



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TIPIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA E
INMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES EXTRAÍDOS DE
TEJIDOS BLANDOS DE *BOTHROPS PUBESCENS* Y DE
BOTHROPS ALTERNATUS PERTENECIENTES A UN BIOTERIO
DE OFIDIOS PONZOÑOSOS**

ALEJANDRO CRAMPET BARDIER

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**Prof. Dr. José Manuel Verdes
Director de Tesis**

**Prof. Dr. Eduardo Juan Gimeno
Co-director**

2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Claudio Borteiro, DMTV, MSc, PhD

(Presidente del tribunal)

Museo Nacional de Historia Natural (MNHN, MEC), Uruguay.

Prof. Claudio Barbeito; MV, PhD. Investigador Principal CONICET

Histología y Embriología y Patología General

Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata – Argentina

**Prof. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana; MVZ, M.Sc.; PhD.
Investigador de CNPq**

**Laboratório de Diagnóstico Patológico, Veterinário Universidade de
Brasília, Brasília DF - Brasil**

2024



Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: Maestría en Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 24/07/2024

TRIBUNAL: Dr. Claudio Borteiro (presidente), Prof. Dr. Claudio Barbeito, Prof. Dr. Fabiano Sant'Ana.

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4558133 - 4	ALEJANDRO, CRAMPET BARDIER		12.

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)


CLAUDIO BORTEIRO.


CLAUDIO BARBEITO


FABIANO SANT'ANA
UnB

TRIBUNAL

FIRMA

La tesis presentada por el Dr. Alejandro Crampet Bardier constituye un detallado trabajo sobre la ocurrencia de neoplasias en dos especies de fideis nativos. La metodología implementada exige el maestrandeo de puesto e punto de decisión de manejo, justificación de neoplasias e histológicos para la caracterización del problema en estudio. Los resultados obtenidos →

constituya una característica muy relevante por
 lo temático, particularmente en el caso de
 los sudamericanos. Se destaca la
 cercanía por solucionar las complejidades
 surgidas durante el desarrollo de los tesis.
 Este resultado que lo presentaría oral
 verificó en sus trabajos de tesis

NOTA	CALIFICACION	NOMBRE	FI
10		ALEJANDRO CRAMPET BARDIER	4252133

[Faint signature]

[Faint signature]
 CLAUDIO BARBETTO

[Faint mirrored text from the reverse side of the page]

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la República Oriental del Uruguay (Udelar), institución en la que realicé mis estudios de Magíster en Salud Animal, gracias al apoyo financiero del proyecto de iniciación a la investigación (modalidad 1) de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

En particular, cabe destacar también, el apoyo del Serpentario de Instituto de Higiene de la Udelar, lugar donde se obtuvieron las muestras que utilicé para desarrollar este proyecto, así como también a la Unidad Académica de Patología, Departamento de Patobiología de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Ambos lugares, me abrieron sus puertas para que este trabajo fuera posible en el marco de mi colaboración honoraria con estas instituciones.

A la Agencia de Cooperación Internacional del Gobierno de Japón (JICA), institución que financió la venida al Uruguay del Experto Sénior Prof. Emérito Dr. Kosuke Okada (DVM, MSc, PhD, Diplomado del Colegio Japonés de Patólogos Veterinarios), quien aportó su conocimiento como uno de los patólogos referentes en este proyecto, y financió parte del kit de anticuerpos primarios que se utilizaron en los experimentos de inmunohistoquímica, así como los de microscopía electrónica de transmisión desarrollados en Uruguay.

A los Dres. Francisco Uzal (UCDavis, San Bernardino, EE.UU.), Josué Díaz-Delgado (Texas A&M University, EE.UU.) y Jose Luiz Catao Dias (Universidade de São Paulo, Brasil), quienes contribuyeron con su conocimiento y disposición a mejorar y expandir los estudios realizados en Uruguay.

A mis directores de tesis, el Prof. Dr. José Manuel Verdes (Udelar, Uruguay) y el Prof. Eduardo Juan Gimeno (Universidad Nacional de La Plata, Argentina), así como también al Prof. Dr. José Antonio Moraña (Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria, Udelar).

Al Dr. Claudio Borteiro (Museo Nacional de Historia Natural, Uruguay), quien apoyo este trabajo a lo largo de todo su proceso, siendo una piedra fundamental en la última etapa de redacción y revisión de esta tesis en su rol de Presidente del tribunal, así como a los Prof. Dr. Claudio Barbeito (Universidad Nacional de La Plata, Argentina) y Fabiano José Ferreira de Sant'Ana (Universidade de Brasília, Brasil).

A todos los compañeros y amigos de la Facultad de Veterinaria de la Udelar, especialmente a todos los integrantes de la Unidad Académica de Patología del Departamento de Patobiología, por sus sugerencias, apoyos y aportes a este trabajo.

A mi esposa Marta, y a nuestras hijas María Belén y María Eugenia, quienes estuvieron siempre acompañando cada etapa de este largo proceso, y a las que dedico este trabajo.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
SUMMARY	9
1.INTRODUCCIÓN	10
1.1 – Bioterio de ofidios ponzoñosos (serpentario de la Udelar)	10
1.1.1 – Colección	11
1.1.2 – Instalaciones y manejo	11
1.1.3 – Accidentes ofídicos en la República Oriental del Uruguay	12
1.1.4 – Género <i>Bothrops</i>	13
1.1.4.1 – <i>Bothrops alternatus</i>	13
1.1.4.2 – <i>Bothrops pubescens</i>	13
1.2 NEOPLASIA EN SERPIENTES	14
1.2.1- Diagnóstico de neoplasias en serpientes	15
1.2.2 – Tratamiento de neoplasias en serpientes	18
1.2 PLANTEAMIENTO DE EL PROBLEMA	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 – GENERAL	21
4.2 – ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 – OBTENCIÓN DE MUESTRAS	22
5.2 – HISTOPATOLOGÍA	22
5.3 – INMUNOHISTOQUÍMICA	23
5.4 – VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS	23
5.5 - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	25
5.6 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
6. RESULTADOS	26
6.1- CASUISTICA GENERAL	26
6.1.1 – Tasa anual de aparición de tumores	26
6.1.2 – Casos por especie y por sexo	27
6.1.3 – Parentesco y tumores en <i>B. pubescens</i>	27
6.2 - CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LOS TUMORES	28

6.3 – HISTOPATOLOGIA	30
6.4 – VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS	32
6.5 – INMUNOHISTOQUÍMICA	34
6.6 – MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	53
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES	66
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10. LISTADO DE ANEXOS	79
I: TABLAS	79
I: ESPECIES POTENCIALMENTE MORTAL PARA EL HOMBRE EN URUGUAY	89
II: PLANILLA DE SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LOS PACIENTES	91
III: PROCEDIMIENTO INCLUSIÓN EN PARAFINA Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	93
IV: PROCEDIMIENTO DE TINCIONES ESPECIALES	94
V: PROCEDIMIENTO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION	95

Resumen

En este trabajo se describen las características poblacionales, clínicas, patológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales de neoplasias espontáneas con alta incidencia en una colección cautiva del género *Bothrops* que eran parte del bioterio de ofidios ponzoñosos de la Udelar.

Diecinueve ejemplares de dos especies de la colección cautiva, *Bothrops alternatus* (nombre común: “Crucera”) y *B. pubescens* (nombre común: “Yara”) desarrollaron 43 neoplasias, de las cuales 37/43 - 86%, resultaron malignas y mayoritariamente de origen mesenquimal y 6/43 - 14%, benignas. De las 48 muestras estudiadas con los distintos paneles de inmunohistoquímica (IHQ) usados se llegó a un diagnóstico definitivo de 16 tipos diferentes de neoplasias. Se estudiaron 55 muestras de órganos de 11 individuos encontrándose metástasis en 7 de ellas.

En una de las neoplasias estudiadas se encontraron en sus células partículas virales con características compatibles con retrovirus y 8 de los 19 ejemplares afectados presentaban un grado de parentesco directo entre ellos.

Se identifican por primera vez en ofidios, el osteosarcoma del tipo telangiectásico, el hemangiopericitoma (PWT), el mielolipoma de localización hepática, una alta frecuencia de hemangiomas y hemangiosarcomas, y el primer caso de mixosarcoma en vipéridos.

Mediante el estudio por IHQ los anticuerpos CD57, IA4, Iba1 y las citoqueratinas A1/A3 resultaron útiles para el diagnóstico de PNST, leiomiomas, granulomas y carcinomas respectivamente.

El desarrollo de tumores es un factor importante de morbilidad y mortalidad para reptiles mantenidos en cautiverio. Se necesitan más estudios para explicar mejor como afectan los factores bióticos y abióticos en la alta frecuencia de neoplasia en esta colección.

Summary

This study describes the population, clinical, pathological, immunohistochemical and ultrastructural characteristics of spontaneous neoplasms with high incidence in a captive collection of the genus *Bothrops* that were part of the Udelar poisonous ophidian vivarium.

Nineteen specimens of two species from the captive collection, *Bothrops alternatus* (common name: “Crucera”) and *B. pubescens* (common name: “Yara”) developed 43 neoplasms, of which 37/43 - 86% were malignant and mostly of mesenchymal origin, and 6/43 - 14%, were benign. Of the 48 samples studied with the different immunohistochemistry (IHC) panels used, a definitive diagnosis of 16 different types of neoplasms were reached. 55 organ samples from 11 individuals were studied, and metastases were found in 7 of them.

In one of the neoplasms studied, viral particles with characteristics compatible with retroviruses were found in its cells, and 8 of the 19 affected specimens had a degree of direct parental relationship between them.

Telangiectatic type osteosarcoma, hemangiopericytoma (PWT), hepatic myelolipoma, a high frequency of hemangiomas and hemangiosarcomas, and the first case of myxosarcoma in viperids were identified for the first time in ophidians.

Through the IHC study, the antibodies CD57, IA4, Iba1 and cytokeratins A1/A3 were useful for the diagnosis of PNST, leiomyosarcomas, granulomas and carcinomas, respectively.

The development of tumors is an important factor of morbidity and mortality for reptiles kept in captivity. More studies are needed to better explain how biotic and abiotic factors affect the high prevalence of neoplasia in this collection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes del Bioterio de Ofidios Ponzñosos (Serpentario) del Instituto de Higiene de la Udelar e importancia de este tipo de instituciones en investigación básica y aplicada

En las últimas cuatro décadas, la tenencia y manejo de anfibios y reptiles en cautiverio, disciplina conocida como Herpetocultura, se ha popularizado en Norte América, Europa y más recientemente en algunos países de Asia y Latinoamérica. Numerosas instituciones, centros e incluso, entes productores privados mantienen y reproducen cientos de especies de herpetofauna, según las disposiciones legales de cada país o región (Ross & Marzec, 1990).

El bioterio de ofidios ponzoñosos (Serpentario) en Uruguay, se creó por un convenio entre 2 instituciones, la Facultad de Medicina y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Udelar). El mismo comenzó a funcionar en el año 1992 y estaba a cargo de un grupo de trabajo conformado por biólogos y estudiantes de la Facultad de Ciencias (Udelar), su principal finalidad desde el inicio, fue el mantenimiento de una colección de especies ponzoñosas y obtención de ponzoña para la posterior fabricación de suero antiofídico de origen nacional (<http://www.serpentario.edu.uy>). Los sueros antiofídicos son veneno-específicos, lo que significa que son adecuados para neutralizar solamente el veneno para el que fueron desarrollados. Sumado a esto, se han reportado variaciones intra-específicas en el veneno, por lo que es de enorme importancia que el suero antiofídico sea desarrollado a partir de venenos procedentes de ofidios de la región donde serán usados (Chippaux & Goyffon, 1997; Morais, 2006). En el año 2006 se integra al grupo de trabajo un veterinario (el autor de la presente tesis) para la supervisión del status sanitario de la colección.

En la actualidad, los estudios de caracterización, molecular y toxicológica de los venenos de serpientes son necesarios para el mejor entendimiento de los procesos bioquímicos y fisiopatológicos que se desencadenan en los pacientes (humanos y animales) posteriormente a la mordedura y descarga de veneno, además de ser la base para ayudar a evaluar el potencial neutralizante de los sueros antiofídicos utilizados para tratar este tipo de envenenamiento (de Roodt et al., 2005).

1.1.1. Características de la colección de ofidios ponzoñosos de la Udelar

La colección está compuesta por animales que provienen de colectas hechas en la naturaleza en los primeros años de funcionamiento del serpentario, de donaciones de particulares, y de nacimientos de madres que estaban preñadas al momento de su captura, ya que en estas instalaciones no se realiza la reproducción de los animales que integran la colección.

En el bioterio (serpentario) se mantienen las cuatro especies potencialmente peligrosas de nuestro país y cuya mordedura puede ser mortal para el hombre y los animales y ellas son:

Micrurus altirostris (nombre vulgar: coral) (Anexo I, figura 1).

Crotalus durissus terrificus (nombre vulgar: cascabel) (Anexo I, figura 2).

Bothrops alternatus (nombre vulgar: crucera) (Anexo I, figura 3).

Bothrops pubescens (nombre vulgar: yara) (Anexo I, figura 4).

Además de estas especies se alojan otras para estudios de comportamiento, alimentación, reproductivos y componentes de su ponzoña en aquellas que la poseen. Ellas son: *Boiruna maculata*, *Ligophis anomalus*, *Phalotris lemniscatus*, *Philodryas olfersii*, *Philodryas patagoniensis*, *Philodryas aestiva*, *Paraphimophis rusticus* (<http://www.serpentario.edu.uy>).

1.1.2. Instalaciones y Manejo

Para el manejo de los animales se dispone de tres salas, una sala sucia donde se realiza la limpieza de las cajas y bebederos y en donde se mantienen varias especies para estudios comportamentales y de su biología, una sala de cuarentena para animales nuevos que ingresan a la colección, aquí se desparasitan y luego de un tiempo pasan a la sala limpia. La sala limpia es donde se mantienen exclusivamente y en condiciones de bioterio los animales a los cuales se les extrae ponzoña (<http://www.serpentario.edu.uy>).

La edad de los animales varía desde individuos de meses hasta animales de más de veinte años. Los animales son mantenidos en cajas de plástico con tapa de cierre hermético en forma individual con un registro alfanumérico (ver anexo II Fig. 2). Son alimentados cada quince días con ratones provenientes del bioterio de roedores convencionales del propio Instituto de Higiene (Udelar), el agua de bebida es previamente

filtrada, esterilizada en autoclave y suministrada en platos plásticos (<http://www.serpentario.edu.uy>).

Desde el año 2006, se mantiene un registro individual con una ficha clínica para cada animal, donde se lleva control de eventos médicos o quirúrgicos, así como del diagnóstico, medicación y tratamiento de enfermedades y su evolución en el tiempo. Por otro lado, se estableció un protocolo de necropsia y elaboración de informe de Anatomía Patológica de cada espécimen encontrado muerto o sometido a eutanasia por el veterinario a cargo (anexo II Fig. 1).

En aquellos animales que presentan síntomas de enfermedad, se estudia el caso clínico, se le realizan estudios paraclínicos (tales como punciones, estudios radiológicos y ecográficos, entre otros) y en caso de identificar tumoraciones, se procede a la exéresis quirúrgica. El material extraído es fijado y mantenido en formol tamponado al 10% hasta su procesamiento histológico, y un trozo se mantiene a -86°C , para su posterior análisis bacteriológico y/o virológico, en aquellos casos que los estudios histopatológicos sugieran la presencia de un microorganismo causante de la enfermedad. Los cuerpos de los animales muertos son ingresados a la colección del museo de la Facultad de Ciencias de la Udelar, con su respectivo número de catálogo.

1.1.3. Accidentes Ofídicos en Uruguay

En nuestro país el Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Udelar, a través de su Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT) registra los casos clínicos producidos en el ser humano por accidentes ofídicos, los casos de accidente ofídico son de denuncia obligatoria por parte de los centros de salud. La notificación de casos de ofidismo en humanos en Uruguay es de 100 a 120 casos anuales, de los cuales más de la mitad son causados por el género *Bothrops* (<http://www.serpentario.edu.uy>).

La incidencia de las 2 especies de *Bothrops* es de aproximadamente de 70 casos al año, con predominio de *B. alternatus* (Chippaux, 1997; Juanena et al., 2018; MSP Uruguay, 2018). Desde que, en el año 1986 en Uruguay, se definió al accidente ofídico de notificación obligatoria, no se han generado casos de ofidismo provocados por *Crotalus durissus terrificus* (Cascabel) y se registró un solo caso por *Micrurus altirostris* en 2017 (Juanena et al., 2018).

La mayor incidencia de mordeduras se observa en los meses cálidos coincidiendo con el período de mayor actividad biológica y metabólica de los ofidios. La mordedura de *Bothrops* determina en los pacientes humanos y animales, lesiones tisulares severas que dejan secuelas invalidantes permanentes por amputaciones de miembros necrosados y alteraciones funcionales como consecuencia de las fibrosis tendinosas y musculares debido a la acción histolítica del veneno (Silva, 1989).

1.1.4. Género *Bothrops*

El género *Bothrops* es un género de serpientes venenosas de la familia Viperidae que agrupa 48 especies que se distribuyen desde México a la mayor parte de América del Sur incluyendo Brasil, Argentina y Uruguay (Uetz et al., 2023). Los miembros de este género son responsables de más víctimas mortales que cualquier otro grupo de serpientes venenosas, sin tratamiento médico la tasa de mortalidad se estima en un 7%. En Uruguay viven 2 especies de este género: *B. alternatus* y *B. pubescens*, y son las responsables del mayor porcentaje de accidentes ofídicos (Juanena et al., 2018).

***Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron y Duméril 1854)**

Conocida con el nombre común de “Víbora de la cruz” o “Crucera”, es una serpiente que mide entre 25 cm y 140 cm, habita en pajonales, pastizales, zonas de bañados, plantaciones (eucalipto, pinos, caña de azúcar y arroz), orillas de cursos de agua en sierras y quebradas, se alimenta de aves, roedores, saurios, ofidios, pudiendo incluso desarrollar canibalismo. Posee la particularidad de ser vivípara, pariendo de 3 a 25 viboreznos en los meses de marzo a mayo (Carreira & Maneyro, 2013).

***Bothrops pubescens* (Cope, 1869)**

Conocida con el nombre común de “Yarará”, es una serpiente que mide entre 22 y 90 cm, habita en sierras, cursos de agua, senderos en el monte, praderas rocosas y médanos, se alimenta de ranas, lagartijas, lagartos juveniles, perdices y ratones, es vivípara y puede parir de 2 a 18 crías en los meses de marzo y abril (Carreira & Maneyro, 2013).

1.2. Neoplasias en Serpientes

Los reptiles son una clase diversa de animales para los cuales existen características anatómicas y fisiológicas únicas, así como procesos fisiológicos y fisiopatológicos complejos (Ossiboff, 2018). Sin embargo, son sensibles a las enfermedades y trastornos que son comunes en otras clases del reino animal, incluyéndose dentro de esta diversidad de patologías a las neoplasias (Christman et al., 2017). El desarrollo de tumores es un factor importante de morbilidad y mortalidad para reptiles criados y mantenidos en cautiverio (Ossiboff, 2018). Existen reportes que confirman el desarrollo de procesos neoplásicos, incluso con cierta incidencia, en antepasados reptiles antiguos, incluyendo varias especies extintas de dinosaurios (Rotschild et al., 2003).

Aunque la mayoría de los tumores en reptiles son de origen espontáneo, algunos tienen una causa conocida, como podría ser el caso de los carcinomas de células escamosas orales secundarios a una estomatitis crónica, tal como ocurre en los mamíferos y las aves (Ossiboff, 2018). Se han identificado varios virus por su potencial carcinogénico en asociación con tumores. Se encontraron inclusiones intranucleares eosinofílicas similares a virus en el citoplasma de linfocitos neoplásicos de una serpiente rey de California (*Lampropeltis getulus californiae*) (Jacobson et al., 1980), partículas de virus tipo C dentro de los tejidos tumorales de una serpiente del maíz (*Pantherophis guttatus*) con un condrosarcoma, lo que sugiere una causa viral, también se sospecha que los arenavirus tengan potencial oncogénico en reptiles (Steinglen et al., 2012). Entre otros carcinógenos capaces de inducir tumores en reptiles se incluye a la irradiación con luz ultravioleta (Watson & Mitchell, 2014). Recientemente se ha sospechado de la existencia de predisposición genética en reptiles genéticamente relacionados, como fue el reporte de adenocarcinomas renales en 3 serpientes de coral del Cabo (Keck et al., 2011).

Aunque se han sugerido contaminantes ambientales como posibles carcinógenos, no existen estudios que examinen la relación entre los contaminantes ambientales y los tumores en los escamosos (Novillo et al., 2006). Dentro de la Clase *Reptilia*, las serpientes son las que presentan el mayor número de reportes (Garner et al., 2004; Hernández-Divers & Garner, 2003; Ramsay et al., 2006; Dietz et al., 2015; Ossiboff, 2018). Los estudios retrospectivos realizados en serpientes, muestran una frecuencia de tumores que van desde 2,9% (Catão-Dias & Nichols, 1999), pasando por 12,5% (Garner et al., 2004), hasta llegar a 15% (Sykes & Trupkiewicz, 2006), y una mayor frecuencia de neoplasias en

colúbridos (Colubridae), con frecuencia decreciente en viperidos (Viperidae) y boidos (Boidae), respectivamente (Hernández-Divers & Garner, 2003).

La histología de las neoplasias en serpientes es similar a las neoplasias que afectan a mamíferos y aves, pudiendo ser de origen epitelial, mesenquimal o linfoide, siendo mesenquimal el tipo más frecuente en serpientes (Kusewitt et al., 1997; Catão-Dias & Nichols, 1999; Page et al., 2017; Ossiboff, 2018), aunque existe un reporte donde las neoplasias más frecuentes son las de tipo epitelial (Ramsay & Fowler, 1996), e incluso, hay otro reporte donde la mayoría de los casos son de tipo linfoide o hematopoyético (Catão-Dias et al., 1999; Cristman et al., 2017; Ossiboff, 2018).

Si bien ciertas neoplasias se encuentran con mayor incidencia que otras, se ha informado de una gran diversidad de tumores en ofidios afectando todos los sistemas (Ossiboff, 2018), reportándose en: tracto digestivo (Martin et al., 1994; Latimer & Rich, 1998; Baron et al., 2014), reproductor (Petterino et al., 2006; Pereira & Viner 2008), respiratorio (Diethelm & Ridgley, 1996), hematopoyético y linfoide (Jacobson et al., 1981; Schumacher et al., 1998; Schilliger & Frye, 2009), así como en corazón (Gumber et al., 2010; Shoemaker et al., 2016), en ojos (Hardon et al 1994), en boca (Comolli et al., 2015), en sistema nervioso (Ramis et al., 1988; Keller et al., 2016; Craig et al., 2005), en riñón (Gravendyck et al. 1997; Garner et al., 2004; Stern et al., 2010), en glándulas endócrinas (Effron et al., 1977; Dadone et al., 2009), en hígado (Catão-Dias et al., 1999), en sistema tegumentario (Kusewit et al., 1997; Gull et al., 2012; Heckers et al., 2012; Dietz et al., 2016) y en sistema músculo-esquelético (Honour et al 1993; Cowen et al., 2011; Dietz et al., 2015).

Las neoplasias en reptiles aparecen en varios reportes, presentadas tanto como casos individuales, así como en estudios de colecciones zoológicas de múltiples especies, pero existe un solo reporte previo incluyendo estudios sistemáticos y retrospectivos de la casuística de las principales neoplasias que afecten una colección de un solo género, y en este estudio, se describe la casuística de tumores en saurios (Gyimesi et al., 2005).

1.2.1 Diagnóstico de neoplasias en serpientes

El diagnóstico de una neoplasia en un reptil sigue siendo un reto para los clínicos, ya que falta investigación primaria en los tipos de tumores específicos. La mayoría de los informes más recientes describen un tipo de tumor específico que ocurre en una especie específica de reptil, existiendo poca información sobre la incidencia de cada tipo tumoral

tomando de referencia una sola especie o estudios que agrupen el comportamiento de un solo tipo de tumor en múltiples especies (Christman et al., 2017). En cuanto a la presentación clínica, los signos más frecuentes observados en serpientes con neoplasias suelen ser inespecíficos, entre otros, letargo, disfagia, anorexia y emaciación (Ramis et al., 1998; Sykes & Trupkiewicz, 2006; Garner et al., 2004), las deformaciones con aumento de volumen del cuerpo, suelen ser indicativas de la aparición y desarrollo avanzado de masas neoplásicas, siendo esta simple constatación clínica insuficiente, debiéndose (tal como ocurre en otras especies de vertebrados) realizar el diagnóstico diferencial con otros procesos que ocasionan el aumento de volumen, tales como: inflamación, hematomas y abscesos. En general, las manifestaciones clínicas están asociadas con los sistemas afectados.

Macroscópicamente la inflamación crónica y caseosa como los granulomas pueden simular el desarrollo de tumores en reptiles, los organismos responsables incluyen bacterias Gram +, Gram - y anaerobias que incluyen especies como *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Gemella*, *Klebsiella*, *Leptospira*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, así como también algunas especies de hongos (Shotts, 1984; Frye, 1991b). De esta manera se vuelve esencial la recolección y envío de muestras de los tejidos lesionados para examen bacteriológico e histopatológico, porque esta herramienta facilita el abordaje a un diagnóstico definitivo y gracias a este, al correcto tratamiento (Divers & Scott, 2019).

Otro diferencial que debe incluirse en el caso de los reptiles, en el caso de *B. pubescens*, y debido a que en su dieta se incluyen anfibios y saurios, es la potencial presencia de parásitos metazoarios del género *Spirometra* spp., los que suelen producir nódulos subcutáneos por acúmulos parasitarios debajo de la piel, que pueden simular tumores (fue observado en la necropsia de varios individuos en este trabajo (Fig.1) por su aspecto exterior cuando se realiza una inspección del exterior del animal afectado por esta parasitosis y que esta descrito para otras especies (Oda et al., 2016).



Fig. 1. *Bothrops pubescens* (Yara) N137. Localización subcutánea e intra-celómica de plerocercoides de *Spirometra* spp.

El uso de análisis paraclínicos tales como la radiología o la ultrasonografía (Schumacher & Toal, 2001), la tomografía axial computarizada o la resonancia magnética nuclear (Keller et al., 2016) proporcionan en la actualidad mayor información y facilitan la interpretación para el correcto diagnóstico clínico.

También, el hemograma completo y la bioquímica plasmática pueden usarse para determinar la salud relativa del paciente y para identificar manifestaciones sistémicas de la enfermedad (Stacy et al., 2011), los síndromes para-neoplásicos pueden manifestarse a través de un leucograma inflamatorio y algunos tumores hematopoyéticos como linfoma y leucemia se asocian con linfocitosis grave (Romagnano et al., 1996).

Finalmente, en aquellos casos que el uso de las técnicas anteriormente mencionadas no resultan concluyentes para llegar al diagnóstico definitivo, como ocurre en neoplasmas causados por células similares en su aspecto histológico, que pueden llevar a confusión del origen tumoral al momento del diagnóstico histopatológico convencional, cuando usamos la tinción de hematoxilina y eosina (HE), el uso complementario de técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica podría ayudar a orientar más precisamente el diagnóstico final por identificación de la estirpe celular original que viene proliferando en la masa tumoral, ayudando al patólogo a cerrar el caso, y definir un pronóstico y tratamiento junto al clínico actuante (Haines & Clark, 1991). Sin embargo, pocos marcadores inmunohistoquímicos o tisulares de neoplasias que se aplican comúnmente a los animales de compañía están validados o fácilmente disponibles para los veterinarios de animales exóticos (Bezjian et al., 2013).

1.2.2 Tratamiento de neoplasias en reptiles

Hasta el momento, persiste una falta de investigación prospectiva sobre las modalidades de tratamiento para las diferentes especies de reptiles, y aunque estos difieren considerablemente en su anatomía y fisiología con otros taxones, la mayoría de los tratamientos contra el cáncer son una adaptación de la investigación clínica y de ciencias básicas y prácticas de oncología clínica en mamíferos de compañía (Christmas et al., 2017). Como tratamiento de las neoplasias se han intentado diferentes terapias siendo la cirugía, la primera elección y la que brinda mejores resultados y es a menudo curativo en casos con tumores fácilmente accesibles y resecables (Christmas et al., 2017). Modalidades de tratamiento secundario y tratamiento de neoplasias metastásicas o sistémicas que se han utilizado en reptiles, incluyen el uso de la quimioterapia (local y sistémica) (Willette et al., 2001), la radiación localizada, la electroquimioterapia, la terapia con láser, la crioterapia y la terapia fotodinámica (Leach et al., 1991; Langan et al., 2001). En la mayoría de casos tratados con quimioterapia y/o radioterapia, no se han obtenido buenos resultados (Folland et al., 2011; Steil et al., 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la colección de serpientes ponzoñosas del bioterio de la Udelar antes mencionado, el mayor problema sanitario observado fue la aparición de tumores (período 2007 al 2018). Si bien se presentaron esporádicamente algunos casos de micosis o abscesos, estos fueron problemas de poca relevancia poblacional.

Los tumores observados fueron de aparición espontánea y detectados en la revisión semanal que se les practicaba a todos los individuos. En varios casos el crecimiento fue muy rápido, en semanas y en otros casos se desarrollaron varios al mismo tiempo. El tratamiento que se instauró fue quirúrgico y el material extraído guardado en formol para posteriores estudios.

Ante la sucesiva aparición de tumores se decidió consultar con otras colecciones como el instituto Malbrán, en Argentina, que poseía una colección importante de serpientes muy similar a la de este caso. El encargado de dicha colección era en ese momento el Dr. Adolfo Rafael De Roodt, quien estuvo a cargo del área Serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S desde el año 1997 hasta el año 2010, y nos confirmó que en esa colección solo observó un caso en todos esos años y fue en el género *Crotalus*.

También se consultó al Dr. Aníbal Melgarejo, encargado del serpentario en el Instituto Vital, Brasil, que también posee una colección muy importante, y quien también confirmó que la aparición de tumores no constituye un problema sanitario en serpientes en dicho instituto.

Siendo entonces que el caso del bioterio de serpientes de la Udelar presentaba una particularmente alta incidencia de tumores en el género *Bothrops*, se decide prestar particular atención al problema, es por ello, que se decide comenzar a estudiar qué tipo de tumores son los que afectaban a esta población, cuál es su origen celular, y los posibles factores tanto bióticos como abióticos a los que pudieran estar expuestos estos ejemplares.

3. HIPÓTESIS

- 1) La clasificación histológica de los tumores en serpientes basada solamente en la técnica de HE sería limitada, debido a la complejidad tisular de los mismos. La utilización de técnicas de tinción complementarias y la inmunohistoquímica específica para cada tipo tumoral, permitiría llegar a un diagnóstico definitivo de las estirpes celulares que originaron estos tumores.
- 2) En aquellos individuos que han desarrollado más de un tumor de tipo neoplásico, la estirpe celular original sería la misma en todos ellos.
- 3) Dada la alta incidencia de tumores en esta colección, podría existir una causa infecciosa (probablemente viral) o/y hereditaria por haberse visto afectados varios individuos emparentados.

4. OBJETIVOS

4.1 - OBJETIVO GENERAL

Tipificar y comparar por histopatología e inmunohistoquímica (IHQ) los diferentes tumores extraídos de tejidos blandos de especímenes de *Bothrops pubescens* y *Bothrops alternatus* pertenecientes al bioterio de ofidios ponzoñosos.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar las diferentes técnicas de IHQ en nuestras condiciones experimentales, usando las recomendaciones del fabricante para detectar inmunomarcación en tejidos de mamíferos y adaptarlas a los tejidos de reptiles sanos.
- Estudiar mediante las técnicas de inmunohistoquímica validadas, aquellos tumores previamente extraídos de las 2 especies mencionadas previamente.
- En aquellos casos de tumores que por el tipo de presentación generen sospecha de origen viral (por ejemplo: retrovirus), complementar los estudios inmunohistoquímicos con la Microscopía Electrónica de Transmisión, para identificar cambios ultra-estructurales, y en caso de ser posible, partículas virales y/o cuerpos de inclusión, que confirmen la presencia de virus en los tejidos afectados.
- Comparar los resultados obtenidos entre las muestras de tumores procedentes de las especies de vipéridos estudiados, y realizar un estudio epidemiológico de la población estudiada, intentando la búsqueda de asociación estadística entre los tipos tumorales diagnosticados y el grado de consanguinidad en los animales afectados que estén emparentados.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Obtención de muestras

El estudio se realizó sobre 48 muestras de posibles neoplasias y 55 muestras de diferentes órganos guardados en el servicio veterinario del bioterio del Instituto de Higiene (Udelar). Éstas fueron extraídas de 19 individuos pertenecientes al género *Bothrops* entre 2007 y 2018. En el caso de las tumoraciones 8 de los individuos estudiados presentaron una única neoplasia, mientras que el resto se estudiaron múltiples masas tumorales (de 2 a 9 tumores en el mismo animal).

Las muestras se obtuvieron mediante cirugía bajo anestesia general o mediante necropsia de individuos a los que se practicó la eutanasia debido a su mala condición general. Los procedimientos médico-quirúrgicos y necropsias estuvieron a cargo del autor, siguiendo protocolos de analgesia, anestesia y eutanasia aprobados por la CEUA de la Facultad de Ciencias (Udelar).

Para las cirugías se usaron diferentes protocolos de anestesia, principalmente Ketamina-Xilacina I/M (60 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente), en algunos ejemplares se usó Propofol I/C (10 mg/kg), y en otros ejemplares se usó Midazolam-Xilazina I/M, (2 mg/kg y 2 mg/kg). Las suturas de las heridas quirúrgicas se realizaron con material sintético absorbible de ácido poliglicólico N° 0 y/o 1, según el caso (Vicryl®, Ethicon®). Previamente a la cirugía (24 horas previas), se administró antibióticos y analgésicos, y se continuó la antibiótico-terapia durante 10 días, por vía I/M, repitiendo cada 48 horas usualmente enrofloxacin 10 mg/kg o marbofloxacin 5 mg/kg.

Se llevó un registro de cada caso, se tomaron fotografías de las lesiones macroscópicas, y el material biopsiado en cirugías o muestreado durante necropsias se conservó hasta su procesamiento en formol (10%).

5.2 Histopatología

Las muestras fueron procesadas por métodos histológicos convencionales, seccionándolas a 4 µm, tiñéndolas con HE u otras técnicas especiales (anexos III y IV). Posteriormente, se realizó su estudio en microscopio de luz transmitida (Olympus BX41, Japón).

Las preparaciones fueron examinadas por el autor y además por tres patólogos: un experto Sénior de la Agencia de Cooperación Internacional del Gobierno de Japón (JICA), un patólogo del laboratorio del Instituto de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina), y un patólogo del laboratorio de Patología de Animais Selvagens (LAPCOM), Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ), Universidade de Sao Paulo (USP), Brasil, con amplia experiencia en diagnóstico en animales silvestres. A los expertos consultantes se les solicitó un diagnóstico presuntivo, o en su defecto, llegar a definir el origen mesenquimático o epitelial de los tumores.

5.3 Inmunohistoquímica

Técnica de Inmunohistoquímica y criterios de clasificación semi-cuantitativa de la inmunomarcación

Para la técnica de inmunohistoquímica se usó el método Complejo Avidina-Biotina peroxidasa (LSAB), como procedimiento de recuperación antigénica, se usó el método de calor húmedo a presión en solución tamponada de citrato de sodio 10 mM, pH = 6, manteniéndolo en ebullición por 10 minutos (Bankfalvi et al., 1994), el revelado se hizo con diaminobenzidina (DAB).

En las muestras procesadas en Uruguay se estudiaron las 48 muestras aplicándoles los 5 anticuerpos usados en la validación. Las muestras estudiadas en el Instituto Adolfo Lutz (IAL Sao Paulo, Brasil) fueron 32, siendo seleccionadas por poseer una mayor complejidad para llegar a un diagnóstico definitivo consensuado entre los patólogos que revisaron la colección de láminas en Uruguay.

Para la evaluación de la inmunohistoquímica se siguieron los siguientes criterios:

Negativo (-): Menos del 5% de las células a marcar.

Positivo ligero (+): 5 al 25% de las células a marcar.

Positivo moderado (++) : 25 al 50% de las células a marcar.

Positivo intenso (+++) : más del 50% de las células a marcar.

5-4 Validación de Anticuerpos

La validación de los anticuerpos primarios se llevó adelante en el Laboratorio de la Unidad Académica de Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria (Udelar) usando un panel de 5 anticuerpos primarios anti-vimentina

monoclonal (dilución 1:50; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.), desmina, monoclonal (dilución 1:25; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.), Anti-AE1 / AE3 monoclonal (dilución 1:1000; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.), Factor VIII policlonal (dilución 1:1000; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.), S-100 monoclonal (dilución 1:1000; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.).

Para la validación de los anticuerpos en nuestras condiciones experimentales, se usaron las recomendaciones de los respectivos fabricantes para tejidos de mamíferos, se hizo una revisión de los antecedentes de la validez de su aplicación en tejidos de reptiles, y siguiendo los criterios de los antecedentes previos en reptiles, se procesaron tejidos de reptiles sanos pertenecientes al mismo género y especie de los tejidos tumorales de las especies a estudiar en este trabajo.

Los tejidos controles se obtuvieron de ejemplares pertenecientes a la misma colección de ofidios de la Udelar (con la misma alimentación y condiciones de macroambiente), a todos ellos se les realizó un estudio previo y revisión de historia clínica, de manera de verificar que los animales no padecían ninguna patología y luego se sometieron a eutanasia usando una única inyección en bolo, por vía intra-celómica de Euthanyl® 8 mg/kg. Se procedió inmediatamente a la necropsia, confirmando macroscópicamente la ausencia de tumores cavitarios que no se hubieran identificado desde el exterior. Se tomaron muestras de diferentes tejidos (hígado, riñón, músculo esquelético e intestino delgado) y se fijaron en formol al 10% tamponado (pH = 7.4), procesándose de igual forma que las muestras de tumores.

En una primera etapa, se validó el mismo panel de anticuerpos en el laboratorio de la Unidad Académica de Patología de la FVET-Udelar, repitiendo este protocolo durante una pasantía del autor en el Instituto Adolpho Lutz (IAL), Sao Paulo, Brasil. En ambos laboratorios, los anticuerpos primarios usados fueron: Anti-AE1 / AE3 monoclonal (dilución 1: 1,000; Biocare Medical, Concord, California, EE. UU.), anti-S100 policlonal (dilución 1:10.000; Dako, Carpintería, California, EE. UU.), anti-desmina monoclonal (dilución 1:3.000; Dako, Carpintería, California, EE. UU.), anti-vimentina monoclonal (dilución 1:3.000; Dako, Carpintería, California, EE. UU.), anti-factorVIII policlonal (dilución 1:1000; Biocare Medical, Concord, California). Se usó como control positivo intestino delgado de uno de los individuos del género *Bothrops* comentados en el párrafo anterior. Como control negativo, se sustituyó el anticuerpo

primario correspondiente por PBS, continuando el proceso de igual forma a la descrita para el protocolo de inmunohistoquímica de rutina.

En una segunda etapa se validó un segundo panel de anticuerpos, integrado por: anti-CD 57 -anti-clúster de diferenciación-, monoclonal (dilución 1:400; Novocastra-Leica, Nussloch, Alemania), anti-ACTA2 monoclonal, clon IA4, contra péptido sintético de ACTA2 que detecta actinas (dilución 1:1.000; Thermo Scientific Lab Vision, Rockford, Illinois, EE. UU.), anti-Iba1, policlonal IgG1 de conejo (dilución 1: 500; Wako Pure Chemical, Richmond, VA, EE. UU), anti-CD 36 (dilución 1:1000, Biorad, UK).

5.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El estudio se realizó con el apoyo técnico y bajo la supervisión del Prof. Dr. Kosuke Okada (Experto Sénior de la Agencia de Cooperación Internacional del Gobierno de Japón, JICA) en el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 100CXII (JEOL, Japón) de la Plataforma de Microscopía Electrónica de Transmisión del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Ministerio de Educación y Cultura, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay) y en la Facultad de Veterinaria de la UC Davis con el apoyo técnico del Prof. Dr. Francisco Uzal. La técnica se describe brevemente en el anexo V.

5.6 Análisis estadístico

Las comparaciones de la incidencia de tumores entre grupos de la población estudiada se realizaron mediante el test de *t* y la prueba de Chi-cuadrado con 1 grado de libertad (1 g. l.), considerando diferencias significativas con $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 CASUÍSTICA GENERAL

De los 19 ejemplares analizados, 9 presentaron múltiples neoplasias que iban desde 2 a 9 por animal, y 8 una única. De las 48 muestras estudiadas, 25 eran de localización sub-cutánea, 22 intra-celómicas y una oral. De las 43 que fueron diagnosticadas como neoplasias, 34 eran de origen mesenquimático, 9 de origen epitelial, completando el total de las muestras 4 granulomas y una metaplasia ósea, 37 de ellas (86%) resultaron malignas y 6 (14%), benignas. No se diagnosticaron neoplasias de origen epitelial en *B. alternatus*.

6.1.1 Tasa anual de aparición de tumores.

Para el cálculo de la tasa anual de aparición de tumores en la población se tuvo en cuenta la cantidad de individuos por especie, calculada con el número de individuos presentes al comienzo de cada año y el número de casos que se produjo para cada especie. La frecuencia anual de aparición de tumoraciones fluctuó entre 0 y 0.04 para ambas especies, Tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia de tumores observados durante el período de estudio en *Bothrops alternatus* y *Bothrops pubescens*.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<i>B. pubescens</i>	93	76	69	66	65	61	61	57	55	52	47	45
Casos	1	2	2	1	1	2	1	0	1	0	2	1
Tasa	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0	0.02	0	0.04	0.02
<i>B. alternatus</i>	36	34	37	46	48	58	68	53	53	51	49	46
Casos	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Tasa	0	0.03	0.03	0.02	0.02	0	0	0	0	0.02	0	0
Total	129	110	106	112	113	119	129	110	108	103	96	91
Total casos	1	3	3	2	2	2	1	0	1	1	2	1

6.1.2 Casos por especie y sexo.

De los 19 individuos estudiados, 5 pertenecieron a la especie *B. alternatus* y 14 a *B. pubescens*, y a su vez 9 eran machos y 10 hembras. La edad de los animales estuvo entre los 6 y 14 años, con una media de 9,3 años (Tabla 2). Las edades no mostraron diferencias significativas (test *t*) entre machos y hembras de cada especie, y en la muestra general.

Tabla 2. Edad en años de individuos estudiados discriminados por especie y sexo. Los datos son la media \pm d. s. (rango).

Especie	Sexo	Edad
<i>B. alternatus</i>	♂ (n = 2)	9,0 (6–12)
	♀ (n = 3)	9,3 \pm 3,5 (6–13)
<i>B. pubescens</i>	♂ (n = 7)	8,6 \pm 2,6 (6–13)
	♀ (n = 7)	10,0 \pm 2,2 (8–14)
Total	19	9,3 \pm 2,6 (6–14)

6.1.3 Parentesco y tumores en *B. pubescens*

Durante el período de estudio (2007-2018) un grupo familiar de *Bothrops pubescens* presentó una casuística llamativamente alta de aparición de tumores. Un ejemplar hembra (N289) produjo dos camadas con un mismo ejemplar macho (N290), y de un total de 13 individuos pertenecientes a esta familia mantenidos en el bioterio, 7 ejemplares desarrollaron tumores. El ejemplar macho N290 también desarrolló tumores que no fueron parte de este estudio. Sin tener en cuenta a este progenitor, y considerando conservadoramente una población general promedio de 62 individuos de la especie durante el período de estudio, la frecuencia de tumores entre los ejemplares emparentados es fuertemente significativa, tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de aparición de tumores en individuos de *B. pubescens* en relación al parentesco.

	Parientes	No parientes
Tumores	7	7
Sin tumores	6	62
χ^2 : p = 0,0001		

6.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS TUMORES

Los tumores encontrados presentaban características macroscópicas muy variadas, su tamaño iba desde pocos mm de diámetro, hasta masas de 7 x 5 cm. Su forma también fue variable, encontrándose masas de superficie lisa y uniforme, redondeados de superficie abollonada, hasta masas de forma y superficie irregular. Generalmente, los más pequeños presentaban consistencia firme (Fig. 2), mientras que aquellos de más de 3 cm. de diámetro presentaban una cavidad quística central y fluctuante, la que al ser cortada presentaba contenido líquido y tejido necrótico (Fig. 3). El tumor N254 C desarrolló un tamaño tal, que comprimió al hígado produciendo en la superficie del mismo una impronta, lo mismo, pero de menor tamaño fue visto en el tumor N254 D, que se desarrolló en la superficie del estómago (Fig. 4).

En 5 individuos de los animales operados, se presentaron recidivas, las mismas ocurrieron entre los 5 y 13 meses posteriores a la cirugía.

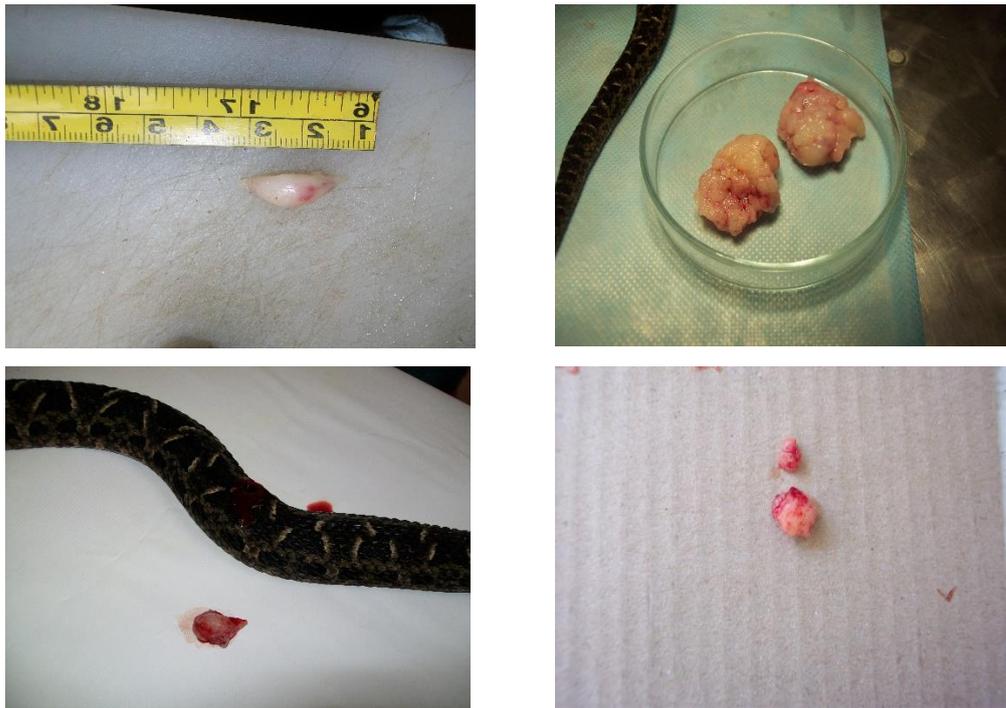


Fig. 2. Tumores pequeños de consistencia maciza.

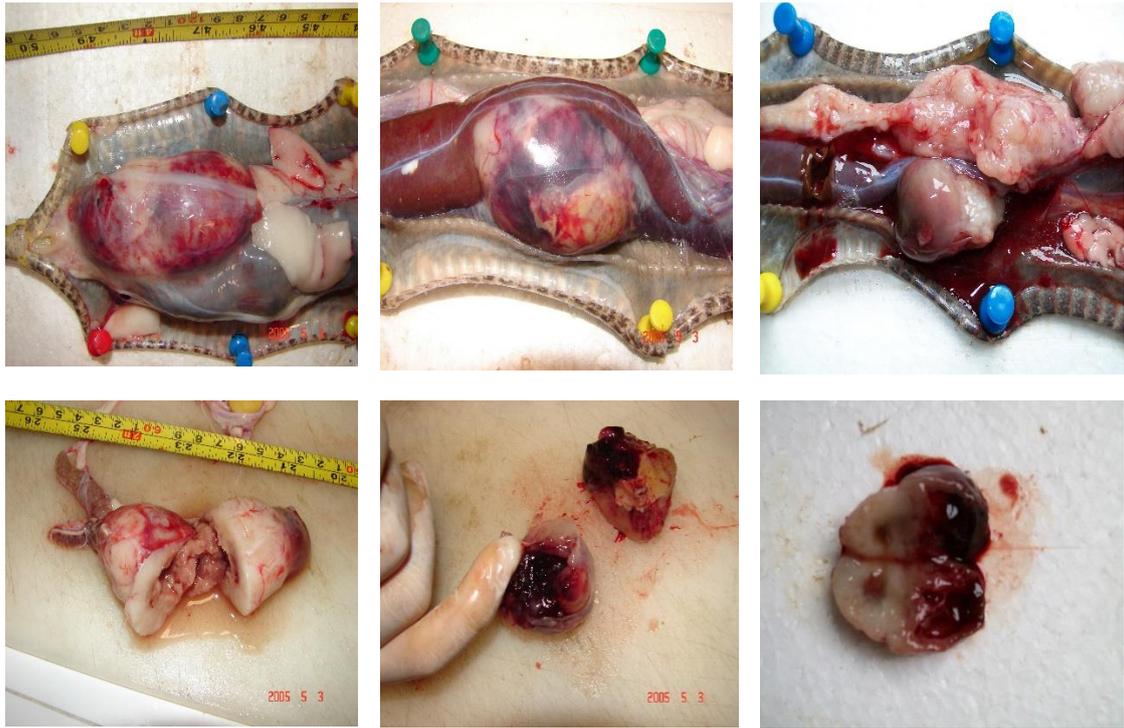


Fig.3. Tumores de gran tamaño con contenido de líquido y tejido necrótico.



A

B

Fig. 4. *Bothrops pubescens* (Yara) N254. (A) muestra N254C. (B) muestra N254D.

6.3 HISTOPATOLOGÍA (HE)

Se estudiaron 48 muestras de tumores provenientes de 19 individuos, 41 muestras de *B. pubescens* y 7 muestras de *B. alternatus*. Del estudio se pudo determinar que 42 eran neoplasias de origen mesenquimático, mientras que 1 era de origen epitelial, y la restante, presentaba tal complejidad tisular que no permitió identificar su estirpe celular original. A su vez, 4 de las muestras no eran neoplasias, correspondiendo, 2 de ellas, a granulomas, y las otras 2, a metaplasias (Ver Tabla 4).

Dentro de las neoplasias de origen mesenquimático, 32 muestras se diagnosticaron como sarcomas de tejidos blandos (STB), 1 mielolipoma, 1 fibrosarcoma, 2 hemangiomas, 1 melanoma, 2 tumores de la vaina de nervios periféricos –PNST- y 3 hemangiosarcomas (Ver tabla 4).

La única neoplasia diagnosticada como epitelial fue un carcinoma de células escamosas, la muestra estudiada por los primeros patólogos mostraba estructura de granuloma, se procesaron posteriores muestras más profundas, y los cortes más profundos dejaron en evidencia la lesión carcinomatosa.

Varias de las neoplasias estudiadas presentaban como característica la presencia de vacuolas tanto intra- como inter-citoplasmáticas (Fig. 5), y otra característica común a varios tumores y órganos estudiados fue la presencia de abundantes heterófilos maduros e inmaduros infiltrando los tejidos (Fig. 6 y Fig. 7).

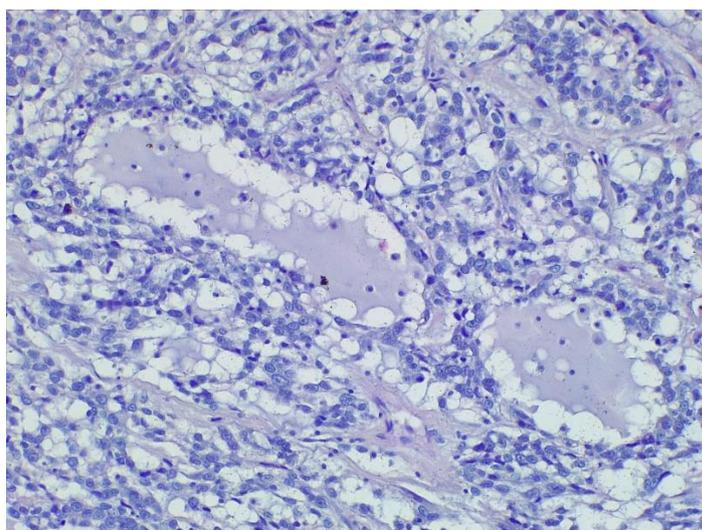


Fig. 5. Vacuolas intra- e inter-citoplasmáticas en tumor. HE, 40X.

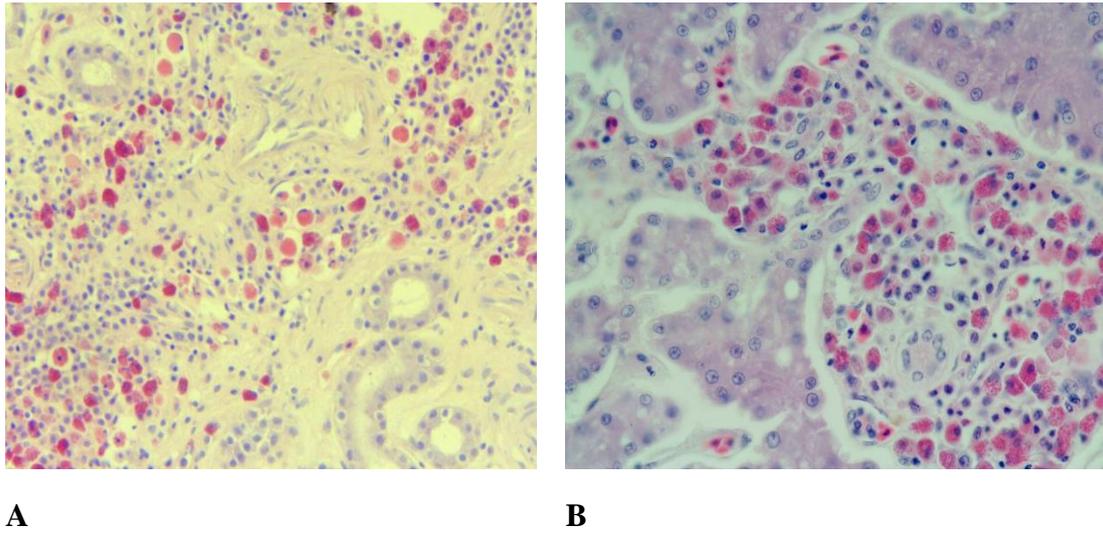


Fig. 6. Infiltrado de heterófilos en órganos. A) Riñón. B) Hígado. HE, 10X.

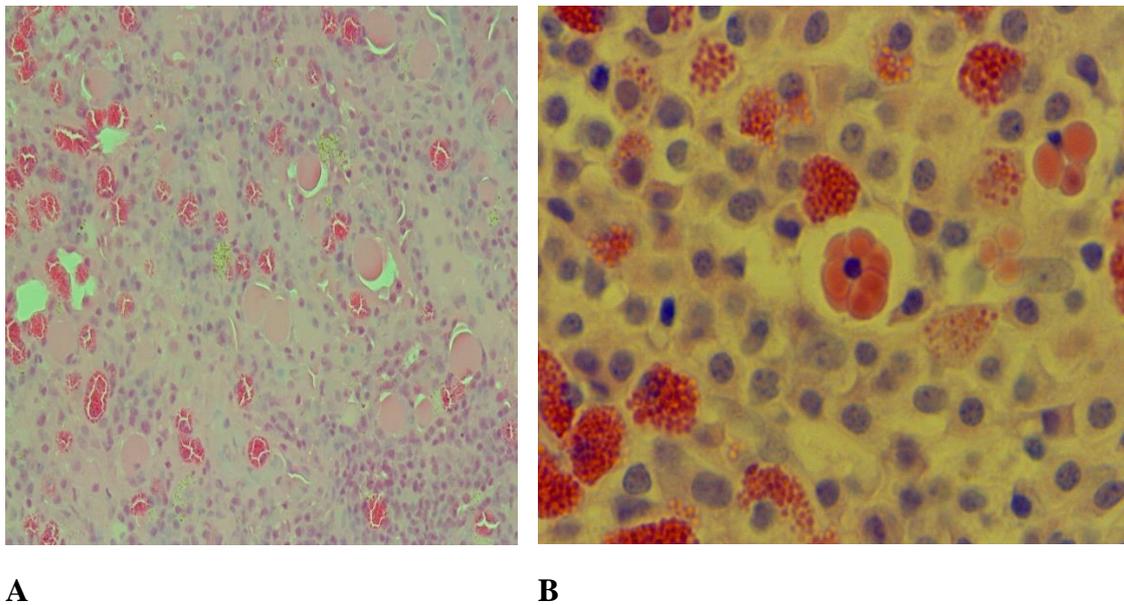
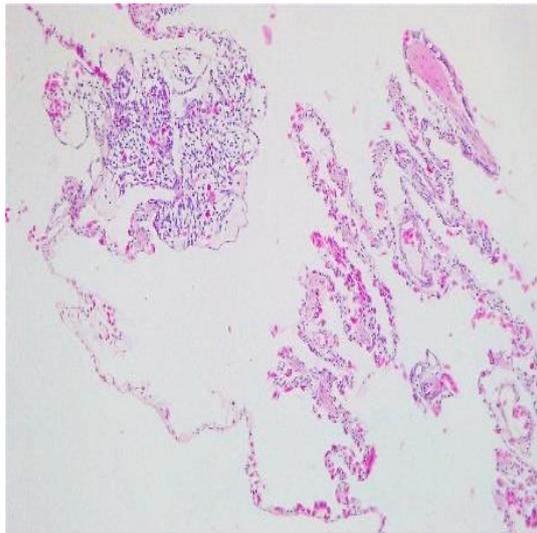
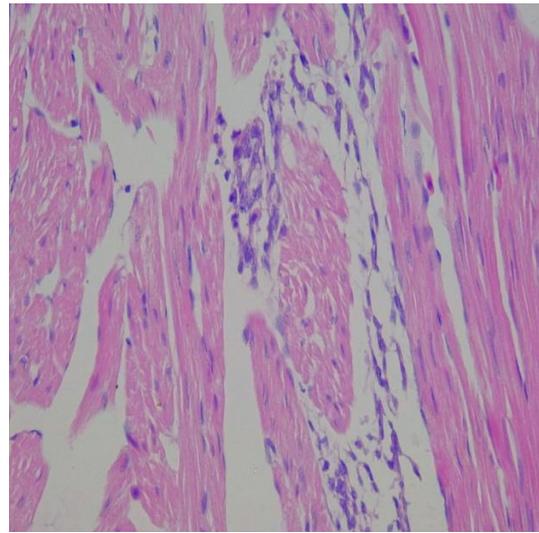


Fig 7. Detalle de grupos de heterófilos. A. HE 40X. B. HE 100X.

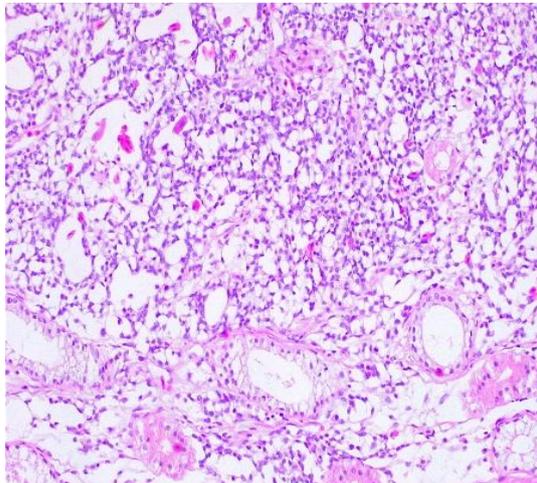
Se estudiaron 55 muestras de órganos de 11 individuos encontrándose metástasis en 7 de ellas. En uno de estos casos (#18 -N137) se observaron varias metástasis implantadas en pulmón, corazón, riñón, hígado (Fig. 8) y en tiroides, observándose émbolos metastásicos en vasos sanguíneos. En el ejemplar N274 se encontró metástasis en ambos riñones. Estos datos se resumen en la tabla 7.



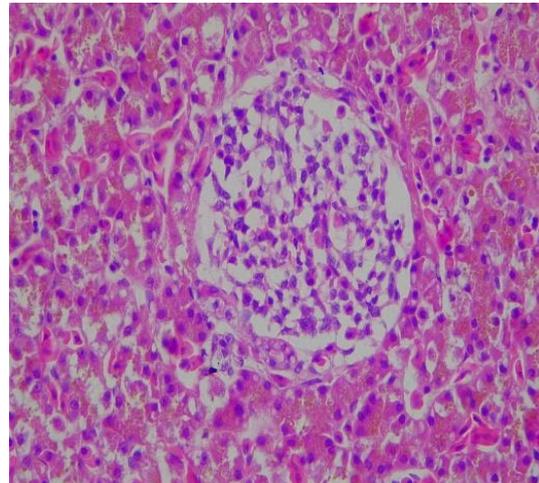
A



B



C



D

Fig. 8. *Bothrops pubescens* (Yara) N137. Metástasis. A) Pulmón. HE, 10X. B) Corazón. HE, 40X. Riñón. HE, 10X. C) Pulmón, detalle ampliado de A). HE, 40X. D) Hígado. HE, 40X.

6.4 VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS

Primera etapa (Vimentina, Desmina, Citoqueratinas, Factor VIII, S-100)

Los anticuerpos vimentina, desmina, factor VIII y S-100 no mostraron marcación ninguna.

Las citoqueratinas mostraron una fuerte marcación en todas las muestras, pero también fue el anticuerpo que más marcación inespecífica mostró en las muestras en general.

Resultados idénticos se registraron con este mismo panel en el instituto Adolpho Lutz, de São Paulo, Brasil.

Segunda etapa

En el estudio mediante el segundo panel los anticuerpos 1A4 (Fig. 9), Iba1 (Fig. 10), y CD57 (Fig. 11) mostraron fuerte marcación, mientras que CD36 no mostró ninguna marcación.

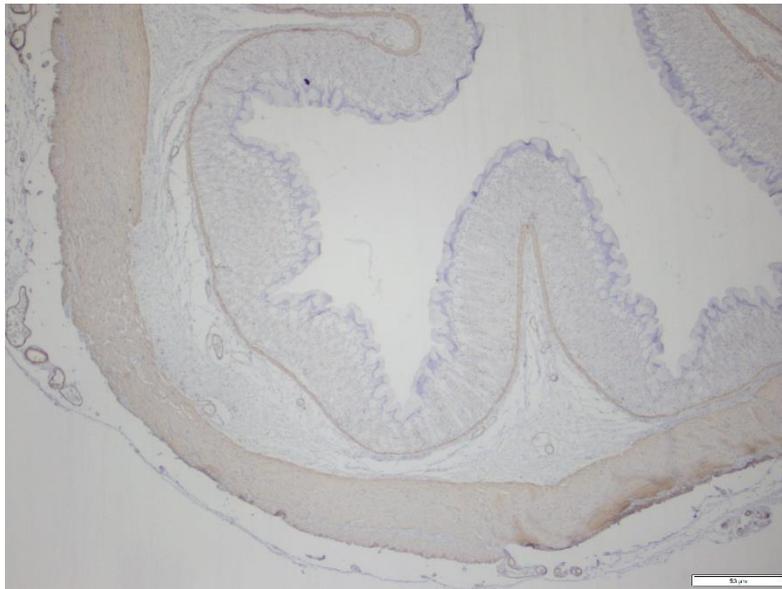
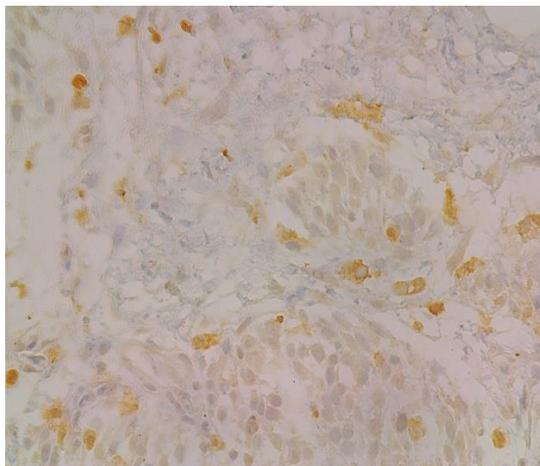
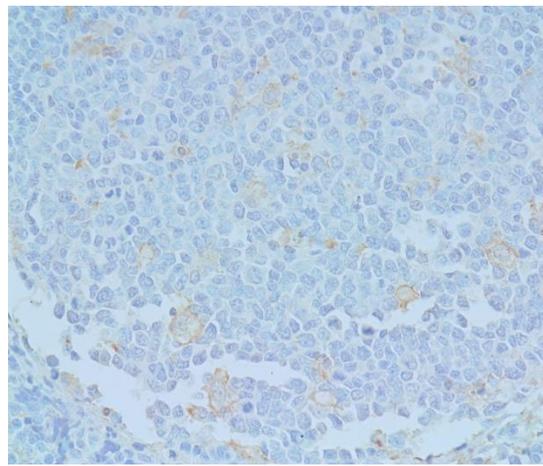


Fig. 9. Intestino, *Bothrops*. IHQ 1A4, 10X.

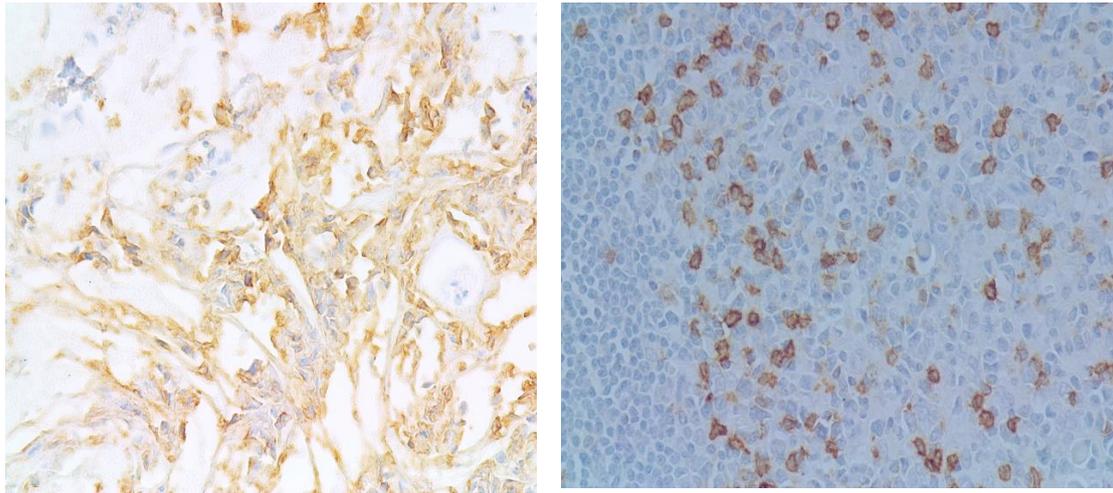


A



B

Fig. 10. *Bothrops pubescens* (Yara) N255. GranulomaA). IHQ Iba1,40X. B) Control positivo mamífero.



A

B

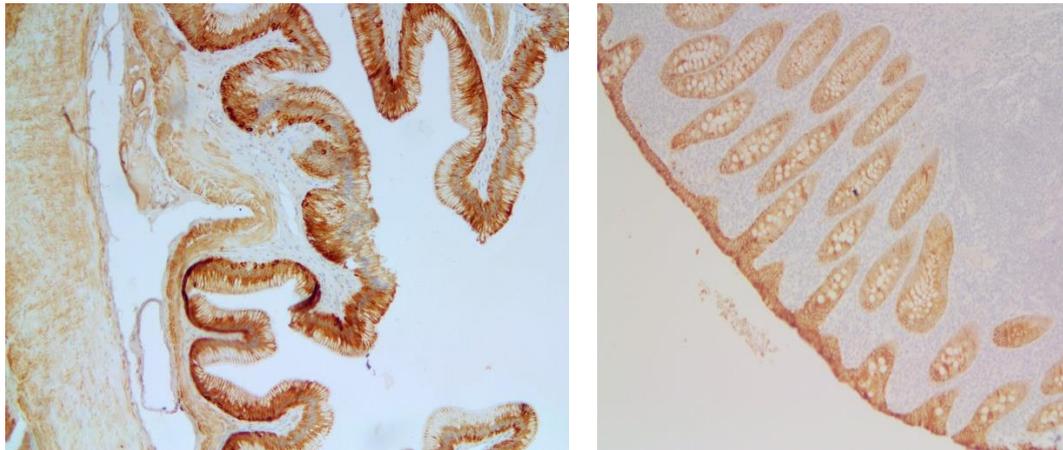
Fig. 11. *Bothrops alternatus* (Crucera) A81A. PNST. A) IHQ CD57, 40X. B) Control positivo (tejidos de mamífero).

6.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

De las 48 muestras estudiadas con los distintos paneles usados se llegó a un diagnóstico definitivo de 16 tipos diferentes de neoplasias, las más comunes fueron: sarcomas de partes blandas (sarcoma indiferenciado / no caracterizado) STB (n = 8), leiomioma (n = 4) (Fig. 5), PNST (n = 7), fibrosarcoma (n = 1), carcinomas (n = 8), vasculares (hemangioma (n = 2) , hemangiosarcoma (n = 3), osteosarcoma telangiectásico (n = 2), melanoma (n =1), tumor de pared perivascular (n = 1), condroma (n = 1), mielolipoma hepático (n = 1), rhabdomiosarcoma (n = 1), mixosarcoma (n = 1), adenoma (n = 1) y fibroma (n = 1).

A continuación, se muestran los principales hallazgos asociados a los diagnósticos realizados en cada caso, que se contrastarán con reportes anteriores en la discusión. Todos los resultados inmunohistoquímicos mostrados en esta sección, así como el tipo de neoplasia diagnosticada se resumen en la tabla 4.

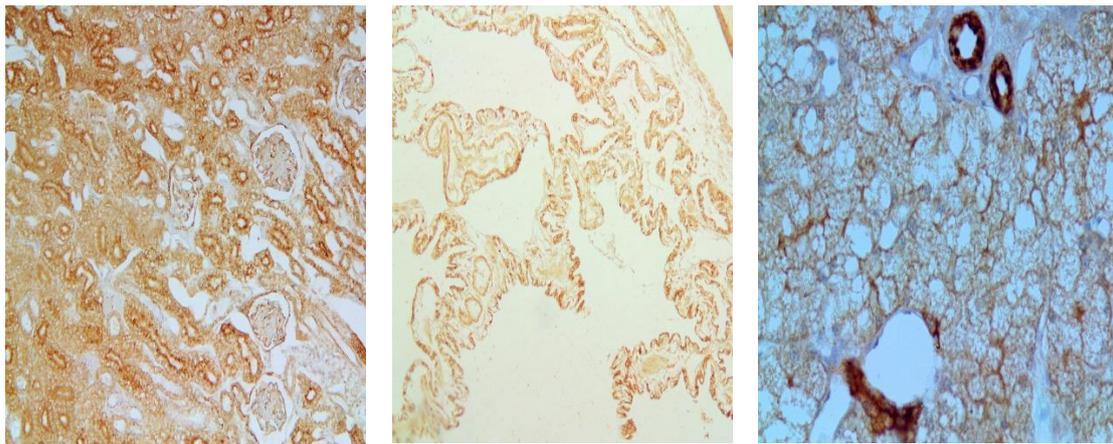
Inmunomarcación contra Citoqueratinas en controles de *Bothrops* y mamífero



A

B

Fig. 12. IHQ contra citoqueratinas. A) Control reptil (tubo digestivo normal *Bothrops*), 10X. B) Control mamífero, 10X.



A

B

C

Fig. 13. IHQ AE1/AE3. A) Riñón. *Bothrops*. 40X. B) Pulmón. *Bothrops*. 40X. C) Hígado. *Bothrops*. 40X.

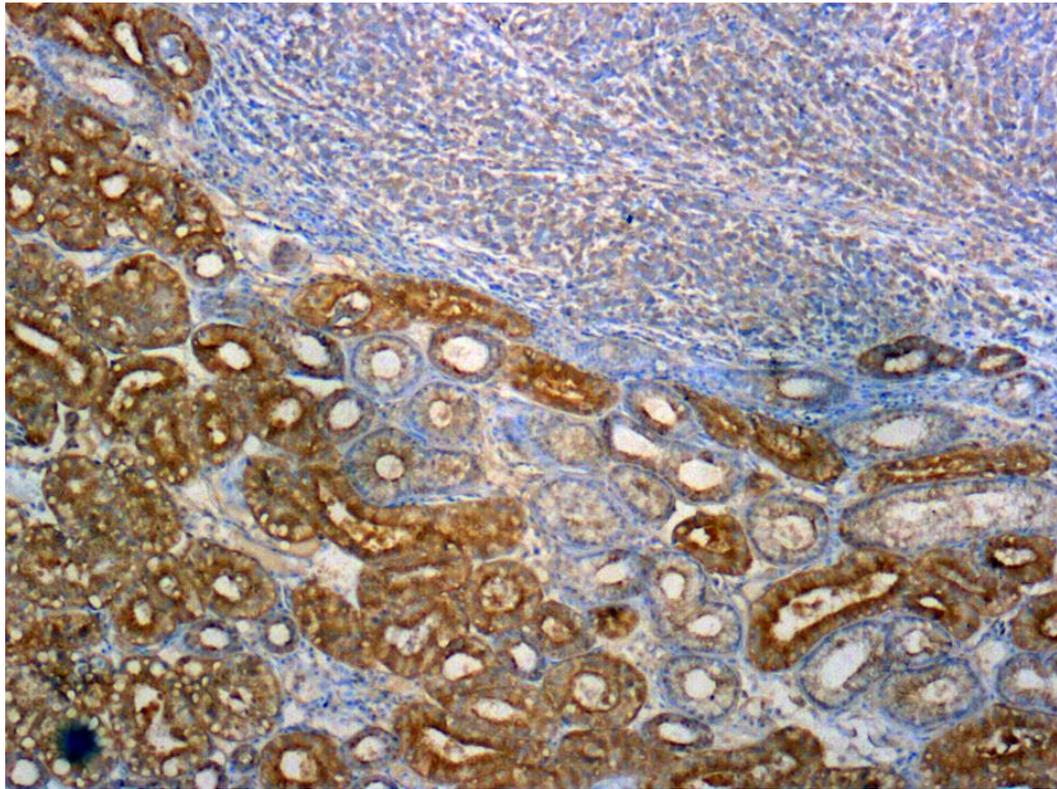


Fig. 14. *Bothrops pubescens* (Yara) N274. Metástasis renal. IHQ AE1/AE3, 40X.

Diagnóstico histopatológico de PNST por HE e Inmunomarcación contra CD57

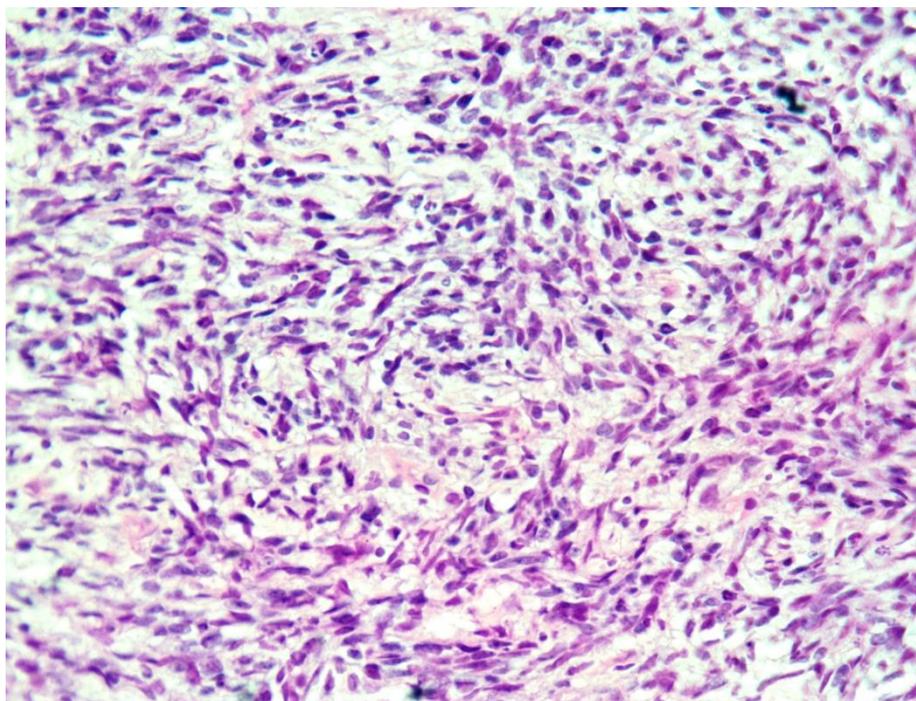


Fig. 15. *Bothrops alternatus* (Crucera) A81. PNST. HE, 10X.

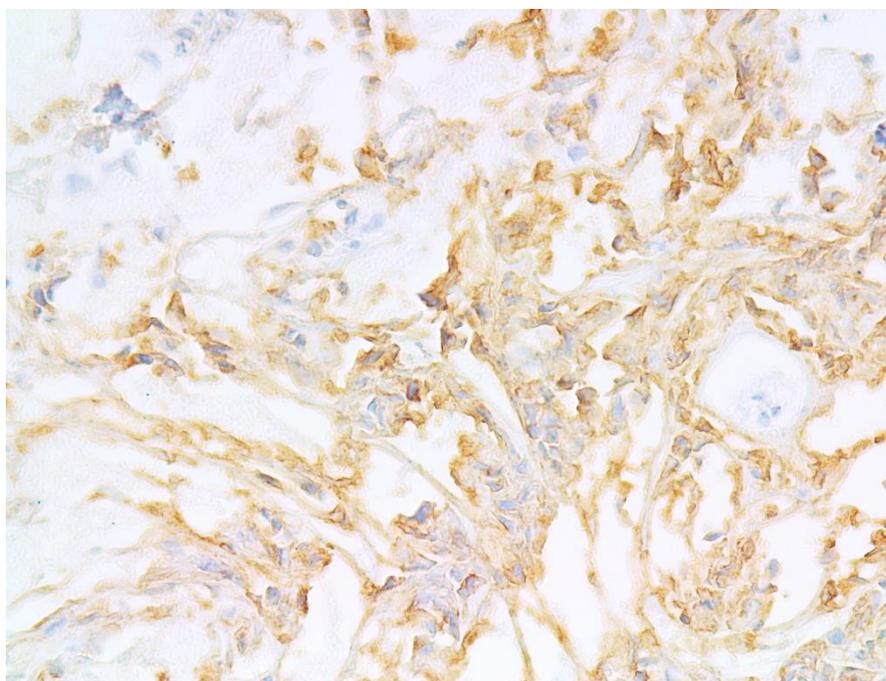


Fig. 16. *Bothrops alternatus* (Crucera) A81. PNST. IHQ CD57, 40X.

Diagnóstico histopatológico de leiomiosarcoma por HE e inmunomarcación contra 1A4



A



B

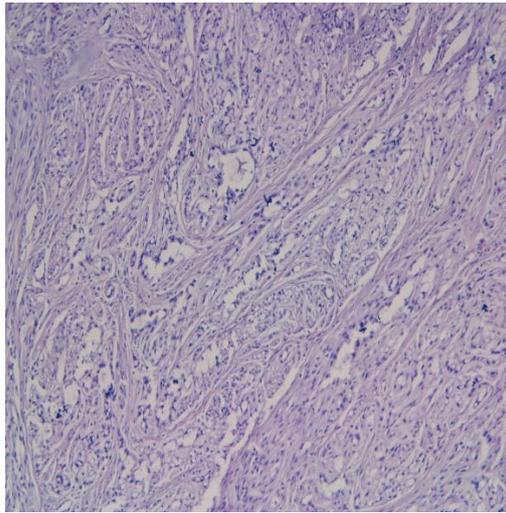


C

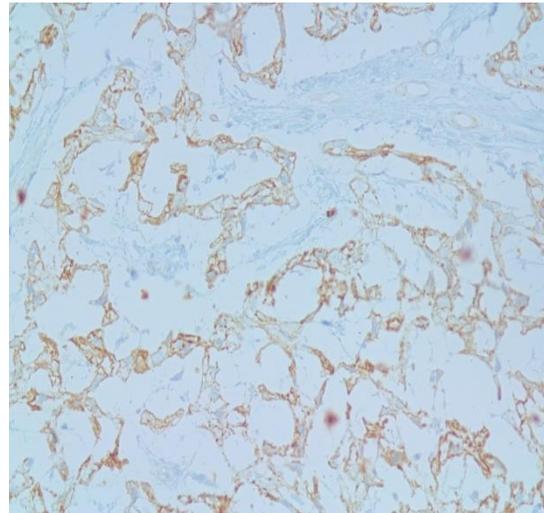


D

Fig. 17. *Bothrops pubescens* (Yara) N254. Similitud macroscópica de los múltiples tumores de este caso.



A



B

Fig. 18. *Bothrops pubescens* (Yara) N254. Leiomyosarcoma. A) HE, 10X. B) IHQ 1A4, 40X

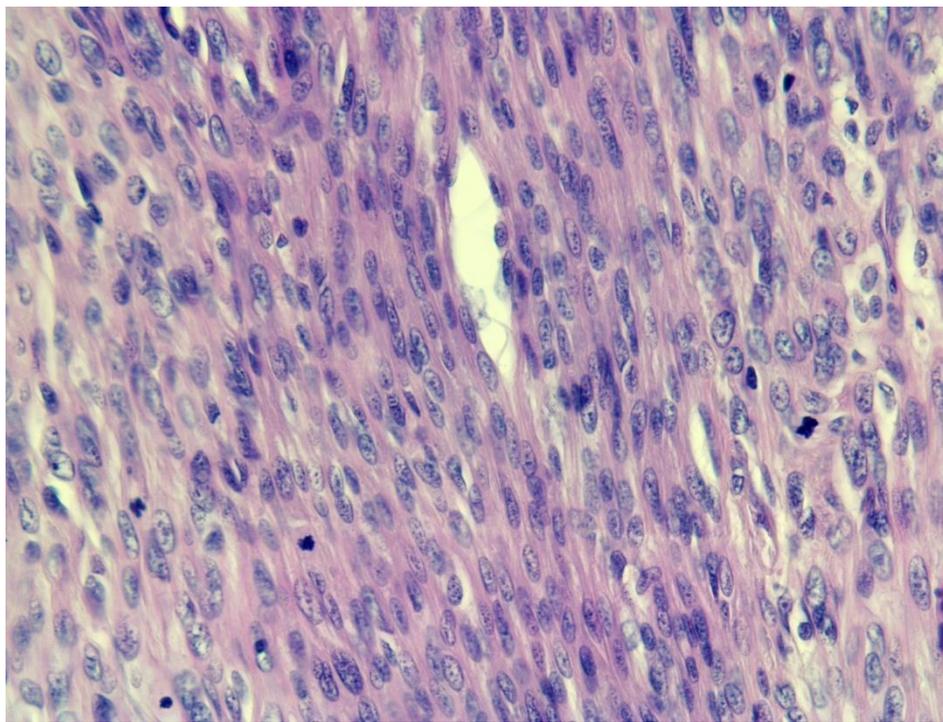
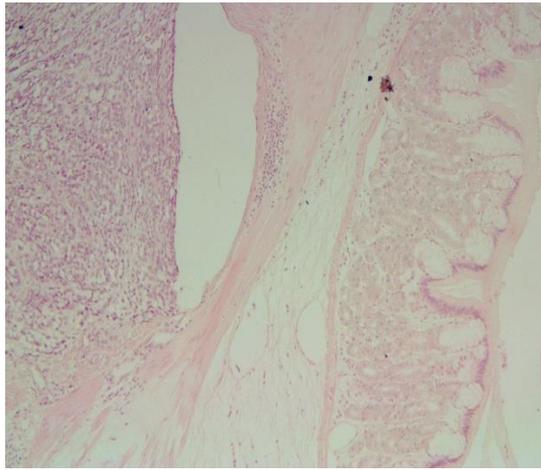
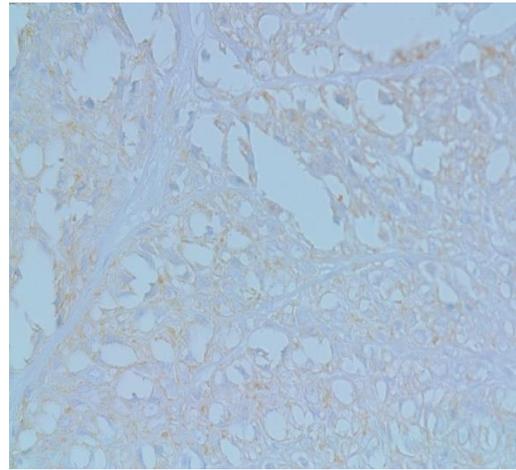


Fig. 19. *Bothrops pubescens* (Yara) N254D. Leiomyosarcoma. Detalle de abundancia de figuras mitóticas por campo de alta resolución (HPF). HE, 40X.

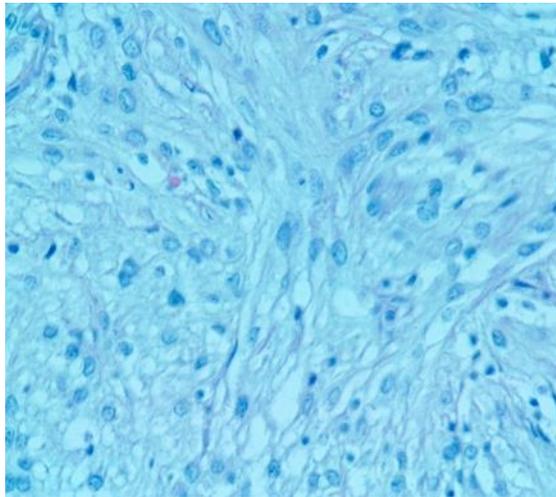


A

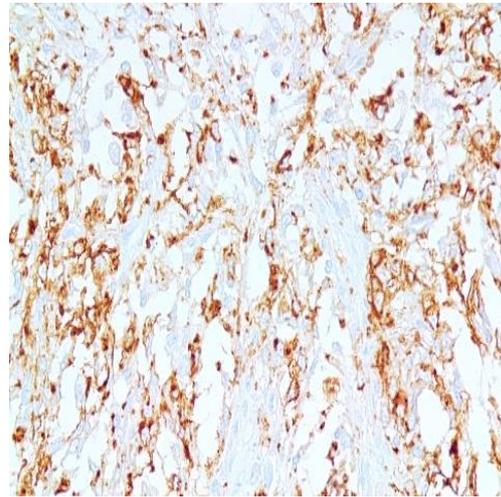


B

Fig. 20. *Bothrops pubescens* (Yara) N254D. Leiomyosarcoma. A) HE, 10X. B) IHQ IA4, 40X.



A



B

Fig. 21. *Bothrops pubescens* (Yara) N254G. Leiomyosarcoma. A) HE, 40X. B) IHQ 1A4. 40X.

Diagnóstico histopatológico de tumores vasculares por HE

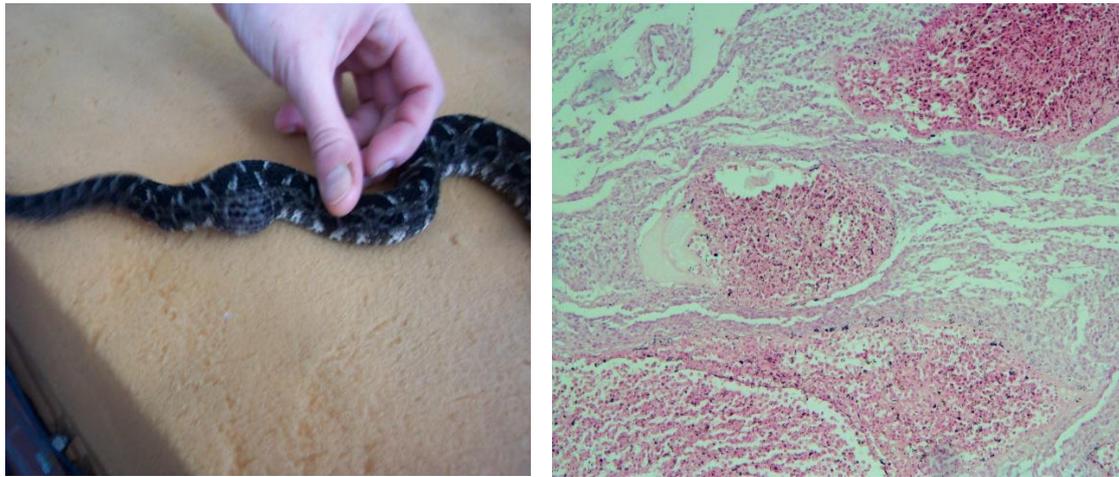


Fig. 22. *Bothrops pubescens* (Yara) N134. Hemangioma. Aspecto Macro y microscópico. HE, 40X.

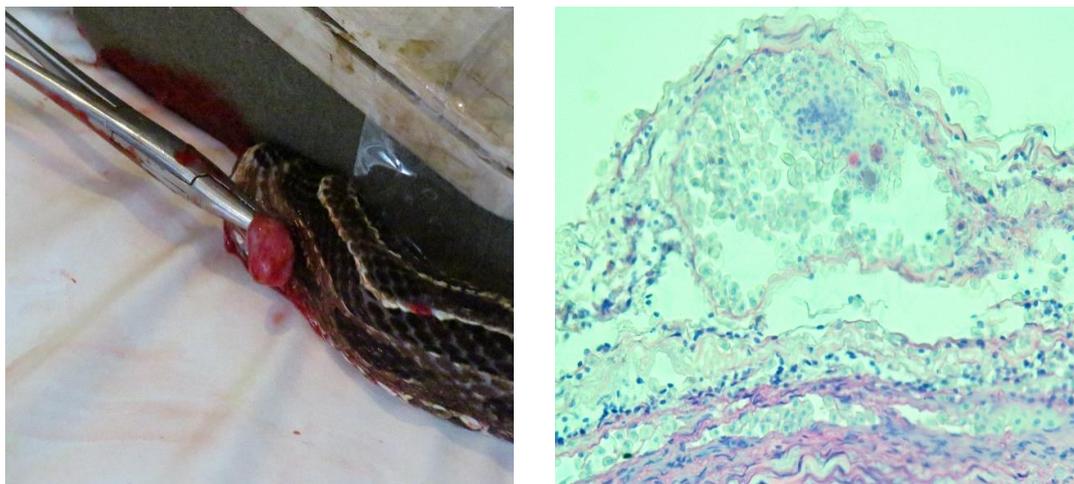


Fig. 23. *Bothrops pubescens* (Yara) N299. Hemangiosarcoma. Aspecto macro y microscópico. HE, 40X.

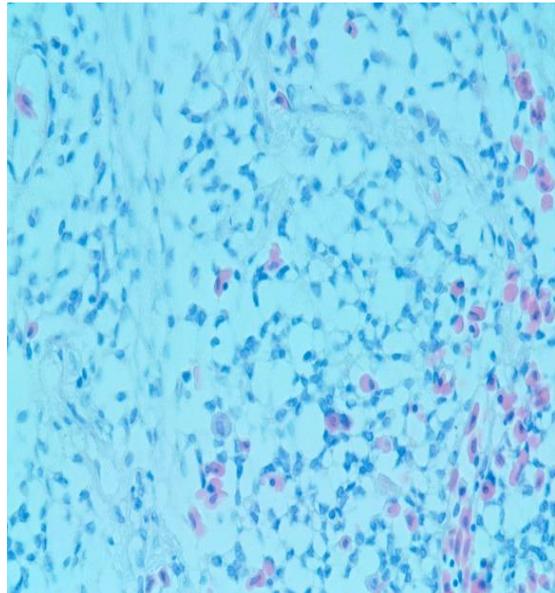
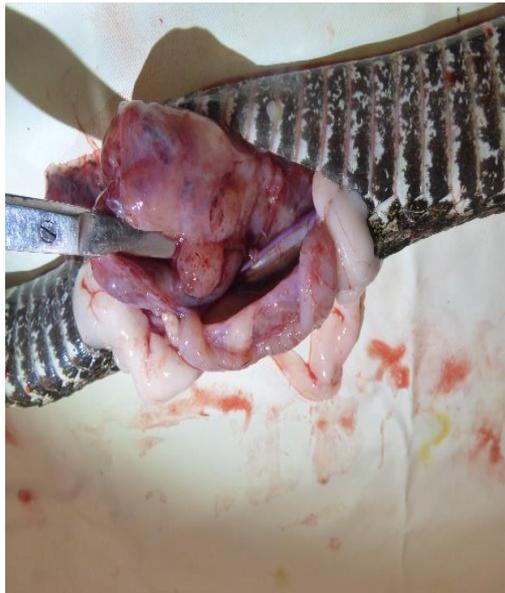


Fig. 24. *Bothrops pubescens* (Yara) N137. Hemangiosarcoma. Aspecto macro y microscópico. 40X.

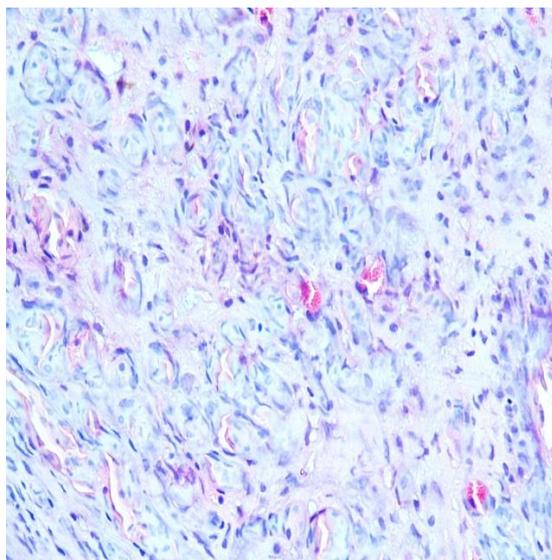
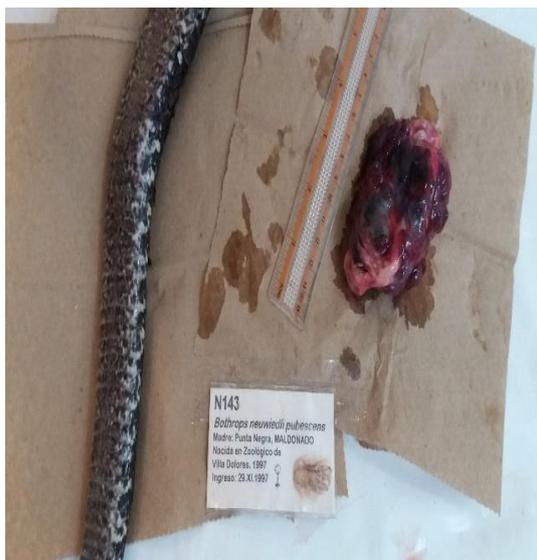


Fig. 25. *Bothrops pubescens* (Yara) N143. Hemangiosarcoma. Aspecto macroscópico y microscópico. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de fibrosarcoma por HE



Fig. 26. *Bothrops pubescens* (Yara) N254I. Fibrosarcoma. Aspecto macro y microscópico. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de rabdomyosarcoma por HE

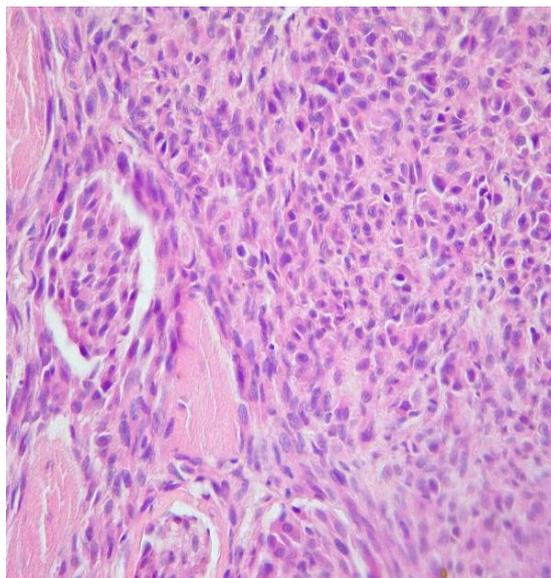


Fig. 27. *Bothrops pubescens* (Yara) N203. Rbdomiosarcoma. Aspecto Macro y microscopico. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de mixosarcoma por HE

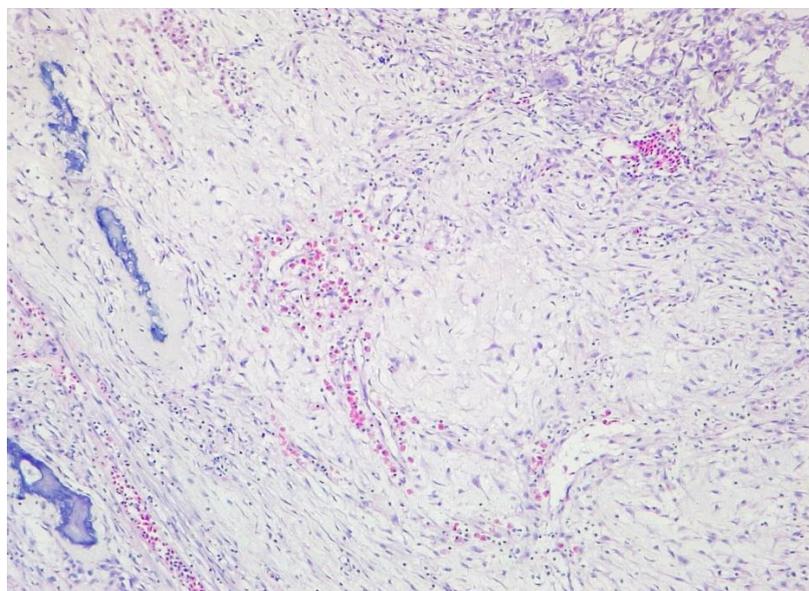


Fig. 28. *Bothrops alternatus* (Crucera) A313. Mixosarcoma. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de hemangiopericitoma por HE



Fig. 29. *Bothrops pubescens* (Yara) N121A. Hemangiopericitoma. Aspecto macroscópico.

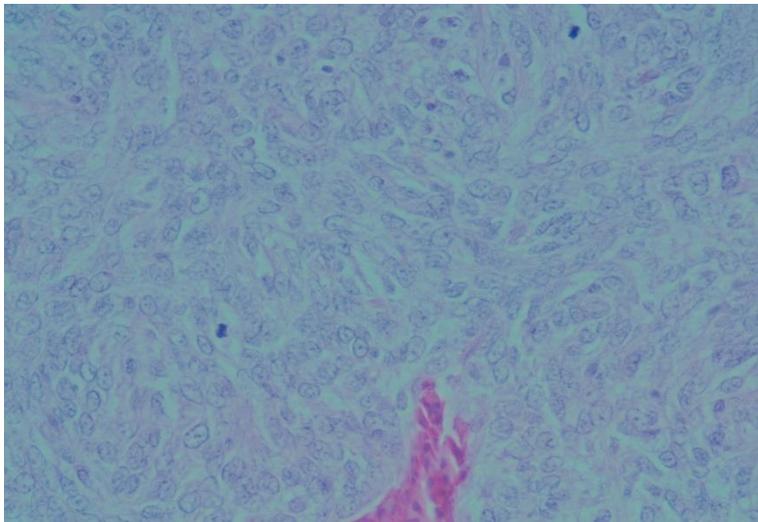


Fig. 30. *Bothrops pubescens* (Yara) N121A. Hemangiopericitoma. Detalle de abundancia de figuras mitóticas por campo de alta resolución (HPF). HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de osteosarcoma telangiectásico por HE

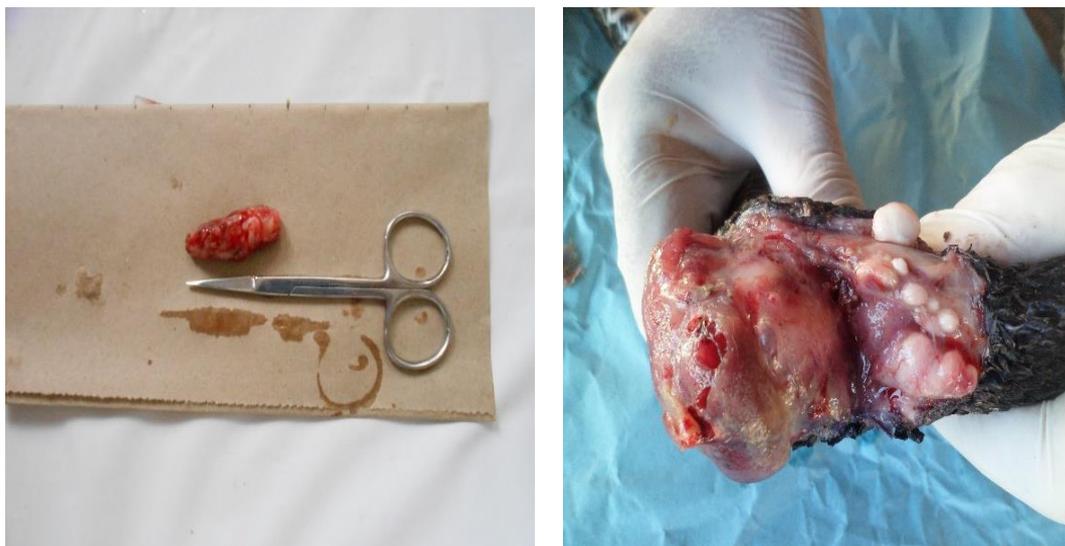


Fig. 31. *Bothrops pubescens* (Yara) N199. Osteosarcoma. Aspecto macroscópico del tumor y la recidiva.

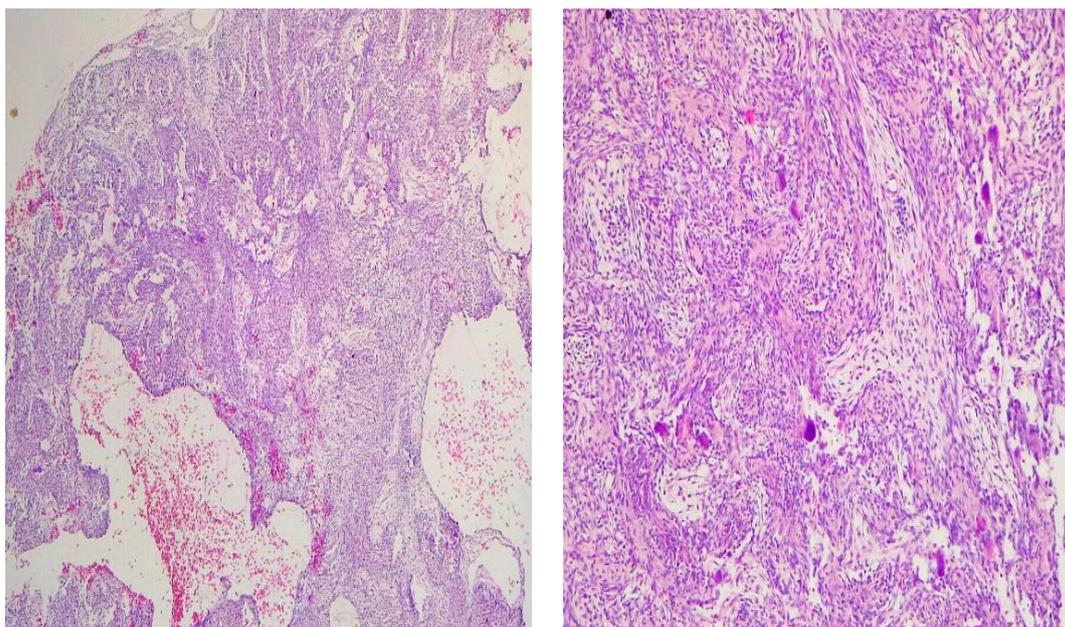


Fig. 32. *Bothrops pubescens* (Yara) N199. Osteosarcoma telangiectásico. Caso N199. HE, 4X y 40X.

Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico de múltiples tumores en el mismo individuo (caso 274)

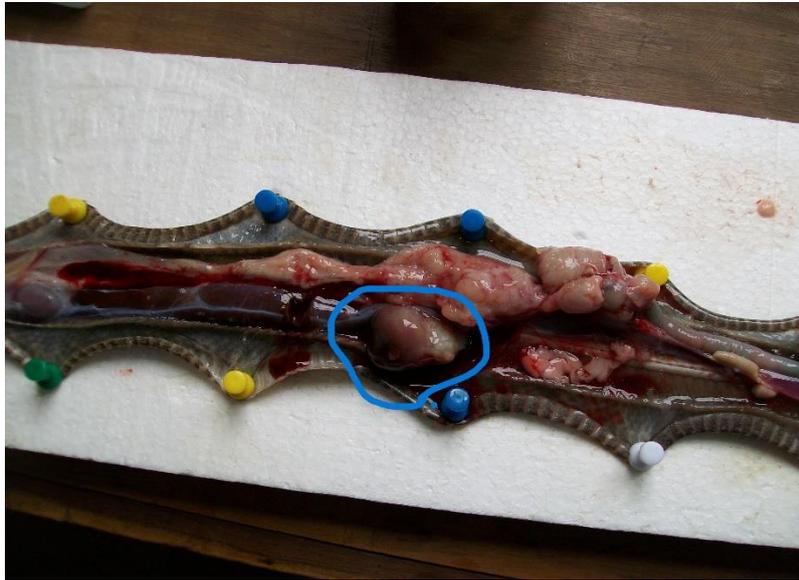


Fig. 33. *Bothrops pubescens* (Yara) N274A. Masa tumoral que ocupa lugar del esplenopáncreas. Aspecto macroscópico.



Fig. 34. *Bothrops pubescens* (Yara) N274D. 99Lipoma. Aspecto macroscópico e IHQ Citoqueratina, 40X.



Fig. 35. *Bothrops pubescens* (Yara) N274. Metástasis en ambos riñones. Aspecto macroscópico.

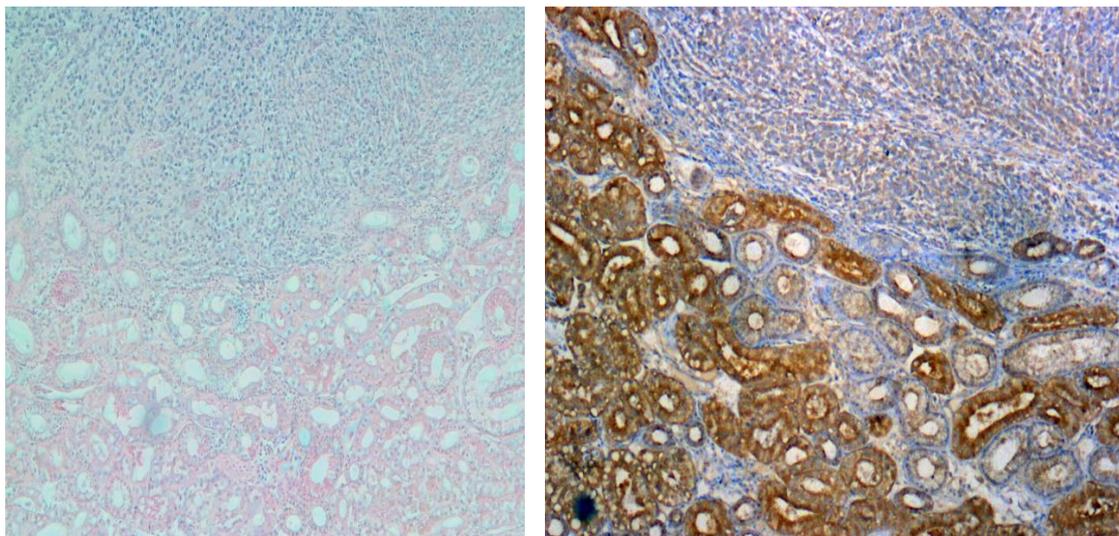


Fig. 36. *Bothrops pubescens* (Yara) N274. Metástasis renal. HE, 40X e IHQ Citoqueratina, 40X.

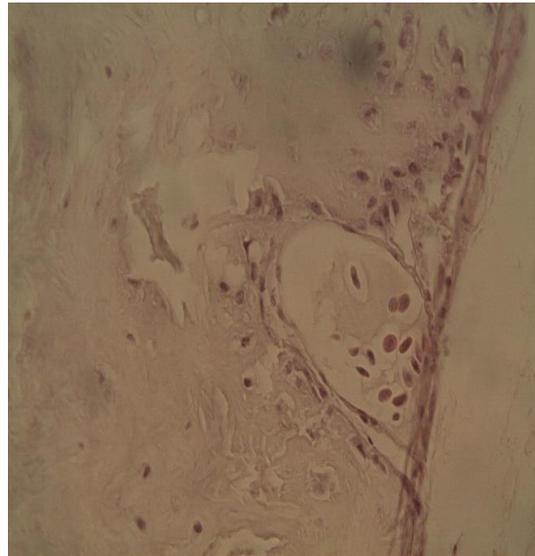


Fig. 37. *Bothrops pubescens* (Yara) N274E. Condroma. Aspecto macroscópico y microscópico. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de mielolipoma por HE

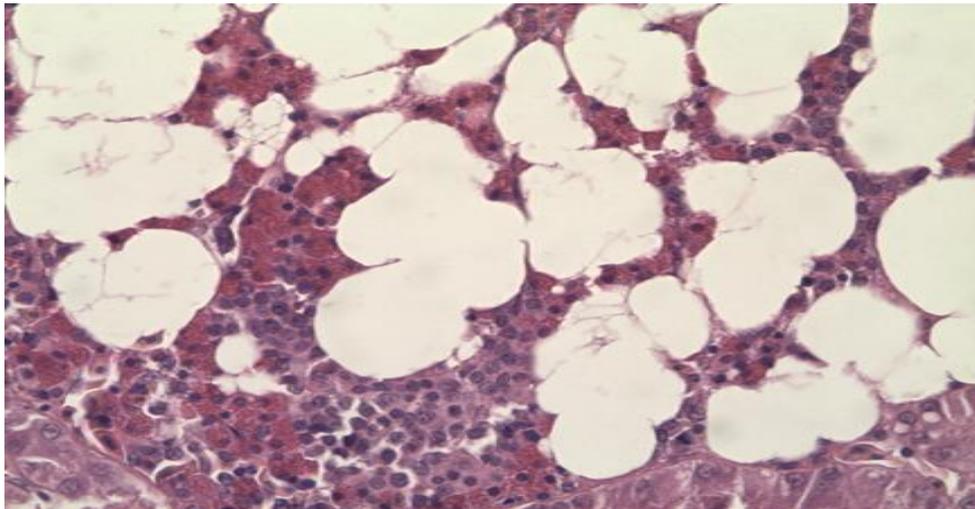


Fig. 38. *Bothrops pubescens* (Yara) N254B. Mielolipoma. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de metaplasia ósea por HE

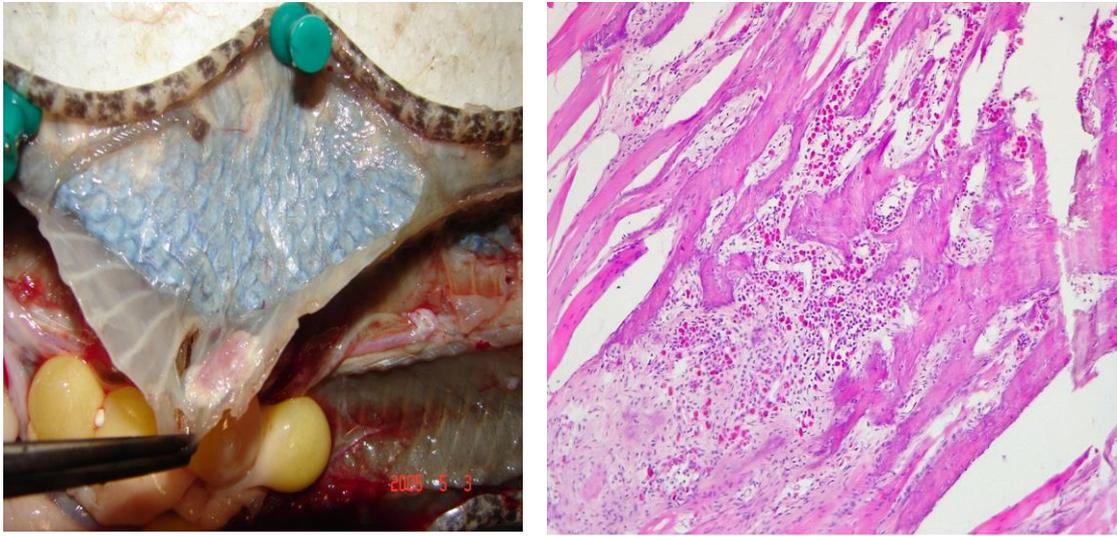


Fig. 39. *Bothrops pubescens* (Yara) N254H. Metaplasia ósea. Aspecto macro y microscópico. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico de melanoma por HE



Fig. 40. *Bothrops pubescens* (Yara) N258. Melanoma. Aspecto macroscópico.

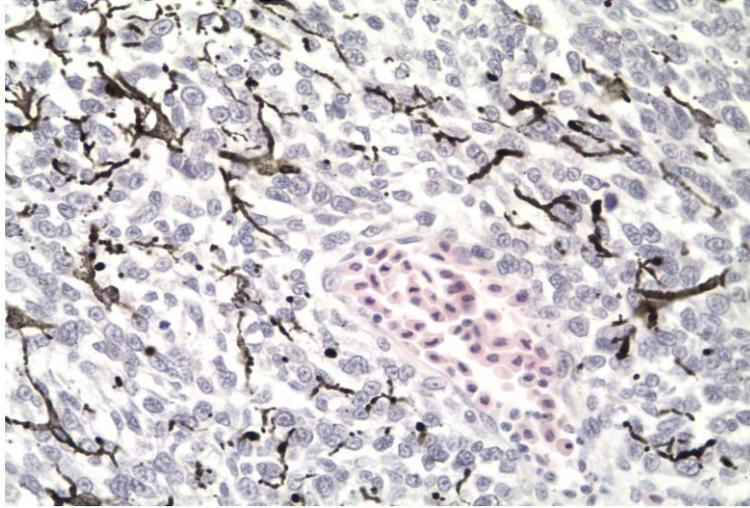


Fig. 41. *Bothrops pubescens* (Yara) N258. Melanoma. HE, 40X.

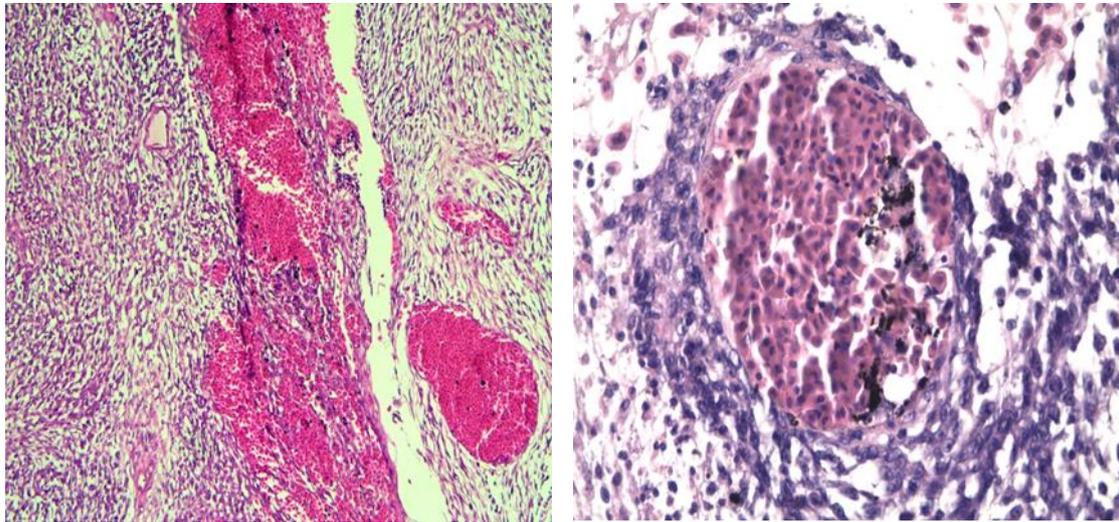


Fig. 42. *Bothrops pubescens* (Yara) N258. Melanocitos tumorales invadiendo vasos. HE, 10X y 40X.

Diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas por HE



Fig. 43. *Bothrops pubescens* (Yara) N275. Carcinoma de células escamosas. Aspecto macroscópico de granuloma inflamatorio crónico con ulceración focalmente extensa en la superficie epitelial, en la profundidad de la masa se identificó la proliferación de células escamosas tumorales.

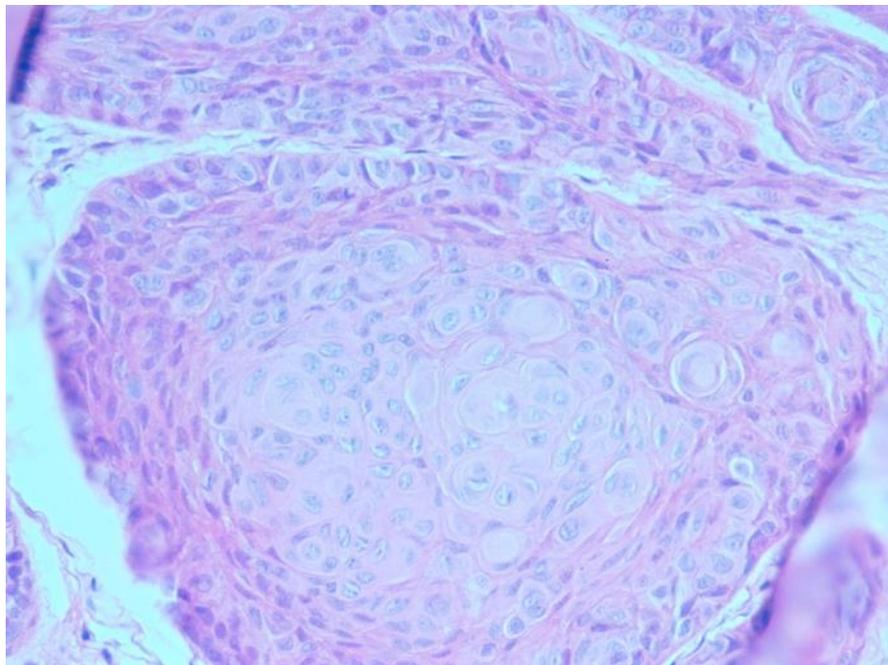


Fig. 44. *Bothrops pubescens* (Yara) N275. Carcinoma de células escamosas. Detalle de nido de células escamosas tumorales organizando la típica “perla de queratina” en su centro. HE, 40X.

Diagnóstico histopatológico adenoma por HE

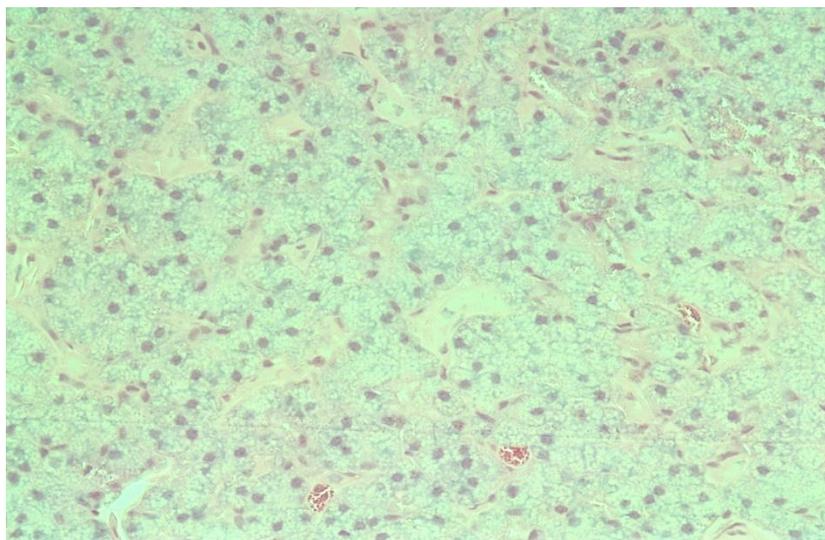


Fig. 45. *Bothrops pubescens* (Yara) N155. Adenoma. HE, 40X.

6.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

En Uruguay se realizó el estudio de muestras de dos de los ejemplares, el ejemplar N 274 y el ejemplar N 199 y una muestra del ejemplar N 254 fue estudiada en el Laboratorio de Diagnóstico de la University of California at Davis (UCDavis) School of Veterinary Medicine, Davis, California, EE. UU.

De las 2 muestras estudiadas del ejemplar N 274, una correspondía a la muestra de tejido tumoral en espleno-páncreas N 274A, y en algunas células, se pudo confirmar que el núcleo era de forma irregular, y que el nucleoplasma tenía una pequeña cantidad de cromatina y un nucléolo grande, otras presentaban una pequeña cantidad de citoplasma y los orgánulos citoplasmáticos estaban poco desarrollados, siendo el rasgo característico de estas células la presencia de múltiples vacuolas en el citoplasma (Fig. 46).

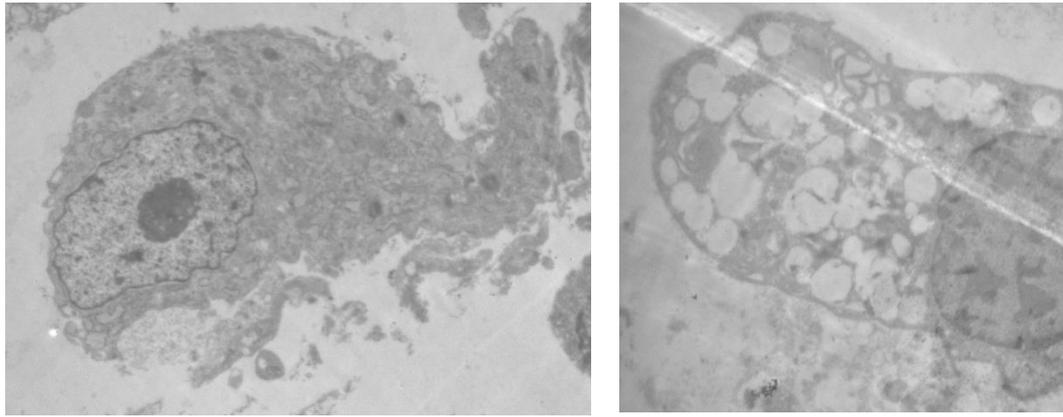


Fig.46. *Bothrops pubescens* (Yara) N274A. Tumor. Microscopia electrónica de transmisión, 10000X.

La segunda muestra de este animal, correspondía a uno de los tumores que se encontró adherido a la pared celómica, registrado originalmente como tumor de columna N274E (Fig. 47), en algunas células se pudo apreciar que la forma del núcleo era ovoide y con bordes irregulares, el nucleoplasma tenía una pequeña cantidad de cromatina y un nucléolo prominente, el retículo endoplásmico rugoso estaba bien desarrollado, pudiendo observarse algunos cuerpos electrón-densos. En otras células de la misma muestra se pudo ver que la forma del núcleo era irregular, había muchas vacuolas en el citoplasma con procesos citoplasmáticos múltiples y tortuosos, también se observaron muchos cuerpos electrón-densos en el citoplasma.

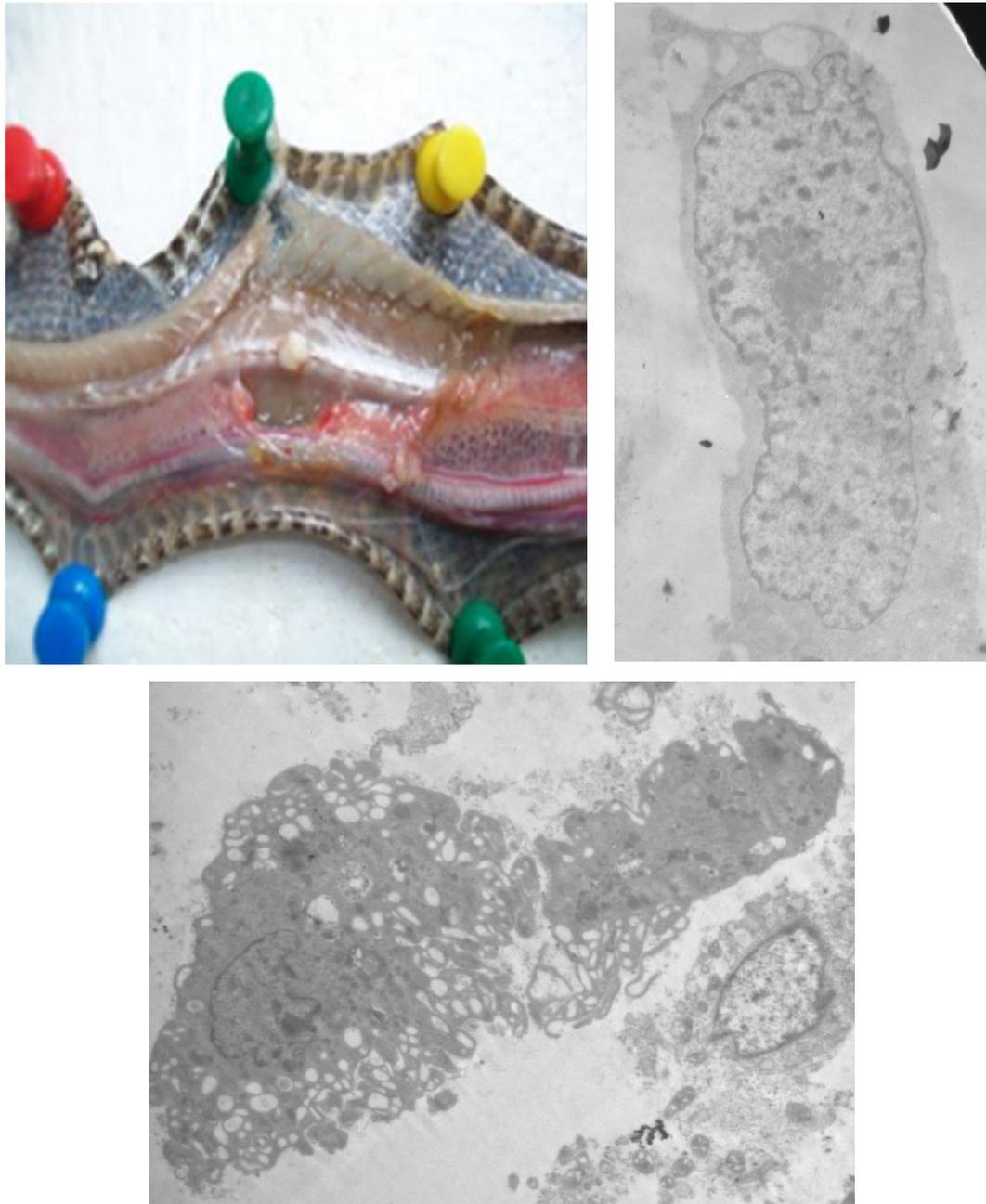


Fig. 47. *Bothrops pubescens* (Yara) N274E Aspecto macroscópico durante la necropsia y microscopia electrónica de transmisión de células del mismo tumor. 10000X.

Para el caso N199A, se observaron células con alta relación Núcleo/Citoplasma, pared nuclear con bordes indentados, siendo la característica más relevante en estas células, el alto número de mitocondrias en sus citoplasmas (Fig. 48).

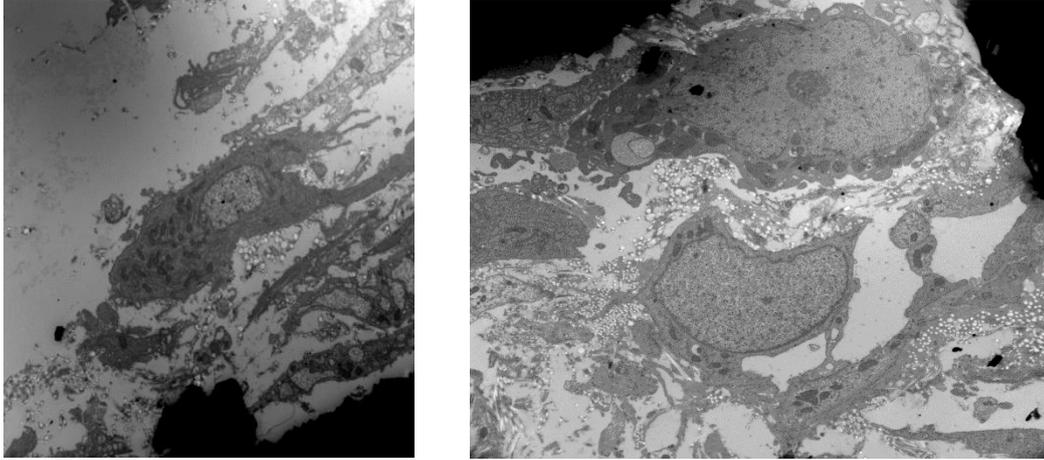
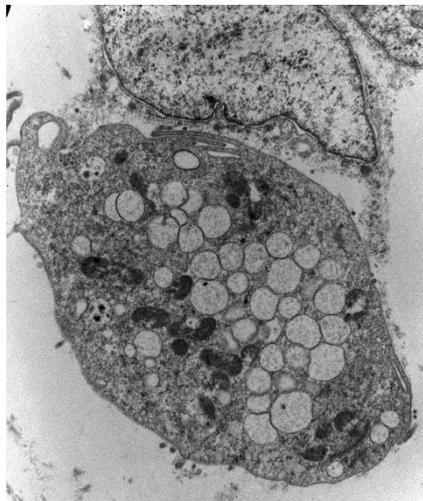
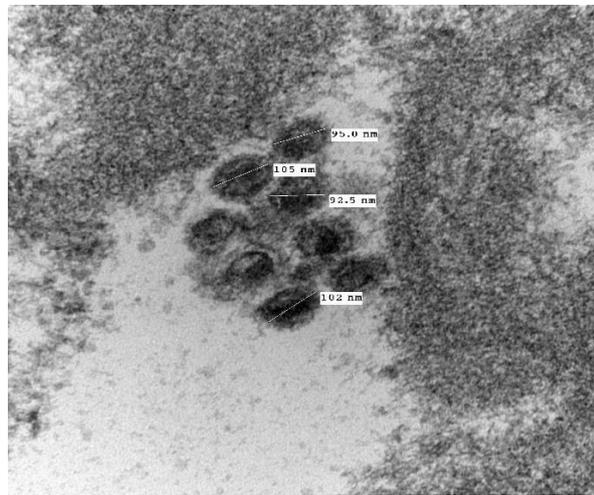


Fig.48. *Bothrops pubescens* (Yara) N199. Microscopía electrónica de transmisión. 5800X.

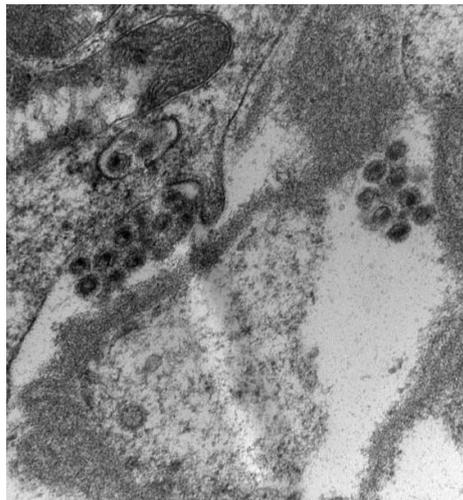
Finalmente, para la muestra perteneciente al caso N254E, se encontraron partículas virales con características ultra-estructurales y morfológicas similares a viriones de retrovirus. Estos viriones eran esféricos, envueltos y de 80-100 nm de diámetro (Fig. 49).



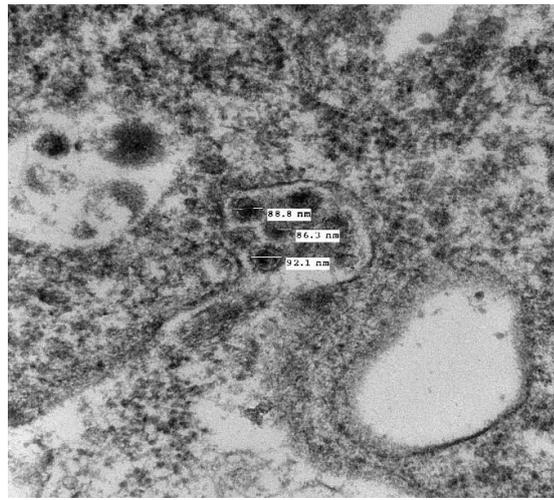
A



B



C



D

Fig. 49. *Bothrops pubescens* (Yara) N254F. Partículas virales compatibles con retrovirus. Microscopía Electrónica de Transmisión. A) y B), 177000X. C) 82300X, D) 106000X.

DISCUSIÓN

En este trabajo se observó una alta incidencia de neoplasias espontáneas en una colección cautiva de *Bothrops alternatus* y *B. pubescens*.

La edad de aparición de las neoplasias estuvo entre 6 y 14 años, con una media de 9 años y coincide con otros trabajos (Catão-Dias & Nichols, 1999; Garner et al., 2004; Sykes & Trupkiewicz, 2006). Esta etapa del ciclo no es una edad avanzada en estas especies, si tenemos en cuenta que se poseían en la colección individuos que superaban los 20 años.

En nuestro estudio no existieron diferencias en la frecuencia de presentación de tumores vinculadas al sexo de los animales estudiados. Asimismo, hubo una mayor incidencia de neoplasias en *B. pubescens* (Yara) que en *B. alternatus* (Crucera). Este dato podría estar influido por la presencia de una mayor proporción de Yaras en esta colección, en los primeros años de estudio, pero en la mayoría de los años (12) que duró este estudio, ambas especies estuvieron en proporciones similares dentro del total de animales estudiados.

La relación de un grado de parentesco directo entre 8 de los 19 ejemplares que desarrollaron tumores, constituye un hallazgo interesante y único. Hay escasos antecedentes en reptiles en los que se sugiere una predisposición hereditaria, no confirmada, para el desarrollo de neoplasias espontáneas (Keck et al., 2011; Needle et al., 2013). En el presente estudio las neoplasias observadas en individuos cercanamente emparentados fueron en su mayoría malignas y de origen mesenquimático. Si bien existe entre ellos un alto grado de parentesco, no se pueden descartar otras causas debidas por ejemplo al hallazgo de partículas compatibles con retrovirus en uno de los individuos cercanamente emparentados.

Todos los tipos de neoplasia hallados en nuestro estudio, salvo el caso de hemangiopericitoma (PWT), el de osteosarcoma telangiectáctico y el de mielolipoma de localización hepática, ya han sido reportados previamente en ofidios. La mayoría de las neoplasias estudiadas eran malignas. Esto es consistente con los hallazgos en estudios previos en reptiles, principalmente ofidios (Effron et al., 1977; Ramsay & Fowler, 1996; Catão-Dias & Nichols, 1999; Garner et al., 2004; Dietz et al., 2016; Page et al. 2017), salvo en un estudio en el que tumores benignos y malignos tuvieron similar frecuencia (Sinn, 2004).

El valor pronóstico de la clasificación histológica de los sarcomas de partes blandas en medicina veterinaria es limitado basándose solo en el diagnóstico realizado en secciones teñidas con HE (Cruz et al., 2005). Esto se debe a la dificultad que presentan para el patólogo revisor la insuficiente diferenciación de las células o tejidos de manera tal que le impide determinar el origen de las células, como ocurrió en el presente trabajo, donde para 32 de las 48 muestras procesadas con HE (66 %) solamente se pudo arribar a un diagnóstico presuntivo de STB (Sarcoma de Tejidos Blandos). El término STB se usa en medicina veterinaria y humana para describir varios tumores mesenquimáticos, predominantemente fusiformes, que comprenden un espectro amplio de tipos tumorales integrado por los fibrosarcomas, mixosarcomas, neurofibrosarcomas, leiomiomas, rabdomiosarcomas y los melanomas amelanícos (Garner et al., 2004).

En reportes previos, en estudios sobre ofidios también indican las dificultades encontradas para arribar a un diagnóstico definitivo de estos tipos tumorales, siendo que el diagnóstico primario de STB fue el más frecuentemente reportado tanto en series de casos (Ramsay & Fowler, 1996; Gardner et al., 2004; Dietz et al., 2016), como en reportes de casos individuales (Abou-Madi et al., 1994; Marcello et al., 2002; Sharpe et al., 2013).

Respecto a los anticuerpos usados en el primer panel, vimentina, desmina, Factor VIII y S-100, no mostraron marcación en nuestros casos, todos ellos salvo desmina, han sido usados con diferentes resultados en otros trabajos. Vimentina mostró marcación positiva en un fibrosarcoma en el trabajo de Santos et al., (2015), pero fue negativa en un fibrosarcoma endocárdico (Gumber et al., 2010), en el trabajo de Matthews et al (2014), no mostro marcación en tejidos normales ni tumorales , arrojando resultados no conclusivos en un STB en el trabajo de Marcello et al. (2002), S-100 marco positivamente en un PNST, Ramis et al. (1998), en un cromatóforoma maligno, Yi Chu et al. (2012) y en varios cromatóforomas, iridofóromas y melanomas, Muñoz-Gutiérrez et al (2016). Factor VIII no marcó positivamente en ninguna de nuestras muestras, de forma similar a lo reportado previamente por Ramis et al. (1998) y Tuttle et al., (2004), pero contrapuesto a lo reportado por Shoemaker et al. (2016) que obtuvieron buena inmunomarcación usando anti-Factor VIII en un hemangiosarcoma cardíaco en una serpiente de Madagascar. Las citoqueratinas han sido usados en varios trabajos reportados con buen éxito (Kao et al. 2016, Kaye et al. 2016, Hsueh et al 2018), en nuestro trabajo marcaron positivamente tanto tejidos sanos (Figs. 12 y 13) como tumorales (Fig. 14).

El posterior estudio con las técnicas de IHQ mediante los dos paneles de anticuerpos permitió llegar a un diagnóstico definitivo en la mayoría de los casos previamente diagnosticados como STB. En referencia a las hipótesis planteadas en un principio podemos ver que nuestra primera hipótesis es válida en su totalidad, dado que, en 48 muestras estudiadas en la primera etapa, en 32 de ellas, solo se pudo llegar a un diagnóstico genérico de STB, y luego del uso complementario de la IHQ, en 22 casos se llegó a un diagnóstico definitivo. Aun así, los STB constituyeron el mayor grupo de este estudio con 8 casos reportados. Los tumores de la vaina de nervios periféricos (PNST) constituyeron el 16% de los casos (7/43), el segundo más frecuente. Curiosamente, este tumor ha sido infrecuentemente diagnosticado en serpientes (Ramis et al., 1988; Garner et al., 2004). La inmunohistoquímica contra CD57 fue definitiva para llegar al diagnóstico definitivo, confirmándose en la mayoría de los casos el diagnóstico histopatológico previo con tinción con HE (Fig. 16). Para el caso del PNST la histopatología convencional por HE también fue eficaz para su diagnóstico (Fig. 15).

Los leiomiomas (9%) si bien constituyeron el tercer tipo tumoral más diagnosticado, los 4 casos pertenecían al mismo ejemplar, posiblemente debido a metástasis y presentaban varios de ellos apariencia macroscópica similar (Fig. 17 A, B, C y D), a nivel histológico se pueden ver los característicos núcleos con forma de “cigarro habano” y abundantes mitosis (Fig. 19). Este tumor ha sido frecuentemente reportado con anterioridad (Barten et al., 1981; Ramsay et al., 1996; Catão-Dias et al., 1999; Gardner et al., 2004; Sykes & Trupkiewicz, 2006; Kwon et al. 2021), y también en este tipo de neoplasia la IHQ confirmó en todos los casos el diagnóstico histológico. El anticuerpo contra el péptido sintético ACTA2 clon (1A4) resultó ser un excelente marcador contra actina de músculo liso en este tipo tumoral (Figs. 18, 20 y 21). Existen antecedentes de diagnóstico usando IHQ en los trabajos de Gumber et al. (2012) y Vasaruchapong et al. (2019). El primero utilizando actina de músculo liso clon (1A4), y ambos trabajos indican la capacidad del tumor de extenderse a otros órganos.

En cuanto a los hemangiomas (1 caso, Fig. 22) y hemangiosarcomas (3 casos, Figs. 23, 24 y 25), resultaron todos de localización subcutánea o intra-celómica, mientras que la mayoría de los casos descritos en la bibliografía presentan localizaciones más diversas, en ovario (Effron et al., 1977), en subcutáneo (Hubbard & Fletcher, 1982), en pulmón, vena cava y músculo (Catão- Días et al., 1999), en hígado (Sykes & Trupkiewicz, 2006), en bazo (Tuttle et al., 2006), y a nivel cardíaco (Stumpel et al., 2012; Shoemaker, 2016).

Garner et al. (2004) reportan una frecuencia de 0,3 y 1,5% de hemangiomas y hemangiosarcomas, respectivamente, en un total de 325 neoplasias estudiadas. La frecuencia en nuestro caso fue mucho mayor a la descrita por estos autores, tanto para los hemangiomas (4,6%) como para los hemangiosarcomas (6,9%). En el caso N 137, se observaron múltiples metástasis en pulmón, corazón, riñón, hígado y tiroides, confirmándose la invasión vascular con émbolos tumorales circulando en la luz de vasos sanguíneos o infiltrando la pared vascular. Macroscópicamente, sólo el hígado mostraba presencia de metástasis, identificándose el resto de las mismas durante el estudio histológico de cada órgano. En nuestro caso el anticuerpo Factor VIII, no marcó en ninguno de estos tumores. La ausencia de marcación en nuestro caso, podría deberse a diferencias en la técnica utilizada entre los diferentes laboratorios, o más probablemente, a diferencias entre las especies estudiadas, tal como ocurre habitualmente con la puesta a punto de esta técnica en especies diferentes a las recomendadas por los fabricantes de los antisueros.

Para el único caso de fibrosarcoma (N254I, Fig. 26) diagnosticado, la inmunohistoquímica no resultó de utilidad. Existe un reporte previo de un ejemplar de *B. pubescens* de la misma colección estudiada, que presentó un sarcoma de alto grado que fue diagnosticado como fibrosarcoma (López et al., 1999). El fibrosarcoma fue considerado como la neoplasia más común reportada en serpientes por Jacobson (1981). Ha sido observada en un ejemplar joven de *B. pubescens* afectando la cavidad oral (Santos & da Motta, 2015), y también por otros autores en piel, tejido subcutáneo y pared corporal (Garner et al., 2004; Sykes & Trukiewicz 2006), el sistema músculo esquelético y el corazón (Gumber et al., 2010). Hasta hace poco tiempo se consideraban a los fibrosarcomas en serpientes localmente invasivos, con una alta recurrencia y bajo potencial metastásico (Garner et al., 2004). Sin embargo, varios estudios han demostrado alta recurrencia y comportamiento metastásico de este tipo tumoral en serpientes y otros reptiles (Jacobson, 1984; Hruban et al., 1989; Frye, 1991; Sharpe et al., 2013). Un caso de fibrosarcoma metastásico asociado a altos niveles de cadmio fue reportado en una víbora cornuda sahariana *Cerastes cerastes* (Oros et al., 2009).

El caso diagnosticado como rhabdomyosarcoma (N203) se desarrolló en los músculos dorsales (Fig. 27), y fue diagnosticado por su apariencia panorámica a bajo aumento, así como por la característica estriación de las fibras musculares tumorales (Hendrick et al., 1998). Este tumor ha sido reportado previamente para ofidios en corazón y en el maxilar

(Elkan & Cooper, 1976; Catão-Dias et al., 1999; Sykes & Trupkiewicz, 2006), en cavidades oral y celómica (Gardner et al., 2004), y localización cutánea (Dietz et al., 2016).

En cuanto al mixosarcoma diagnosticado en el ejemplar A313 (Fig. 28), es una neoplasia muy rara en reptiles. Se han reportado solamente cuatro casos en saurios; 2 en iguanas y 2 en dragones barbudos (*Pogona vitticeps*) (Gardner et al., 2004; Mauldin & Done, 2006; Gardhouse et al., 2014). En serpientes, en el trabajo de Gardner et al. (2004), se reportan 2 casos en un total de 325 individuos estudiados (0,6%), correspondiendo a un colúbrido y un boiido, constituyendo el de este estudio el primer reporte en un vipérido.

El hemangiopericitoma aquí reportado (caso N121A, Figs. 29 y 30), no presenta antecedentes en serpientes (frecuentemente mencionado por su nombre en inglés como tumor de pared perivascular -Perivascular Wall Tumor o PWT-). El PWT es un tumor vascular derivado de los pericitos, compuesto por proliferación celular de origen mesenquimático (no endotelial), rodea a canales vasculares de pared delgada son tumores originados en el pericito, que pueden presentarse en cualquier zona del organismo (Iljri et al., 2002). es una nueva entidad tumoral que se sumaría a la lista de neoplasias que afectan a este grupo.

El osteosarcoma (de tipo telangiectásico) en el caso de estudio N199 (Fig. 31), ya ha sido descrito en reptiles, incluido un reporte reciente de un caso de osteosarcoma perióstico en una tortuga de 240 millones de años de antigüedad (Haridy et al., 2019). En serpientes han sido rara vez descritos (Cowen et al., 2011), nuestro caso constituye el primer diagnóstico del tipo telangiectásico en vipéridos. El mismo presentó recidiva muy agresiva, de rápido crecimiento, desarrollando un gran tamaño en muy poco tiempo (Fig. 32).

El ejemplar N274 presentó 8 neoplasias, 7 de ellas, epiteliales diagnosticadas como carcinomas, algunas de ellas aparentemente metástasis, el origen aparentemente fue en el espleno-páncreas por el notorio mayor tamaño que presentaba la masa que sustituía este órgano (Fig. 33), la IHQ confirmó el origen epitelial de la neoplasia (Fig. 34), también se encontraron metástasis en ambos riñones (Figs. 35 y 36).

Este mismo ejemplar desarrollo un tumor mesenquimático benigno diagnosticado como condroma (Fig. 37), habiendo escasos reportes previos de esta neoplasia en serpientes (Diethelm et al., 1996).

En el caso N254B se diagnosticó un mielolipoma de localización hepática (Fig. 38). En serpientes se reportaron dos casos de mielolipoma, uno en un colúbrido (*Pantherophis guttatus*) y otro en un boiido (*Aspidites melanocephalus*) pero en ambos casos no detalla ubicación (Dietz et al., 2016). Esta neoplasia también ha sido descrita en aves (Latimer & Rakich, 1995).

La muestra (N254H) resulto ser una metaplasia ósea (Fig. 39) siendo esta lesión extremadamente rara de ver en todas las especies, ha sido descrita en la cápsula de una articulación de una *Boa constrictor* con severa osteoartritis (Isaza et al., 2000), y se describió metaplasia ósea de piel y músculos en un colúbrido salvaje (Nogueira et al., 2016).

Con respecto a las neoplasias de tipo tegumentario y epitelial, se registró un melanoma, un carcinoma de células escamosas, y un adenoma. El primero merece algunas consideraciones previas. Resulta evidente tras la simple observación de la piel de los reptiles, que estos presentan una inmensa diversidad de patrones y coloraciones cutáneas. Esta característica fenotípica está mediada por cromóforos, un grupo de pigmentos y sustancias reflectivas de la luz presentes en células que residen en la dermis. Las células encargadas de acumular estos pigmentos se las denomina cromatóforos, estas incluyen a los xantóforos (que contienen carotenoides y pteridina roja o amarilla), iridóforos (que contienen sustancias birrefringentes) cristales de purina de color variable y melanóforos que contienen melanosomas (negro). La nomenclatura de tumores que surgen de los cromatóforos se basa en el tipo celular que le da origen al tumor (a modo de ejemplo, a los tumores constituidos con melanóforos, se los denomina melanoforoma), el diagnóstico histopatológico se realiza por microscopia convencional de luz transmitida, o por sus características ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión. Algunos de estos tumores han sido caracterizados y diagnosticados anteriormente (Ball, 1946; Catão-Dias & Nichols, 1999; Sykes & Trupkiewicz, 2006; Muñoz-Gutierrez, 2016). En este caso fue confirmado sin problema por histopatología y técnica de HE (Fig. 41) y el estudio por IHQ con el anticuerpo S-100 no mostró concordancia. En el caso de estudio, y en concordancia con reportes anteriores, los melanomas en reptiles (usualmente cutáneos) son malignos y con un alto potencial metastásico (Garner, 2004). Esto último se pudo confirmar mediante la observación de émbolos metastásicos de melanóforos tumorales infiltrando la pared y en la luz de los vasos próximos al tumor (Fig. 42). Cabe resaltar que el melanoma estudiado presentó una

localización intracelómica, (Fig. 40) no tegumentaria como cabría de esperarse debido a su origen en cromatóforos cutáneos (dérmicos). Numerosas especies de anfibios y peces normalmente presentan acúmulos de melanóforos en órganos internos, por lo que la ocurrencia de melanomas en especies ectotérmicas podría no ser exclusivamente de presentación tegumentaria (Franco-Belussi et al., 2017).

El carcinoma de células escamosas tiene numerosos reportes en reptiles, y generalmente su diagnóstico no ofrece mayores dificultades (Hill, 1977; Catão-Díaz et al., 1999; Sykes & Trupkiewicz, 2006; Anderson et al., 2010; Souza-Paival et al., 2011; Steeil et al., 2013). En nuestro caso, se localizó en la mucosa oral, teniendo dificultad su diagnóstico en los primeros cortes por la presencia de un granuloma asociado, que cubría gran parte del tumor (Fig. 43). El diagnóstico con HE, realizando cortes en la profundidad de la masa, no presentó dificultad (Fig. 44).

Entre las neoplasias benignas el adenoma (caso N155) es el diagnóstico más reportado (Ramsay et al., 1996; Catão-Dias & Nichols, 1999; Sykes & Trupkiewicz, 2006), en nuestro caso, se diagnosticó un caso de adenoma (Fig.45) de glándulas del rastro coincidiendo con los hallazgos reportados previamente por Gal y Mandoki (2004).

En base a todo lo visto anteriormente la segunda hipótesis planteada no es válida en su totalidad, si bien la mayoría de los individuos estudiados desarrollo neoplasias que se originaban en el mismo tejido, los casos N254 y N121 presentaron diferentes tipos de neoplasia en un mismo individuo todas de origen mesenquimático y los casos N274 y N275 desarrollaron neoplasias tanto de origen epitelial como mesenquimático.

Dentro del diagnóstico diferencial de las neoplasias estudiadas, deben tenerse en cuenta los granulomas. Macroscópicamente la inflamación crónica y caseosa de los granulomas pueden simular el desarrollo de neoplasia en reptiles, especialmente con respecto a la deformidad y el tejido necrótico (Mauldin & Done 2006). Los granulomas subcutáneos son un problema frecuente en reptiles, los microorganismos responsables incluyen aerobios gramnegativos y Gram positivos, anaerobios, hongos y parásitos metazoos (Jacobson ,1986; Russo, 1987; Montali, 1988). Los casos A216 y N255 fueron diagnosticados como granulomas y la IHQ con el anticuerpo Iba1 corroboró dicho diagnóstico.

También dentro de este diagnóstico diferencial deben incluirse los quistes parasitarios de localización subcutánea como los observados en este estudio.

En un gran número de los tumores y algunos órganos estudiados se pudo ver la presencia de un gran número de heterófilos, tanto de formas maduras como inmaduras infiltrando los tumores, tejidos vecinos y órganos. Cada vez está más claro en mamíferos que los neutrófilos asociados a tumores (TAN) desempeñan un papel importante en la biología del cáncer (Fridlender, 2012) lo que haría sospechar algún grado de relación entre estas células sanguíneas y su presencia en neoplasias en serpientes.

En cuanto a las partículas virales similares a retrovirus tipo C, su presencia ha sido previamente bien documentada en serpientes: el retrovirus de la víbora de Russell (VRV) (Zeigel & Clark, 1971) y el retrovirus de la serpiente de maíz (CSRV) (Lunger et al., 1974). Además de éstos, las partículas tipo C han sido identificadas en tejidos neoplásicos de varias serpientes, incluyendo una boa constrictor (*Boa constrictor*) con eritroleucosis (Ippen et al., 1978), víboras brasileñas (*Bothrops moojeni*) con tumores renales (Hoge et al., 1995), y una serpiente de cuatro líneas (*Elaphe obsoleta quadrivittata*) con leucemia linfóide (Zshiesche, 1988), una serpiente del maíz (*Elaphe guttata*) con un rabdiomiosarcoma (Clark et al., 1979). La enfermedad neoplásica asociada con retrovirus se diagnosticó también en cuatro pitones birmanas (*Python molurus bivittatus*) de una sola colección y los autores sugieren la posibilidad de transmisión horizontal debido a que estaban todas juntas, pero también vertical porque existía parentesco directo (Chandra et al., 2001). Las partículas virales halladas en nuestro estudio, se encontraron en un tumor originado en el oviducto, fue diagnosticado como un leiomioma (N254E) y pertenecía a una de las serpientes que estaban emparentadas directamente entre sí, en base a esto, nuestra tercer hipótesis aunque resulta válida, con la información recabada no nos permite afirmar que sean los retrovirus identificados por microscopía electrónica de transmisión, los responsables de la alta frecuencia de neoplasias en esta colección.

En individuos del género *Bothrops* también se reportó la presencia de partículas virales similares en 7 de 15 animales estudiados, localizados inter- e intra-celulares en glándulas de veneno de varios animales aparentemente sanos provenientes de la naturaleza (Carneiro et al., 1992).

En las publicaciones referentes a neoplasias de reptiles durante los últimos 20 años, la incidencia de diferentes tipos de tumores parece ser muy variable entre las distintas colecciones. Por ejemplo, los de origen linfóide y hematopoyético, en el Parque zoológico de Washington (Catão-Dias & Nichols, 1999) y el zoológico de San Diego reportaron tasas de incidencia de 30,8% y 25%, respectivamente. Sin embargo, una revisión del

Zoológico de Sacramento (Ramsay et al., 1996) no reportó tumores hematopoyéticos, y una tasa de 7% se encontró en serpientes en un estudio más actual (Sykes & Trupkiewicz, 2006). Las razones de esta diferencia en las tasas reportadas por diferentes instituciones no están claras. En nuestros resultados no se encontraron casos de neoplasia de este tipo.

8. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que en las especies nativas del género *Bothrops*, las neoplasias más frecuentes, en las condiciones del presente estudio, son de origen mesenquimático y de tipo maligno. La clasificación de las mismas, dada la complejidad tisular de algunos tumores, requiere del diagnóstico con técnicas complementarias en base a la inmunohistoquímica. Algunas excepciones lo constituyen los rhabdomiomas y los tumores malignos de tipo tegumentario como el melanoma y el carcinoma de células escamosas.

En el caso de los leiomiomas, melanomas y carcinomas, hubo en general detección de recidivas y aparentes procesos metastásicos, los que sugieren un alto grado de malignidad, y clínicamente, una mala prognosis debida a recurrencias y diseminación. También se pudo apreciar en varios ejemplares que pueden coexistir más de un tipo de neoplasia en el mismo individuo.

La presentación de neoplasias espontáneas en *B. alternatus* y *B. pubescens* no presenta en apariencia relación con edad avanzada o sexo de los individuos, y sí podría existir en una familia de esta última especie, una predisposición hereditaria a lo cual se suma la presencia de un virus con potencial carcinogénico. No se puede descartar o informar una base genética para la neoplasia en esta familia debido a que no se definieron genes específicos involucrados en la evolución de las enfermedades tumorales.

Se identifican por primera vez en ofidios, el osteosarcoma del tipo telangiectásico, el hemangiopericitoma (PWT), el mielolipoma de localización hepática, una alta frecuencia de hemangiomas y hemangiosarcomas, y el primer caso de mixosarcoma en vipéridos.

Los anticuerpos CD57, IA4, Iba1 y las citoqueratinas A1/A3 resultaron útiles para el diagnóstico de PNST, leiomiomas, granulomas y carcinomas respectivamente.

El hallazgo de retrovirus tipo C en especies del género *Bothrops* asociado y no asociado a la enfermedad neoplásica, en animales de vida libre y de cautiverio, sugiere la posibilidad de que algunos individuos sean portadores. Su eventual asociación con procesos neoplásicos en cautiverio podría asociarse a las condiciones de manejo.

La alta incidencia de neoplasias encontradas en esta colección de vipéridos, nos lleva por otra parte, a cuestionar el hecho registrado en varios reportes de que “la mayor frecuencia se da en colúbridos”, quizás eso sea porque son el grupo mayormente mantenido en cautiverio, mientras que los vipéridos, por poseer ponzoña peligrosa para el ser humano, son el grupo que menos es criado y mantenido en cautiverio.

La frecuencia relativamente alta de enfermedades neoplásicas en las serpientes en nuestro estudio indica la necesidad de una mayor investigación sobre la etiología y fisiopatología de la neoplasia en ofidios. Los factores que predisponen al desarrollo de tumores en reptiles continúan siendo elucidados, por lo que se necesitan más estudios para explicar mejor cómo afectan los factores bióticos y abióticos en la alta prevalencia de neoplasias en ejemplares de colección.

El mejor conocimiento de las diversas patologías en condiciones de cría controladas en planes de manejo y conservación *ex-situ*, puede redundar en una mejora de las condiciones de cría, con un aumento de la calidad y expectativa de vida de los individuos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Abou-Madi, N., Jacobson, E.R., Buergelt, C.D., Schumacher, J. & Williams, B.H. (1994). Disseminated undifferentiated sarcoma in an Indian rock python (*Python molurus molurus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25(1): 143-149.

- 2) Anderson, E.T., Kennedy, S., Harms, C.A. (2010). Squamous cell carcinoma with vascular invasion in a Diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(4): 745-748.
- 3) Ball, H.A. (1946) Melanosarcoma and rhabdomyoma in two pine snakes (*Pituophis melanoleucus*). *Cancer Research Journal*, (6): 134-138.
- 4) Baron, H.R., Allavena, R., Melville, L.M. & Doneley, R.J. (2014). Gastric adenocarcinoma in a Diamond python (*Morelia spilota spilota*). *Australian Veterinary Journal*, 92(10): 405-409.
- 5) Barten SD, Frye FL. (1981) Leiomyosarcoma and myxoma in a Texas indigo snake. *Am Vet Med Assoc* ;179 (11):1292–5.
- 6) Bezjian, M., Diep, A. N., de Matos, R., & Schaefer, D. (2013). Chinese Box turtle (*Cuora flavomarginata*) with lymphoid leukemia characterized by immunohistochemical and cytochemical phenotyping. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(3), 368-376.
- 7) Carneiro, S.M., Tanaka, H. & Kisielius, J.J. (1992). Occurrence of retrovirus-like particles in various cellular and intercellular compartments of the venom glands from *Bothrops jararacussu*. *Research in Veterinary Science* 53(3): 399-401.
- 8) Carreira, S. & Maneyro, R. (2013). *Guía de Reptiles del Uruguay*. De la Fuga, Montevideo.
- 9) Catão-Dias, J.L. & Nichols, D.K. (1999). Neoplasia in snakes at the national Zoological Park Washington DC (1978-1997). *Journal of Comparative Pathology*, 120(1): 89-95.
- 10) Chandra, A.M.S., Jacobson, E.R., Munn, J.R. (2001). Retroviral particles in neoplasms of Burmese pythons (*Python molurus bivittatus*). *Veterinary Pathology*, 38(5): 561-564.
- 11) Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005662.
- 12) Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (1997). Snakes and scorpions: what are the risks for the traveler? *Medicine Tropicale: Revue du Corps de Sante Colonial*, 57(4): 519-521.
- 13) Christman, J., Devau, M. & Jillheatley, J. (2017). Oncology of Reptiles, diseases, diagnosis and treatments. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 20(1): 87-110.

- 14) Chu PY, Zhuo YX, Wang FI, Jeng CR, Pang VF, Chang PH, Chin SC, Liu CH. (2012). Spontaneous neoplasms in zoo mammals, birds, and reptiles in Taiwan – a 10-year survey. *Animal Biology* 62: 95–110
- 15) Clark, H.F., Andersen, P.R., Lunger, P.D. (1979). Propagation and characterization of a C-type virus from a rhabdomyosarcoma of a Corn snake. *Journal of General Virology*, 43(3): 673-683.
- 16) Comolli, J.R., Olsen, M.H., Seguel, M., Schnellbacher, R.W., Fox, A.J., Divers, S.J. & Sakamoto, K. (2015). Ameloblastoma in a wild black ratsnake (*Pantherophis alleghaniensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(4): 536-539.
- 17) Cowen, M.L., Monks, D.J. & Raidal, S.R. (2011). Osteosarcoma in a woma python (*Aspidites ramsayi*). *Australian Veterinary Journal*, 89(12): 520-523.
- 18) Craig, L.E., Wolf, J.C. & Ramsay, E.C. (2005). Spinal cord glioma in a Ridge-Nosed rattlesnake (*Crotalus willardi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36: 313-315.
- 19) Cruz, J., Navarro, S., Guerra, M., García, R., Lima, M., Molina, P. & Llombart-Bosch, A. (2005). Valor de la inmunohistoquímica en la tipificación de los sarcomas de partes blandas y su discordancia con el análisis histopatológico convencional: un estudio de casos procedentes del INO (Cuba). *Revista Española de Patología*, 38(3): 149-156.
- 20) Dadone, L., Klaphake, E., Garner, M.M., Schwahn, D. & Sigler, L. (2009) Pituitary cystadenoma, enterolipidosis, and cutaneous mycosis in an Everglades ratsnake (*Elaphe obsoleta rossalleni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(3): 538-541.
- 21) De Roodt, A., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J., Robles-Ortiz, L. & Alagón A. (2005). Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta Médica de México*, 141(1): 13-21.
- 22) Diethelm, G., Stauber, E., Tillson, M. & Ridgley, S. (1996). Tracheal resection and anastomosis for an intratraqueal condroma in a ballpython. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 209(4): 786-788.

- 23) Dietz, J., Heckers, K.O., Aupperle, H. & Pees, M. (2015). Bone tumours in lizards and snakes. A rare clinical finding. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 43(1): 31-39.
- 24) Dietz, J., Heckers, K.O., Aupperle, H. & Pees, M. (2016). Cutaneous and subcutaneous soft tissue tumours in snakes: a retrospective study of 33 cases. *Journal of Comparative Pathology*, 155(1): 76-87.
- 25) Divers, S.J. & Scott, J.S. (2019). *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. 3rd Ed. Elsevier.
- 26) Effron, M., Griner, L. & Benirschke, K. (1977). Nature and rate of neoplasia found in captive wild mammals, birds, and reptiles at necropsy. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1): 185-198.
- 27) Elkan, E. & Cooper, J.E. (1976). Tumors and pseudotumours in some reptiles. *Journal of Comparative Pathology*, 86(3): 337-348.
- 28) Folland, D. W., Johnston, M. S., Thamm, D. H., & Reavill, D. (2011). Diagnosis and management of lymphoma in a green iguana (*Iguana iguana*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(7), 985-991.
- 29) Franco-Belussi, L., Borges-Provete, D., De Oliceira, C. (2017) Environmental correlates of internal coloration in frogs vary throughout space and lineages. *Ecology and Evolution*, 7(22): 9222-9233.
- 30) Fridlender, G., Albelda S. M. (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33 (5):949–955.
- 31) Frye, F.L. a (1991). Common pathological lesions and disease processes. En: *Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry*. Vol II. Frye, F.L. (Ed.), Krieger Publishing Co., pp.: 529-617.
- 32) Frye F.L b (1991)b. Biochemical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry. Vol 1. Florida: Krieger Publishing Co.
- 33) Gál, J. & Míra Mandoki, M. (2012). Adenoma of the cloacal scent gland in a California kingsnake (*Lampropeltis californiae*). *Acta Veterinaria Hungarica* 60(4): 459-463.

- 34) Garner, M.M., Hernandez-Divers, S.M. & Raymond, J.T. (2004). Reptile neoplasia: a retrospective study of case submissions to a specialty diagnostic service. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 7(3): 653-671.

- 35) Gravendyck, M., Marschang, R.E., Schroeder-Gravendyck, A.S. & Kaleta, E.F. (1997). Renal Adenocarcinoma in a reticulated python (*Python reticulatus*). *Veterinary Record*, 140(14): 374-375.
- 36) Gumber, S., Nevarez, J.G. & Doo-Youn Cho, D. (2010). Endocardial fibrosarcoma in a reticulated python (*Python reticularis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(6): 1013-1016.
- 37) Gumber, S., Schnellbacher, R., Orandle, M.S. & Wakamatsu, N. (2012). Pathology in practice. Leiomyosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(3): 327-329.
- 38) Gull, J.M, Lange, C.E., Favrot, C., Dorrestein, G.M. & Hatt, J.M (2012). Multiple papillomas in a diamond python (*Morelia spilota spilota*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(4): 946-949.
- 39) Gyimesi, Z.S., Garner, M.M., Burns, R.B., Nichols, D.K., Brannian, R.E., Raymond, J.T., Poonacha, K.B., Kennedy, M., Wojcieszyn, J.W. & Nordhausen, R. (2005). High Incidence of lymphoid neoplasia in a colony of Egyptian spiny tail Lizards (*Uromastyx aegyptius*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(1): 103-110.
- 40) Haines, D. M., & Clark, E. G. (1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *The Canadian Veterinary Journal*, 32(5): 295.
- 41) Hardon, T., Fledelius, B. & Heegaard, S. (1994). Keratoacanthoma of the spectacle in a *Boa constrictor*. *Veterinary Ophthalmology*, 10(5): 320-322.
- 42) Haridy, Y., Witzmann, F., Asbach, P., Schoch, R. R., Fröbisch, N., & Rothschild, B. M. (2019). Triassic cancer—osteosarcoma in a 240-million-year-old stem-turtle. *JAMA oncology*, 5(3), 425-426.
- 43) Heckers, K.O., Aupperle, H., Schmidt, V. & Pees, M. (2012). Melanophoromas and iridophoromas in reptiles *Journal of Comparative Pathology* 146(2-3): 258-268.
- 44) Hendrick, M. J. (1998). Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. (*No Title*).
- 45) Hernandez-Divers, S.M. & Garner, M.M. (2003). Neoplasia of reptiles with an emphasis on lizards. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 68(1): 251-273.

- 46) Hill, H. (1977). Oral squamous cell carcinoma in a California king Snake. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 171(9): 981-982.
- 47) Hoge, A.Y.A., Tucker, S., Williams, D.S., Ogata, A.S., Guerra, J.K. & Jacobson, E.R. (1995). Spontaneous renal tumors in *Bothrops moojeni*. *Proceedings of the 5th International Colloquium of Pathology of Reptiles and Amphibians*, 5: 283-285.
- 48) Honour, S.M., Ayroud, M., Wheler, C. (1993). Metastatic chondrosarcoma and subcutaneous granulomas in a grey rat snake (*Elaphe obsoleta obsoleta*). *Canadian Veterinary Journal*, 34 (4): 238-240.
- 49) Hruban, Z., Carter, W.E., Meehan, T., Frye, F.L. & Harshbarger, J.C. (1989). Neoplasia in reptiles and amphibians in the Lincoln Park zoological garden. *Proceedings of the 3rd International Colloquium of Pathology of Reptiles and Amphibians*: 76-77.
- 50) Hsueh, C.S., Li, W.T., Jeng, C.R., Pang, H.W., Chang, H.W. (2018). Diffuse-type Gastric Mucinous and Signet Ring Cell Adenocarcinoma in a Captive California King Snake (*Lampropeltis getula californiae*). *J Comp Path*, 160: 10-14.
- 51) Hubbard, G.B. & Fletcher, K.C. (1982). Hemangioma in an eastern sand viper (*Vipera ammodytes meridionalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 13(4): 169-172.
- 52) Iljri, K., Yuasa, S., Yone, K., Matsunaga, S., Ryoki, T. & Taniguchi, N. (2002). Primary epidural hemangiopericytoma in the lumbar spine: a case report. *Spine*, 27(7): 189-192.
- 53) Ippen, R., Mladenov, Z. & Konstantinov, A. (1978). Leukosis with viral presence proven by means of an electron microscope in two boa constrictors. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 120: 357-368.
- 54) Jacobson, E.R. (1984) Chromomycosis and fibrosarcoma in a mangrove snake. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(11): 1428-1430.
- 55) Jacobson, E.R., Calderwood, M.B., French, T.W., Iverson, W., Page, D. & Raphael, B. (1981). Lymphosarcoma in an Eastern king snake and a rhinoceros viper. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(11): 1231-1235.
- 56) Jacobson, E.R., Greiner, E.C., Clubb, S. & Harvey-Clarke, C. (1986). Pustular dermatitis caused by subcutaneous dracunculiasis in snakes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9): 1133-1134.

- 57) Jacobson, E.R., Seeli, S.J. & Novilla, M.N. (1980). Lymphosarcoma associated with virus-like intranuclear inclusions in a California king snake (Colubridae: *Lampropeltis*). *Journal of the National Cancer Institute*, 65(3): 577-583.
- 58) Juanena, C., Saldun, P., Zelada, B., Negrin, A., Paciel, D., & Carreira, S. (2018). Bite by coral vibra (*Micrurus altirostris*): first case in Uruguay. *Revista Medica del Uruguay*, 34(4), 246-250.
- 59) Kao, C. F., Chen J. L., Tsao, W. T., Lee, A. L., Liu, C. H., Wang, F. I. (2016). A renal adenocarcinoma in a corn snake (*Pantherophis guttatus*) resembling human collecting duct carcinoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , Vol. 28(5) 599–603.
- 60) Kaye, S., Daverio, H., Eddy, R., Ossiboff, R., Peters-Kennedy, J., Morrisey, J. (2016). Surgical resection of an interrenal Cell Adenocarcinoma in a Woma Python (*Aspidites ramsayi*) whith 18 month follow-up. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(2): 26-31.
- 61) Keck, M., Dawn, M., Zimmerman, D.M., Ramsay, E.C., Douglass, M., Drury, R. & Reavill, D.R. (2011). Renal adenocarcinoma in Cape coral snakes (*Aspidelaps lubricus lubricus*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 21(1): 5-8.
- 62) Keller, A.K., Sanchez-Migallon, D., Sanders, C., Tong, N., Morh, C.H., Lowenstine, L. & Sisó, S. (2016). Clinical and pathological findings in a Red-tailed Boa constrictor (*Boa constrictor constrictor*) with a primary neural neoplasm within the diencephalon and mesencephalon. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(3): 85-89.
- 63) Kusewitt, D.F., Reece, R.L. & Miska, K.B. (1997). S- 100 Immunoreactivity in melanomas of two marsupials, a Bird and a reptile. *Veterinary Pathology*, 34(6): 615-618.
- 64) Kwon, J., Kim, S.W., Kim, S.G., Kim, H.J., Lee, S.B., Kang, J.W., & Park, S.C. (2021). A case of submandibular leiomyosarcoma, mimicking an abscess, in a Ball Python (*Python regius*). *Veterinary Sciences*, 8(10): 224.
- 65) Langan, J.N., Adams, W.H., Patton, S., Lindermann, K. & Schumacher, J. (2001). Radiation and intralesional chemotherapy for a fibrosarcoma in a constrictor *Boa constrictor ortonii*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 11(1): 4-8.
- 66) Latimer, K.S.; Rakich, P.M.(1995). Subcutaneous and hepatic myelolipomas in four exotic birds. *Veterinary Pathology*, (32):84-87.

- 67) Latimer, K.S. & Rich, G.R. (1998). Colonic adenocarcinoma in a Cornsnake (*Elaphe guttata guttata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(3): 344-346.
- 68) Leach, M.W., Nichols, D.K., Hartsell, W. & Torgerson, R.W. 1991. Radiation therapy of a malignant chromatophoroma in a yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(2): 241-244.
- 69) López, E., Meneghel, M., Lopez, G., Carreira, S. & Morales, S. (1999). Fibrosarcoma en *Bothrops pubescens*. Reporte de un caso. *Resúmenes del V Congreso Latinoamericano de Herpetología*: 78.
- 70) Lunger, P.D., Hardy, W.D. Jr. & Clark, H.F. (1974). C-type virus particles in a reptilian tumor. *Journal of the National Cancer Institute*, 52(4): 1231-1235.
- 71) Marcello Jr., H.B., Ribeiro, C.A., Caliari, M.V. & Cassali, G.D. (2002). Spindle cell sarcoma in *Bothrops leucurus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54(3): 325-327.
- 72) Martin, J. C., Schelling, S. H., & Pokras, M. A. (1994). Gastric adenocarcinoma in a Florida indigo snake (*Drymarchon corais couperi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 133-137.
- 73) Matthews, M.E., Eshar, D., Delk, K.W., Pohlman, L. & Andrews, G. (2014). Splenopancreatic ductal adenocarcinoma with multiorgan metastasis in a northern water snake (*Nerodia sipedon*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(2): 437-440.
- 74) Mauldin G.N. , Done L.B.(2006) Oncology. In: Reptile Medicine and Surgery, 2nd edn. Mader DR, ed. St. Louis: Saunders Elsevier :299–322.
- 75) Montali, R.J. (1988). Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds, and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, 99(1): 1-26.
- 76) Morais, V., & Massaldi, H. (2006). Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12, 497-511.
- 77) Muñoz-Gutiérrez, J.F., Garner, M.M. & Kiupel, M. (2016). Cutaneous chromatophoromas in captive snakes. *Veterinary Pathology*, 53(6): 1213-1219.
-

- 78) Needle, D., McKnight, C. A., & Kiupel, M. (2013). Chondroblastic osteosarcoma in two related spiny-tailed monitor lizards (*Varanus acanthurus*). *Journal of exotic pet medicine*, 22(3), 265-269.
- 79) Nogueira, C., Jerdy, H. & Silveira, L. (2016). Osseous metaplasia in a free-living snake (Patagonian green racer; *Philodryas patagoniensis*) in Brazil, 2012. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(2): 430-432.
- 80) Novillo, A., Kitana, N., Marquez, E. & Callard, I.P. (2006). Reptilian genotoxicity. En: *Toxicology of Reptiles*, Gardner, S.C. & Oberdörster, E. Eds., Taylor & Francis. Pp.: 241-265.
- 81) Oda, F.H., Borteiro, C., Da Graça, R.J., Tavares, L.E.R., Crampet, A., Guerra, V., De Lima, F.S., Bellay, S., Karling, L.C., Castro, O., Takemoto, R.M. & Pavanelli, G.C. (2016). Parasitism by larval tapeworms genus *Spirometra* in South American amphibians and reptiles: new records from Brazil and Uruguay, and a review of current knowledge in the region. *Acta Tropica*, 164: 150-164.
- 82) Orós, J., Monagas, P., Andrada, M., Calabuig, P. & Pether, J. (2009). Metastatic fibrosarcoma in a captive Saharan horned viper (*Cerastes cerastes*) with high hepatic levels of cadmium. *Veterinary Record*, 164(22): 690-692.
- 83) Ossiboff, R. J. (2018). Serpentes. In: *Pathology of wildlife and zoo animals* (pp. 897-919). Academic Press.
- 84) Page-Karjian, A., Hahne, M., Leach, K., Murphy, H., Lock, B., Rivera, S. (2017). "Neoplasia in snakes at Zoo Atlanta during 1992–2012," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(2): 521-524.
- 85) Pereira, M.E. & Viner, T.C. (2008). Oviduct adenocarcinoma in some species of captive snakes. *Veterinary Pathology*, 45(5): 693-697.
- 86) Petterino, C., Bedin, M. & Ratto, A. (2006). Undifferentiated tumor in the ovary 95-100.
- 87) Ramis, A., Pumarola, M., Fernandez-Morán, J., Añor, S., Majó, N. & Zidan, A. (1988). Malignant peripheral nerve sheath tumor in a Water moccasin (*Agkistrodon piscivorus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(2): 205-208.
- 88) Ramsay, E.C., Lowenstine, L. & Fowler, M.E. (1996). A retrospective study of Neoplasia in a Collection of Captive Snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 27(1): 28-34.

- 89) Romagnano, A., Jacobson, E. R., Boon, G. D., Broeder, A., Ivan, L., & Homer, B. L. (1996). Lymphosarcoma in a green iguana (*Iguana iguana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 83-89.
 - 90) Ross, R.A. & Marzec, G. (1990). *The reproductive husbandry of pythons and boas*. The Institute for Herpetological Research, California.
 - 91) Rotschild, B.M., Tanke, D.H. & Helbling, M. (2003). Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften*, 90(11): 495-500.
 - 92) Russo, E.A. (1987). Diagnosis of lumps and bumps in snakes. *Compendium on Continuing Education (Veterinary Practice)*, 9: 795-807.
 - 93) Santos, E.D., Silva, J.R., Machado, T., Dau, S., Rodriguez, R. & Da Motta, A.C. (2015). Oral fibrosarcoma in yararaca (*Bothrops pubescens*): anatomopathological and immunohistochemical aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(7): 664-670.
 - 94) Schilliger, L., Selleri, P. & Frye, F.L. (2009). Lymphoblastic lymphoma and leukemic blood profile in a red-tail boa (*Boa constrictor constrictor*) with concurrent inclusion body disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1): 159-162.
 - 95) Schumacher, J., Bennet, A., Fox, L., Deem, S., Neuwirth, L. & Fox, J. (1998). Mast cell tumor in an Eastern kingsnake (*Lampropeltis getulus getulus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(1): 101-104.
 - 96) Schumacher, J. & Toal, R.L. (2001). Advanced radiography and ultrasonography in reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(4): 162-168.
 - 97) Sharpe, S., Lamm, C.G. & Killick, R. (2013). Intracoelomic anaplastic sarcoma in an intersex Madagascar tree boa (*Sanzinia madagascariensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1): 153-157.
 - 98) Shoemaker, M., Barrie, M. & Holman, H. (2016). Pathology in practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(2): 153-155.
 - 99) Shotts, E.B. (1984) *Aeromonas* In: Hoff GL, Frye FL, Jacobsen ER, . *Diseases of Amphibians and Reptiles*. New York: Plenum Press. : 49-58.
 - 100) Silva, J.J. (1989). Las serpientes del género *Bothrops* en la Amazonia Colombiana. *Acta Medica Colombiana*, 14(3): 1-2.
 - 101) Sinn, A. D. (2004). *Pathologie der Reptilien-eine retrospektive Studie* (Doctoral dissertation, lmu).
-

- 102) Sousa Paival, M.I., Biscola, N., Fernandes, T.R., Sequeira, J.L. & Ferreira Jr., R.S. (2011). Carcinoma de células escamosas em Jararaca-pintada (*Bothropoides pauloensis*) cautiva. *Veterinária e Zootecnia*, 18(2): 86-88.
- 103) Stacy, N., Alleman, A.R. & Saylor, K.A. (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clinical Laboratory Medicine*, 31: 87-108.
- 104) Steeil, J.C., Schumacher, J., Hecht, S., Baine, K., Ramsay, E.C., Ferguson, S., Miller, D. & Lee, N.D. (2013). Diagnosis and treatment of a pharyngeal squamous cell carcinoma in a Madagascar ground boa (*Boa madagascariensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1): 144-151.
- 105) Steinglen, M.D., Sanders, C. & Kistler, A.L. (2012). Identification, characterization and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. *Mbio*, 3(4): e00180-212.
- 106) Stern, A.W., Velguth, K.E. & D'Agostino, J. (2010). Metastatic ductal adenocarcinoma in a Western hognose snake (*Heterodon nasicus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(82): 320-324.
-
- 107) Stumpel, J.B., Del-Pozo, J., French, A. & Eatwell, K. (2012). Cardiac hemangioma in a corn snake (*Pantherophis guttatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(2): 360-366.
- 108) Sykes, J.M. & Trupkiewicz, J.G. (2006). Reptile neoplasia at the Philadelphia Zoological garden, 1901-2002. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(1):11-19.
- 109) Tuttle, A.D., Harms, C.A. & Wettere, A.J. (2006). Splenic hemangiosarcoma in a Corn snake (*Elaphe guttata*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 16(4):140-143.
- 110) Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F. & Hošek, J. (Eds.) (2023). The Reptile Database. Disponible en: <http://www.reptile-database.org> (19 Setiembre 2023).
- 111) Vasaruchapong, T., Laoungbua, P., Chanhom, L. & Banlunara, W. (2019). Surgical removal and recurrence of leiomyosarcoma in a King Cobra, *Ophiophagus hannah*. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 49(1): 87-91.
- 112) Watson, M.K. & Mitchell, M.A. (2014). Vitamin D and ultraviolet B radiation considerations for exotic Pets. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(4): 369-379.

- 113) Willette, M.M., Garner, M.M. & Drew, M. (2001). Chemotherapeutic treatment of lymphoma in a king cobra (*Ophiophagus hannah*). En: *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (Orlando, Florida)*: 20-23.
- 114) Yi Chu, P., Xing Zhuo, Y., Inwang, F., Ren Jeng, C.H., Fei Pang, V., Heng Chang, P., Chien Chin, S. & Hsuan Liu, C.H. (2012). Spontaneous neoplasms in zoo mammals, birds, and reptiles in Taiwan - A 10-year survey. *Animal Biology*, 62(1): 95-110.
- 115) Zeigel, R.F. & Clark, H.F. (1971). Histologic and electron microscopic observations on a tumor-bearing viper: establishment of a "C"-type virus producing cell line. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(2): 309–321.
- 116) Zshiesche, W. (1988). Lymphoid leukemia with presence of C virus particles in a four-lined chicken snake: *Elaphe obsoleta quadrivittata*. *Verhandlungen des Internationalen Symp Erkrank Zoot*, 30: 275-277.
-

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1 Tablas

Tabla 4. Resultados del estudio histopatológico con los diagnósticos presuntivos de los tres patólogos revisores

No Caso	ID	Diagnóstico Patólogo 1	Diagnóstico Patólogo 2	Diagnóstico Patólogo 3	Diagnóstico presuntivo
1	A N254-Tumor – Cirugía	Fibrosarcoma	Mesenquimal	Sarcoma	STS
	B N254 Hígado	Metastasis	Metastasis	Mielolipoma	Mielolipoma
	C N254 Tumor pegado hígado	Sarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
	D N254 Tumor pared Estomago	Sarcoma	Sarcoma	Leiomiomasarcoma	STS
	E N254 Tumor Oviducto Grande	Fibrosarcoma	Sarcoma	Sarcoma Vs Carcinoma	STS
	F N254 Tumor Oviducto	Sarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
	G N254 Tumor Pegado Riñón	Fibrosarcoma	Sarcoma	Leiomiomasarcoma	STS
	H N254 Tumor Piel Grande	Metaplasia	Metaplasia	Metaplasia ósea	Metaplasia ósea
	I N254 Tumor Piel Chico	Fibrosarcoma	Sarcoma	Fibrosarcoma	Fibrosarcoma
2	A N289 Tumor	Fibrosarcoma	Sarcoma	Fibroma	STS
	B N289 Cirugía 2	Fibrosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
3	A A81 Tumor 1	Fibrosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
	B A81 Tumor 2	Fibrosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
	C A81 Tumor 3	Fibrosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
4	N 203	Fibrosarcoma	Sarcoma	Rhabdomiosarcoma	STS
5	A N253	Fibromixosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS

	B N253 Recidiva	Fibromixosarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS
6	A A216 Tumor 1	Epitelial	Epitelial	Granuloma	Granuloma
	B A216 Tumor 2	Epitelial	Epitelial	Granuloma	Granuloma
7	A 313	Fibrosarcoma	Sarcoma	Mixosarcoma	STS
8	A N134 Tumor 1 Cirug.	Hemangioma	Hemangioma	Hemangiosarcoma	Hemangioma
	B N134 Tumor 2 Cirug.	Hemangioma	Hemangioma	Hemangiosarcoma	Hemangioma
	C N134 Necrop.	Hemangioma	Sarcoma	STS	STS
9	N 258	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma
10	N 155	Hemangiosarcoma	Sarcoma	Adenoma Vs Sarcoma	STS
11	A N274 Tumor parte roja	Sarcoma	Sarcoma	Carcinoma	STS
	B N274 Tumor parte blanca	Sarcoma	Sarcoma	Carcinoma	STS
	C N274 Tumor digestivo	Sarcoma	Sarcoma	Carcinoma	STS
	D N274 Tumor Grasa	Sarcoma	Sarcoma	Carcinoma	STS
	E N274 Tumor Col. Vert. 1	Metaplasia	Metaplasia	Metaplasia condroide	Metaplasia
	F N274 Tumor Col. Vert. 2	Sarcoma	Sarcoma	Epitelial Metastasis	STS
	G N274 Tumor Col. Vert. 3	Sarcoma	Sarcoma	Epitelial Metastasis	STS
	H N274 Tumor Col. Vert. 4	Sarcoma	Sarcoma	Epitelial Metastasis	STS
12	A N275 Tumor boca	Granuloma	Granuloma	Carcinoma células escamosas	Carcinoma células escamosas
	B N275 Tumor estomago	Carcinoma	Mesenquimal	Carcinoma Vs Sarcoma	Carcinoma Vs Sarcoma

	C N275 Tumor Colum A	Epitelial	Mesenquimal	STS	STS
	D N275 Tumor Colum B	Epitelial	Mesenquimal	STS	STS
	E N275 Tumor Colum C	Epitelial	Mesenquimal	STS	STS
13	A N121	-----	-----	PNST	PNST
	B N121	-----	-----	PNST	PNST
14	N299	-----	-----	Hemangiosarcoma	Hemangiosarcoma
15	A N255	Sarcoma	Sarcoma	Tumor células redondas	STS
	B N255 Recidiva	Sarcoma	Sarcoma	Tumor células redondas	STS
16	A N199	Fibrosarcoma	Sarcoma	Osteosarcoma telangiectatico	STS
	B N 199 Recidiva	Fibrosarcoma	Sarcoma	PNST	STS
17	N 143	-----	-----	Hemangiosarcoma	Hemangiosarcoma
18	N137	-----	-----	Hemangiosarcoma	Hemangiosarcoma
19	A 223	Sarcoma	Sarcoma	Sarcoma	STS

Tabla 5. Resultados del estudio con la técnica de inmunohistoquímica y diagnóstico definitivo

N° caso	ID	IHC	Diagnosis definitivo
1	A N254- Tumor 1- surgery	CD57, 1A4 , AE1/AE3, S100, Des	Leiomyosarcoma
	B N254 Higado	NE	Hepatic myelolipoma

	C N254	AE1/AE3, Vim, S-100, Des	STS
	Tumor pegado hígado		
	D N254	1A4 , AE1/AE3, Vim, CD57	Leiomyosarcoma
	Tumor pared Estomago		
	E N254	AE1/AE3, CD57, 1A4	Leiomyosarcoma
	Tumor Oviducto Grande		
	F N254	NE	STS
	Tumor Oviducto		
	G N254	1A4, CD57	Leiomyosarcoma
	Tumor Pegado Riñón		
	H N254	NE	Metaplasia
	Tumor Piel Grande		
	I N254	NE	Fibrosarcoma
	Tumor Piel Chico		
2	A N289	NE	Fibroma
	Tumor		
	B N289	CD 57 , AE1/AE3, 1A4, S100, Des	PNST
	Cirugía 2 recidiva		
3	A A81	CD 57 , AE1/AE3, 1A4, S100, Des	PNST
	Tumor 1		

	B A81 Tumor 2	NE	STS
	C A81 Tumor 3	NE	STS
4	N 203	NE	Rhabdomiosarcoma
5	A N253	AE1/AE3,CD57,1A4	PNST
	B N253 Recidiva	AE1/AE3,CD57,1A4	PNST
6	A A216 Tumor 1	Iba 1	Granuloma
	B A216 Tumor 2	Iba 1	Granuloma
7	A 313	NE	Mixosarcoma
8	A N134 Tumor 1 Cirug.	NE	Hemangioma
	B N134 Tumor 2 Cirug.	NE	Hemangioma
	C N134 Recidiva Necrop.	CD57, 1A4	STS
9	N 258	S-100	Melanoma
10	N 155	NE	Adenoma
11	A N274 Tumor parte roja	AE1/AE3	Carcinoma
	B N274 Tumor parte blanca	AE1/AE3	Carcinoma

	C	N274	AE1/AE3	Carcinoma
	Tumor			
	digestivo			
	D	N274	AE1/AE3	Carcinoma
	Tumor			
	Grasa			
	E	N274	AE1/AE3	Condroma
	Tumor Col.			
	Vert. 1			
	F	N274	AE1/AE3	Carcinoma Metastasis
	Tumor Col.			
	Vert. 2			
	G	N274	AE1/AE3	Carcinoma Metastasis
	Tumor Col.			
	Vert. 3			
	H	N274	AE1/AE3	Carcinoma Metastasis
	Tumor Col.			
	Vert. 4			
12	A	N275	AE1/AE3 Vim Des	Carcinoma células escamosas
	Tumor boca			
	B	N275	AE1/AE3 CD 57	PNST
	Tumor			
	estomago			
	C	N275	AE1/AE3 CD 57	PNST
	Tumor			
	Colum A			
	D	N275	AE1/AE3 CD 57 1A4	STS
	Tumor			
	Colum B			
	E	N275	AE1/AE3 CD 57 1A4	STS
	Tumor			
	Colum C			

13	A N121	CD57 1A4 Vim	PWT
	B N121	CD57 1A4	PNST
14	A299	NE	Hemangiosarcoma
15	A N255	NE	Granuloma
	B N255 Recidiva	Iba1 AE1/AE3	Granuloma
16	A N199	NE	Osteosarcoma Telangiectatico
	B N 199 Recidiva	NE	Osteosarcoma Telangiectatico
17	N 143	Factor VIII	Hemangiosarcoma
18	N 137	Factor VIII	Hemangiosarcoma
19	A 223	NE	STS

Observación: En color rojo se indican los anticuerpos que dieron inmunomarcación específica.

Tabla 6. Datos de sexo, edad, origen y localización del tumor de todos los individuos estudiados.

N° caso	Sexo	Edad (Años)	Origen del espécimen	ID	Localización del tumor
1	H	9	Maldonado	A N254-Tumor Primer Cirugía	SC
				B N254 Hígado	IC
				C N254 Tumor pegado hígado	IC
				D N254 Tumor pared Estomago	IC
				E N254 Tumor Oviducto Grande	IC
				F N254 Tumor Oviducto	IC
				G N254 Tumor Pegado Riñón	IC
				H N254 Tumor Piel Grande	SC
				I N254 Tumor Piel Chico	SC
2	H	12	Maldonado	A N289 Tumor	SC
				B N289 Cirugía 2 (Recidiva)	SC

3	M	12	Nacida en cautiverio	A A81 Tumor 1	SC
				B A81 Tumor 2	SC
				C A81 Tumor 3	SC
4	M	7		N 203	SC
5	M	6	Nacida en cautiverio	A N253	SC
				B N253 (Recidiva)	SC
6	H	9	Colonia	A A216 Tumor 1	IC
				B A216 Tumor 2	IC
7	M	6	Nacida en cautiverio	A 313	SC
8	M	13		A N134 Tumor 1 Cirug.	SC
				B N134 Tumor 2 Cirug.	SC
				C N134 (Recidiva) Necrop.	SC
9	H	8	Nacida en cautiverio	N 258	SC
10	M	11		N 155	SC
11	H	9	Nacida en cautiverio	A N274 Tumor parte roja	IC
				B N274 Tumor parte blanca	IC
				C N274 Tumor digestivo	IC
				D N274 Tumor Grasa	IC
				E N274 Tumor Col. Vert. 1	IC
				F N274 Tumor Col. Vert. 2	IC
				G N274 Tumor Col. Vert. 3	IC
				H N274 Tumor Col. Vert. 4	IC
12	M	9	Nacida en cautiverio	A N275 Tumor boca	O
				B N275 Tumor estomago	IC
				C N275 Tumor Colum A	IC
				D N275 Tumor Colum B	IC
				E N275 Tumor Colum C	IC
13	H	8		A N121	SC
				B N121	SC
14	H	13		N299	SC

15	M	7	Nacida en cautiverio	A N255	SC
				B N255 (Recidiva)	SC
16	H	14		A N199	SC
				B N 199 (Recidiva)	SC
17	H	10		N 143	IC
18	M	7	Capturada en el puerto Mdeo.	N137	IC
19	H	6	Colonia	A 223	SC

Tabla 7. Datos de metástasis en órganos relevados

	Estomago	Riñon	Pulmòn	Oviducto	Higado	Esplenopancreas	Corazon	Tiroides
N 199	-	-	-	-	-	-	-	
N 137	-	+	+		+		+	+
N274	-	+	-	-	-	-	-	-
N121	-	-	-	-	-	-	-	-
N143	-	-	-	-	-	-	-	-
N134		-			-	-		
N 289		-			-			
N 254	-	-	-		-		-	-
N 203		-			-			
N 275	-	-	-					-

A81				-	-			
-----	--	--	--	---	---	--	--	--

**ANEXO II. ESPECIES POTENCIALMENTE MORTAL PARA EL
HOMBRE EN URUGUAY**



Micrurus altirostris (nombre común: Coral).



Crotalus durissus (nombre común: Cascabel)



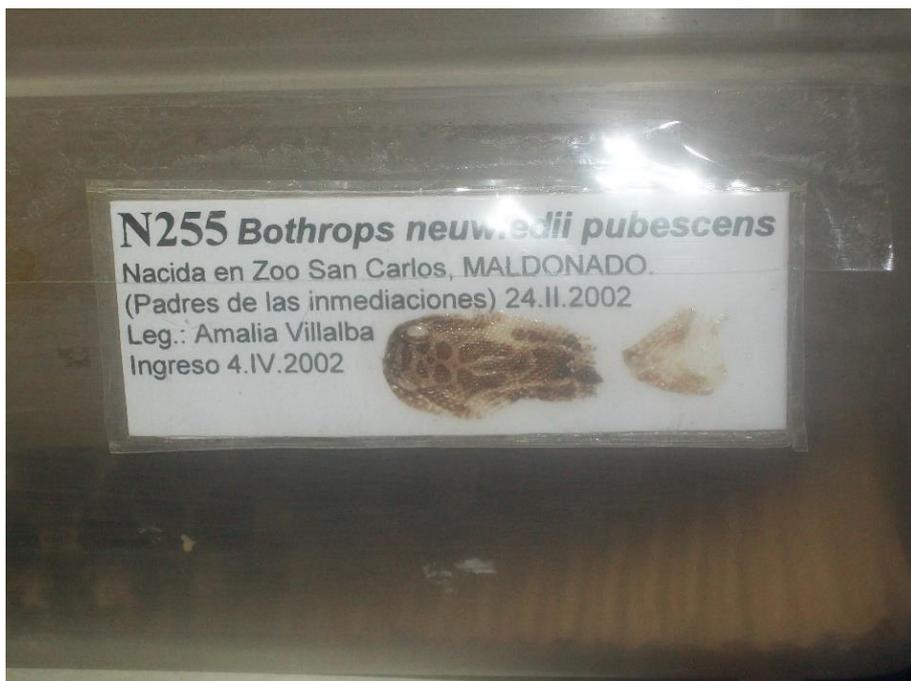
Bothrops alternatus (nombre común: Crucera).



Bothrops pubescens (nombre común: Yara).

ANEXO III. Planillas de seguimiento clínico de los pacientes.

GENERO	ESPECIE	CODIGO
FECHA DE INGRESO	LONGITUD	PESO
SEXO	FECHA DE MUERTE	FECHA DE NECROPSIA
DATOS PRE- MORTEM		
PIEL Y ORIFICIOS EXTERNOS		
DIGESTIVO Y CARDIO RESPIRATORIO		
URINARIO Y REPRODUCTOR		
MUESTRAS DE SANGRE	MATERIAL PARA HISTOPATOLOGÍA	NÚMERO DE INGRESO A COLECCIÓN



Registro alfanumérico de cada ejemplar.

ANEXO IV. PROCEDIMIENTO DE INCLUCION EN PARAFINA Y TINCION CON HE

- **Desparafinar**
 - 1 – Dejar los cortes over night en estufa
 - 2 – Xilol 1 10’
 - 3 – Xilol 2 15’
- **Hidratar**
 - 4 – Alcohol 100° 1’
 - 5 – Alcohol 95° 1’
 - 6 – Alcohol 70° 1’
 - 7 – Lavado en agua corriente (varios pasajes, el ultimo se hace en agua destilada)
- **Tinción**
 - 8 – **Hematoxilina de Mayer** 10’
 - 9 – Lavado con agua corriente 10’
 - 10 – **Eosina** 3-4’
 - 11 – Lavado con agua (Opcional)
- **Deshidratar**
 - 12 – Alcohol 95° 2’
 - 13 – Alcohol 100° 2’
 - 14 – Alcohol 100° 2’
- **Montaje**
 - 15 – Xilol 1 2’
 - 16 – Xilol 2 2’
 - 17 - Montaje

ANEXO IV. PROCEDIMIENTO DE TINCIONES ESPECIALES

- **Desparafinar**

1 – Dejar los cortes over night en estufa

2 – Xilol 1 10'

3 – Xilol 2 15'

- **Hidratar**

4 – Alcohol 100° 1'

5 – Alcohol 95° 1'

6 – Alcohol 70° 1'

7 – Lavado en agua corriente (varios pasajes, el ultimo se hace en agua destilada)

- **Tinción**

8 – **Acido periodico** 10'

9 – Lavar varias veces con agua destilada

10 – **Reactivo de Schiff** tapado 30'

11 –Virar en agua corriente

12 – Hematoxilina 10'

13 – Virar 10'

- **Deshidratar**

14 – Alcohol 95° 2'

15 – Alcohol 100° 2'

16 – Alcohol 100° 2'

- **Montaje**

17 – Xilol 1 2'

18 – Xilol 2 2'

19 – Montaje

ANEXO V. PROCEDIMIENTO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La técnica utilizada se basó en el siguiente protocolo:

a. Fijación: Se tomaron muestras de tumores de dos casos para microscopía óptica, fraccionándolas en bloques de tejido de 1 mm³ para proceder a su fijación en glutaraldehído al 2.5% en solución de sacarosa tamponada con cacodilato sódico (pH 7.4) durante 24 horas.

b. Post-fijación e inclusión: Las muestras fueron talladas respetando las regiones microscópicas, post-fijadas en tetróxido de osmio al 1%, lavadas en una solución de cacodilato sódico de 0.025 M, deshidratadas en etanol y orientadas e incluidas en epón 812.

c. Ultramicrotomía: Para realizar los cortes ultrafinos se utilizó un ultra-micrótomo modelo MT6000-XL, RMC, Inc. Se cortaron la mitad de los bloques obtenidos, dejando la otra mitad como respaldo, se obtuvieron secciones semifinas de 1 µm, las que se tiñeron con solución de azul de toluidina al 1% para realizar la selección de los cortes de las secciones finas de 70 nm. Éstas se recogieron en rejillas de níquel y se contrastaron siguiendo el método de Reynolds (Reynolds, 1963).