

## Presencia de virus eritrocitarios de lagartos (LEV) en *Podarcis bocagei* y *P. carbonelli* (Lacertidae) del noroeste de Portugal

VICENTE ROCA & M. ANGELES GALDÓN

Departament de Zoologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València,  
c/ Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot, (Valencia, España)  
(e-mail: Vicente.Roca@uv.es)

**Resumen:** Se describen inclusiones intraeritrocitarias detectadas en la sangre de los lacértidos *Podarcis bocagei* y *P. carbonelli*, detectadas bajo dos formas: inclusiones vacuolizadas y opacas, e inclusiones acidófilas rodeadas por una zona difusa. Estas inclusiones corresponden a LEV (Virus Intraeritrocitarios de Lagartos, en sus siglas en inglés) y resultan diferentes de otros tipos de inclusiones encontradas en otros grupos de reptiles, en anfibios y en peces. Contrariamente a lo que ocurre con otros parásitos intraeritrocitarios, no hay diferencias de tamaño o forma en los eritrocitos infectados y no infectados por LEV.

**Palabras clave:** lacértidos, parásito, sangre.

**Abstract:** Lizard Intraerythrocytic Virus (LEV) in the blood of *Podarcis bocagei* and *P. carbonelli* (Lacertidae) from northwest Portugal. – Intraerythrocytic inclusions in the blood of the lizards *Podarcis bocagei* and *P. carbonelli* are described. They correspond to two morphological types: vacuolated inclusions and acidophilic inclusions surrounded by a diffuse area. These inclusions are considered LEV (Lizard Erythrocytic Virus) and differ from other inclusions found in other reptiles, amphibians and fish. There are no differences in the size or shape of erythrocytes infected and non-infected by LEV, contrary to that observed in the case of other intraerythrocytic parasites.

**Key words:** blood, lacertids, parasite.

### INTRODUCCIÓN

Desde la primera mitad de la década de 1960, cualquier inclusión esférica encontrada en el citoplasma de los eritrocitos de diversos vertebrados era comúnmente identificada como un corpúsculo paranuclear de naturaleza protozoaria y adscrito bien al género *Toddia* o bien al género *Pirhemocyton* (SPEARE *et al.*, 1991; ESSBAUER & AHNE, 2001). El género *Toddia* fue considerado como un protozoo hasta que MARQUARDT & YAEGER (1967) esbozaron la hipótesis de que estas inclusiones intraeritrocitarias parecían ser el resultado de una infección causada por un desoxirribovirus. Análisis posteriores (BOOKER & YONGUE, 1982; GRUIA-GRAY &

DESSER, 1992; JOHNSRUDE *et al.*, 1997) confirmaron el estatus vírico del género *Toddia*. En cuanto al género *Pirhemocyton*, algunos autores lo consideraron un piroplásmido (ARCAÏ DE PERAZA & DE LA ROCA, 1971), mientras que otros no dudan de su naturaleza vírica (WILLIAMS *et al.*, 2005), incluyéndolo algunos en la familia Iridoviridae (TELFORD & JACOBSON, 1993). Estos mismos autores recomiendan la no utilización de la nomenclatura *Pirhemocyton* y sí el uso de la terminología Virus Eritrocitarios de Lagartos (LEV, Lizard Erythrocytic Virus) a fin de diferenciarlos de otros virus infectivos de otros grupos de vertebrados. Así, las inclusiones observadas en eritrocitos de lagartos se referencian en la

actualidad como LEV evitando con ello, también, alusiones al género *Toddia*, históricamente asociado también a anfibios y ofidios (JOHNSRUDE *et al.*, 1997; ALVES DE MATOS *et al.*, 2002).

En el presente artículo se describen las inclusiones intraeritrocitarias encontradas en los hospedadores *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) y *P. carbonelli* (Pérez-Mellado, 1981) y se discute su estatus taxonómico respecto a inclusiones similares detectadas en otros grupos de vertebrados ectotermos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo se llevó a cabo en dos localidades costeras de la región de Douro litoral y en una localidad interior de la provincia de Tras-Os-Montes e Alto Douro. Las dos localidades costeras fueron: Madalena, UTM 29T NF25 (n = 37 *Podarcis bocagei*), y Torreira, UTM 29T NF21 (n = 33 *P. carbonelli*). Ambas localidades se encuentran geográficamente cercanas (distantes 40 km) y albergan similares hábitats, dunas húmedas cubiertas de vegetación psammófila (véase CARRETERO *et al.*, 2002, para una descripción más detallada). El clima de la región es marítimo atlántico con veranos cálidos e inviernos lluviosos y templados, temperatura anual media de 12°C y precipitación anual total de 1000-1200 mm. La localidad interior, Vila Pouca de Aguiar, UTM 29T PF19 (n = 38 *P. bocagei*) se localiza cerca de la Sierra de Alvao, a 650 m de altura. El clima de esa zona es subatlántico, más frío y seco que el de las otras localidades, con una temperatura anual media de 8°C (DIRECÇÃO GERAL DO AMBIENTE, 1995).

Los animales capturados no mostraban signos aparentes de enfermedad o debilidad. Tras su captura y toma de medidas y de muestras, fueron devueltos al medio. Si bien

los métodos de extracción sanguínea recomendables para estos reptiles son los descritos por BROTONS (2004), por motivos de optimización de recursos y de evitar mayores molestias a los animales, la sangre (una gota) para la preparación de extensiones se obtuvo mediante la ruptura de la cola de cada ejemplar (SEVINÇ *et al.*, 2000) (las colas se conservaron para ser utilizadas también en análisis genéticos). Se llevó a cabo la extensión de la gota de sangre sobre el portaobjetos (PERPIÑAN *et al.*, 2006) y las preparaciones se secaron al aire y se colorearon utilizando el método estándar MayGrünwal/Giemsa. La observación de las preparaciones se realizó con el objetivo 100x siguiendo las rutinas estándar (SACCHI *et al.*, 2007).

### RESULTADOS

En 24 de 75 ejemplares de *Podarcis bocagei* (prevalencia 32%) y 8 de 33 de *P. carbonelli* (prevalencia 24.2%) se detectó la presencia de inclusiones características muy probablemente causadas por un desoxirribovirus icosaédrico citoplasmático.

Las inclusiones responden a dos patrones morfológico-estructurales: (i) inclusiones vacuolizadas que se muestran como estructuras más o menos regulares y opacas, que ocupan una porción variable del citoplasma eritrocitario, y (ii) inclusiones de menor tamaño, acidófilas, en algunos casos adyacentes a las primeras y, en ocasiones, rodeadas por una zona difusa (Fig. 1). Dentro de este último tipo, se observaron varios casos en los que las inclusiones presentaban una serie de evaginaciones periféricas.

Se llevó a cabo la medición del diámetro máximo de eritrocitos infectados y no infectados por LEV sin detectarse diferencias de tamaño o de forma entre las células infectadas y las que no lo estaban.

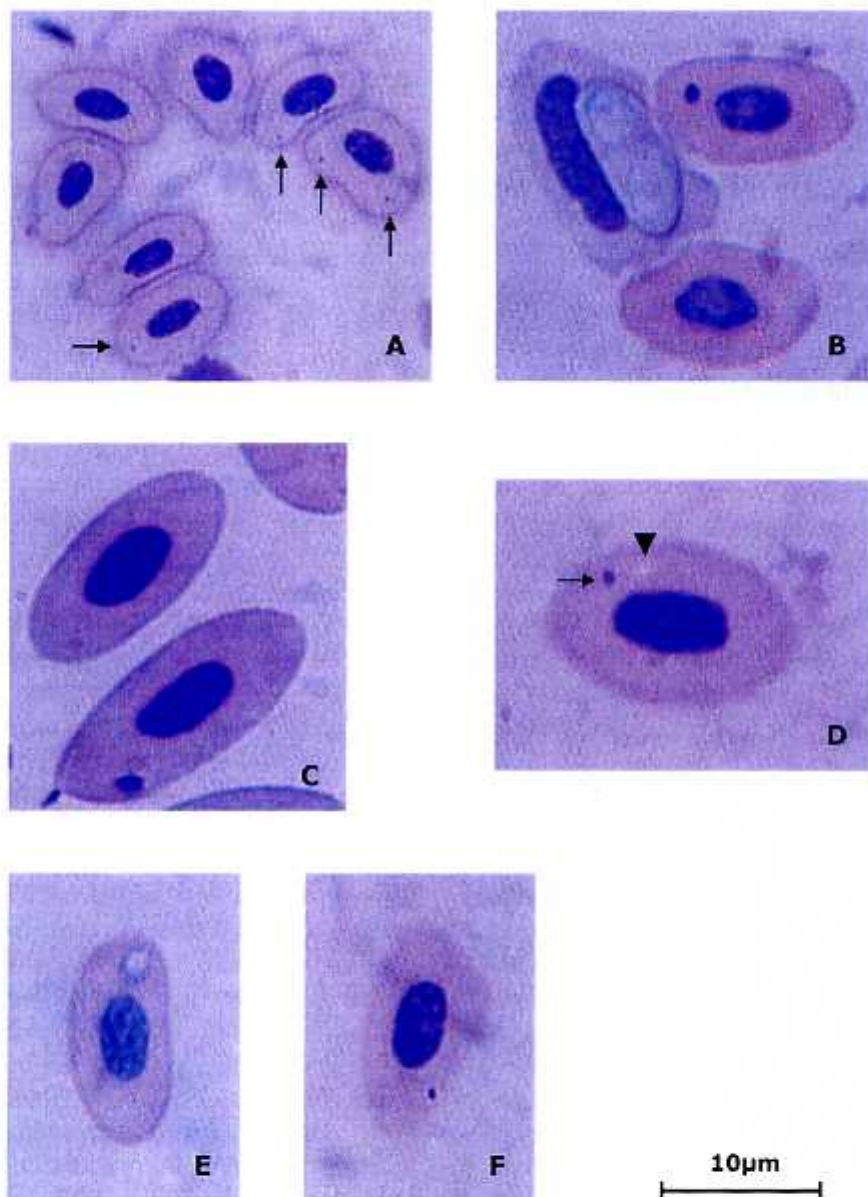


FIGURA 1. Virus Eritrocitarios de Lagartos (cuerpos de inclusión). (A) Eritrocitos infectados. (B) Inclusión acidófila (en la parte izquierda, un eritrocito infectado por una hemogregarina). (C) Inclusión acidófila con evaginaciones periféricas. (D) Inclusión de tipo acidófilo (flecha) adyacente a inclusión de tipo vacuolar (punta de flecha). (E) Inclusión vacuolizada de morfología regular. (F) Inclusión acidófila rodeada por zona difusa. A, C y D procedentes de *Podarcis bocagei*. B, E y F procedentes de *P. carbonelli*.

FIGURE 1. Lizard Intraerythrocytic Virus. (A) Infected erythrocytes. (B): Acidophilic inclusion (at the left, erythrocyte infected by a haemogregarine). (C) Acidophilic inclusion with peripheral evaginations. (D) Acidophilic inclusion (arrow) adjacent to a vacuolated inclusion (end of arrow). (E) Vacuolated regular inclusion. (F) Acidophilic inclusion surrounded by diffuse area. A, C and D from *Podarcis bocagei*. B, E and F from *P. carbonelli*.

## DISCUSIÓN

Las inclusiones intraeritrocitarias en lagartos, como las encontradas en *Podarcis bocagei* y *P. carbonelli*, se encuadran en la actualidad bajo la denominación genérica de LEV (véase Introducción) evitando con ello la utilización del epíteto *Pirhemocytion* y para su diferenciación de los FEV (Frog Erythrocytic Virus), de los SEV (Snake Erythrocytic Virus) (SMITH *et al.*, 1994) y de los VEN (Viral Erythrocytic Necrosis) (MACMILLAN *et al.*, 1989). La presente es la primera cita de este tipo de inclusiones para lagartos de la Península Ibérica.

La diferencia fundamental entre los LEV, los SEV y los FEV radica en la presencia o ausencia de un tercer tipo de inclusión o cuerpo cristalino menos común, visible en microscopía óptica, de forma variable y frecuentemente asociado a lo que SMITH *et al.* (1994) denominaron como masas floculentas de material citoplásmico. Así, esos tres tipos de virus eritrocitarios presentan comúnmente inclusiones citoplasmáticas que responden a los dos patrones morfológico-estructurales referidos anteriormente (véase Resultados), esto es, un primer tipo de aspecto vacuolar, irregular y más o menos opaco, y un segundo tipo acidófilo y de menor tamaño y que se corresponde con el lugar del ensamblaje viral (SPEARE *et al.*, 1991; TELFORD & JACOBSON, 1993; JOHNSRUDE *et al.*, 1997). Por el contrario, el tercer tipo de inclusión está presente tanto en FEV (SPEARE *et al.*, 1991; GRUIA-GRAY & DESSER, 1992) como en SEV (BROOKER & YONGUE, 1982; JOHNSRUDE *et al.*, 1997), pero ausente en LEV (STEBBENS & JOHNSTON, 1996; TELFORD & JACOBSON, 1993).

No obstante, existen de casos de anfibios en cuyos eritrocitos no se apreció la existencia de este tercer tipo de inclusión (BERNARD *et al.*, 1969; PEREIRA *et al.*, 1973), razón por la cual ALVES DE MATOS *et al.*

(1995) dudan de su valor como carácter diferencial entre los LEV, SEV y FEV. Por otro lado, JOHNSRUDE *et al.* (1997) no hacen referencia alguna a la existencia de inclusiones de tipo vacuolar en eritrocitos de *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae) y señalan únicamente la existencia de inclusiones acidófilas y cuerpos cristalinos no siempre coincidentes en el mismo eritrocito, lo cual podría estar relacionado con las distintas fases de infección (GRUIA-GRAY & DESSER, 1992; TELFORD & JACOBSON, 1993).

A diferencia de lo que ocurre con otros parásitos sanguíneos intraeritrocitarios, como por ejemplo *Hepatozoon* spp. (MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2001; ROCA & GALDÓN, 2010), no hay diferencias de tamaño o forma en los eritrocitos infectados y no infectados por LEV, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores (SPEARE *et al.*, 1991; PAPERNA & ALVES DE MATOS, 1993; ALVES DE MATOS *et al.*, 2002), si bien TELFORD & JACOBSON (1993) y SMITH *et al.* (1994) señalan un ligero aumento de volumen de los eritrocitos infectados en relación con fases avanzadas de la infección en el caso de FEV. El orden de aparición en cuanto a grado de desarrollo de los distintos tipos de inclusiones tiene sentido desde el momento en que, mientras las primeras están relacionadas con los lugares de ensamblaje viral, las terceras parecen representar una respuesta del hospedador frente a la infección vírica (GRUIA-GRAY *et al.*, 1989), o bien agregados de proteína viral residual (GRUIA-GRAY & DESSER, 1992), lo que explicaría el hecho de que este tercer tipo de inclusión presenta formas variadas entre los distintos grupos de anfibios y reptiles.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PTDC/BIA-BDE/67678/2006 del FCT, Portugal.

## REFERENCIAS

- ALVES DE MATOS, A.P., PAPERNA, I. & CRESPO, E. (2002): Experimental infection of lacertids with lizard erythrocytic viruses. *Intervirology*, 45: 150-159.
- ALVES DE MATOS, A.P., PAPERNA, I. & LAINSON, R. (1995): An erythrocytic virus of the Brazilian tree-frog, *Phrynohyas venulosa*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 653-655.
- ARCAY DE PERAZA, L. & DE LA ROCA, C. (1971): The "paranuclear corpuscles" in poikilothermic vertebrates: description of a new species of *Pirhemocytion* in *Iguana iguana* of Venezuela, with remarks on the nature of these organisms and their relation to allied parasites. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 69: 57-67.
- BERNARD, G.W., COOPER, E.L. & MANDELL, M.L. (1969): Lamellar membrane encircled viruses in the erythrocytes of *Rana pipiens*. *Journal of Ultrastructural Research*, 26: 8-16.
- BOOKER, K.A. & YONGUE, W.H. Jr. (1982): *Cytotoddia* (= *Toddia*) infection of Serpentes and its incidence in two geographical areas. *Virginia Journal Science*, 33: 11-21.
- BROTONS, N. (2004): Toma de muestras de sangre y orina en animales exóticos. Parte I: Reptiles. *Pequeños Animales Revista Veterinaria*, 50: 42-48.
- CARRETERO, M.A., BARBOSA, D., SÁ' SOUSA, P., HARRIS, D.J. & PINHO, C. (2002): Sintopía estricta entre *Podarcis bocagei* y *P. carbonelli*. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 13: 20-24.
- DIRECÇÃO GERAL DO AMBIENTE. (1995): *Atlas do Ambiente*. Direcção Geral do Ambiente, Lisboa.
- ESSBAUER, S. & AHNE, W. (2001): Viruses of lower vertebrates. *Journal of Veterinary Medicine*, 48: 403-475.
- GRUIA-GRAY, J. & DESSER, S.S. (1992): Cytopathological observations and epizootiology of frog erythrocytic virus in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 34-41.
- GRUIA-GRAY, J., PETRIC, M. & DESSER, S.S. (1989): Ultrastructural, biochemical and biophysical properties of an erythrocytic virus of frogs from Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 25: 497-506.
- JOHNSRUDE, J.D., RASKIN, R.E., HOGE, Y.A. & ERDOS, G.W. (1997): Intraerythrocytic inclusions associated with iridorival infection in a Fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake. *Veterinary Pathology*, 34: 235-238.
- MACMILLAN, J.R., MULCAHY, D. & LANDOLT, M.L. (1989): Cytopathology and coagulopathy associated with viral erythrocytic necrosis in chum salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1: 255-262.
- MARQUARDT, W.C. & YAEGER, R.G. (1967): The structure and taxonomic status of a *Toddia* from the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus leuostoma*. *Journal of Protozoology*, 14: 726-731.
- MARTÍNEZ SILVESTRE, A., MATEO, J.A., SILVEIRA, L.S. & BANNERT, B. (2001): Presencia de protozoos intraeritrocitarios en el lagarto gigante de La Gomera (*Gallotia simonyi gomerana*). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 12: 90-92.
- PAPERNA, I. & ALVES DE MATOS, A.P. (1993): Erythrocytic viral infections of lizards and frogs: new hosts, geographical locations and description of the infection process. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 16: 105-109.
- PEREIRA, N.D.M., COSTA, S.C.G. & DE SOUSA, M.A. (1973): *Toddia* sp., "corpúsculo paranuclear" no sangue de *Leptodactylus* e *Bufo* do Brasil. Desen-

- volvimiento e citoquímica. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 71: 19-31.
- PERPIÑAN, D., HERNANDEZ-DIVERS, S.M., MCBRIDE, M. & HERNANDEZ-DIVERS, S.J. (2006): Comparison of three different techniques to produce blood smears from green iguanas, *Iguana iguana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 16: 99-101.
- ROCA, V. & GALDÓN, M.A. (2010): Haemogregarine blood parasites in the lizards *Podarcis bocagei* and *Podarcis carbonelli* from NW Portugal. *Systematic Parasitology*, 75: 75-79.
- SACCHI, R., PUPIN, F., ZUFFI, A.L., SCALI, S., BONCONPAGNI, E., BINDA, A., GALEOTTI, P. & FASOLA, M. (2007): Blood cell morphology of the Moorish gecko, *Tarentola mauritanica*. *Amphibia-Reptilia*, 28: 503-508.
- SEVINÇ, M., UGURTAS, L.H. & YILDIRIMHAN, H.S. (2000): Erythrocyte measurements in *Lacerta rudis* (Reptilia, Lacertidae). *Turkey Journal of Zoology*, 24: 207-209.
- SMITH, T.G., DESSER, S.S. & HONG, H. (1994): Morphology, ultrastructure, and taxonomic status of *Toddia* sp. in northern water snakes (*Nerodia sipedon sipedon*) from Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 30: 169-175.
- SPEARE, R., FREELAND, W.J. & BOLTON, S.J. (1991): A possible iridovirus in erythrocytes of *Bufo marinus* in Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 27: 457-462.
- STEBBENS, W.E. & JOHNSTON, M.R.L. (1996): The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*. *Journal of Ultrastructural Research*, 15: 543-554.
- TELFORD, S.R. JR. & JACOBSON, E.R. (1993): Lizard erythrocytic virus in East African chameleons. *Journal of Wildlife Diseases*, 29: 57-63.
- WILLIAMS, T., BARBOSA-SOLOMIEU, V. & CHINCHAR, V.G. (2005): A decade of advances in iridovirus research. *Advances in Virus Research*, 65: 173-248.

ms # 255

Recibido: 08/04/09

Aceptado: 13/03/11