamente con el tubo digestivo y de otras funciones vitales (Crawford & Burd, 2016).

2.8.2: Organización Celular

2.8.2.1. Lobulillo Hepático y la Vena Centrolobulillar

El tejido conectivo separa a los lobulillos, aunque en reptiles no es tan visible, su forma es prismática o hexagonal y poligonal midiendo entre 1 a 2 mm de diámetro, en el centro poseen una Vena Centrolobulillar de un gran diámetro (Crawford & Burd, 2016).

2.8.2.2. Espacios Portales y las Triadas Portales

Ubicados en los vértices del lobulillo, formados de tejido conectivo, las denominadas triadas portales están formadas por una de las ramas de la vena porta, la rama de la arteria hepática y un conducto biliar, además de contar con fibras nerviosas y vasos linfáticos (Crawford & Burd, 2016).

2.8.3: Patologías Hepáticas

2.8.3.1. Congestión Hepática

Se define como hígado congestionado al conjunto de manifestaciones bioquímicas y clínicas hepáticas secundarias a una congestión hepática pasiva resultado de una insuficiencia cardíaca derecha que provoca el aumento de la presión del sistema venoso portal (Jubb, Kennedy & Palmer, 2016).

En la visualización macroscópica del órgano este posee una coloración intensa púrpura con el aumento de tamaño con los bordes redondeados, al corte tiene un aspecto denominado “hígado en nuez moscada” dada la presencia de áreas pálidas que pertenecen a zonas periféricas periportales que están más preservadas, además de poseer una frecuente degeneración grasa que se

alterna con otras de tono más oscuro y zonas enrojecidas por a la propia congestión o a la necrosis del área centrolobulillar. En cuanto a la evaluación histológica, se aprecia la existencia de una dilatación de las venas centrolobulillares y de las sinusoides (Orfanidis, 2018).

Se observa también la compresión y la atrofia de hepatocitos adyacentes, siendo la zona 3 del acino la más comprometida que se ubica en la zona adyacente a la región centrolobulliar y se encuentra menos irrigada (Orfanidis, 2018).

En el caso de los hepatocitos ubicados en la región peri portal, estos suelen estar muy bien conservados, y los cambios degenerativos aumentan a medida que se acerca la región centrolobulliar. La degeneración grasa es mucho más frecuente, pero con ausencia de inflamación (Orfanidis, 2018).

Se suelen desarrollar áreas de fibrosis en la zona III con esclerosis de la vena centrolobulliar, la fibrosis progresa y forma puentes entre las diferentes venas centrales que rodean al espacio portal, con la formación de nodulaciones y el desarrollo posterior de una cirrosis (Orfanidis, 2018).

2.8.3.2. Anomalías Vasculares Congénitas

Estos incluyen aneurismas congénitos de la vena porta, malformaciones arteriovenosas hepáticas, derivaciones portosistémicas congénitas, entre la vena porta y otras venas sistémicas e hipoplasia primaria de la vena porta (Schwartz, Mitchell, Keating & Chan, 2006).

Los shunts portosistémicos congénitos extrahepáticos se distinguen fácilmente de las derivaciones que se adquieren durante la hipertensión portal, ya que las

derivaciones adquiridas son, típicamente, múltiples, con paredes finas, conexiones venosas colaterales tortuosas, entre la vena porta y la vena cava caudal, vena renal o vena ácigos (Schwartz *et al.*, 2006).

Aunque no se desarrollan múltiples shunts adquiridos en presencia de derivaciones portosistémicas congénitas (PSS), pueden surgir con otras anomalías congénitas, como malformaciones arteriovenosas o hipoplasia o displasia de las venas portales, como consecuencia de la hipertensión portal secundaria a lesión hepática y trastornos circulatorios (Crawford & Burd, 2016).

2.8.3.3. Adaptaciones Hepatocelulares y Acumulaciones Intracelulares

El hígado debe ser altamente adaptable para equilibrar la función con la demanda cambiante. Los aumentos en el tamaño de los hepatocitos (hipertrofia) colectivamente ponen en servicio una masa más grande de hepatocitos (Crawford & Burd, 2016).

Dichas adaptaciones en el volumen y la función hepática resultan de alteraciones en la expresión de muchos genes (Crawford & Burd, 2016).

Estas respuestas son más evidentes en especies más pequeñas, especialmente en roedores de laboratorio que tienen una respuesta de crecimiento hepático muy pronunciada después de la exposición a diversos xenobióticos (Crawford & Burd, 2016).

El hígado también puede adaptarse a la demanda reducida del suministro de oxígeno mediante una combinación de atrofia celular y apoptosis (Crawford & Burd, 2016).

Los hepatocitos pueden perderse por apoptosis en cantidades sustanciales, con una elevación mínima en las enzimas séricas del origen hepático, como la alanina aminotransferasa (Schwartz *et al.*, 2006).

2.8.3.4. Desplazamiento, Torsión y Rotura.

La posición del hígado debe ser observada tan pronto como se abra el abdomen en el examen postmortem. El desplazamiento caudal que resulta en la extensión de los márgenes del hígado más allá del arco costal puede ser el resultado de un agrandamiento hepático o del desplazamiento del diafragma secundario a un derrame pleural u otras lesiones que ocupan espacio en el tórax (Schwartz *et al.*, 2006).

Los desplazamientos congénitos o adquiridos asociados con hernias ventrales y diafragmáticas son comunes (Schwartz *et al.*, 2006). Los lóbulos individuales o todo el órgano se pueden desplazar hacia el interior de la zona subcutánea, la cavidad pleural o el saco pericárdico, a menudo junto con otras vísceras. El suministro de sangre lobar no siempre puede verse comprometido; sin embargo, los lóbulos desplazados individuales pueden estar gravemente congestionados y pueden romperse, o con el tiempo, y endurecerse (Schwartz *et al.*, 2006).

Se han notificado torsiones hepáticas parciales o completas en animales donde los lóbulos del torso pueden presentar varios grados de isquemia, que culminan en un infarto causado por oclusión venosa o trombosis venosa y / o arterial, y los animales afectados pueden morir a causa de un shock, hemorragia o desarrollo de peritonitis séptica (Schwartz *et al.*, 2006).

La rotura del hígado ocurre comúnmente como resultado de un trauma por la fragilidad en relación con su masa. La ruptura hepática fatal puede ser producida

por la presión por colisiones por atropellamientos sin mucha evidencia de trauma en otras partes del cuerpo. Los desgarros grandes pueden ser evidentes en la cápsula hepática y el parénquima hepático después del trauma; sin embargo, los patrones lineales de anastomosis de finas fisuras capsulares superficiales pueden ocultarse en parte por la sangre coagulada (Schwartz et al., 2006).

2.8.3.5. Fibrosis

La fibrosis hepática es una forma potencialmente reversible de cicatrización de heridas en la que hay una acumulación de varios componentes de la Matriz Extracelular (MEC) (Hernandez-Gea, & Friedman, 2016).

En los casos de lesión aguda o autolimitada, la fibrosis puede resolverse por completo y la arquitectura normal del hígado puede restaurarse, pero cuando el daño es demasiado costoso para repararlo, puede quedar una cicatriz permanente, y si la lesión es persistente, hay una deposición progresiva en la matriz extracelular, que conduce a la "vía común final" terminando en fibrosis y cirrosis (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

2.8.3.6. Hipertrofia Hepatocelular por Barbitúricos

Hipertrofia es el término utilizado para el aumento del tamaño del hígado causado por un aumento en el volumen de hepatocitos que puede resultar de la expansión de uno o más componentes organelares de los hepatocitos (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

La exposición a diversos xenobióticos puede inducir la expresión de muchos genes, lo que lleva a la expansión del retículo endoplásmico liso (SER), lo que produce una hipertrofia de los hepatocitos (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

Los agentes que provocan esta respuesta actúan a través de receptores nucleares como el receptor de arilhidrocarburo activado, el receptor constitutivo de androsterona o el receptor de pregnano X (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

El pentobarbital, por ejemplo, es un potente inductor de los diversos sistemas enzimáticos, incluidos varios citocromos P450 (CYPs). La hipertrofia puede ocurrir en regiones lobulares definidas, típicamente la región centrolobulillar, o puede afectar a todo el lóbulo en casos más avanzados, dependiendo de la actividad y el nivel de dosis del xenobiótico (Crawford & Burd, 2016).

Incluso cuando está restringida a la región centrolobulillar, la hipertrofia suele agrandar todo el hígado (Hernández, 2016). Aunque la hipertrofia hepatocelular se asocia con mayor frecuencia con un aumento preferencial en la SER, la proliferación de peroxisomas y las mitocondrias también pueden causar hipertrofia hepatocelular (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

El aspecto microscópico de la hipertrofia en la tinción habitual de hematoxilina y eosina a veces sugiere la participación selectiva de un orgánulo. Si se aumenta el volumen total de SER, a menudo se observa que el citoplasma tiene una apariencia eosinofílica de vidrio esmerilado al microscopio óptico (Hernández, 2016). Si aumenta el volumen peroxisoma total, a menudo se observa que el citoplasma tiene una apariencia granular eosinofílica en el microscopio óptico (Hernandez-Gea & Friedman, 2016).

2.9: Bazo

2.9.1: Organización Histológica

El bazo es un órgano de tipo linfoide que se localiza en la parte alta de la cavidad abdominal con proximidad al diafragma, su forma es ovoide, alargado y triangular que posee secciones transversales, siendo el órgano linfoide más voluminoso y grande del organismo, al igual que el hígado es de coloración rojiza intensa debida a su relación funcional sanguínea, es decir de almacén y de depuración de las células sanguíneas, el bazo interviniente en la hemólisis de los eritrocitos y de plaquetas en la sangre, almacena trombocitos, monocitos y otros tipos de células sanguíneas, además de producir linfocitos y eritrocitos por hematopoyesis, aunque esta función sólo se da en la vida fetal (Sherwood & Parsons, 2016).

En su exterior el bazo está conformado por una capa denominada cápsula, que está formada por tejido conectivo fibroso denso, además de fibras elásticas y de músculo liso, la parte más externa es recubierta por mesotelio y de la cápsula parten tabiques que van hacia el interior del bazo formando compartimentos, que en conjunto se los denomina parénquima del bazo, mientras que el resto es conformado por el estroma, estructura conformada por tejido conectivo, fibroblastos y fibras musculares, los compartimentos se los distingue por una parte externa denominada “Pulpa Roja” y por una parte central denominada “Pulpa Blanca” (Sherwood & Parsons, 2016).

En el caso de la pulpa blanca está se encuentra formada por tejido linfático, que cuenta principalmente con células blancas como los linfocitos y macrófagos, que se disponen circundado de ramas de las arterias esplénicas denominadas arterias centrales que se distribuyen por la parte interior del bazo (Sherwood & Parsons, 2016).

Estas se pueden distinguir en 3 compartimentos de la pulpa blanca: la denominada “Vainas Linfoides Periarteriales”(PALS), la zona marginal y los folículos, cuya principal misión es la producción y la diferenciación de los linfocitos, además de cumplir la función de reservorio de los mismos los contienen 1/4 del total de los linfocitos del organismo, en cuanto a la pulpa roja esta es la encargada de la filtración sanguínea, siendo una red densa de senos venosos que están llenas de sangre, de ahí proviene su coloración rojiza, además de los cordones esplénicos o de Billroth (Sherwood & Parsons, 2016).

Los cordones esplénicos están conformados por fibras reticulares, macrófagos y células, en cuanto a las células reticulares son un tipo de miofibroblastos que parecen ayudar a que el bazo se contraiga, en los cordones se localizan los eritrocitos, monocitos y granulocitos , dentro de la pulpa roja los macrófagos se encargan de la destrucción de plaquetas y eritrocitos que se encuentren en mal estado, así como de material extraño, estas células suelen presentar depósitos de pigmentos en el citoplasma, además de encargarse del almacenamiento de plaquetas, hierro y eritrocitos (Sherwood & Parsons, 2016).

2.9.2: Patologías en Bazo

Esplenomegalia

Es definida como el incremento del tamaño esplénico, además de un aumento del peso, siendo el órgano linfático más grande del organismo, además de su participación en la respuesta inmune primaria contra microorganismos y proteínas extrañas, además de su función como filtro sanguíneo para retirar a los eritrocitos envejecidos y a células sanguíneas unidas a anticuerpos (Jubb, Kennedy & Palmer, 2016).

Existen 7 mecanismos básicos que resultan en esplenomegalia:

Hiperplasia de las células del sistema retículo endotelial (SRE) o líneas linfoides.

Es uno de los principales mecanismos de esplenomegalia. Esto ocurre en varias infecciones sistémicas, en enfermedades autoinmunes y en tirotoxicosis. Causas infecciosas comunes de esplenomegalia incluyen endocarditis infecciosa, tuberculosis, mononucleosis infecciosa, tuberculosis (Jubb *et al.*, 2016).

Esplenomegalia congestiva.

En la mayoría de los casos resulta de enfermedad hepática, en especial por cirrosis con hipertensión portal (síndrome de Bantý). Hay que recordar que el hígado entre sus múltiples funciones también es un reservorio de sangre, y cuando la fibrosis hepática progresa, se pierde esa función, por lo que la sangre se desvía (fuga) hacia el bazo y otros sitios, aumentando la presión en el territorio esplácnico. Sin embargo, la trombosis de la vena porta o esplénica y el *cor pulmonale* pueden tener el mismo efecto. La hiperplasia reactiva de las células del SRE de la pulpa roja ocurre con frecuencia en esplenomegalia congestiva, que aumenta aún más el tamaño del bazo. La esplenomegalia secundaria a este mecanismo es por lo general asintomática (Jubb, *et al.*, 2016).

Anormalidades en la morfología de los eritrocitos.

En especial esferocitosis hereditaria, talasemias y enfermedad de células falciformes, anemia hemolítica autoinmune y policitemia vera pueden causar atrapamiento de eritrocitos en los sinusoides de la pulpa roja, lo que produce esplenomegalia y anemia (Jubb *et al.*, 2016).

Hematopoyesis extramedular.

Ocurre hematopoyesis esplénica en estados de insuficiencia de médula ósea como en el caso de la mielofibrosis con metaplasia mieloide, mieloptisis y osteopetrosis. En estos casos se encuentra anemia y en alguna otra reacción leucoeritroblástica (Jubb *et al.*, 2016).

Esplenomegalia maligna.

Los linfomas (linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin) representan las enfermedades malignas primarias más frecuentes del bazo, aunque también es un foco de asentamientos de otras enfermedades malignas como la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células peludas (tricoleucemia) y algunas leucemias agudas. La esplenomegalia que se acompaña de adenomegalia generalizada es sugerente de Linfoma o LLC. Es muy raro que las neoplasias no hematológicas se asienten en el bazo (metástasis). Entre los carcinomas que lo pueden hacer están el de mama, pulmón, colorrectal, ovario y melanoma (Jubb *et al.*, 2016).

Esplenomegalia por depósito.

La infiltración del bazo por material anormal ocurre en varias enfermedades, como la amiloidosis y varias "enfermedades por depósito". La esplenomegalia en estas condiciones con frecuencia se complica por hiperplasia reactiva de los macrófagos de la pulpa roja (Jubb *et al.*, 2016).

Lesiones no neoplásicas.

Hemangiomas, quistes y hematomas son las entidades más comunes en esta categoría. Otras causas incluyen granulomas infecciosos por micobacterias y hongos, granulomas no infecciosos (sarcoidosis) e infartos. Los infartos esplénicos con frecuencia ocurren en anemia de células falciformes como resultado del bloqueo de los sinusoides esplénicas por los eritrocitos deformes. También ocurre por embolismo cardíaco en el caso de endocarditis infecciosa o trombos murales. Otras causas de infartos esplénicos son la esplenomegalia masiva de cualquier etiología, principalmente secundaria a hematopoyesis esplénica, leucemia mieloide crónica y mielofibrosis primaria (Jubb *et al.*, 2016).

2.10: Páncreas

2.10.1. Organización Histológica

Es una glándula de características mixtas es decir es exocrino conformada por los acinos pancreáticos y endocrina conformada por los islotes de Langerhans (Gittes, 2016).

2.10.2: Acinos Pancreáticos

Desde su parte apical hasta el interior del acino, posee una coloración más clara gracias a la acumulación de los productos de su secreción, los denominados gránulos de zimógeno que posee precursores enzimáticos (Pan & Wright, 2017).

La parte basal es mucho más oscura o teñida gracias a la abundancia de retículo endoplásmico rugoso responsable de la síntesis de precursores enzimáticos (Gittes, 2016).

2.10.3: Células Centroacinares

Ubicadas en algunos acinos y de apariencia mucho más pálida, cuya función es la de formar a los túbulos intracinares que dirigen el producto liberado por los acinos (Gittes, 2016).

2.10.4: Túbulos Intra acinares y Conductos Intercalares

Los túbulos convergen hacia los conductos intercalares desembocando en los interlobulillares que a su vez se dirigen a los conductos pancreáticos desembocando finalmente en el tubo digestivo porción duodenal junto con el colédoco (Pan & Wright, 2017).

2.10.5. Islotes de Langerhans

Distribuidos entre los acinos y siendo agrupaciones celulares poseyendo una red densa de capilares especializados en liberar a productos sintetizados (Pan & Wright, 2017).

Difíciles de distinguir en microscopio, pero existen varios tipos de células encargadas de la secreción hormonal, Células α : Glucagón, Células β : Insulina, células δ : Somatostatina, células F, polipéptido pancreático. (Gittes, 2016).

2.10.3. Patologías del Páncreas.

En el páncreas se pueden dar problemas nutricionales y del tipo infeccioso, los nutricionales se desencadenan cuando los animales ingieren excesivamente carbohidratos y grasas, haciendo que el páncreas se sobreesfuerce e inclusive un cambio brusco de alimentación puede llegar a generar una pancreatitis. En cuanto a enfermedades pancreáticas provocadas por agentes infecciosos como a los hemoparásitos se destaca al *Haemogregarina* spp. que ha sido descrito en *Podonemes expansa* causando inflamación pancreática provocando daños y lesiones a nivel de los capilares, obstruyéndolos desencadenando necrosis tisular e infiltrados (Batalla *et al.*, 2015).

2.11. Vesícula Biliar

2.11.1: Histología

Histológicamente la vesícula biliar posee tres capas que son: la mucosa recubierta por epitelio cilíndrico descansa sobre eminencias que le dan la apariencia de tabiques. Existen glándulas de tipo mucoso llamadas glándulas de Lushka, que abundan en el cuello. Esta mucosa cumple funciones de absorción, elaboración y secreción de sustancias que luego son eliminadas hacia la luz intestinal (Zachary & McGravin, 2012). Una capa fibromuscular en la que se encuentran los elementos nerviosos, una serosa que fija la vesícula a la fosilla cística, extendiéndose desde el cuello hasta el fondo, la arteria cística, rama de la arteria hepática derecha es la encargada de irrigar la vesícula, ésta se divide

en una rama superficial que recorre la cara peritoneal de la vesícula y otra rama profunda que se encuentra entre la vesícula y la cara inferior del hígado. Hay que recordar que es una arteria terminal, por lo tanto, cualquier proceso inflamatorio que interrumpa el flujo hepático puede producir isquemia y necrosis de la vesícula (Zachary & McGravin, 2012).

Ocasionalmente, puede haber variaciones en la anatomía de la arteria cística, presentándose como una doble arteria cística, u originarse de otras arterias como la arteria hepática izquierda, la arteria gastroduodenal, la arteria hepática común o del tronco celíaco. Las venas tanto superficiales como profundas drenan hacia la vena porta, mientras que los linfáticos desembocan en el ganglio cístico y en los ganglios del surco transversal (Zachary & McGravin, 2012).

2.11.2: Principales Patologías de la Vesícula Biliar

En cuanto a enfermedades vesicales en tortugas se destaca a la colecistitis obstructiva, la litiasis por la formación de sarro biliar, patologías presentes en animales adultos o geriátricos, cuando es una enfermedad vesical del tipo obstructiva por la formación de cálculos biliares, estos suelen generar un daño o un defecto en el vaciado de la vesícula y por ello esta se hipertrofia (Salmerón, et. Al, 2008).

El análisis histopatológico del presente trabajo de titulación se desarrolló en el laboratorio de histología de la Universidad de Las Américas (UDLA) en las Sedes Granados y Queri, Quito – Ecuador, en las áreas de histología y Ambiental respectivamente.

3.2. Población y muestra:

Las muestras fueron tomadas y recolectadas durante el mes de abril de 2017 en el Parque Nacional Yasuní, en 3 localidades diferentes, denominadas “Sani Isla”, “Nueva Providencia” y “Indillama”, dentro de cada comunidad se analizaron 10 individuos dando un total de 30 tortugas, los animales fueron escogidos al azar basándose en los criterios de inclusión y de exclusión expuestos a continuación:

3.3. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de la población y del análisis histopatológico.

Tabla 1 *Criterios de Inclusión y de Exclusión*

| Criterios de Inclusión | Criterios de Exclusión |
|--|---|
| Individuos Pertenecientes a las Poblaciones de Sant Isla, Nueva Providencia, Indillama | Otras Poblaciones Aledañas |
| Edad no mayor a los 3 meses | Edad Mayor a los 3 Meses |
| Que la placa histológica se encuentre en buenas condiciones | Placas dañadas, con artefactos, rotas o alteradas |
| 10 individuos por Población | Un número menor o mayor de animales eutanasiados. |

3.4. Materiales:

Tabla 2 *Materiales*

| Materiales de Laboratorio | Materiales de Oficina |
|---------------------------------|--------------------------|
| Placas Histológicas (92) | Esferográfico |
| Casete de Inclusión Histológica | Mandil |
| Microscopio OLYPUS CX31 | Tiras de Papel Periódico |
| Aceite de Inmersión | Cuaderno de Apuntes |
| Tiras de Papel Limpiador | |
| Programa Infinitive Analyze | |

3.5. Metodología de la Investigación:

3.5.1. Antecedentes y Levantamiento de la Información

El presente trabajo de titulación es una continuación del trabajo de titulación de la estudiante Gabriela Aguirre Marfetán, quién realizó el estudio anatomopatológico de las glándulas anexas al sistema digestivo en neonatos de tortugas charapas (*Podonecmes unifilis*) pertenecientes al Parque Nacional Yasuní, en colaboración con WCS- Ecuador, dicho trabajo se encuentra en el repositorio de la UDLA Quito-Ecuador. Las necropsias para la toma de muestras fueron iniciadas en el mes de octubre del 2017 y las muestras fueron procesadas realizando los respectivos cortes y montaje de las placas.

3.5.2. Proceso de Contención Física

Este proceso se lo realiza con el objetivo de sacrificar al animal (Underwood & Cartner, 2013).

3.5.3. Técnica de Eutanasia

Se utilizó fenobarbital sódico a una dosis de 60 a 100 mg/kg de peso (Aguirre-Marfetán, 2018).

El fármaco fue administrado intracelómicamente y posteriormente se realizó un corte en la médula espinal, según lo indica el protocolo de eutanasia de reptiles de la *American Veterinary Medical Association* (Aguirre- Marfetán, 2018).

3.5.4. Almacenamiento y Conservación de los Animales.

Tras el proceso de eutanasia, procedieron a la inyección de formol al 4% en cada uno de los individuos para su conservación, cada animal fue almacenado en frascos conteniendo formol tamponado al 10%, dichos recipientes fueron etiquetados, con códigos con los cuales identificaron a cada individuo de la siguiente manera: SI para la comunidad Sani Isla, NP para la comunidad Nueva Providencia, I para la comunidad Indillama (Aguirre-Marfetán, 2018).

Los individuos fueron transportados al Laboratorio de Histopatología de la UDLA Quito-Ecuador, en la sede Granados, donde les realizaron la necropsia y se recolectaron las 4 glándulas anexas al sistema digestivo.

3.5.5: Procesamiento de las Placas de Histología

Las muestras fueron procesadas realizando cortes finos y precisos en cada uno de los órganos, enviados a los Laboratorios de Histopatología (LABCYQ) de la UDLA Quito-Ecuador en la Sede Granados, donde fueron usados para la

elaboración de las placas histológicas según lo descrito previamente por Basantes-Taimal, 2019. La tinción fue realizada con hematoxilina y eosina (HE) según el protocolo descrito por Montalvo, 2010 y Basantes-Taimal, 2019, como se detalla a continuación:

Desparafinación de los cortes en xilol por un tiempo de 3 min.

Hidratación de los cortes en baños decrecientes en alcohol.

Tinción con hematoxilina seguido de un lavado con agua destilada y aplicación de eosina.

Deshidratación en baños crecientes de Etanol

Diafanización con Xilol y finalmente montaje de las placas.

3.5.6. Lectura de las Placas Histológicas

La lectura de las muestras histológicas fue realizada en el laboratorio de histología de la UDLA Quito-Ecuador, Sede Granados, donde se realizó una descripción histológica e histopatológica del tejido para determinar si poseía algún tipo de alteración. Los patrones de alteración se basaron en variables como el patrón de distribución, área o localización de la afectación, grado de severidad, y tamaño de la lesión, las lesiones fueron clasificadas de acuerdo con el tipo de alteración como, degenerativo, circulatorio, proliferativo o inflamatorio.

3.5.5. Observación microscópica

El análisis histopatológico se basó en el siguiente protocolo establecido.

1. Se retiró la funda de protección y posteriormente se encendió el microscopio.

2. La placa histológica se la ubicó sobre la platina y se la sujetó por las pinzas guía (Fig. 5).
3. Se colocó el lente objetivo 4x logrando obtener la panorámica de la placa, para ubicar el área problema y lograr un enfoque correcto, posteriormente se adecuo y se enfocó con el condensador usando lentamente el macrométrico (Fig. 5).
4. Se visualizó toda la muestra, con una primera observación, este proceso se realizó con los demás aumentos siempre de menor a mayor aumento (Fig. 5).
5. Se fijó el sitio de interés y se cambió al objetivo 10x, 40x y 100 x respectivamente (Fig. 5).
6. Se observó y describió el campo visual (zona, tipo de lesión, tamaño de la lesión), estos pasos se realizan con todos los demás aumentos (Fig. 6).
7. Se realizo las respectivas tomas fotográficas en las zonas e interés con el software Infinitive Analyze tomando en consideración los respectivos tamaños del objetivo (Fig. 6).
8. Se limpio las lentes del microscopio dejando en posición del ocular en 4x, desenchufado y guardado el equipo y las placas.

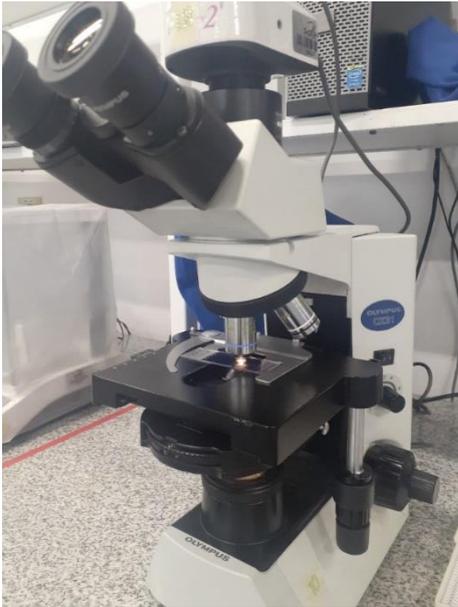


Figura 5. Observación Microscópica en el Microscopio Olympus CX31 en el Laboratorio de Ambiental UDLA Quito-Ecuador, Sede Queri, Rosero, 2019.

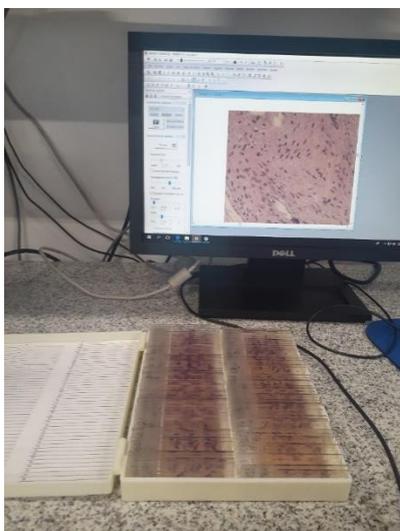


Figura 6. Toma de Fotos con programa Infinite Analyze. Rosero, 2019.

CAPÍTULO IV: DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Descripción del estudio:

Para la realización del diseño experimental del trabajo de titulación se seleccionó a los individuos de manera aleatoria para formar parte del análisis, se realizó una base de datos clasificando estos de manera concisa y ordenada y dada la naturaleza de este se clasificó a este trabajo de titulación del tipo descriptivo, observacional. Transversal y retrospectivo (Chávez, 2016).

Se lo clasificó de esta manera, ya que se describe la frecuencia de presentación de las lesiones en los órganos, se analizó los cambios morfológicos de manera macroscópica mediante la recopilación de datos obtenidos anteriormente, así, como los cambios en la morfología microscópica de tejidos a nivel celular, teniendo este estudio como principal objetivo el determinar las características estructurales y morfológicas de las unidades intervenidas y/o estudiadas en cada uno de los 4 órganos.

Se habla de estudio transversal ya que la investigación fue realizada en un momento en un espacio determinado, se profundizó en el análisis histórico de las muestras para describir si las lesiones macroscópicas coincidan con las microscópicas, aunque no se realizó ningún tipo de seguimiento al resto de la población, ni una continuidad en el eje temporal, pero si se mostraron resultados sobre el estado sanitario de la población.

El estudio es de tipo observacional, porque se observó y se analizó las muestras histológicas de los órganos anexos al sistema digestivo, mostrando cambios morfológicos asociados a posibles patologías, o procesos fisiológicos normales mediante la observación microscópica de los mismos.

4.2. Variables

Tabla 3 *Tabla de Variables*

| Variable | Tipo de Variable | Definición | Indicador | Unidad de Medida | Ítem | Instrumento |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|---|---|---|----------------------|
| Lugar de Procedencia | Cualitativa Dependiente | Población del Animal | Comunidad | Nueva Providencia Indillama Sani Isla | Nombre de la Comunidad | Ubicación Geográfica |
| Órgano | Cualitativa Independiente | Unidad funcional característica | Histología normal vs. Alteraciones patológicas | Normal Alterado Enfermo | # de órganos normales # de órganos alterados | Microscopio |
| Lesión | Cualitativa Independiente | Alteración producida en el órgano | Infeciosa Metabólica Proliferativa Microcirculatoria | Leve Moderado Grave | Tipo de Alteración % | Microscopio |

4.3. Diseño experimental

Se inspeccionó las placas histológicas durante los meses de enero de 2019 hasta agosto de 2019, los cuales fueron analizados junto con la historia clínica de los animales y anteriores trabajos de titulación, así, se realizó un análisis estadístico de cuál fue la patología más recurrente en las placas por órgano y finalmente se emitió un informe de los resultados obtenidos, en el gráfico 1 se demuestra de manera gráfica el proceso realizado.

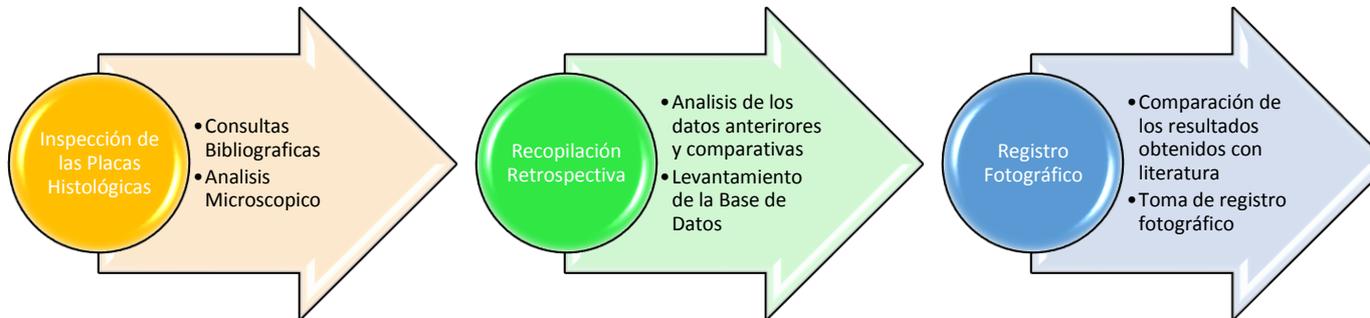


Gráfico 1 Esquema del Diseño Experimental

4.4. Análisis estadístico

Por tratarse de un estudio descriptivo y dado que la población muestral es relativamente pequeña (30 individuos), no se aplicó una prueba estadística como tal y solo se interpretó y tabuló los resultados obtenidos, que fueron respaldados con fuentes bibliográficas, asesoría técnica y de los conocimientos que fueron adquiridos, para obtener resultados concisos y coherentes.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

En el presente trabajo de titulación se realizó una observación microscópica de hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo pertenecientes a 30 individuos de tres comunidades de Tortugas Charapas (*Podonecmis unifilis*) para hacer una evaluación histopatológico de las mismas y encontrar alteraciones o hallazgos que pueden o no estar relacionadas con posibles patologías, se analizó un total de 92 placas, mostrando alteraciones sutiles en hígado (congestión, fibrosis) y páncreas (congestión) (Luz & Stringhini, 2003).

5.1. Evaluación Microscópica de Hígado

El hígado siendo la glándula más voluminosa y grande del organismo, anatómicamente en los mamíferos está bajo el diafragma, en tortugas su ubicación anatómica es diferente, este está ubicado o adherido al borde superior del estómago cercano al cardias, dado que, en la estructura anatómica normal de las tortugas, no poseen diafragma y por ende poseen cavidad celómica (Luz & Stringhini, 2003). Se describe que el hígado de los reptiles, posee una organización estructural menos ordenada en la distribución de los lobulillos hepáticos, en algunas especies como en las tortugas se puede distinguir el lobulillo clásico en forma hexagonal, las áreas portales contienen a las ramas de la vena porta, conductos biliares y de tejido conectivo interlobulillar, características que fueron observadas en las placas de hígado analizadas en el presente estudio, corroborando el buen estado de las estructuras hepáticas (Luz & Stringhini, 2003).

El análisis microscópico de los hígados determinó la presencia de congestión, áreas de fibrosis y lipidosis. Mostrando los siguientes resultados: 16 individuos (36%) presentan zonas de congestión multifocal moderada; 7 individuos (15%) presentaron áreas de fibrosis focalizada de leve a moderada; 8 individuos (18%)

presentaron áreas de lipidosis o esteatosis moderada, y 14 individuos no presentaron hallazgos relevantes o presentaron hallazgos menores (31%). Se realizó un esquema porcentual de los hallazgos en el total de la población (Gráfico 2).



Gráfico 2. Hallazgos histopatológicos en el hígado de toda la población analizada.

5.1.1. Congestión Hepática

Se determinó la presencia de zonas multifocales moderadas de congestión en la zona de los conductos lobulillares y triadas portales, en los individuos SI04, SI06, SI07, SI08, SI09, SI10 de la comunidad Sani Isla correspondientes a 6 individuos de los 10 analizados (20%), en la población Nueva Providencia se destacó el patrón descrito arriba en los individuos NP01, NP02, NP03, NP04, NP06, NP08 y NP09 dando un total de 7 individuos de los 10 analizados (23%) y en la comunidad de Indillama fueron 3 individuos (I07, I09 e I010) de los 10 (10%) individuos con patrón congestivo, afectando mayormente las zonas correspondientes en la triada portal lo que sugiere un hallazgo de tipo micro

circulatorio. 14 individuos (47%) no presentaron hallazgos relevantes o correspondientes a patrón congestivo. La población Nueva Providencia fue la que contó con mayor número de individuos (Gráfico 3).

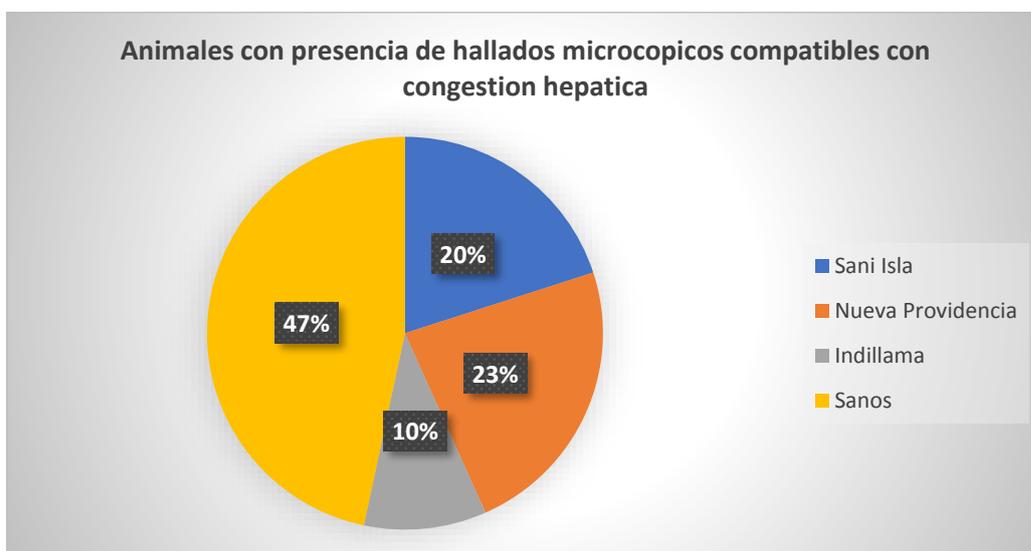


Gráfico 3. Hallazgos microscópicos de congestión hepática en tortugas Charapas analizadas en el presente estudio.

Las principales áreas hepáticas afectadas con congestión en los 16 animales fueron, la triada portal, el lobulillo hepático, zona centro lobulillar y región de los capilares sinusoidales, siendo la zona correspondiente a las Triadas Portales (29%) la más afectada, seguido de una congestión multifocal a difusa en todo el lobulillo (25%), congestión focal leve en la zona centrolobulillar (24%) y congestión multifocal en los capilares sinusoidales (22%) (Gráfico 4).

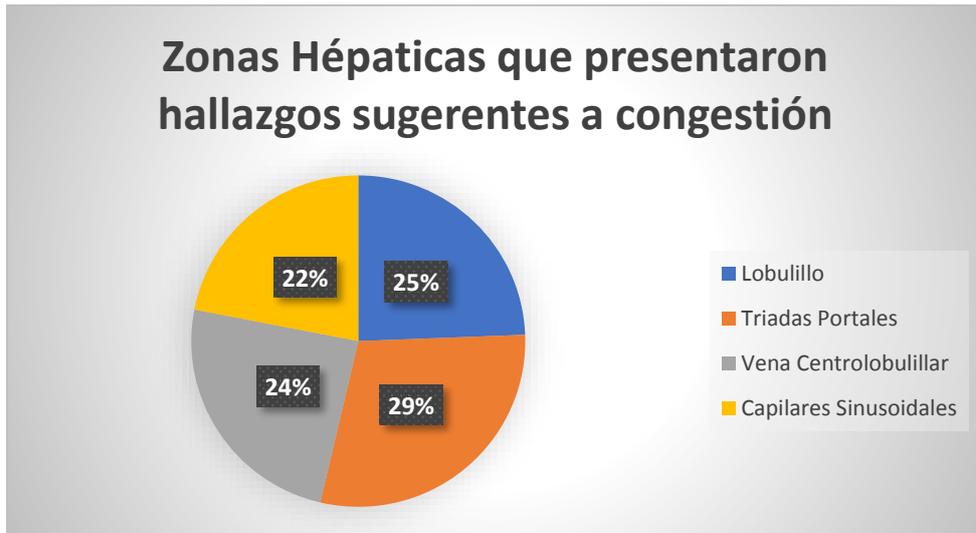


Gráfico 4. Zonas Hepáticas que presentaron hallazgos microscópicos de congestión.

El análisis microscópico de las placas histológicas de hígado determinó la presencia de hematíes nucleados entre las trabéculas hepáticas, sinusoides hepáticas (Fig. 7), así como dentro de la vena centrolobulillar (Fig. 8) y rama de la vena porta (Fig. 9).

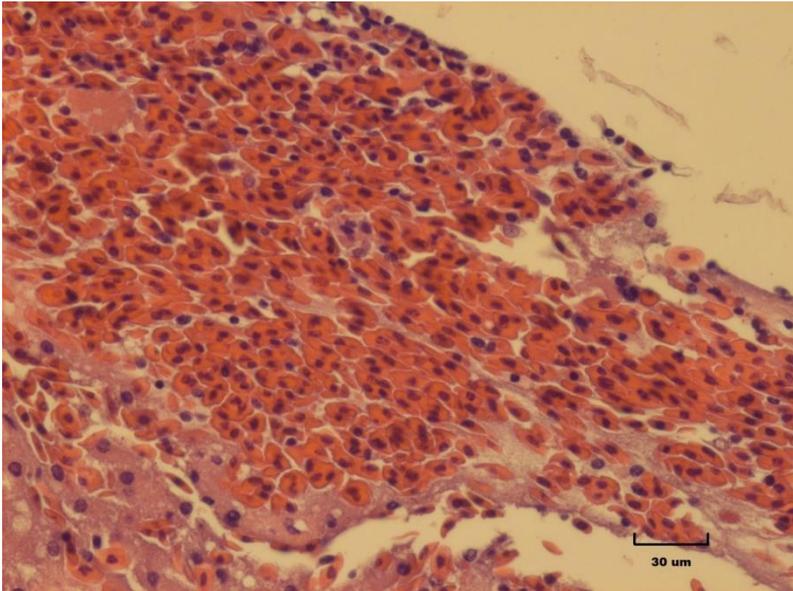


Figura 7. Hígado, Microfotografía que muestra la presencia de hematíes nucleados mostrando congestión hepática en el lobulillo hepático de manera generalizada NP08 40X, HE (Rosero, 2019).

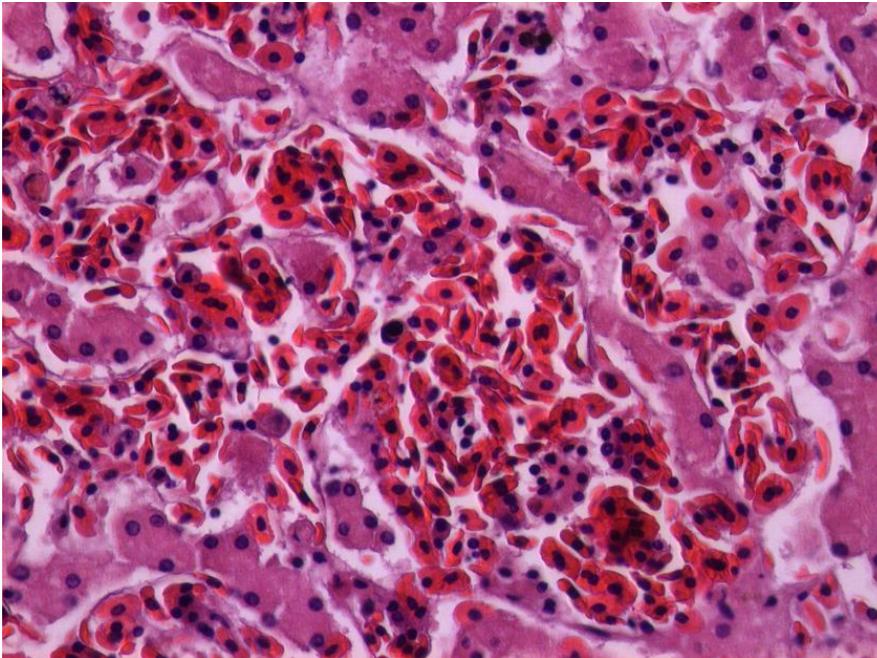


Figura 8. Hígado, Microfotografía que muestra áreas de congestión en zona centrolobulillar NP05 40X, HE (Rosero, 2019).

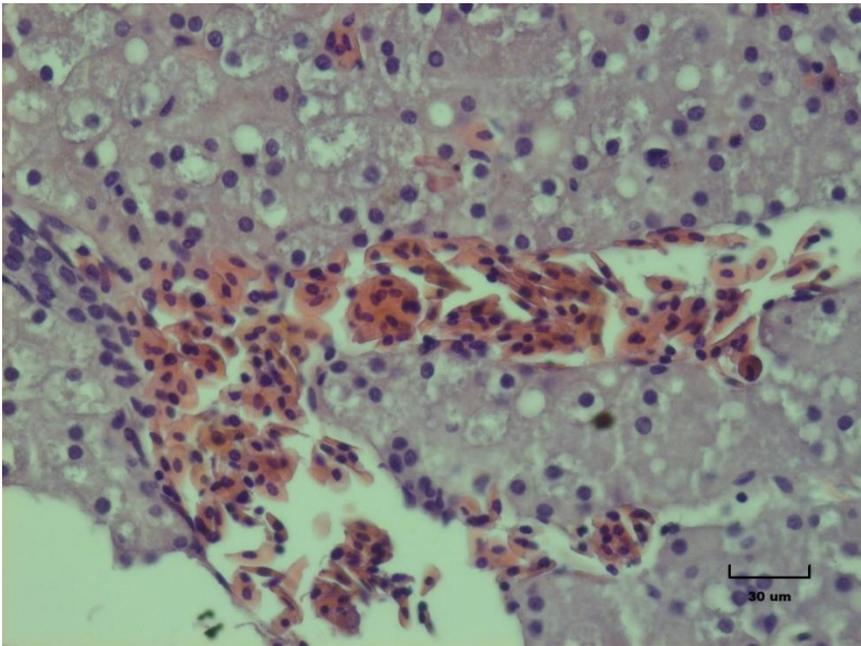


Figura 9. Hígado, Microfotografía que muestra áreas de congestión en la vena porta y micro vesículas sugerentes a lipidosis SI06 40X, HE (Rosero, 2019).

5.1.2. Fibrosis

Se destacó que en los individuos NP06, NP08, I01, I07, SI02, SI06 presentaron un engrosamiento anormal correspondiente a la triada portal con presencia de fibroblastos y de tejido de granulación (Fig. 10 y Fig. 11).

Las áreas de fibrosis focalizadas representan el 20% (6 individuos) del total de la población y 24 animales (80%) no presentaron hallazgos sugerentes a fibrosis, siendo el hallazgo de menor relevancia en el estudio (Gráfico 5).

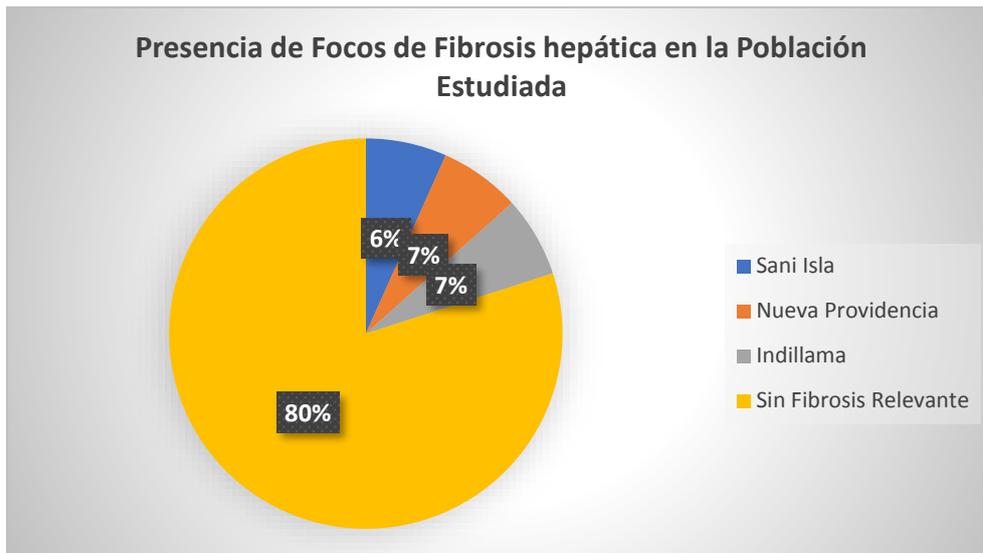


Gráfico 5. Porcentaje Poblacional de Animales que presentaron áreas de fibrosis en el tejido hepático.

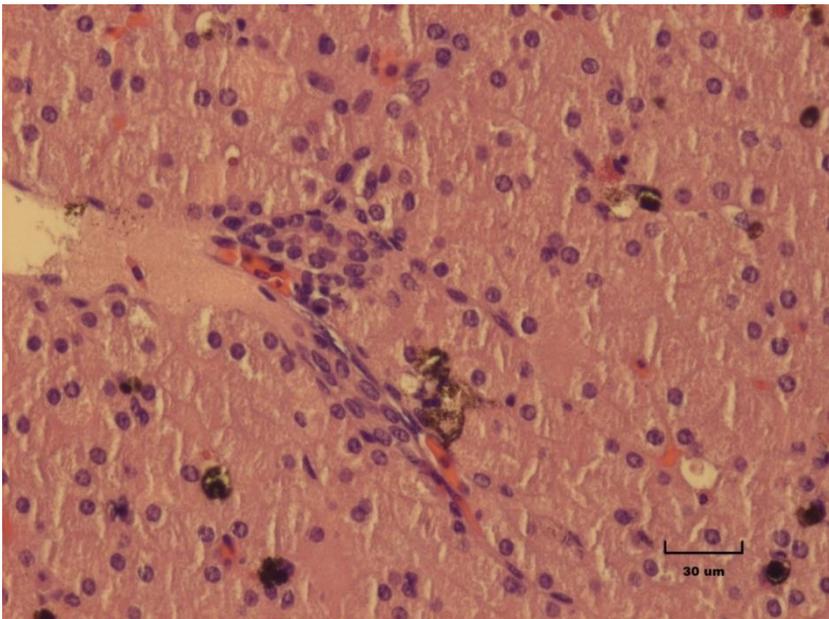


Figura 10. Hígado, Microfotografía, muestra un área focalizada de fibrosis en la vena porta, NP06 40X, HE (Rosero, 2019).

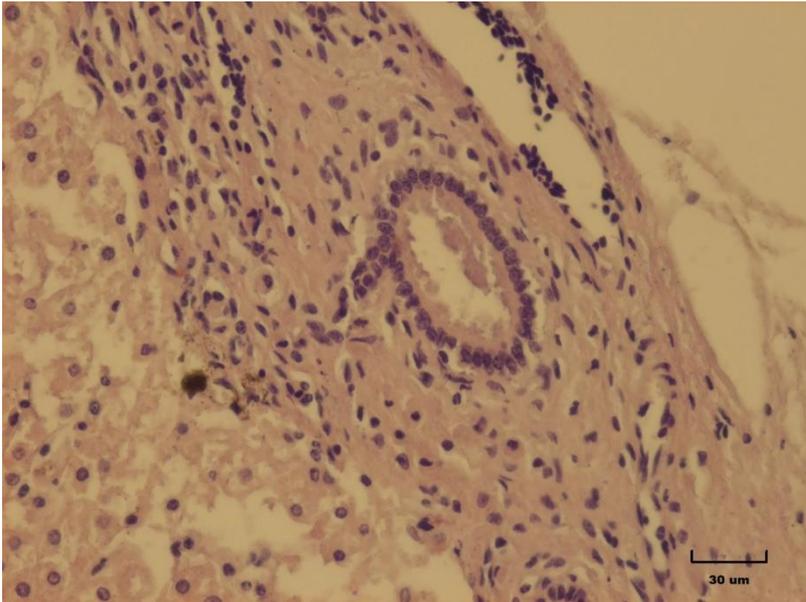


Figura 11. Hígado, Microfotografía, muestra un área focaliza de fibrosis en la cápsula, NP06 40X, HE (Rosero, 2019).

5.1.3. Lipidosis Hepática

La observación microscópica de las placas de hígado demostró que un individuo de la comunidad Nueva Providencia y varios individuos de la comunidad Sani Isla presentaron hallazgos que sugieren un proceso de lipidosis hepática por la presencia de micro vesículas en el parénquima hepático (Fig. 12, 13 y 14), en la comunidad Indillama no se observaron estas alteraciones o fueron irrelevantes en la observación, los animales que presentaron lipidosis hepática fueron 8 individuos (NP02, SI02, SI04, SI05, SI06, SI07, SI08 y SI09) que representan el 27% de la población total (Gráfico. 6).

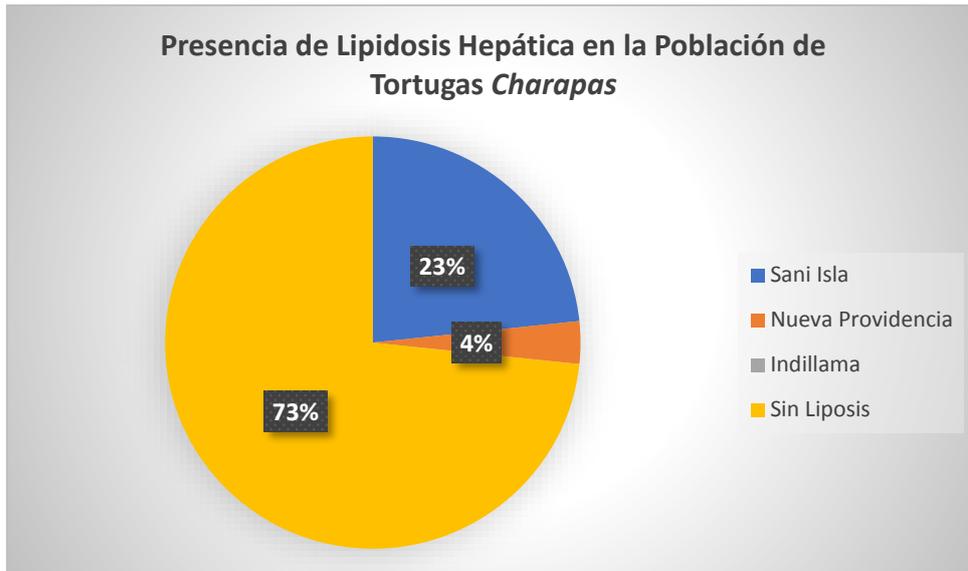


Gráfico 6. Gráfica que representa la presencia de lipidosis en la población total de tortugas Charapas.

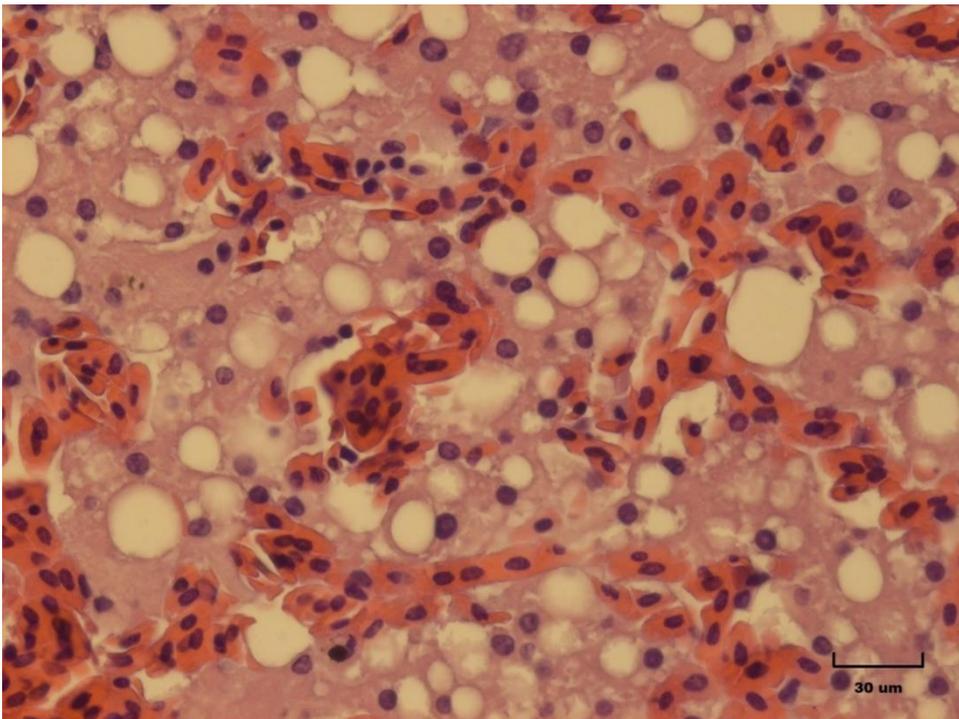


Figura 12. Hígado, Microfotografía, presencia de micro y macro vesículas en el parénquima hepático, con zonas de congestión generalizada en capilares sinusoidales, SI07 40X, HE (Rosero, 2019).

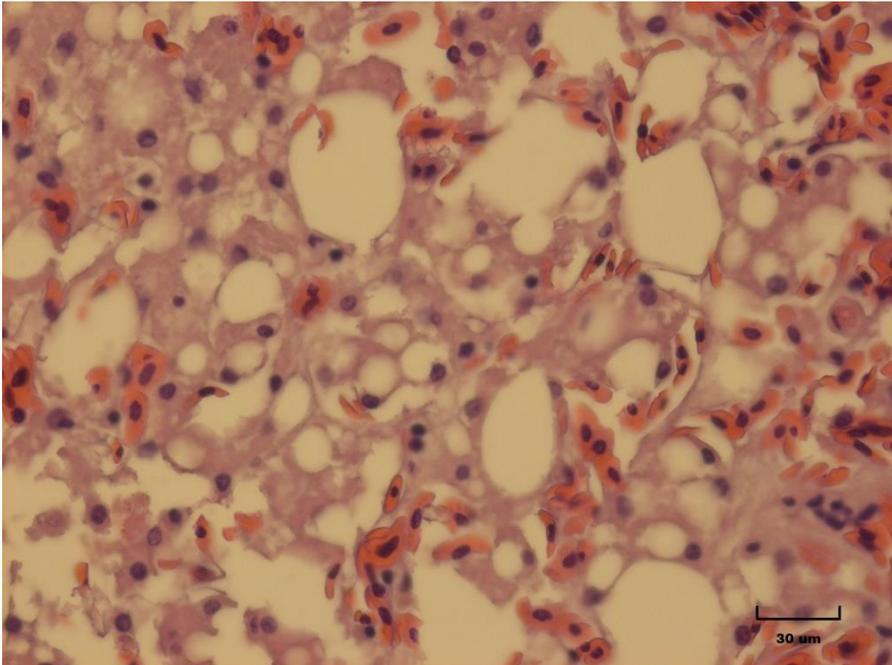


Figura 13. Hígado, Microfotografía, presencia de micro y macro vesículas en el parénquima hepático, además de presencia de congestión multifocal, SI07 40X, HE (Rosero, 2019).

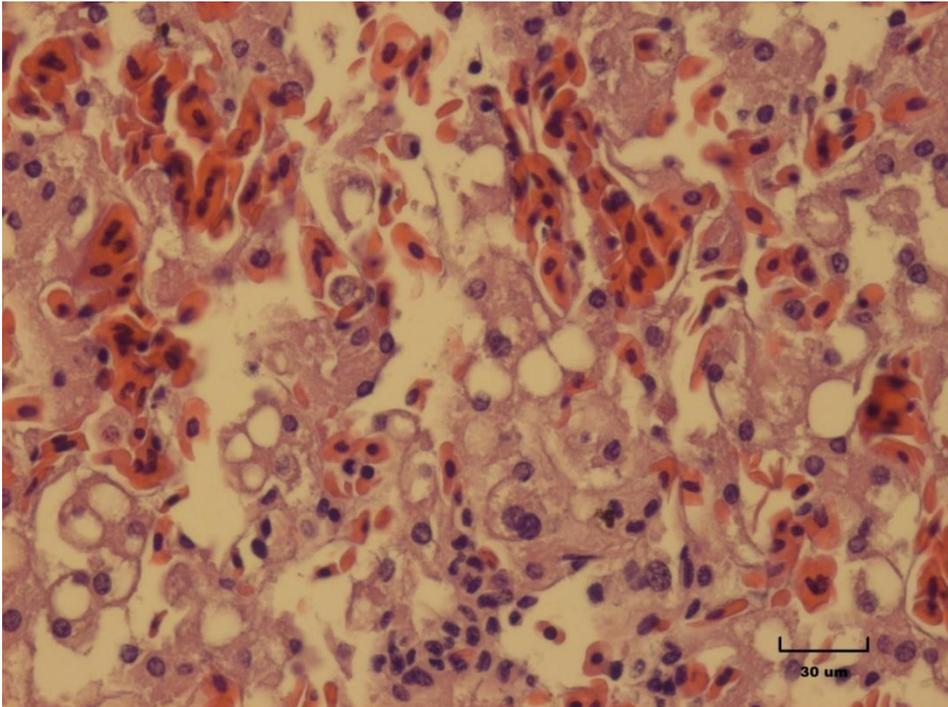


Figura 14. Hígado, Microfotografía, presencia de micro y macro vesículas en el parénquima hepático, además de presencia de congestión multifocal, SI07 40X, HE (Rosero, 2019).

5.2. Evaluación Microscópica de Páncreas

En el análisis histopatológico del páncreas se visualizó zonas de congestión focal leve en el tejido pancreático principalmente en la zona acinar (Fig. 15) en los individuos pertenecientes a la población de Nueva Providencia con un total de 3 individuos (NP04, NP08 y NP10) estos representan solo el 10% de la población, el resto de individuos no presentaron congestión en este órgano, las poblaciones de Sani Isla e Indillama no presentaron congestión pancreática (Gráfico 7).

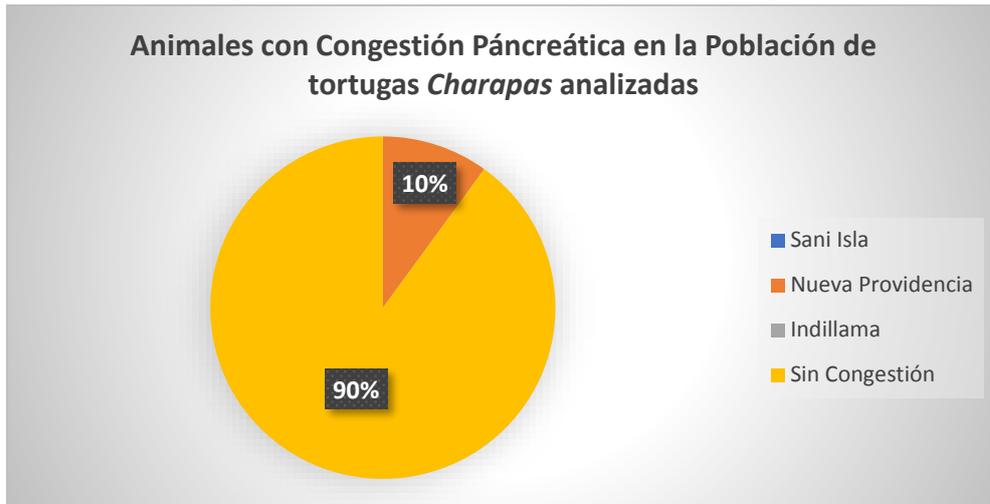


Gráfico 7. Tortugas Charapas que presentaron Congestión Pancreática.

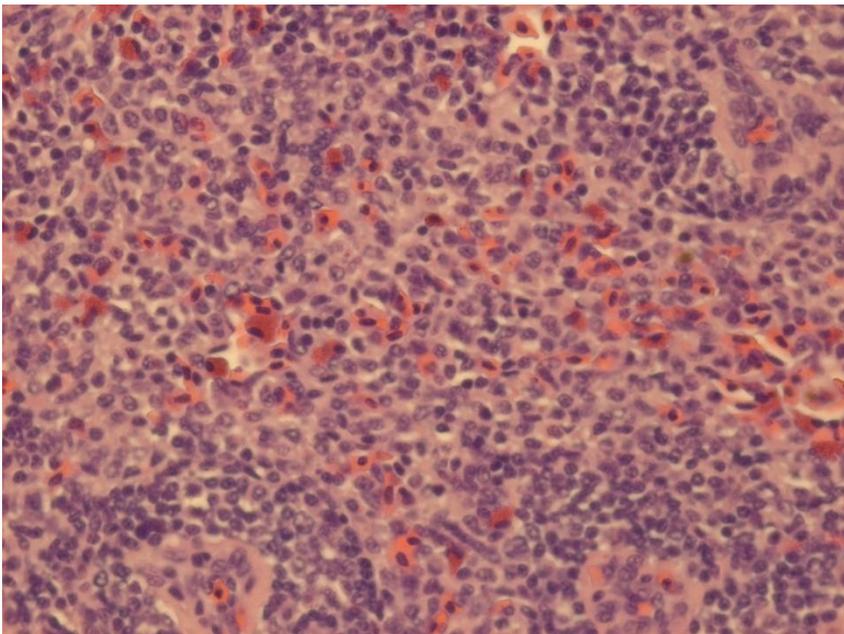


Figura 15. Páncreas, Microfotografía, se observa la presencia de hematíes en la zona acinar o exocrina del páncreas develando una congestión leve focal, NP08 40X, HE (Rosero, 2019).

5.3. Evaluación Microscópica de Bazo

El análisis microscópico del bazo mostró la presencia de un engrosamiento fibrótico de la zona capsular donde 7 de los 30 individuos presentaron dicho hallazgo siendo la comunidad Indillama la que mayor cantidad de individuos presentaron un engrosamiento de leve a moderado del tejido de la cápsula esplénica en 4 (I04, I05, I07 e I10) de los 7 individuos representado el 13.33% de la población global, en la comunidad nueva providencia se observó esta alteración en solo 1 individuo (NP06) (3.33%) de la población total y en Sani Isla solo se encontraron a 2 individuos con esta lesión (SI06 Y SI07) representado el 7% de la población total, en el resto de los individuos (77%) la estructura esplénica se encontró normal (Gráfico 8). Microscópicamente, se observó un engrosamiento de la capsula del órgano y acumulación de hematíes nucleados entre el parénquima del bazo, denotando fácilmente la pulpa roja y la pulpa blanca (Fig. 17).

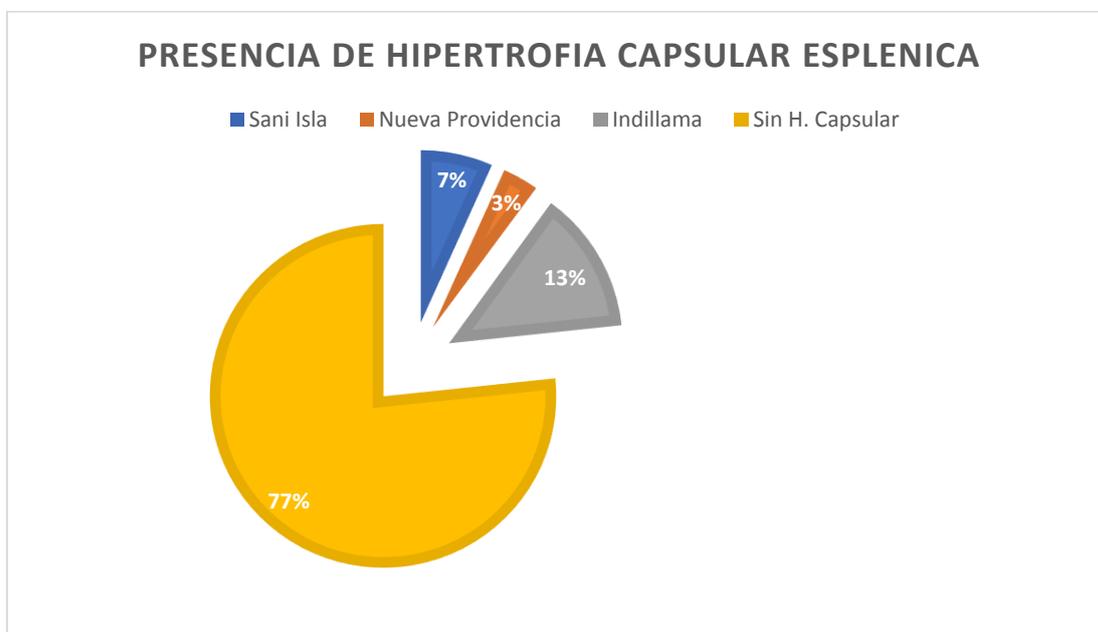


Gráfico 8. Gráfica de la aparición de Hipertrofia capsular del bazo en la población.

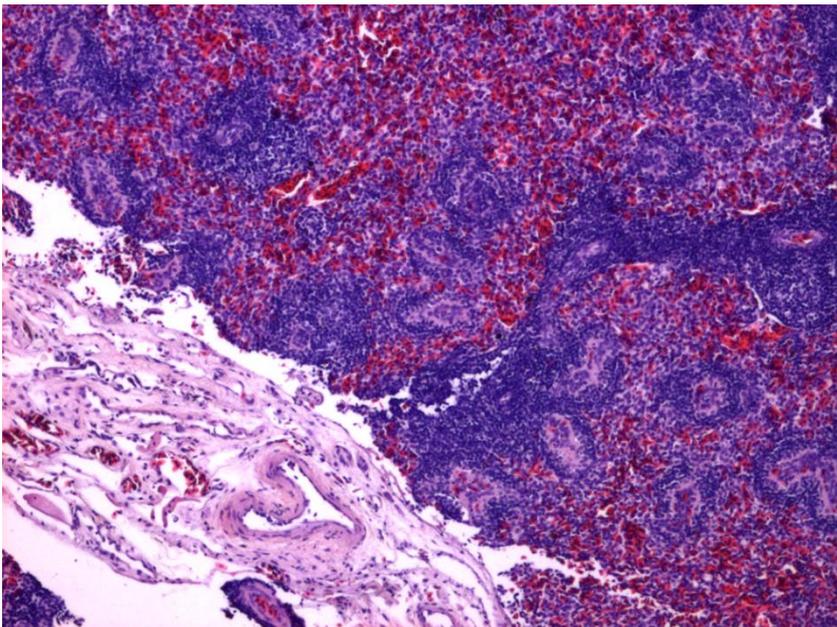


Figura 16. Bazo, Microfotografía, se observa un engrosamiento notorio de la cápsula, además se denota un incremento de la pulpa roja aludiendo a congestión esplénica, I10 40X, HE (Rosero, 2019).

5.4. Evaluación Microscópica de Vesícula Biliar

El análisis microscópico de las placas de vesícula biliar mostró en 3 individuos de la población total la presencia de un líquido rosáceo (edema) en el espacio intersticial de la vesícula biliar (Fig. 17).

Indillama presento a 2 individuos (I05 e I07) representado el 6.67% de los animales analizados con dicha alteración, mientras que en la comunidad Nueva Providencia presentó un solo individuo NP04 con edema en la vesícula biliar representado el 3.33% de los animales analizados, el 90% del resto de ellos animales (27) no presentaron este hallazgo (Gráfico 9).

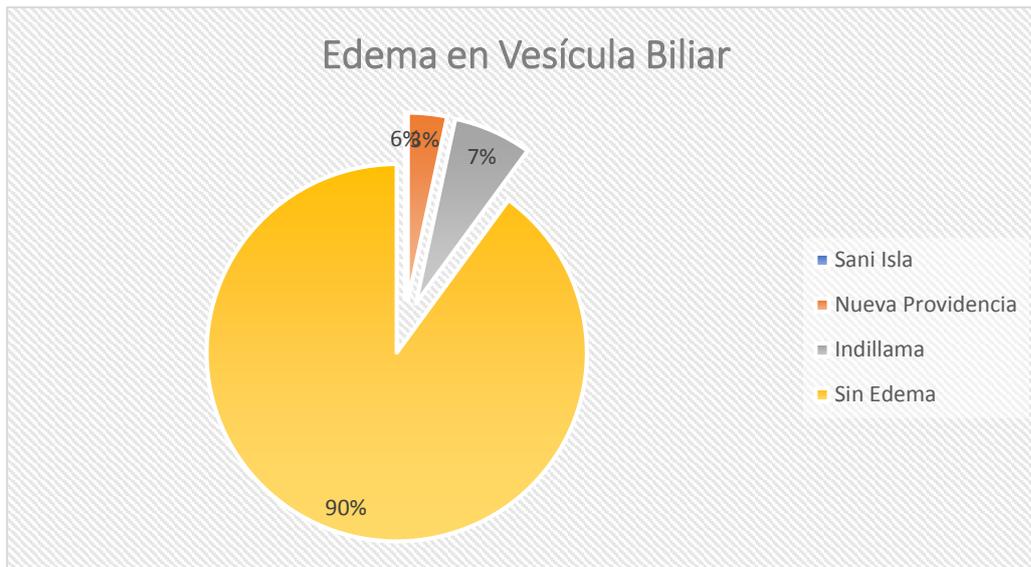


Gráfico 9. Grafica de la presencia de Edema en Vesícula Biliar en la Población de tortugas Charapas analizadas.

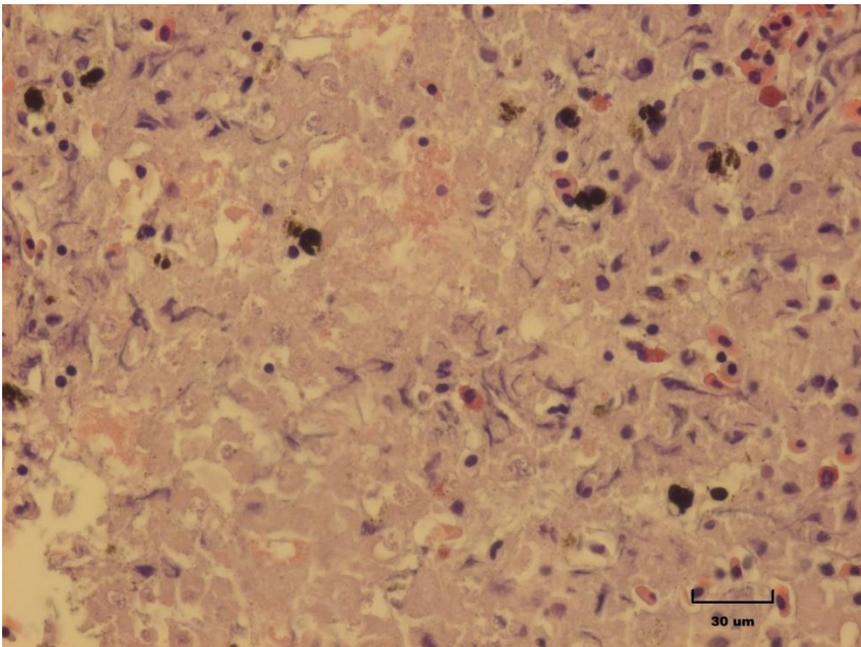


Figura 17. Vesícula Biliar, Microfotografía, se observa la presencia de un líquido rosáceo (edema) focal, leve en la zona intersticial de la vesícula biliar, 105 40X, HE (Rosero, 2019).

El presente estudio ha demostrado que el hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo analizados microscópicamente muestran hallazgos patológicos que están relacionados con procesos fisiológicos derivados de la eutanasia y que no estarían relacionados con procesos infecciosos o inflamatorios que causen una enfermedad a los animales, concluyendo que los órganos analizados de las tortugas charapas se muestran aparentemente sanos.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

La congestión hepática suele deberse a daños en el parénquima lo que causa la rotura de vasos sanguíneos y este puede llegar a acumularse en algunas cavidades, espacios tisulares como en este caso los lobulillos hepáticos y triadas portales (Orfanidis, 2018). No se reconoce a la congestión hepática como un cambio postmortem normal y se puede destacar que los animales afectados con esta alteración presentan cuadros de parasitismo o pueden estar infectados por algún agente infeccioso ya sea virus o bacterias, o presentar este proceso congestivo debido a agentes tóxicos o farmacológicos, acciones físicas y iatrogénicos en el uso de la aguja de eutanasia durante este procedimiento (Orfanidis, 2018). Los hallazgos microscópicos en las placas de hígado de las tortugas charapas analizadas mostraron la presencia de congestión en las trabéculas hepáticas, en los sinusoides, vena centrolobulillar y portal. Estas alteraciones presentes en los animales podrían explicarse como consecuencia del uso de pentobarbital, un anestésico depresor del sistema nervioso central, que a pesar de no presentar registros de que el fármaco provoque alteraciones relacionadas con hemorragias internas, al ser usado como medio de eutanasia, suele provocar paro cardiorrespiratorio por la depresión del sistema nervioso central, que produce congestión pasiva en los órganos. Sin embargo, esta alteración también podría haber sido provocada por la ruptura de un vaso sanguíneo al introducir la aguja vía intracelómica, en la aplicación del anestésico provocando una hemorragia interna (Gallardo, Paredes, & Pérez, 2003; Learly, Underwood & Cartner, 2013).

La fibrosis observada podría estar condicionada al agente etiológico, del cual va a depender en que zona del hígado se va a depositar el tejido y además se destaca la aparición o la activación de células de defensas propias del hígado (Tacke & Trautwein, 2015).

El proceso fibrótico podría estar condicionado por un agente etiológico, del cual va a depender en que zona del hígado se va a depositar el tejido y además se destaca la aparición o la activación de células de defensas propias del hígado donde se presenta este tejido de granulación (Tacke & Trautwein, 2015). Fue mostrado aquí que las zonas que presentaron fibrosis fueron los espacios porta en el conductillo biliar, pero estas áreas no mostraron presencia de otros componentes básicos que acompañan a una infección causada por un agente infeccioso, como la presencia de infiltrado inflamatorio o presencia de daño celular, descartando esta posible causa, sin embargo se debería continuar realizando estudios orientados a la detección de agentes infecciosos, sea con el uso de inmunohistoquímica así como con la aplicación de técnicas moleculares, para asociarlos a la presentación de esta condición, sin embargo en ningún de las muestras de los tejidos no se evidencio la presencia de infiltrados celulares o daños masivos celulares de manera grave.

Se descarta la hipótesis de que los animales analizados hayan sido intoxicados debido a que en esa condición se observaría un cambio en la morfología de los hepatocitos, y para hablar de una hepatotoxicidad por fármacos, hepatitis virales o hepatitis autoinmune, los hepatocitos deberían presentar un proceso de necrosis (Tacke & Trautwein, 2015), características que no fueron observadas en los hígados analizados.

Un proceso inflamatorio crónico suele ser un estímulo para que se instaure una fibrosis, el cual se podría relacionar enfermedades hepáticas virales o a una enfermedad autoinmune, sin embargo, en los hígados analizados no se observaron células inflamatorias como macrófagos que sugieran que se trata de un proceso crónico, en el análisis histológico se descartó la presencia de células inflamatorias circundantes, por lo cual se descartó un posible proceso infeccioso o parasitario. (Lurie, Webb, Cytter-Kuint , Shteingart & Lederkremer, 2017).

Otro de los factores que justificaría la aparición de fibrosis en algunos individuos es que estos también están pasando por un proceso de lipidosis, por el acúmulo de grasa en los hepatocitos que causan muerte celular y su sustitución por tejido de granulación (Lurie *et al.*, 2017), condición que fue observada en el hígado de varios individuos analizados en la presente investigación y que podrían explicar la proliferación de tejido conjuntivo en las zonas hepáticas afectadas. Varios estudios han propuesto que la fibrosis posee un principal mecanismo que es el proceso inflamatorio crónico que va provocando progresivamente la muerte de los hepatocitos y estos son reemplazados por tejido de granulación o de cicatrización secundarias (Tacke & Trautwein, 2015),

En el caso de enfermedades que afecten a los conductos biliares o a un posible proceso obstructivo, que desencadene fibrosis de manera progresiva estos estarían acompañados de lesiones, que estrecharían la luz del conducto biliar, y en el análisis realizado no se observó aumento de tejido o de las células que recubren al conducto biliar, por lo que se descartaría un proceso obstructivo, sin embargo se debería realizar más estudios enfocados en pruebas de estructura como histoquímicas para mostrar la integridad celular y de funcionalidad hepática en los animales vivos (Lurie, *et al.*, 2017).

Entre los hallazgos encontrados principalmente en los individuos de la comunidad Sani Isla, se visualizó la hipertrofia de algunos hepatocitos que contenían pequeñas vacuolas, relacionadas con esteatosis micro vesicular (Lipidosis hepática), caracterizada por la aparición de pequeñas vacuolas de grasa intracitoplasmática o también denominadas liposomas que se depositan y acumulan en la célula. La esteatosis muestra a los lípidos en el interior de los liposomas adheridos a la membrana de las células parenquimatosas dándole la tonalidad icterica (amarilla), causando el agrandamiento de los órganos y dándoles una tonalidad amarillenta (Tacke & Trautwein, 2015), esta condición, de la presencia de esteatosis o hígado graso está relacionada al análisis macroscópico efectuado en el anterior trabajo de titulación, donde los hígados

analizados presentaban esta anomalía (Aguirre, 2018), corroborando esta alteración.

Según Divers & Cooper, se describe a la lipidosis hepática como una condición clínica que ha sido comúnmente diagnosticada en tortugas, ya que es más una condición metabólica más que una verdadera enfermedad, los animales que han sido sometidos a dietas con demasiado contenido grasa han demostrado poseer características relacionadas con el hígado graso (Maccolini, 2010). Otras de las causas relacionadas con lipidosis hepática es la ausencia de ejercicio, por trastornos fisiológicos y por episodios de hipoxia crónica o de estrés, lo que estaría relacionado directamente con el manejo con el cual recibieron los animales al momento de ser eutanasiados o su almacenamiento.

La presencia de esteatosis en los hígados analizados podría deberse a que las tortugas son alimentadas con una dieta rica en carbohidratos y existe un desbalance su alimentación provocando la aparición de hígado graso, que a su vez provoca daño celular, desencadena su muerte y posterior necrosis, donde se producirá un posterior reemplazo por tejido de granulación o tejido fibrótico disminuyendo la funcionalidad y capacidad del hígado para cumplir sus funciones (Lurie *et al.*, 2017). Sin embargo, en la historia clínica de los animales no se encontró datos que indiquen que los animales presentaban signos aparentes de enfermedad hepática, como la presencia de ascitis.

Otro aspecto para recalcar es que los animales eutanasiados no presentaron flacidez, ni debilidad, ni malas condiciones corporales, en la historia clínica no se determinó que los animales hayan regurgitado, ni que hayan pasado por episodios diarreicos.

Por este motivo es que se determina que los animales pasaron por un curso agudo de la patología, es decir que acaba de comenzar y es por ello por lo que los neonatos se encuentran en buenas condiciones corporales.

La vesícula biliar es continua o no con el hígado, en tortugas está inmersa en el lóbulo hepático derecho y revestida por un epitelio simple cilíndrico o pseudoestratificado. Los hallazgos encontrados en la vesícula biliar en la presente investigación, son descritos como normales, ya que uno de los cambios postmortem en la vesícula se caracteriza por la presencia de líquido en el espacio intersticial de la vesícula de animales en ayuno y al no existir ingesta de alimentos esta no puede vaciarse, y los animales no presentan edema, la ausencia de este se debe a que los animales han ingerido alimentos previo el sacrificio (Mendieta *et.al*, 2006).

Se ha descrito que las áreas de congestión en el páncreas tiene relación a un curso inicial de pancreatitis aguda que es un proceso inflamatorio que suele transformarse en un cuadro grave, que pone en riesgo la vida del animal, la misma que puede tener origen infeccioso o no infeccioso, este último es causado por la activación intersticial y auto digestión del páncreas y de los tejidos circundantes de enzimas que alteren la barrera de protección celular y de las enteroquinasas que suele actuar producido activación de las enzimas proteolíticas, lo que provoca auto digestión celular y suele provocar un edema generalizado, si la causa persiste se producen zonas necróticas por coagulación y zonas hemorrágicas (Pan & Wright, 2017).

Lesiones congestivas o hemorrágicas en el parénquima del páncreas fueron reportadas en el análisis macroscópico previo del órgano (Aguirre, 2018), de la misma manera, lesiones microscópicas fueron evidenciadas en el presente estudio donde se analizó y se observó zonas de congestión vascular con disposición multifocal pero no generalizada en la zona acinar, que se podría

deducir ocurrieron debido al proceso de eutanasia o a las técnicas de sujeción, y se descarta como posible causa a un proceso inflamatorio o infeccioso ya que no se observaron agregados o infiltrados leucocitarios en la zona acinar, ni en zonas circundantes a esta, por lo que se descartaría un curso de pancreatitis, pero para comprobarlo sería necesario realizar pruebas complementarias a los animales vivos como determinación de lipasa pancreática, pruebas de bioquímica sanguínea y pruebas moleculares de detección de patógenos.

El análisis microscópico del bazo mostró áreas de congestión, pero al ser un órgano hematopoyético puede considerarse como una condición normal, y puede que la excesiva congestión de igual forma esté relacionada directamente con el proceso de eutanasia o a un cambio postmortem (Cerutti, Col & Puga, 2013).

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

Se determinó la existencia de hallazgos histopatológicos en las placas histológicas pertenecientes a las glándulas anexas al sistema digestivo, en cuanto a los hallazgos hepáticos identificados pueden estar relacionados a cambios fisiológicos por la técnica de eutanasia, por cambios nutricionales o por cambios metabólicos ya que no se encontraron en los hallazgos de las placas la presencia de material celular asociados con procesos infecciosos o parasitarios.

La presencia de hallazgos como esteatosis, fibrosis y congestión en el hígado de las tortugas analizadas, esta última alteración podría estar directamente relacionada como consecuencia de la parada cardiorrespiratoria que se dio al momento de la eutanasia de los animales al aplicar el pentobarbital, lo que desencadenó insuficiencia cardíaca congestiva provocando congestión hepática, descartando que esta condición esté relacionada a un agente infeccioso u otra condición patológica.

Los individuos pertenecientes a la comunidad Sani Isla fueron las que evidenciaron mayor porcentaje o número de individuos con hallazgos relacionados a un curso de lipidosis hepática o hígado graso, dichos hallazgos más que una patología como tal, puede estar ligado a que los animales pueden estar siendo alimentados con dietas ricas en carbohidratos o a un cambio repentino de horario en las comidas lo que produce una reacción fisiológica en el organismo de los individuos, este problema podría producir daño en el hígado y muerte celular de los hepatocitos dándose un proceso fibrótico y necrótico de los mismos, la necrosis destruye el tejido hepático que es reemplazado

posteriormente por tejido de granulación, formando la fibrosis, disminuyendo la funcionalidad del hígado, lo que afectaría a los animales al momento de su liberación a la vida silvestre.

Los hallazgos en la vesícula biliar podrían estar relacionados a una distensión es determinado como un cambio fisiológico normal en los animales ya que esta se agranda al tener un llenado de líquido, que posteriormente es vaciada cuando los animales ingieren alimento, el edema en cambio es una característica post mortem normal y no indica ningún proceso patológico.

En el caso del páncreas se determinó que las zonas multifocales congestivas en la estructura acinar y un engrosamiento en la cápsula esplénica, dichos hallazgos no representan ningún tipo de alteración patológica o no indica que los animales están pasado por un proceso patológico debido a que no se encontró agregados o infiltrados mononucleares que indiquen que el páncreas este atravesando un proceso inflamatorio infeccioso, las áreas congestivas podrían deberse a una respuesta fisiológica normal por el proceso de eutanasia en sí, al momento de la sujeción o al proceso de anestesia en general.

En conclusión los hallazgos encontrados en las placas histológicas de las glándulas anexas al sistema digestivo pertenecientes a los individuos de las 3 comunidades de tortugas charapas del Parque Nacional Yasuní, no están relacionados con procesos patológicos, sino que su aparición están relacionados a procesos físicos ligados al proceso de eutanasia, como la punción intracelómica o los productos químicos empleados en el proceso, dicho manejo podría haber influido en las hemorragias internas, mientras que el proceso de lipodosis podría estar ligada a procesos metabólicos ligados a la nutrición de los animales.

En general los órganos (hígado, vesícula biliar, páncreas y bazo) de los animales analizados se muestran aparentemente sanos.

7.2. Recomendaciones

Se recomienda monitorear constantemente a los animales que se encuentran en el programa de conservación y a los que son liberados a fin de garantizar que estos animales se encuentran en un buen estado de salud.

Se debe continuar realizando estudios y/o exámenes en animales vivos en cautiverio y de vida libre, de distintas edades, principalmente relacionados con hematología, bioquímica sanguínea, prueba de electrolitos, entre otros exámenes complementarios que ayudarían a monitorear el estado de salud de los animales dentro del programa.

Para el caso de la lipidosis es recomendable realizar un control nutricional de los animales que se encuentran dentro del programa de conservación, determinando una mejor dieta para mejorar la salud de las tortugas que puedan desarrollarse con normalidad en vida silvestre

Es recomendable continuar con el análisis histopatológico en el resto de los órganos como pulmones, corazón, riñones y el resto de órganos del sistema digestivo, es importante recalcar que si se realiza otro proceso de eutanasia para la extracción de muestras histológicas, es recomendable usar anestesia inhalada como el sevoflurano o isoflurano ya que los barbitúricos o el manejo al momento de inyectar vía intracelómica puede alterar los resultados produciendo hemorragias internas que podrían enmascarar las patologías.

REFERENCIAS

- Aguirre-Marfetán, G. (2018). Evaluación Anatomopatológica de las Glándulas Anexas al Sistema Digestivo en Tortugas Charapas, Pertenecientes a un programa de Manejo en el Parque Nacional Yasuní, Recuperado el 16 de Octubre de 2019 de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9864/1/UDLA-EC-TMVZ-2018-39.pdf>
- Alves, R. R. N & Santana, G. G. (2008). Use and commercialization of *Podocnemis expansa* (Schweiger 1812) (Testudines: Podocnemididae) for medicinal purposes in North of Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 4(1):3.
- Basantes-Taimal, G. (2019). Evaluación Anatomopatológica de Riñón de Tortugas Charapas (*Podocnemis unifilis*), Recuperadas del Parque Nacional Yasuní Recuperado el 16 de Octubre de 2019 de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10939/1/UDLA-EC-TMVZ-2019-04.pdf>
- Batalla L., L., Casas A., E., Julca, R, Sánchez, N., Angelats, R., Rojas, ...& Cárdenas, J. (2015). Presencia de Hemoparásitos en Tortugas Motelo (*Cholnides denticulata*) (Linnaeus, 1766) Comercializada en el Mercado de Belén, Iquitos, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 489.
- Cano DA, et al. (2017). Pancreatic development and disease. *Gastroenterol*: 132: 745-762
- Cerutti A, Cols M, Puga I. (2013). «Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes». *Nat Rev Immunol*. 13(2): 118-132. Consultado el 17 de diciembre de 2019.

- Chávez, J. (2016). Tipos de Estudios – Estudios Descriptivos, Analíticos e Integrativos. Recuperado el 04 de septiembre de 2019 de
- Cuevas, R., Utretras, V., & Muñoz, I (2010). Manejo Comunitario de Tortugas Charapas en Comunidades Kichwas y Waorani del Parque Nacional Yasuní, Recuperado el 13 de Agosto de 2019
- Crawford JM, & Burd AD. (2016). Anatomy, pathophysiology and basic mechanism of disease. In Burt AD, et al., editors. Macsween's Pathology of the liver. 6th ed. New York: *Churchill Livingstone*; p 2-77
- Darnell, J., et al. (2013). Biología Celular y Molecular. *Editorial Médica Panamericana*, Barcelona. Cuarta edición.
- Divers, S.J. & Cooper, J.E. 2000. Reptile hepatic lipidosis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9(3): 153-164.
- Figueroa-Forero, C. (2010). SABER LOCAL, USO Y MANEJO DE LAS TORTUGAS CHARAPAS *Podonecmis expansa* y TARICAYA *Podonecmis unifilis* (TESTUDINES: PODONECMIDAE) EN EL RESGUARDO CURARE- LOS INGLESES LA PEDRERA: AMAZONAS: COLOMBIA. Recuperado el 18 de Agosto de 2019 de.
- Gallardo, C., Paredes, E., & Pérez, J. (2003). Estudio Histopatológico de Hígado y Riñón en Caninos y su relación con las concentraciones de urea, creatinina, proteínas, enzimas (ALT, ASP) en sangre premortem y en humor acuoso a las 0 y 24 horas postmortem. Recuperado el 02 de septiembre de 2019 de

- Genoy-Puerto, A. (2018). Informe de los Estudios Preliminares Anatomopatológicos y Hematológicos en neonatos de tortugas charapas, *Podonecmes unifilis* (Testudines, Pleurototida) del Parque Nacional Yasuní 1-34.
- Gittes GK. (2016). Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*, 326: 4-35
- Hernandez-Gea V & Friedman SL. (2016). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*; 6: 425-450
- Hinkle SG, et al. (2017). Liver lobe torsion in dogs: 13 cases. *J Am Vet Med Assoc*; 228:242-247
- IUCN (2017). The IUCN red list of threatened species.
<http://www.iucnredlist.org/search>. (Consultado: 2019).
- Jubb, K.V.F; Kennedy, Peter; & Palmer, N (2016). *Pathology of Domestic Animals* (Sexta ed.) Montevideo: Hemisferio Sur
- Learly, S., Underwood, W., Anthony, R., & Cartner, S. (2013). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association. <https://doi.org/10.1016B978-012088449-0.50009-1>

- Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart &S, Lederkremer GZ. (2017). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* ; 21(41): 11567-11583.
- Luz, VLF & Stringhini, JHR, (2003). Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.32, n. 1, p.1-9
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2015) New insights into functional aspects of liver morphology *Toxicol Pathol.* 2005;33(1):27-34..
- MAE (2017). Sistema Único de Información Ambiental. Disponible en <http://goo.gl/6bKE7> (consultado el 14 de mayo de 2019).
- MAE (2011). Plan de Manejo del Parque Nacional Yasuní. Recuperado Mayo de 2019,
- MAE. (2016) Plan de Manejo del Parque Nacional Yasuní. Retrieved December 16, 2017, from <https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>
- Mendieta Sevilla SR, Muñoz Carlin ML, Díaz de León Ponce G, Olguín Juárez P. (2006). Deficiencia con la edad del vaciamiento vesicular. *Anales de Radiología, México*.
- Montalvo, C. (2010). Técnica Histológica. Recuperado el 02 de Septiembre de 2019

- Orfandis, NT. (2018). Generalidades sobre los trastornos vasculares del hígado, *Thomas Jefferson University Hospital*.
- Pan, FC. & Wright, C. (2017). Pancreas organogenesis from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*, 240: 530- 565.
- Páez, V. P., Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., & Castaño-Mora, O. V. y Bock, B.C. 212. V. Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia, 528 pp.
- Rhondin, A., G., J., Prichard, P. C. H., Van Dijk, P. P., Saumure, R.A., Buhlmann, K. A., Inverson, J. B., ... & Bour, R. (2014), TURTLE OF THE WORLD Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution and Conservation Status, 7(5), 1 – 151. Recuperado el 20 de Agosto de 2019 de
- Salmerón J, Ruiz Extremera Á.(2008). Protocolo de patología biliar aguda. Cólico biliar colecistitis aguda colangitis aguda. [Internet]. Granada;
- Schwartz SG, Mitchell SL, Keating JH & Chan DL.(2006). Liver lobe torsion in dogs: 13 cases (1995-2004). *J Am Vet Med Assoc*. 2006 Jan 15;228(2):242-7.
- Sherwood, R.,r; Parsons, Thomas S. (2016). *The Vertebrate Body*. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International. p. 188. ISBN 0-03-910284-X.

- Tacke F & Trautwein C (2015). Mechanisms of liver fibrosis resolution. *J Hepatol.*; 63(4):1038-1039.
- Tennet-Brown BS, et al. (2012). Liver lobe torsion in six horses. *J Am Vet Med Assoc*; 241: 616-620
- Vargas-Ramírez, M., Castaño-Mora, O. V. & Fritza, U. (2017). Molecular phylogeny and divergence times of ancient South American and Malagasy river turtles (Testudines: Pleurodira: Podocnemididae). *Organisms, Diversity and Evolution* 8:388-398.
- WCS. (2016). Tortuga charapa (*Podocnemis unifilis* & *P. expansa*). Recuperado el 16 de Agosto de 2019 de.
- Work, T. (2000) MANUAL DE NECROPSIA DE TORTUGAS MARINAS PARA BIOLOGOS EN REFUGIOS O ÁREAS REMOTAS. (NWHC-HFS, Ed.). Recuperado el 30 de Agosto de 2019
- Zachary, J. F., & McGavin, M. D. (2012). *Pathology Basic of Veterinary Disease*.

