

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



“Citología del epitelio genital de crías hembras de elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, en el Pacífico Mexicano, y exploración de la presencia de patógenos oncogénicos”

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Microbiología

Presenta:

Valeria Aline Ramírez Ramírez

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse
Presidente

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Secretario

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández
Vocal

M. en C. Cecilia Barragán Vargas
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo 2020
México

“Citología del epitelio genital de crías hembras de elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, en el Pacífico Mexicano, y exploración de la presencia de patógenos oncogénicos”

RESUMEN

La estructura de las comunidades microbianas en los epitelios juega un papel fundamental para la salud de los hospederos, y de la integridad de los tejidos. El lobo fino austral y el lobo marino de California presentan carcinoma urogenital (CUG), y en este último tiene una prevalencia del 25% en individuos varados en las costas de California. La presencia de CUG se ha atribuido principalmente a la acumulación de pesticidas y a infecciones por un gamaherpesvirus OtHV-1, mientras que la transformación pre-cancerígena a papilomavirus. El elefante marino del Norte comparte parte de su distribución geográfica con el lobo marino de California, por lo que puede estar expuesto a los mismos contaminantes y patógenos que provocan el desarrollo del CUG en el lobo marino de California. Hasta la fecha no hay reportes de CUG en el elefante marino del Norte, ni se ha explorado la frecuencia de la transformación pre-cancerígena. Esta tesis es la primera aproximación a estudiar la presencia de OtHV-1, papilomavirus y la microbiota del epitelio vaginal en relación a la transformación oncogénica en una especie de vida libre. Se observó que el elefante marino del Norte tiene mayor prevalencia de OtHV-1, papilomavirus y de células reactivas (36.84 %), binucleadas (52.63 %) y de metaplasia atípica (47.37 %) que el lobo marino de California, aunque la intensidad con la que se presentaron estos tipos celulares es mayor. Se identificaron 1,460 variantes de secuencias de amplificación (ASVs, por sus siglas en inglés), de las cuales 53 conformaron el bacterioma central. Los Firmicutes fueron el filo más abundante (25.53 %), mientras que la clase más abundante fue Bacilli (21.44 %). La composición del microbioma bacteriano del elefante marino del Norte concuerda con lo esperado para el epitelio vaginal de otros mamíferos. A pesar de la presencia de los patógenos oncogénicos y la frecuencia de la transformación pre-oncogénica epitelial, la ausencia de cáncer sugiere una mayor resistencia al desarrollo de esta patología.

Palabras clave: Epitelio genital, bacterioma, microbioma, virus oncogénicos, elefante marino del Norte, transformación precancerígena.

“Cytology of the genital epithelium of female weanlings of Northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*, in the Mexican Pacific, and exploration of the presence of oncogenic pathogens”

SUMMARY

The structure of the microbial communities of epithelia is fundamental for the health of the hosts and the integrity of the tissues. The south American fur seal and the California sea lion are known to develop urogenital carcinoma (UGC), a pathology that currently has a prevalence of 25% in individuals stranded on the coast of California. The presence of UGC has been attributed mainly to accumulation of pesticides and infections by a gammaherpesvirus OtHV-1, while precancerous transformation has been linked to papillomavirus. The Northern elephant seal shares part of its distribution with the California sea lion, so it is likely to be exposed to some of the same pollutants and pathogens that cause the development of UGC in the California sea lion. Until now there are no reports of UGC in the Northern elephant seal. This thesis is the first approach to investigate the presence of oncogenic pathogens, characterize the microbiome of the vaginal epithelium and examine their association with pre-oncogenic transformation in a free-living species. The Northern elephant seal was found to have a higher prevalence of OtHV-1, papillomavirus and reactive cells (36.84%), binucleated (52.63%) and atypical metaplasia (47.37%) than the California sea lion, although their intensity was greater. We detected 1,460 amplicon sequence variants (ASVs), and 53 of those formed the core bacteriome of the Northern elephant seal. Firmicutes were the most abundant phylum (25.53%), and the most abundant class was Bacilli (21.44%). The composition of the bacterial microbiome in the Northern elephant seal is consistent with that expected for the epithelium of the vagina. The interaction of the Northern elephant seal with pro-oncogenic pathogens, the abnormal transformation of their epithelium and the absence of cancer suggests greater resistance to cellular transformation.

Keywords: Genital epithelium, bacteriome, microbiome, oncogenic viruses, Northern elephant seal, precancerous transformation.

DEDICATORIAS

A mis papás, por creer en mí durante los momentos más difíciles, por siempre apoyarme en todas mis decisiones y motivarme a alcanzar mis metas, sin su soporte no podría haber logrado esta tesis, me brindaron todas las herramientas necesarias para enfrentar nuevos retos, y agradezco infinitamente su amor.

A mis hermanos; Rebeca y Sebastián, tener que soportarlos siempre es una dicha, no podría imaginar la vida sin sus palabras inventadas, risas y chistes malos, siempre tendrán mi apoyo.

A mi Abue, por ser mi segunda madre y criarme con tanto amor.

A mi tía Blanca, y mi tío Miguel, quienes siempre me enseñan a ser crítica y honesta.

A Karen y Lili, por toda una vida de aventuras.

It always seems impossible until it is done.

-Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Autónoma de Querétaro, por el programa FOFI, el cual patrocinó este proyecto.
- A Karina Alethya Acevedo Whitehouse, por brindarme su apoyo y confianza para llevar a cabo este proyecto, por todo el conocimiento compartido durante mi formación en la licenciatura, por mostrarme la belleza de Benitos, y sobre todo, por enseñarme el amor a la ciencia.
- A Cecilia Barragán Vargas, quien me introdujo a este maravilloso tema, por sus enseñanzas, paciencia frente al microscopio y su soporte durante todo el proyecto.
- A Fausto Arellano Carbajal y Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández por contribuir en mi formación, por el apoyo y las correcciones que me brindaron.
- A Carlos, por su ayuda y paciencia para resolver todas mis dudas.
- A mis profesores, quienes ofrecieron su conocimiento y compartieron su pasión por diferentes temas.
- Al laboratorio GMEE, cuyos integrantes me apoyaron y aconsejaron durante todo este trabajo; a Nami, Marina, Anahí, Ara, Fabi y Pereida.
- A mis amigos: Rocío, Gibrán, Carina, Pacheco, Jairo, Dani, Nalle y Juanjo, con quienes compartí increíbles aventuras, miles de risas y las mejores charlas.
- A Oscar, Omar, Abi, Vane, Laura, Karen y Karenzo, por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	12
II.1. Epitelio genital	12
II.1.1. Transformación del epitelio genital	13
II.2. Comunidades microbianas de los epitelios de mamíferos	16
II.3. Transformación de los epitelios y su relación con microorganismos	19
II.4. VPH y la transformación epitelial	22
II.5. Herpesviridae y la transformación epitelial	23
II.6. El cáncer en la fauna silvestre	25
II.7. Cáncer en pinnípedos	26
II.8. El elefante marino del Norte	30
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
VI. METODOLOGÍA	35
VI.1. Área de muestreo	35
VI.2. Colecta de muestras	36
VI.3. Análisis de las muestras	36
VI.3.1. Caracterización citológica	36
VI.3.2. Extracción y purificación de ADN	38
VI.3.3. Detección de posibles patógenos oncogénicos	38
VI.3.4. Clonación a partir de PCR	40
VI.3.5. Análisis estadísticos	41
VI.3.6. Secuenciación masiva	42
VI.3.6.1. Detección de ADN bacteriano	42
VI.3.6.2. Análisis del fragmento 16SrRNA	43

VII. RESULTADOS	45
VII.1. Descripción morfológica celular del epitelio genital del elefante marino del Norte	45
VII.2. Prevalencia e intensidad de los tipos celulares del epitelio genital del elefante marino del Norte	47
VII.3. Prevalencia de displasia genital	49
VII.4. Prevalencia de agentes infecciosos con potencial oncogénico	50
VII.5. Caracterización del microbioma bacteriano genital	51
VIII. DISCUSIÓN	58
IX. CONCLUSIONES	63
X. BIBLIOGRAFÍA	64

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reportes de cáncer en pinnípedos.	29
Cuadro 2. Prevalencia de displasia en epitelio genital del elefante marino del Norte.	50
Cuadro 3. Clasificación taxonómica del microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.	56
Cuadro 3 (Continuación). Clasificación taxonómica del microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.	57

Dirección General de Bibliotecas UAQ

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Progresión de la transformación celular durante un proceso de carcinogénesis. Imagen modificada de Terese Winslow LLC Medical and Scientific Illustration (2014). 13
- Figura 2.** Células binucleadas. Imagen tomada del Manual de Citopatología Diagnóstica (Gamboni y Miziara, 2011). 14
- Figura 3.** Células reactivas. Imagen tomada de Citopatología de los ganglios linfáticos (Viguer et al., 1997). 15
- Figura 4.** Células de metaplasia atípica. Imágenes tomadas del Manual de Citopatología Diagnóstica (Gamboni y Miziara, 2011). 15
- Figura 5.** Células coilocíticas. Imagen tomada del Boletín Oncológico del área sanitaria de Teruel (Spinoso-Cruz y Muniesa-Soriano, 2008). 16
- Figura 6.** Mapa del Archipiélago de San Benito compuesto por la isla del Oeste, la isla Central y la isla del Este. Imagen tomada de Elorriaga-Verplancken et al., 2015. 35
- Figura 7.** Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** células normales, **B** células pleomórficas, **C** células metaplásicas. 45
- Figura 8.** Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** neutrófilos, **B** linfocitos. 46
- Figura 9.** Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** coilocitos, **B** células de metaplasia atípica, **C** células reactivas, **D** células binucleadas. 47
- Figura 10.** Prevalencia de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. Las barras rojas corresponden a los tipos celulares relacionados con transformación pre-cancerígena, mientras que las barras azules son del resto de los tipos celulares encontrados. 48
- Figura 11.** Intensidad medida en celularidad de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. 49
- Figura 12.** Prevalencia de ADN viral de OtHV-1 y papilomavirus en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte y lobo marino de California del Archipiélago de San Benito. Los datos del lobo marino de California se obtuvieron de Barragán-Vargas (2015). 51
- Figura 13.** Abundancia de los Phyla del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano. 52
- Figura 14.** Abundancia de las clases del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano. 53

Figura 15. Diversidad del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano. **A.** diversidad observada, **B.** índice de Shannon, **C.** índice de Simpson. 54

Figura 16. Tendencia de los ASVs que conforman el microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. 55

Figura 17. Heatmap de las familias que integran el microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. 55

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

La microbiota, es decir, todos los microorganismos que habitan en los órganos y tejidos de los organismos, como la piel o el intestino, es un ecosistema complejo cuya composición y diversidad varía entre especies (Luo et al., 2017). Cuando existe una alteración en el funcionamiento y en la diversidad de microorganismos que conforman la microbiota, se da un proceso conocido como disbiosis (Levy et al., 2017). El papel de la microbiota, en particular de la microbiota bacteriana, es clave para el correcto desarrollo y funcionamiento de los diferentes sistemas que conforman a un organismo (Sekirov et al., 2010; Rooks y Garrett, 2016). La microbiota puede influir en la transformación celular pre-cancerígena al intervenir en las funciones que realiza el sistema inmune, o bien mediante señales que modifican el comportamiento de las células (Garrett, 2015). Algunos virus también han sido asociados con el desarrollo de tumores malignos, como el caso del virus de Epstein-Barr, el virus de la hepatitis B o el virus del papiloma humano (VPH) (Foulongne et al., 2012; Ewald et al., 2015; Mitra et al., 2016).

La mayoría de los casos de cáncer cervical en humanos se han atribuido a ciertos patógenos, de los cuales el principal es el VPH (Sarita y Sarita, 2017). Estos virus cuentan con proteínas que ayudan a la progresión de la transformación cancerígena y la evasión del sistema inmune (Mitra et al., 2015; Schiffman et al., 2016; McBride y Warburton, 2017). El VPH infecta a las células basales que se encuentran en la zona de transición del cérvix, y se propaga a través las capas epiteliales que van madurando. Cuando alcanza un grado alto de infección celular, logra transformar todo el epitelio e induce la formación de tumores con características de malignidad que logran invadir el estroma (Schiffman et al., 2016). Algunos gammaherpesvirus también han sido asociados al desarrollo de cáncer en diferentes especies. Entre estos virus resalta el herpes virus simple tipo 2 (HSV-2) que ha sido relacionado a una transformación celular que también puede conducir al desarrollo de cáncer cervical (Rawls et al., 1968; Macnab, 1974).

En contraste con lo que se ha investigado sobre el microbioma del humano, para los animales de vida libre a la fecha existen pocos estudios semejantes, y por eso aún tenemos escasa información sobre cómo varía de acuerdo a la historia de vida de los organismos, o conforme a sus hábitos alimenticios que pueden incluir largos periodos de inanición y el tipo de dieta que tienen (Colston y Jackson, 2016). Sin embargo, al igual que ocurre en el humano, las células de otros animales pueden transformarse y malignizarse. Se han reportado casos de cáncer en animales de vida libre, aunque tienen menor prevalencia que en el humano y los animales domésticos y parecen ser eventos esporádicos en su mayoría.

Actualmente el CUG afecta al 25 % de los animales varados en las costas de California (Deming et al., 2018). Los tumores se han encontrado en adultos y subadultos, aunque en 2016 se reportó que las crías también pueden tener transformación pre-cancerígena del epitelio genital (Barragán-Vargas et al., 2016). El desarrollo de cáncer en estos animales se ha asociado principalmente a la presencia de un gamaherpesvirus de otáridos (OthV-1), que fue aislado a partir de tejido tumoral (King et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que otros microorganismos, como el papilomavirus del lobo marino de California, también están presentes en muestras de CUG (Rivera et al., 2012). Más recientemente, el CUG ha sido reportado en otra especie, en el lobo fino austral (*Arctocephalus australis*), y se ha sugerido que la patología podría estar asociado a la presencia de OthV-1 (Dagleish et al., 2013), al igual que lo reportado para el lobo marino de California. En fócidos no existen muchos reportes de cáncer, y ninguno de CUG. Sin embargo, dado que algunas especies de pinnípedos, como el elefante marino del Norte, comparten algunas zonas de su distribución con el lobo marino de California (Elorriaga-Verplancken et al., 2015), y por lo tanto están expuestos a varios de los mismos factores de riesgo, resulta interesante observar que no se hayan presentado casos de CUG.

Entre los machos y las hembras del elefante marino del Norte hay un claro dimorfismo sexual, debido a las diferencias en cuanto al tamaño y a la presencia de una probóscide nasal en los machos (Le Boeuf y Laws, 1994; Coorevits et al., 2018). Esta especie es capaz de bucear 1.5 km durante dos horas, lo que les permite alejarse de la costa y encontrar alimento en las profundidades del mar (Le Boeuf y Laws, 1994). Sin embargo, tienen periodos en tierra bien definidos, principalmente durante la época reproductiva, donde se da el nacimiento y la lactancia de las crías durante 28 días después de su nacimiento (Stewart y DeLong, 1995; Habran et al., 2010).

El elefante marino del Norte y el lobo marino de California forman parte de la superfamilia de los pinnípedos (Riedman, 1990), y a lo largo de la costa Noreste del Pacífico comparten colonias reproductivas, aunque difieren en sus hábitos alimenticios y de buceo (Peterson y Bartholomew, 1969). Sin embargo, es posible que ambas especies estén expuestas a los mismos factores que influyen en el desarrollo de CUG en el lobo marino de California. Esta tesis investigó la presencia de células pre-cancerígenas y de los patógenos potencialmente oncogénicos, OthV-1 y papilomavirus, en el epitelio cervical de crías de elefante marino del Norte, y se contrastaron los resultados con lo reportado para el lobo marino de California. También se caracterizó el microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte y se comparó con el del lobo marino de California y el del humano, para realizar un análisis preliminar sobre las variaciones en la composición del microbioma bacteriano del tracto cervical de estas especies, como una primera aproximación a identificar especies o grupos de especies bacterianas que estén relacionadas con una mayor susceptibilidad a la transformación celular.

II. ANTECEDENTES

II.1. Epitelio genital

El epitelio es un tejido compuesto por diferentes capas de células que recubre toda la superficie externa de los organismos y de sus órganos (Ross y Pawlina, 2015). Las células que conforman el tejido epitelial presentan tres características principales: tienen uniones intercelulares muy estrechas, poseen diferentes funciones asociadas a regiones morfológicas de las células y se encuentran apoyadas en una membrana basal (Lowe y Anderson, 2015; Ross y Pawlina, 2015). El tejido epitelial puede clasificarse como simple o estratificado de acuerdo a la cantidad de capas por las que está formado; además, en términos de la arquitectura de sus células, estas pueden ser escamosas, cúbicas y cilíndricas (Lowe y Anderson, 2015; Ross y Pawlina, 2015).

El epitelio del tracto cervical se encuentra dividido de acuerdo a la cercanía al útero. El exocérnix es la región más próxima a la cavidad vaginal y está formado por epitelio plano estratificado, mientras que el endocérnix está formado por epitelio cilíndrico simple, y es la región más cercana al útero (Kurman y Solomon, 1994; Botella, 1997; Ross y Pawlina, 2015). El exocérnix se encuentra dividido en varios estratos: basal, parabasal, intermedio y superficial, donde las células del estrato basal son las únicas que pueden dividirse y generar células nuevas, que irán madurando hasta llegar al estrato superficial, donde dichas células se desprenderán (Botella, 1997; Tatti, 2011).

Las células basales forman una sola capa de células que se caracterizan por tener un núcleo grande y poco espacio citoplasmático, el cual incrementa mientras maduran (Tatti, 2011; Lowe y Anderson, 2015; Ross y Pawlina, 2015). Las células parabasales tienen mayor cantidad de citoplasma, son más grandes que las células basales y forman el estrato parabasal (Tatti, 2011; Ross y Pawlina, 2015). El estrato intermedio se encuentra formado por células que están madurando, cuyo citoplasma aumenta y gradualmente su núcleo se pierde, de forma que las células superficiales pueden tener un núcleo picnótico o inexistente con abundante citoplasma (Botella, 1997; Tatti, 2011; Ross y Pawlina, 2015).

Al iniciar la edad reproductiva, los estrógenos y la progesterona inducen la maduración y descamación del epitelio, el cual se renueva constantemente, de acuerdo a la cantidad de estrógeno que se segregue (Tatti, 2011; Ross y Pawlina, 2015). Después de la menopausia, el epitelio pierde grosor y la renovación no es tan frecuente, lo que disminuye la protección, dando paso a infecciones (Tatti, 2011).

Entre el exocérvix y el endocérvix está la unión escamocolumnar, la cual es conocida durante la infancia como unión escamocolumnar original (Tatti, 2011). En la pubertad esta zona se alarga y llega a su máximo desarrollo durante el inicio de la etapa reproductiva cuando se da la menarca, momento en el que se conoce como unión escamocolumnar funcional, la cual se vuelve una zona de transición donde se encuentran células metaplásicas (Botella, 1997; Tatti, 2011). La metaplasia se refiere al cambio de las células cilíndricas a células escamosas, las cuales reflejan la maduración normal del epitelio cervical (Botella, 1997; Ross y Pawlina, 2015).

Existen dos mecanismos por los cuales se da la transición del epitelio cilíndrico al escamoso. Uno, el crecimiento del epitelio escamoso en la zona de transición, y dos, debido a la proliferación de las células de reserva, las cuales comienzan a diferenciarse en células escamosas (Tatti, 2011). La unión escamocolumnar madura es capaz de responder a estímulos hormonales, y es la zona en la que se dan las lesiones precursoras del cáncer del cuello uterino (Botella, 1997; Tatti, 2011).

II.1.1. Transformación del epitelio genital

Durante el desarrollo de tumores (Figura 1), la morfología típica de las células se pierde de forma paulatina hasta que el tumor se vuelve invasivo (Lowe y Anderson, 2015; Nayar y Wilbur, 2015). Los métodos para el diagnóstico de la transformación del cuello uterino suelen ser muy eficientes y poco invasivos, como la prueba de Papanicolau, la cual se diseñó con base en el conocimiento que se tiene del cambio morfológico de las células del epitelio cervicouterino (Tatti, 2011; Nayar y Wilbur, 2015).

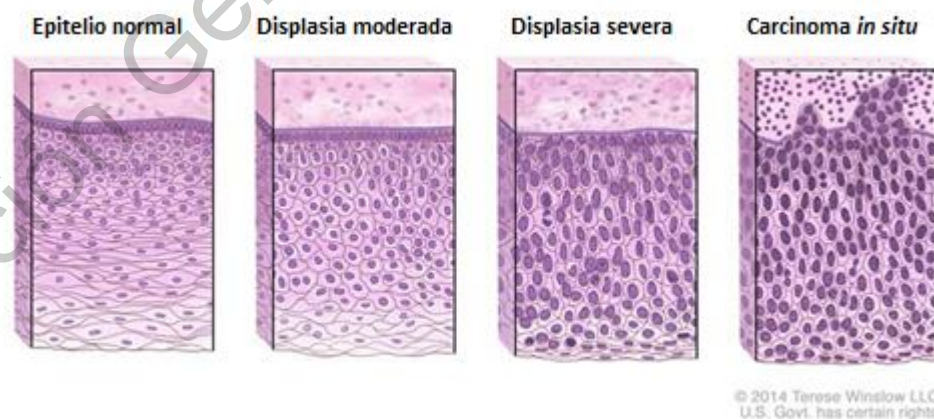


Figura 1. Progresión de la transformación celular durante un proceso de carcinogénesis. Imagen modificada de Terese Winslow LLC Medical and Scientific Illustration (2014).

Para la detección de la transformación del epitelio cervical, las principales células que se buscan son aquellas que pueden indicar un cambio pre-cancerígeno en el epitelio genital, entre las cuales están las células binucleadas, células reactivas, células que presentan metaplasia atípica y coilocitos, los cuales en humanos son característicos de infección por virus del papiloma humano (VPH) (Nayar y Wilbur, 2015).

Cuando se observan células binucleadas en muestras del epitelio cervical, se asume que el epitelio está madurando de forma incorrecta, ya que como se mencionó anteriormente, las células del estrato superficial pueden tener un núcleo pequeño o ni siquiera tenerlo, por lo que estas células no deberían ser capaces de dividirse (Nayar y Wilbur, 2015). Estas células son fáciles de identificar en el microscopio, ya que se ven ambos núcleos muy pegados y compartiendo el mismo espacio citoplasmático (Figura 2). Este fenómeno se asocia a la transformación celular anormal que puede aparecer a causa de una desregulación en la programación de la célula ocasionada a su vez por diversos factores (Kurman y Solomon, 1994).

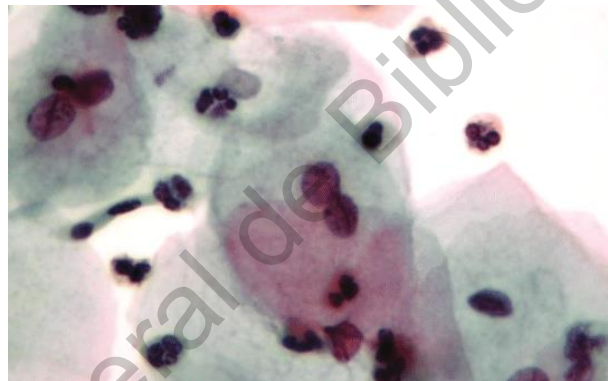


Figura 2. Células binucleadas. Imagen tomada del Manual de Citopatología Diagnóstica (Gamboni y Miziara, 2011).

Las células reactivas se caracterizan por presentar un núcleo en el que se observan huecos dentro de éste debido al proceso de reestructuración de la eucromatina y heterocromatina (Figura 3), lo que se asocia a la producción descontrolada de elementos necesarios para la supervivencia y replicación de la célula (Kurman y Solomon, 1994). Al igual que en el caso de las células binucleadas, las células reactivas indican una transformación anormal del epitelio. En este caso, la célula está "estresada" e intenta solucionar bioquímica y molecularmente los problemas para asegurar su supervivencia (Botella, 1997). Si bien este tipo de células puede indicar transformación pre-cancerígena, también es posible encontrarlas en epitelio sano (Kurman y Solomon, 1994), por lo que es necesario hacer una correcta determinación de la salud del epitelio vaginal tomando en cuenta otros tipos de morfologías celulares.

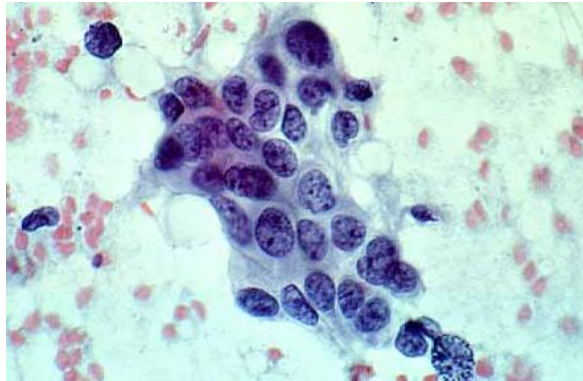


Figura 3. Células reactivas. Imagen tomada de Citopatología de los ganglios linfáticos (Viguer et al., 1997).

Como se mencionó con anterioridad, existen células metaplásicas que son normales en un epitelio vaginal sano (Botella, 1997; Tatti, 2011; Ross y Pawlina, 2015). Sin embargo, también es posible encontrar células con características de metaplasia atípica, las cuales indican la transformación anormal del epitelio, que puede llevar al desarrollo de cáncer. Sin embargo, al igual que en el caso de las células reactivas y binucleadas, la presencia de uno solo de estos tipos celulares no es evidencia suficiente para diagnosticar cáncer cérvico uterino (Kurman y Solomon, 1994). Al microscopio estas células tienen un núcleo más oscuro y carente de una estructura circular característica; además su forma no es tan definida como en el caso de las células normales, y la cantidad de citoplasma es menor a la que debería ser en el caso de células superficiales (Figura 4) (Alameda et al., 2004).

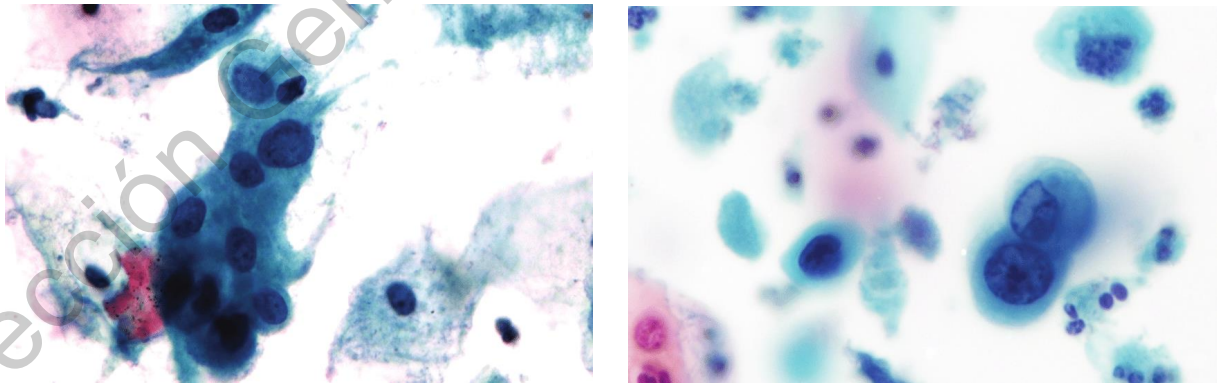


Figura 4. Células de metaplasia atípica. Imágenes tomadas del Manual de Citopatología Diagnóstica (Gamboni y Miziara, 2011).

Otras células consideradas diagnósticas son los coilocitos. La morfología típica de estas células consiste en la presencia de un halo transparente alrededor del núcleo (Figura 5) que parece presentar una resistencia para el mismo, lo que provoca que el núcleo sufra deformaciones y pierda su estructura circular del núcleo (Sarita y Sarita, 2017). Las células coilocíticas son características de infección por VPH, por lo que al encontrarlas en la prueba de Papanicolau resultan un claro indicador de infección por dicho virus (Rincón et al., 2016). Los coilocitos son los indicadores de transformación viral más distintivos al observar una citología, el halo formado alrededor del núcleo contiene proteínas virales que se han acumulado a través de la maduración de la célula, ya que el VPH se caracteriza por infectar células basales, por lo que el daño se refleja al llega hasta el estrato superficial (Nayar y Wilbur, 2015).

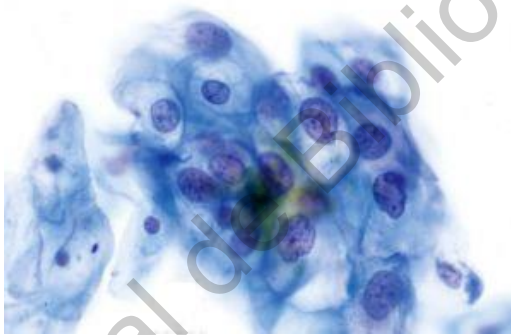


Figura 5. Células coilocíticas. Imagen tomada del Boletín Oncológico del área sanitaria de Teruel (Spinoso-Cruz y Muniesa-Soriano, 2008).

II.2. Comunidades microbianas de los epitelios de mamíferos

La microbiota es el conjunto de hongos, bacterias, virus, arqueas y parásitos que forman un ecosistema complejo que coloniza todo el cuerpo de un organismo multicelular, y cuya composición y diversidad de especies a través del tiempo está determinado por factores genéticos, inmunológicos y ambientales (Luo et al., 2017). Las comunidades microbianas cumplen funciones de gran importancia para el hospedero que colonizan, por lo que el cambio en su estructura implica un daño que impide el correcto funcionamiento de la microbiota, lo que a su vez afecta al hospedero (Levy et al., 2017). Esta alteración en la composición y el funcionamiento de la microbiota es conocido como disbiosis.

La primera colonización microbiana en humanos se da cuando el bebé pasa por el canal vaginal durante el parto, lo que hace que se llene de la microbiota vaginal de la madre, que está compuesta en su mayor parte por *Lactobacillus* que comenzarán la colonización en el bebé (Macpherson et al., 2017), principalmente en el tracto respiratorio y digestivo. Esta primera colonización es importante, ya que la maduración del sistema inmune y el correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal se da gracias a la microbiota (Rooks y Garrett, 2016). Cada vez se realizan más estudios para entender la relación que existe entre la microbiota y distintos sistemas del cuerpo, donde la disbiosis puede estar relacionado con enfermedades como el Alzheimer, lupus, diabetes, cáncer, entre otras (Sekirov et al., 2010; Rooks y Garrett, 2016; Luo et al., 2017).

Las comunidades microbianas bacterianas suelen ser constantes a través del tiempo y cumplen papeles de gran importancia metabólica e inmune para su hospedero, por lo que cuando ocurre una disbiosis, aumenta la susceptibilidad a desarrollar distintas enfermedades (Sekirov et al., 2010). A la fecha, la mayoría de los estudios sobre microbiota se habían centrado en el estudio de las comunidades bacterianas del tracto intestinal y cómo la composición y abundancia de las mismas estaban relacionadas con la presencia de enfermedades metabólicas (Barko et al., 2018). Otros estudios explican cómo las comunidades bacterianas del intestino pueden influir en otras partes del cuerpo, como en el cerebro, en el caso de enfermedades como el Alzheimer, la depresión o la ansiedad (Foster y Neufeld, 2013; Jiang et al., 2017).

La microbiota bacteriana intestinal del humano está compuesta principalmente por integrantes de los Phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias, los cuales participan en la regulación del metabolismo de su hospedero, de forma que varía de acuerdo a la proporción de los integrantes de la comunidad bacteriana (Heintz-Buschart y Wilmes, 2018). En cuanto a los hongos que habitan el tracto gastrointestinal de los humanos, se ha observado que aquellos individuos que presentan baja abundancia de *Saccharomycetaceae* tienen más diversidad de otras especies, como aquellas pertenecientes a las familias *Ustilaginaceae*, *Hypocreaceae*, *Sclerotinaceae* y *Schizosaccharomycetaceae* (Soverini et al., 2019).

La composición de la microbiota intestinal varía de acuerdo al tipo de alimentación del organismo, en el caso de los rumiantes, la microbiota intestinal posee principalmente microorganismos con la capacidad de fermentar, para aprovechar la fibra vegetal de su dieta (McCann et al., 2017). Por ello, la microbiota del tracto gastrointestinal de los carnívoros tiene microorganismos específicos para la digestión de carne, e incluso se ha propuesto que algunas bacterias, como los Bacteroidetes, influyen en el olor que caracteriza a cada uno de los diferentes individuos (Yamaguchi et al., 2019).

Dentro de la variedad de microorganismos que pueden encontrarse en la piel de los humanos, se encuentran las Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias, aunque de forma dominante se encuentran los géneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Methylobacterium* y *Staphylococcus* (Kong, 2011; Egert y Simmering, 2016). Se ha encontrado que las arqueas representan alrededor del 4% de las comunidades de procariontas que conforman la microbiota de la piel, entre las cuales se encuentran arqueas pertenecientes a los Phyla Thaumarchaeota y Euryarchaeota (Probst et al., 2013).

En cuanto a la microbiota viral que se presenta en la piel de los humanos se ha encontrado ADN de poliomavirus, papilomavirus y circovirus en individuos que no tienen enfermedades cutáneas (Foulongne et al., 2012). Otros estudios han determinado que virus como poliomavirus pueden estar asociados con el desarrollo de cáncer en células del sector basal de la epidermis (Sherwani et al., 2018).

Las comunidades microbianas suelen tener una estructura constante, aunque experimenta ciertas variaciones a lo largo de la vida de los organismos. En el caso del tracto vaginal, la microbiota es un factor protector contra infecciones, y también experimenta cambios relacionados con el desarrollo y estado hormonal, mismos que han sido bien estudiados en humanos. Es común que la microbiota de las mujeres sanas este formada por comunidades donde predominan especies de *Lactobacillus*, las cuales crean el ambiente adecuado para que se dé la implantación y el desarrollo del embrión (García-Velasco et al., 2017; Bernabeu et al., 2019). A pesar de que las comunidades de *Lactobacillus* son dominantes en el epitelio del tracto vaginal, durante el embarazo aumenta todavía más su abundancia, mientras disminuye la de especies pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Gardnerella*, esta última asociada a la infertilidad (Bernabeu et al., 2019).

Existen muchas cosas que pueden provocar la variación en las comunidades microbianas del tracto vaginal, como la higiene, los hábitos sexuales y la edad reproductiva (Noyes et al., 2018). Incluso se ha visto que en mujeres, después del primer sangrado y de iniciar una vida sexual, la estructura de las comunidades microbianas cambia, si bien *Lactobacillus* sigue siendo el género dominante, aumenta la diversidad y abundancia de géneros como *Prevotella*, *Atopobium* y *Shuttleworthia* (Carda-Diéguez et al., 2019).

Se sabe que en las comunidades microbianas del tracto genital femenino, ocurren fenómenos de sinergia y antagonismo, como *Gardnerella* y *Prevotella* en el caso del primero, cuya asociación se relaciona con la vaginosis bacteriana (Onywera et al., 2019). Como ya se mencionó, la dinámica de la microbiota vaginal puede ayudar a la protección con enfermedades, entre las cuales se encuentran las infecciones de transmisión sexual (Martin, 2012). Se sabe que existe una asociación entre la

disbiosis en la microbiota del tracto vaginal, y la presencia de VPH, pero también se ha demostrado que bacterias como *L. gasseri* facilita la detección de este patógeno (Brotman et al., 2014b).

Por otro lado, existe la teoría de que la ecología de un organismo y su evolución son fuerzas que no sólo actúan en el individuo, también en sus comunidades microbianas (Colston y Jackson, 2016). En el tracto gastrointestinal de los vertebrados, las bacterias dominantes pertenecen a los Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, sin importar si son omnívoros o herbívoros, aunque las proporciones de estos Phyla varían significativamente (Ley et al., 2008; Colston et al., 2015). En general, entre los mamíferos que poseen dietas similares, ya sean carnívoros o herbívoros, se ha encontrado relación entre su microbiota (Ley et al., 2008). Sin embargo, la proporción de Firmicutes varía ampliamente, siendo más abundante en mamíferos carnívoros que en los herbívoros, por lo que la presencia de estas bacterias se asocia principalmente con la degradación de proteínas (Nelson et al., 2013).

Se ha observado que los animales que tienen periodos largos de inanición y que se alimentan de forma intermitente también experimentan variaciones en la microbiota de su tracto gastrointestinal, fenómeno que aún no ha sido estudiado de forma exhaustiva (Colston y Jackson, 2016). Uno de los fila más abundantes dentro de las comunidades microbianas del tracto gastrointestinal de los mamíferos es el de las Proteobacterias, al igual que lo observado para aves, reptiles y algunos peces (Colston y Jackson, 2016).

II.3. Transformación de los epitelios y su relación con microorganismos

Se han realizado diversos estudios que relacionan la estructura de las comunidades microbianas con la transformación anormal de diferentes tejidos. Se ha observado que la microbiota puede participar de distintas formas en el proceso de transformación celular que puede llevar a carcinogénesis al alterar el balance de la proliferación y muerte de las células del hospedero, modificar las funciones del sistema inmune o influir en el metabolismo y la producción de moléculas por parte del hospedero (Garrett, 2015).

Existen algunos microorganismos considerados factores de riesgo o factores protectores para el desarrollo de cáncer (Chen et al., 2017). En el caso de la transformación cancerígena del epitelio del colon y recto, los biofilms bacterianos que se forman en las paredes del colon dañan la homeostasis del tejido, provocando que haya una reducción y redistribución de la E-cadherina, se aumente la producción de IL-6, se active Stat3 y la proliferación del epitelio, lo que lleva al desarrollo de tumores en esa zona (Dejea et al., 2014).

La presencia de bacterias como *H. pylori* o *Fusobacterium* spp., ha sido asociada al desarrollo de cáncer de estómago y cáncer de colon respectivamente, además se ha visto que inducen el aumento de *Escherichia coli* (Elinav et al., 2019). En casos de cáncer de colon y recto, también se ha observado que suele haber una disminución en la diversidad de las comunidades microbianas. En especial, se ha reportado que la abundancia de géneros bacterianos de tinción Gram positivas como *Clostridium*, disminuye, mientras que bacterias Gram negativas, de los géneros *Fusobacterium*, *Atopobium* y *Porphyromonas* aumentan, lo que tiene un efecto pro-inflamatorio en el intestino que favorece la transformación epitelial (Ahn et al., 2013).

Toxinas producidas por *Bacteroides fragilis* se asocian con la transformación del epitelio intestinal provocando neoplasia del colon y recto al degradar la E-cadherina de las células epiteliales, lo que provoca la migración de la β -catenina al núcleo, y activa en consecuencia a la proliferación celular (Dutilh et al., 2013; Boleij et al., 2015; Rajagopala et al., 2017). La presencia de cepas de *E. coli* que poseen la isla de patogenicidad pks son capaces de producir la toxina colibactina, la cual altera el ADN de las células, incrementando la frecuencia de las mutaciones en el material genético, lo que lleva a la transformación del epitelio y por ende al desarrollo de tumores (Dutilh et al., 2013; Wassenaar, 2018).

Existen otros estudios que resaltan la importancia de la microbiota bacteriana durante la transformación cancerígena del tejido cervical, ya que los microorganismos que pueden influir en la liberación de citosinas pro-inflamatorias, que modifican el ambiente del tracto cervical (Mert et al., 2018). En casos de cáncer cervical se ha resaltado la participación de *Fusobacterium* spp, la cual posee la capacidad de influir en las células inmunes para que se diferencien en efectores Th2. Además, *Fusobacterium* spp. tiene un efecto sobre la E-cadherina de las células infectadas por VPH, favoreciendo el desarrollo del cáncer (Audirac-Chalifour et al., 2016).

A pesar de que existen bacterias a las que se les atribuye la aparición de cierto tipos de cáncer, se sabe que son los virus quienes pueden inducir el desarrollo de tumores, malignos y benignos en vertebrados (Ewald et al., 2015). El primer virus reconocido como causante de cáncer fue el gammaherpesvirus 4, conocido como virus de Epstein-Barr, el cual se asocia con el linfoma de Burkitt (Epstein et al., 1964). Así mismo, el virus linfotrópico humano de células T tipo I (HTLV-1), el virus de la hepatitis B, el VPH y el poliomavirus de las células de Merkel se relacionan con el desarrollo de diversos tumores malignos (Foulongne et al., 2012; Ewald et al., 2015; Mitra et al., 2016). Incluso estudios recientes han detectado al virus del Zika en pacientes que presentan transformación del epitelio genital, por lo que este virus podría ser el causante o cofactor de estos cambios celulares, ya que otros patógenos como VPH no fueron encontrados en las muestras analizadas (Tobar et al., 2018).

Hay también una estrecha relación entre las bacterias del microbioma y virus asociados a cáncer. En algunos casos la disbiosis también contribuye a la formación de un ambiente pro-inflamatorio, donde se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que favorece la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH, las cuales son necesarias para que se dé el proceso de carcinogénesis debido al efecto que tienen en la proliferación celular y la inactivación de la apoptosis (Mitra et al., 2016).

A pesar de que no es fácil saber si el desarrollo del cáncer favorece el cambio en la microbiota, o si la presencia de ciertas comunidades microbianas son las que influyen en la aparición del proceso cancerígeno, está claro que existe una relación entre el cáncer y la estructura de las comunidades microbianas de la región donde se genera el tumor, e incluso de otras zonas. Recientemente se reportó la influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo de cáncer de endometrio, debido a que existen microorganismos que favorecen la absorción de grasas (Backhed et al., 2004), lo que genera tejido adiposo que favorece la producción de estrógeno, o bien mediante enzimas bacterianas, el que haya una reabsorción de esta hormona que promueve el desarrollo de tumores en la matriz (Mert et al., 2018).

Cuando ocurre una disbiosis en el microbioma genital, es posible que la abundancia de *Lactobacillus* disminuya, y aumente la colonización de microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*, los cuales se han asociado con el incremento en la severidad de la neoplasia cervical (Mitra et al., 2016). Recientemente se asoció la presencia de bacterias como *Peptostreptococcus anaerobius* y *Anaerococcus tetradius* con la progresión de la transformación celular, en especial *Sneathia sanguinegens*, la cual puede verse involucrada en la activación de vías inflamatorias en el cérvix y en el cambio de su pH, por lo que su presencia podría ayudar al desarrollo de la displasia cervical (Mitra et al., 2015; Laniewski et al., 2018).

Por otro lado, se ha observado que los epitelios vaginales en los que la presencia de comunidades de *Lactobacillus* spp. es dominante, tienen protección contra la infección por VPH (Mitra et al., 2015). Experimentos *in vitro* han mostrado que *Lactobacillus* spp. puede tener un efecto citotóxico en células infectadas por VPH, que ayuda a contrarrestar el proceso de tumorigénesis viral (Motevaseli et al., 2013). Como se ha mencionado, los factores hormonales y ambientales pueden regular la microbiota; por ejemplo, se ha observado que fumar conduce a una disbiosis en el epitelio cervical, donde la cantidad de *Lactobacillus* spp. es alterada, lo que propicia las infecciones persistentes de VPH y el desarrollo de displasia cervical (Brotman et al., 2014a).

Por lo tanto, cada vez hay mayor evidencia de que las comunidades microbianas del epitelio juegan un papel fundamental en el desarrollo de cáncer, aunque la transformación epitelial no siempre está asociada con un solo microorganismo. El cáncer cervicouterino ha sido relacionado en gran medida a la infección por VPH (Guijon et al., 1992), aunque también es posible que ocurra una co-infección con otros organismos, como *Chlamydia trachomatis*, que pueden estar involucrados en la modulación del sistema inmune, lo que facilita que ocurra la infección por VPH y el desarrollo de tumores (Tamim et al., 2002; Zhu et al., 2016; Coorevits et al., 2018). Además de la co-infección con *C. trachomatis*, se han detectado otros patógenos, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* y herpesvirus simplex tipo 2, que pueden propiciar un ambiente adecuado para que VPH colonice las células del epitelio cervical y provoque la transformación que puede llevar a la aparición de cáncer (Smith et al., 2002; Coorevits et al., 2018).

II.4. VPH y la transformación epitelial

El VPH es un virus icosaédrico de 55 nm de diámetro, que pertenece a la familia Papillomaviridae, del cual se han identificado más de 200 genotipos, de los cuales 12 son asociados al desarrollo de cáncer en humanos (IARC, 2019). Los genotipos de alto riesgo son el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, mientras que los de menor riesgo incluyen a los genotipos 6 y 11 (Sendagorta-Cudós et al., 2019). El genoma del VPH está organizado en una molécula circular de ADN de doble cadena dividido en tres regiones dedicadas al inicio de la replicación, la codificación de proteínas no estructurales y de proteínas estructurales (Vallejo-Ruiz et al., 2015).

Durante el inicio de la infección, las proteínas E1 y E2 son de gran importancia, debido a que se encargan de mantener la replicación viral, y en el caso de E2, también está involucrada en la represión de E6 y E7 (Egawa et al., 2015). Las proteínas E4 y E5 también son de gran importancia en la etapa inicial de la infección; E4 promueve la síntesis de los viriones, y se cree que participa en la liberación y transmisión de los mismo, mientras que la proteína E5 estabiliza al receptor del factor de crecimiento epidérmico y potencia la actividad de las MAP cinasas (Egawa et al., 2015).

La clave para la capacidad pro-oncogénica del VPH está en las proteínas E6 y E7, las cuales se encargan de la inhibición de p53 y pRB, moléculas celulares encargadas de la muerte celular programada e inhibir la división celular, es decir que juegan un papel en la supresión de tumores (Egawa et al., 2015; McBride y Warburton, 2017). La proteína viral E6 desregula el ciclo celular, la señalización inmune y la diferenciación de las células, mientras que E7 promueve la acumulación de mutaciones en el genoma celular (Vallejo-Ruiz et al., 2015). Existen factores que promueven la infección por VPH y el cambio oncogénico, como la disbiosis, donde las nuevas comunidades

bacterianas generan ROS, las cuales promueven la pérdida de los genes E1 y E2 debido al daño en el ADN, lo que resulta en una sobreexpresión de E6 y E7 (Mitra et al., 2015).

La zona de transición del cérvix es un área muy susceptible a la infección por VPH, el cual infecta las células basales y comienza a provocar alteraciones celulares consideradas pre-cancerígenas, las cuales pueden revertirse (Egawa et al., 2015). Una vez infectadas las células basales, el virus se propaga por el estrato parabasal y el estratificado hasta invadir todo el tejido y comenzar la producción de las proteínas E6 y E7, lo que provoca la extensión del proceso cancerígeno y posteriormente la formación e invasión tumoral (Schiffman et al., 2016).

La evasión viral del sistema inmune es de gran importancia en la infección, y el VPH tiene diferentes maneras de lograrlo, una de ellas es la distribución mediante las células basales, ya que mientras van madurando y suben por el estrato parabasal y estratificado, el virus mantiene un número de copias para evadir al sistema inmune (Rincón et al., 2007). Las células de Langerhans son atraídas por el ligando de citosina CC 20 (CCL20), el cual es inhibido por las proteínas virales E6 y E7, lo que impide la respuesta del sistema inmune a la infección por VPH (Schiffman et al., 2016). Por otro lado, la proteína E7 del VPH también es capaz de inhibir al IFN α , y otras citosinas, por lo que el virus no puede ser eliminado adecuadamente por el hospedero (Rincón et al., 2007).

II.5. Herpesviridae y la transformación epitelial

Dentro de la familia Herpesviridae se encuentran los gammaherpesvirus, una subfamilia viral que agrupa algunos virus considerados pro-cancerígenos; uno de los más reconocidos es el virus del Epstein-Barr (EBV), el cual ha sido asociado con el desarrollo y la inducción de transformación cancerígena en las células escamosas de la cavidad oral en el humano (Sand y Jalouli, 2014). El EBV es capaz de infectar células escamosas, las cuales ayudan en la dispersión del virus, el cual se transmite a través de la saliva, aunque el EBV presenta tropismo por los linfocitos B (Sand y Jalouli, 2014).

Se han estudiado las proteínas que podrían estar relacionadas con la formación de tumores inducidos por EBV, estas moléculas suelen ser parecidas a las proteínas celulares, entre ellas, la proteína nuclear EBNA-1 tiene una expresión constante en células infectadas por EBV, ya que participa en la estabilidad y la replicación del genoma viral (Saha y Robertson, 2019). Otras proteínas como EBNA3A en conjunto con EBNA3C reprimen la transcripción de las proteínas BIM, p14, p15, p16 y p18, e inhibe la diferenciación de las células B (Saha y Robertson, 2019).

El herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) también está asociado a oncogenes, en humanos, las células infectadas por el virus expresan el antígeno nuclear asociado a latencia (LANA), el cual se encarga de la inhibición de p53, p73 y pRB, extendiendo el ciclo de vida de las células infectadas, lo que ayuda a detectar la presencia viral en los tumores, aunque la cantidad de LANA en las muestras puede ser muy variable (Santag et al., 2013). Existen otras moléculas producidas por KSHV como los micro ARNs virales, la proteína K1, encargada de incrementar la angiogénesis en células infectadas y modular la aparición del receptor de linfocitos B (BCR) (Tomlinson y Damania, 2004; Zhang et al., 2016). Otra proteína importante para la oncogénesis en las células infectadas por KSHV, es la proteína K15, que regula la replicación lítica del virus, modula señales dependientes del BCR e induce la producción de citosinas pro-inflamatorias (Poole et al., 1999; Steinbrück et al., 2015).

El KSHV altera la diferenciación de células infectadas mediante la acción de las proteínas virales vFLIP, vGPCR y metaloproteinasas celulares implicadas en la vía de Notch (Marigliò et al., 2017). Durante la modulación de la vascularización, se incrementa la expresión de citosinas pro-inflamatorias, de angiogénesis y Prox-1, el cual regula la diferenciación de células endoteliales (Hong et al., 2004).

Otros virus de la familia Herpesviridae, como el herpes virus simple tipo 1 (HSV-1) también se han asociado con procesos cancerígenos epiteliales, en este caso en el epitelio escamoso de la cavidad oral (Sand y Jalouli, 2014). Se ha demostrado que HSV-1 puede coinfectar con otros patógenos y aumentar el riesgo de desarrollar cáncer (Southam et al., 1969), aunque otros estudios han demostrado que durante el proceso cancerígeno, el papel del virus es crucial para inducir la transformación celular y participar en el proceso de metástasis (Duff y Rapp, 1973).

El Herpes virus simple tipo 2 (HSV-2) ha sido identificado como agente causal de la transformación celular para el desarrollo de cáncer cervical, aunque después de que se detectara la presencia de VPH en estos tumores, se consideró que pudiera existir una co-infección entre estos virus (Rawls et al., 1968; Macnab, 1974). Se ha determinado que la infección por HSV-2 puede ser el agente causal de mutaciones y daños celulares que contribuyen a la inducción de la transformación celular cancerígena inducida por VPH (Meyers et al., 2003).

Después de la infección por transmisión sexual de HSV-2, el virus se replica en el estrato basal del cérvix, similar al mecanismo que usa VPH, aunque en este caso, el virus puede migrar a los ganglios y permanecer como una infección latente (Meyers et al., 2003; Thellman y Triezenberg, 2017). Cuando ocurre una disbiosis en el epitelio genital, el virus es capaz de reactivarse, provocando cambios que a su vez favorecen la disbiosis, que a su vez promueve la replicación viral, provocando

daños en la barrera epitelial, que facilita la entrada de virus, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del VPH (Torcia, 2019).

II.6. El cáncer en la fauna silvestre

Aunque el cáncer es una de las enfermedades más importantes para los humanos, se debe tener en cuenta que no son los únicos organismos que pueden sufrir el desarrollo de esta patología. Existen varios reportes de casos de cáncer en fauna silvestre, aunque estos suelen reportarse en animales criados en zoológicos o como casos esporádicos (Nagy et al., 2007), aunque es probable que la ausencia de reportes se debe a la falta de investigación al respecto.

Uno de los tipos de cáncer de mayor importancia para los animales de vida libre es el que se desarrolla en el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), esta especie presenta dos tipos de cáncer contagioso: el tumor facial tipo 1 (DFT1) que se identificó desde 1996 (Hawkins et al., 2006); y el tumor facial tipo 2 (DFT2), el cual fue caracterizado por primera vez en 2014 (Pye et al., 2016). Tanto el DFT1 como el DFT2 suelen aparecer de forma similar en los animales, ambos crecen en la zona del cuello, cara y en la cavidad bucal, lo que provoca que mueran aproximadamente después de seis meses de haberse contagiado debido a la falta de alimentos que pueden ingerir (Pearse y Swift, 2006; Pye et al., 2016). Se cree que la transmisión del DFT1 y DFT2 se da mediante las mordeduras de los demonios de Tasmania durante sus peleas, lo que provoca que se transfieran algunas células de los animales enfermos a los sanos, las cuales se establecen de forma similar a los trasplantes, debido a la endogamia que existe en las poblaciones del demonio de Tasmania que provocan defectos en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Pearse y Swift, 2006).

Otro ejemplo de cáncer en vida libre es el de las belugas (*Delphinapterus leucas*) del estero de St. Lawrence, cuya población fue afectada por cáncer. En el año 2000 se encontró una prevalencia de 27 % en animales muertos (Martineau et al., 2002), lo que se atribuye a los contaminantes desechados en el estuario por las industrias de la región, en especial debido a la bioacumulación de PCBs (Martineau et al., 2002). La baja diversidad genética en las poblaciones de belugas, aunado a la inmunosupresión ocasionada por los contaminantes del agua, provoca que la mayor incidencia de cáncer se de en animales adultos, quienes han estado por más tiempo expuestos a estas condiciones (Lair et al., 2016).

El fibropapiloma que afecta a las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) fue reportado por primera vez en 1938 (Smith y Coates, 1938). Se caracteriza por desarrollar tumores externos en el tejido blando y formar nódulos en diversos órganos, lo que interfiere con las funciones vitales provocando la muerte de los individuos (Williams et al., 1994). La incidencia de esta patología es muy alta,

presentándose en el 92% de algunas poblaciones de tortugas aunque la prevalencia de esta enfermedad sigue aumentando (Aguirre y Lutz, 2004). El agente causal más asociado a la presencia de fibropapilomatosis en las tortugas verdes es la infección por herpesvirus (Rebell et al., 1975), aunque se han tomado en cuenta otros factores que pueden contribuir a que se de dicha infección, como la invasión por microalgas (Van Houtan et al., 2010), el aumento en la temperatura del agua (Haines y Kleese, 1977), la contaminación del mar (Dos Santos et al., 2010) e incluso la presencia de ciertos ectoparásitos (Greenblatt et al., 2004).

Otros animales que presentan casos de cáncer son las marmotas (*Marmota monax*), en quienes se ha reportado hepatocarcinoma asociado a infecciones por el virus de la hepatitis de marmotas, muy similar al virus de la hepatitis B que afecta a los humanos (Summers et al., 1978). La trucha de coral (*Plectropomus leopardus*) es otro organismo en quien se han reportado casos de melanoma asociado al incremento de la radiación ultravioleta (Sweet et al., 2012). Los delfines nariz de botella del Atlántico (*Tursiops truncatus*) presentan carcinoma de células escamosas y papilomas genitales (Bossart et al., 2005), los cuales fueron asociados a infecciones por papilomavirus de *Tursiops truncatus* (TtPV1) en delfines de diferentes colonias (Rector et al., 2008).

II.7. Cáncer en pinnípedos

Debido a la posición que ocupan en las redes tróficas, los mamíferos marinos se consideran centinelas de ecosistema, al ser depredadores tope pueden reflejar la salud de los organismos que están por debajo de ellos y del ambiente en el que se encuentran (McAloose y Newton, 2009). La prevalencia de cáncer en mamíferos marinos ha incrementado en los últimos años, lo que nos hace pensar que las condiciones marinas se tornan cada vez menos favorables.

El primer reporte de carcinoma urogenital (CUG) en pinnípedos fue en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*), en la costa oeste de Norteamérica en 1983 por Howard et al. En las últimas décadas se ha observado un aumento en la prevalencia de CUG en el lobo marino de California, en especial en el Pacífico, a la altura de California, incluso se ha reportado que el 25% de los animales varados examinados en el Centro de Mamíferos Marinos (MMC) de California presentan CUG (Deming et al., 2018). El cáncer suele iniciar en el tracto genital de los animales, para después causar metástasis y migrar a la zona abdominal, riñones y vejiga (Gulland et al., 1996), lo que representa problemas fisiológicos que provocan su muerte.

Reportes previos sólo habían encontrado evidencia de CUG en adultos y subadultos, aunque recientemente surgió nueva evidencia de que crías de lobo marino de California presentan transformación pre-cancerígena, incluso cuando estos individuos no han iniciado su periodo reproductivo (Barragán-Vargas et al., 2016), lo que sugiere que estas crías tienen la capacidad de reparar el daño celular que presentan.

Al igual que en el caso de humanos, el CUG se ha asociado con la presencia de un gammaherpesvirus de otáridos (OthV-1), el cual se ha aislado a partir de tumores y de individuos infectados (King et al., 2002). En general se le ha atribuido el desarrollo de CUG principalmente a la presencia de OthV-1 (Buckles et al., 2006), aunque estudios recientes han demostrado que existen otros microorganismos como papilomavirus que también pueden influir en la aparición del CUG (Peñín et al., 2019; Rivera et al., 2012). Además, se observó que la prevalencia de OthV-1 en el tracto genital de lobo marino de California es muy baja en adultos y crías, por lo que es posible que el OthV-1 no sea un factor que promueve la aparición del CUG, a pesar de que posteriormente pueda contribuir en el desarrollo del mismo (Barragán-Vargas et al., 2016).

Además de los patógenos que se han vinculado con la aparición del CUG en el lobo marino de California, se han encontrado factores genéticos como el locus Zaca-DRB.A del MHC de clase II (Bowen et al., 2005) que incrementa la susceptibilidad al desarrollo de CUG. También se ha observado que en los casos donde los animales son homocigotos en el microsatélite Pv11, suelen tener mayor susceptibilidad a desarrollar CUG (Browning et al., 2014). El microsatélite Pv11 está dentro del gen HPSE2 que codifica para la proteína heparanasa 2, que ha sido vinculada con cáncer en humanos, por lo que igual que Pv11, HPSE2 tiene un rol importante para la aparición de CUG en lobo marino de California (Browning et al., 2014).

La presencia de contaminantes ambientales como organoclorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos, se ha vinculado con la aparición de cáncer en humanos (McGlynn et al., 2006) y en animales de vida libre (Metcalf et al., 1999). Todos estos contaminantes no sólo se encuentran en ambientes terrestres, el mar es el receptor de la mayoría de químicos industriales, pesticidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT) o policlorobifenilos (PCBs) (Metcalf et al., 1999; Niño-Torres et al., 2009), los cuales se van acumulando en los individuos que se encuentran en la cima de sus redes tróficas como los mamíferos marinos. Estos contaminantes se acumulan y afectan el sistema inmune de los organismos (Hall et al., 2008). En lobo marino de California, se ha asociado la contaminación con organoclorados con la mortalidad por CUG (Ylitalo et al., 2005a), en especial con la presencia de PCBs, los cuales funcionan como disruptores endócrinos, suprimen el sistema inmune de los individuos y pueden provocar mutaciones que favorezcan en desarrollo de tumores (Ylitalo et al., 2005b; Peñín et al., 2018). Sin embargo, los niveles de contaminación por PCBs varían

de acuerdo a la región geográfica, ya que este contaminante se encuentra principalmente en la zona del Pacífico, por lo que los individuos que habitan el área se ven más afectados a comparación de los que se encuentran en el Golfo de California (Barragán-Vargas, 2015).

Además del lobo marino de California, se ha encontrado que el lobo fino austral (*Arctocephalus australis*) también presenta CUG que podría estar asociado a la presencia de OtHV-1 (Dagleish et al., 2013). La distribución del lobo fino austral no coincide con la del lobo marino de California, por lo que es posible que los factores y patógenos que podrían estar influyendo en la progresión del CUG estén distribuidos a lo largo del Pacífico, y puedan llegar a afectar a más de una especie de pinnípedo.

El lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) es otro otárido que ha presentado cáncer pulmonar de una manera anecdótica; específicamente, se reportó esta patología en un individuo que habitaba en cautiverio en la isla Rebun, Hokkaido, Japón (Nakagun et al., 2017). Existen otras especies de otáridos a los que se les han detectado varios tipos de cáncer, aunque estos suelen ser casos aislados o que afectan a una pequeña parte de la población (Cuadro 1).

Se han reportado varios casos aislados de cáncer en odobénidos adultos en muestras recolectadas de 1995 al 2004, entre los que se encuentran casos de leiomioma uterino y de ovario, leiomioma mesentérico, tumor estromal gastrointestinal, fibroadenoma, neoplasia torácica fibrohistocítica, hemangioma intestinal y hepático (Mumford et al., 2005) y recientemente se describieron dos casos de cáncer pulmonar en morsas (*Odobenus rosmarus divergens*) de vida libre, uno en el mar de Chukotka en Rusia y otro en Barrow, Alaska (Seguel et al., 2016; Nakagun et al., 2017).

En fócidos hay pocos casos de cáncer reportados, como el caso de un linfosarcoma encontrado en una foca de puerto (*Phoca vitulina*) varada (Stroud y Stevens, 1980), o el caso aislado de un tumor de ovario en el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) (Mawdesley-Thomas, 1971). Para el elefante marino del Norte existe un reporte aislado de adenocarcinoma biliar, evento que no parece ser una enfermedad que afecte a la población de manera significativa, y que aún no se conoce cuál es el agente etiológico de dicha patología (Fauquier et al., 2003).

Cuadro 1. Reportes de cáncer en pinnípedos.

Especie	Tipo de cáncer	Referencia
<i>Zalophus californianus</i>	Carcinoma urogenital	Howard et al., 1983
<i>Arctocephalus australis</i>	Carcinoma urogenital	Dagleish et al., 2013
<i>Callorhinus ursinus</i>	Ganglioneuroblastoma	Spraker y Lander, 2010
<i>Arctocephalus pusillus</i>	Mesenquimoma maligno	Laricchiuta et al., 2013
	Liposarcoma metastásico	Pervin et al., 2016
<i>Callorhinus ursinus</i>	Fibrosarcoma renal	Brown, 1975
	Linfosarcoma	Stedham y Casey, 1977
<i>Eumetopias jubatus</i>	Adenocarcinoma pulmonar	Sato et al., 1998
	Rabdomiosarcoma pleomórfico con metástasis pulmonar	Zabka et al., 2004
<i>Otaria flavescens</i>	Tumor de células intersticiales del ovario	Biancani et al., 2010
	Adenocarcinoma gástrico	Yamazaki et al., 2016
<i>Eumetopias jubatus</i>	Tumor pulmonar de mastocitos	Seguel et al., 2016
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	Leiomioma uterino, de ovario, leiomioma mesentérico, tumor estromal gastrointestinal, fibroadenoma, neoplasia torácica fibrohistocítica hemangioma intestinal y hepático	Mumford et al., 2005
	Tumor pulmonar de mastocitos	Seguel et al., 2016
<i>Cystophora cristata</i>	Adenocarcinoma pulmonar	Aschfalk y Bacciarini, 2002
<i>Phoca vitulina</i>	Linfosarcoma	Stroud y Stevens, 1980
	Linfoma meningeal de células T	Labrut et al., 2007
	Melanoma dérmico	Morick et al., 2010
	Carcinoma de células escamosas esofágicas	Flower et al., 2014
	Linfoma intestinal epiteliotrópico de células T	Malberg et al., 2017
<i>Phoca larga</i>	Tumor testicular de células de Sertoli	Rotstein et al., 2019
<i>Phoca hispida</i>	Adenocarcinoma del intestino delgado	Mikaelian et al., 2001
<i>Mirounga leonina</i>	Tumor en ovario	Mawdesley-Thomas, 1971
<i>Mirounga angustirostris</i>	Adenocarcinoma biliar	Fauquier et al., 2003

II.8. El elefante marino del Norte

El elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*) es un carnívoro que pertenece al clado Pinnipedia, familia Phocidae (focas verdaderas), donde también se encuentra el elefante marino del sur (*M. leonina*) (Riedman, 1990). El elefante marino del Norte se distribuye desde el Norte del Pacífico Mexicano hasta las Islas Aleutianas y el golfo de Alaska (Stewart y DeLong, 1995). Alrededor del año 1800 la caza para obtener su grasa incrementó drásticamente, lo que provocó que sus poblaciones decayeran, e incluso se creyó al borde de la extinción durante 1870 (Bartholomew y Hubbs, 1960). Sin embargo, las poblaciones de elefante marino del Norte se han recuperado a lo largo de los años (Lowry, 2014; Elorriaga-Verplancken et al., 2015) y hasta ahora parece no haber repercusiones genéticas debido al posible cuello de botella que sufrieron (Elorriaga-Verplancken, 2015).

Existe un claro dimorfismo sexual entre los machos y las hembras del elefante marino del Norte, ya que los machos presentan una probóscide nasal, miden aproximadamente 6.7 m y llegan a pesar 2300 kg, mientras que las hembras pueden llegar a medir 2.8 m y pesar 710 kg (Le Boeuf y Laws, 1994; Coorevits et al., 2018). La mayor parte del tiempo, el elefante marino del Norte permanece en el agua, pudiendo descender hasta 1.5 km y bucear durante dos horas (Le Boeuf y Laws, 1994). A pesar de eso, es necesario que pasen tiempo en tierra, cuando mudan el pelaje y durante la época reproductiva, el nacimiento y la lactancia de las crías (Stewart y DeLong, 1995). Los machos adultos llegan a las playas durante invierno para establecer su territorio, por lo que se enfrentan entre ellos hasta delimitar el área donde se encuentran las hembras, quienes llegan semanas después (Le Boeuf y Laws, 1994).

Durante el periodo en el que se delimitan los territorios y una vez que las hembras llegan al harén, los machos permanecen sin alimento para no alejarse de su territorio, por lo que llegan a estar alrededor de 100 días en inanición (Hoelzel et al., 1999). Las hembras paren una cría aproximadamente una semana después de haber llegado al territorio (Le Boeuf y Laws, 1994), y la amamantan por 28 días, de manera continua durante los cuales las hembras se mantienen en la playa sin alimento (Costa et al., 1986; Habran et al., 2010). El destete ocurre abruptamente cuando las hembras se regresan al mar, y las crías se mantienen en la playa durante los siguientes dos meses y medio mientras comienzan a nadar, sin alimentarse (Costa et al., 1986).

El alimento principal del elefante marino del Norte juvenil y adulto son los cefalópodos como el calamar de fresa (*Histioteuthis heteropsis*), el calamar boreopacífico (*Gonatopsis borealis*), otros tipos de calamares (*Octopoteuthis deletron* y *Histioteuthis dofleini*) y la merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) (Le Boeuf y Laws, 1994; Kuhn et al., 2009).

Se ha observado que el elefante marino del Norte es susceptible a infecciones por parásitos como *Leptospira* spp., *Toxoplasma* spp. y algunos gammaherpesvirus que provocan la formación de úlceras en su cavidad bucal (Dubey et al., 2004; Colegrove et al., 2005b; Goldstein et al., 2006), aunque esto no parece representar un riesgo, ya que estas infecciones no comprometen la salud de las poblaciones. Sin embargo, el nemátodo *Otostrongylus circumlitus* afecta al 12% de los organismos varados en las costas de California provocando anorexia, deshidratación, letargo y hemorragias de boca y narinas (Colegrove et al., 2005a; Kaye et al., 2017; Sheldon et al., 2019). Por otro lado, se han reportado infecciones bacterianas ocasionadas por *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus equi* y *Enterococcus* que podrían estar relacionadas con la muerte de crías de elefante marino del Norte (Spraker et al., 2014).

El elefante marino del Norte está emparentado filogenéticamente con el lobo marino de California, ya que ambos pertenecen al clado Pinnipedia, aunque ambos divergieron hace 23 millones de años (Riedman, 1990). Además, el elefante marino del Norte comparte parte de su distribución con el lobo marino de California, ya que este último se distribuye a lo largo de la costa Noreste del Pacífico, donde realizan actividades como la crianza y reproducción (Peterson y Bartholomew, 1969). Estos organismos presentan diferencias en cuanto a su temporada reproductiva (variando por aproximadamente seis meses), sus hábitos de buceo y alimentación, ya que el lobo marino de California es un animal más costero que no suele sumergirse tanto para buscar su alimento (Peterson y Bartholomew, 1969).

III. JUSTIFICACIÓN

Existen muchos factores que pueden influir en la abundancia y composición de las comunidades microbianas del epitelio genital (Carda-Diéguez et al., 2019). Estudios sobre el papel de las comunidades microbianas en el desarrollo de diferentes patologías es un tema de gran interés en la actualidad, ya que en humanos se ha encontrado que existe una relación entre la transformación del epitelio genital y ciertas estructuras de comunidades microbianas (Chen et al., 2017).

El elefante marino del Norte es una especie simpátrica al lobo marino de California que también es considerado un depredador que refleja la salud del ecosistema en el que se encuentra (Kuhn et al., 2009). A pesar de ello, estos organismos poseen características en las que divergen, ya que sus hábitos alimenticios no son iguales, bucean a distintas profundidades y tienen diferentes tiempos de lactancia (Temte y Temte, 1993; Heath y Perrin, 2009). Sin embargo, el elefante marino del Norte podría estar expuesto a los mismos patógenos y contaminantes que provocan el desarrollo de transformación pre-cancerígena en crías de lobo marino de California (Ylitalo et al., 2005; Barragán-Vargas et al., 2016; Peñín et al., 2018).

En la actualidad es poco lo que se conoce sobre la transformación del epitelio genital en animales de vida libre. Hasta la fecha no se ha reportado ningún caso de CUG en el elefante marino del Norte, por lo que es importante indagar en la salud del epitelio genital de este organismo, y de esta manera empezar a generar conocimiento para entender el papel de los microorganismos en la transformación anormal del epitelio vaginal en animales de vida libre.

IV. HIPÓTESIS

1. La transformación precancerígena del epitelio genital de crías de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito es menor que la reportada para el lobo marino de California en esta misma isla.
2. La prevalencia genital de los virus asociados al carcinoma urogenital del lobo marino de California, OtHV-1 y papilomavirus, de las crías de elefante marino del Norte es menor a la reportada para el lobo marino de California en la misma isla.
3. El microbioma bacteriano genital de crías de elefante marino del Norte difiere al de crías de lobo marino de California.

Dirección General de Bibliotecas UFR

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir la citología genital cervical, el microbioma bacteriano y la presencia de virus potencialmente oncogénicos de crías de elefante marino del Norte, y compararlos con los del lobo marino de California.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el epitelio genital de crías de elefante marino del Norte.
2. Investigar la ocurrencia de transformación celular genital precancerígena en crías de elefante marino del Norte.
3. Determinar la presencia de patógenos potencialmente oncogénicos en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte.
4. Caracterizar el microbioma bacteriano genital de crías de elefante marino del Norte, y compararlo con el de crías de lobo marino de California nacidas en el Archipiélago de San Benito.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Área de muestreo

La costa occidental de la Península de Baja California, se encuentra en el Pacífico Mexicano, el cual se divide en Pacífico noroeste y Pacífico sureste. El muestreo realizado para esta tesis se llevó a cabo en el Archipiélago de San Benito (28.30°N, 115.56°W), ubicado a 75 kilómetros de la costa occidental de la Península de Baja California. El Archipiélago está compuesto por la isla del Oeste, Central y del Este, las cuales cuentan con una altitud máxima de 1204 metros sobre el nivel del mar.

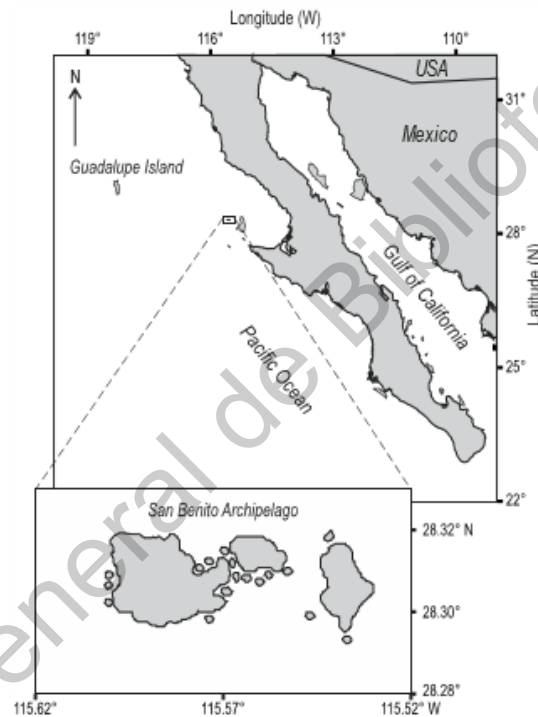


Figura 6. Mapa del Archipiélago de San Benito compuesto por la isla del Oeste, la isla Central y la isla del Este. Imagen tomada de Elorriaga-Verplancken et al., 2015.

El Archipiélago de San Benito forma parte de las Islas del Pacífico de la Península de Baja California, región declarada en 2016 como Área Natural Protegida con carácter de Reserva de la Biosfera (DOF, 2016). Las islas que conforman el archipiélago son de gran importancia para distintas especies de pinnípedos, siendo el único lugar de las costas Mexicanas donde coexisten cuatro especies de pinnípedos: el lobo marino de California *Zalophus californianus*; el lobo fino de Guadalupe *Arctocephalus philippii townsendi*; la foca común, *Phoca vitulina*; y el elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris* (Elorriaga-Verplancken et al., 2015).

VI.2. Colecta de muestras

El número de la licencia otorgada por SEMARNAT fue SGPA/DGVS/00050/16. Se colectaron muestras de epitelio cervical de 19 crías hembras de elefante marino del Norte. Las crías fueron capturadas de forma manual, con la ayuda de una toalla húmeda que fue colocada sobre su cabeza, para disminuir el estrés lo más posible. Debido al tamaño de las crías, fue necesaria la ayuda de dos personas, las cuales sostenían la cabeza y el dorso de la cría, mientras otra persona colectaba las muestras del tracto genital con cepillos citológicos estériles.

Las improntas celulares genitales se realizaron siguiendo el protocolo reportado para la toma de muestras de epitelio genital en el lobo marino de California (Barragán-Vargas, 2013). El protocolo consistió en la introducción de un cepillo citológico en la cavidad vaginal de las hembras hasta el cérvix, donde se realizaba un raspado circular con movimientos suaves para obtener la mayor cantidad de células de las paredes vaginales. Una vez que se tenía la muestra en el cepillo, se realizaban improntas celulares rodando el cepillo sobre la superficie de tres laminillas y rociándolas enseguida con un fijador citológico (Citofix) para preservar las estructuras celulares. Posteriormente se almacenaba el cepillo citológico en un microtubo de 1.5 ml con etanol al 96%.

VI.3. Análisis de las muestras

VI.3.1. Caracterización citológica

Las laminillas con las improntas celulares fueron preparadas siguiendo la tinción modificada de Papanicolaou previamente reportada para el lobo marino de California (Barragán-Vargas, 2013). Para la tinción se usaron tres tipos de colorantes; Hematoxilina de Harris, OG6 y EA-50, los cuales permiten identificar los diferentes tipos celulares, además es necesario realizar lavados y decoloraciones conforme al siguiente protocolo:

- Etanol al 80 % durante 30 segundos.
- Etanol al 70 % durante 30 segundos.
- Etanol al 50 % durante 30 segundos.
- Agua destilada durante 30 segundos.
- Hematoxilina de Harris por 4.5 minutos.
- Agua destilada por 30 segundos.
- Solución de HCl 0.25 % sumergiendo las laminillas 6 veces seguidas.
- Agua corriente durante 6 minutos.

- Agua destilada durante 30 segundos.
- Etanol al 50 % durante 30 segundos.
- Etanol al 70 % durante 30 segundos.
- Etanol al 80 % durante 30 segundos.
- Etanol al 95 % durante 30 segundos.
- OG6 durante 90 segundos.
- Etanol al 95 % durante 30 segundos.
- Etanol al 95 % durante 30 segundos (segundo enjuague).
- EA-50 durante 90 segundos.
- Etanol al 95 % durante 30 segundos.
- Etanol al 95 % durante 30 segundos (segundo enjuague).
- Etanol al 95 % durante 30 segundos (tercer enjuague).
- Etanol al 100 % durante 30 segundos.
- Solución xilol-alcohol (1:1) durante 30 segundos.
- Xilol al 100 % durante 30 segundos.
- Secar a temperatura ambiente.
- Montar con 50 μ l de resina sobre la tinción cubriendo la laminilla con un cubreobjetos.

Una vez que las laminillas se secaron, se definió el área de tinción de que presentaba cada una para que el análisis fuera equivalente con el conteo de las células. Se colocó la laminilla sobre una hoja milimétrica y con la ayuda de un estereoscopio se contaron los cuadros de 1 milímetro que correspondían al área teñida de la laminilla. Posteriormente se analizaron las laminillas al microscopio con el objetivo de 40X y 100X para determinar las características morfológicas que tenía cada tipo celular. Los tipos celulares fueron descritos previamente para lobo marino de California (Barragán-Vargas, 2013), por lo que se buscaron células que tuvieran las características previamente reportadas. Una vez identificados los diferentes tipos celulares, se realizaron los conteos para determinar el grado de transformación celular que presentaban las diferentes muestras. A partir de estos datos, se calculó la prevalencia y la intensidad con la que se presentaron estos tipos celulares en las muestras.

VI.3.2. Extracción y purificación de ADN

Se extrajo el ADN a partir de los cepillos citológicos que se guardaron en etanol al 96 %. Los tubos se agitaron en vórtex durante dos minutos para que se desprendiera la mayor cantidad de material biológico, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante dos minutos, se retiró el cepillo y se volvió a guardar en un tubo con alcohol al 96 %. Se retiró el etanol antes de agregar 500 µl de solución de lisis (Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, NaCl 1M, SDS 5 %, proteinasa K y agua destilada estéril) y se mezcló por inversión. Las muestras se incubaron a 58 °C durante una hora, se agregaron 300 µl de solución concentrada de sales (NaCl 6M) y se mezcló inmediatamente por inversión. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo antes de agregar 800 µl de isopropanol y mezclar por agitación en el vórtex. Se realizó una incubación a -20 °C durante una hora antes de centrifugar los tubos durante 20 minutos a 13,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol al 70 % al tubo con el pellet para realizar un último lavado, después se volvió a centrifugar a 13,000 rpm durante dos minutos. Finalmente se decantó lentamente el sobrenadante y se dejó secar por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente para posteriormente re suspender el pellet en 80 µl de agua destilada estéril. Las muestras se mantuvieron a -20 °C.

Las muestras de ADN se leyeron en un espectrofotómetro Nanodrop (Qiagen) para determinar la pureza del ADN obtenido al medir las absorbancias 260/280 y 260/230, mientras que la cantidad de ADN presente en la muestra se cuantificó en ng/µl. Una vez que se obtuvieron esos datos para todas las muestras, se hicieron alícuotas del ADN para tener todas las muestras a una concentración máxima de 10 µM.

VI.3.3. Detección de posibles patógenos oncogénicos

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificaron fragmentos del ADN de OthV-1, con primers específicos para el gen de la polimerasa de ADN (Dpol), del cual se esperaba un producto de 192 pb. Los primers que se usaron fueron Dpol 697 (GCGGGAACGCAACTATATCCT) y Dpol 65 (TCTTCGTCCAGTATCATTG) (Velez, 2012). Las reacciones de PCR se prepararon para cada muestra con buffer 10X a una concentración final de 1X, dNTPs a 1 µM, MgCl₂ a 5 µM, los primers Dpol697 y Dpol65 a 0.2 µM cada uno, Taq DNA polimerasa (Invitrogen) a 0.025 u/µl, agua estéril libre de nucleasas y ADN previamente extraído de cada muestra a 1.6 µM, para obtener un volumen final de 12.5 µl por muestra. El programa para la amplificación del fragmento fue:

95 °C por tres minutos

40 ciclos

95 °C por 40 segundos

52 °C por 30 segundos

72 °C por 40 segundos

72 °C por 10 minutos

4 °C hasta realizar la electroforesis

Como controles positivos para este análisis se utilizó ADN de epitelio genital de lobo marino de California que había sido detectado como positivo para OtHV-1 (Barragán-Vargas, 2015).

Se realizó un gel de agarosa al 1 % teñido con 3 µl de bromuro de etidio, donde se cargaron los productos de la PCR, y se corrieron en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 30 minutos. En cada pozo se cargaron 4 µl del producto de PCR, 2 µl del buffer de carga (5x) y 4 µl de agua. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para determinar el tamaño de las bandas obtenidas a partir del PCR.

En el caso de la amplificación de fragmentos de ADN de papilomavirus, se diseñaron los primers PapV0618_L1_F (ATACAGGACGGGGACATGG) y PapV0618_L1_R (TCATATTCCTCAGCGTGCCT) que reconocen el gen L1, generados a partir de la secuencia HQ293213.1 de GenBank, de los que se esperaba un producto de 539 pb. El volumen final de las reacciones fue de 10 µl por cada muestra analizada; se prepararon con buffer 10X a una concentración final de 1X, dNTPs a 0.2 µM, MgCl₂ a 3 µM, BSA a 0.1 mg/ml, los primers PapV0618_L1_F y PapV0618_L1_R a 0.3 µM cada uno, Taq DNA polimerasa (Invitrogen) a 0.025 u/µl, agua estéril libre de nucleasas y ADN previamente extraído de cada muestra a 2 µM. El programa para la amplificación del fragmento fue:

94 °C por tres minutos

30 ciclos

94 °C por 40 segundos

64 °C por 30 segundos

72 °C por 1 minuto

72 °C por 10 minutos

4 °C hasta realizar la electroforesis

El control positivo que se usó para este análisis fue ADN de una muestra de lobo marino de California previamente confirmada como positiva para papilomavirus. Para confirmar la amplificación del fragmento esperado en las muestras de elefante marino, se preparó un gel de agarosa al 1.2 % teñido con 3 µl de bromuro de etidio, el cual se corrió en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 30 minutos después de haber cargado los productos de la PCR. En cada pozo se cargaron 4 µl del producto de PCR, 2 µl del buffer de carga (5x) y 4 µl de agua. Para determinar el peso del producto, se utilizó como referencia el marcador de peso molecular de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

VI.3.4. Clonación a partir de PCR

En el caso de las muestras que resultaron positivas, se realizó una clonación de los productos obtenidos por PCR para confirmar la identidad del segmento amplificado. Se siguió el protocolo publicado para la clonación con TOPO TA (Invitrogen). Inicialmente, la ligación se realizó con 1 µl de solución de sales (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 1 µl del vector pCR4-TOPO TA, 1 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl del producto de PCR. Se dejó incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente hacer la transformación de las células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen). Las células competentes se incubaron en hielo durante 30 minutos con 2 µl del producto de la ligación, posteriormente se realizó un choque térmico al poner las células durante 30 segundos a 42 °C y pasarlas a hielo inmediatamente. Después se agregaron 250 µl de medio de Cultivo Súper Óptimo (SOC) y se dejaron en agitación (200 rpm) durante 1 hora a 37 °C. Las células transformadas se sembraron por el método de extensión en placa en agar LB con ampicilina a 1 mg/ml y se dejaron incubando toda la noche a 37 °C a 200 rpm.

Se realizó una PCR igual a la descrita para OtHV-1 y papilomavirus para las muestras respectivas a partir de las colonias que se obtuvieron de la transformación de las células DH5α. Las colonias picadas también fueron incubadas en tubos Falcon™ con medio líquido LB con ampicilina a 1 mg/ml para realizar la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Miniprep/TENS para el cual se prepararon las soluciones TE y TENS. La solución TE se preparó Tris HCl 10 mM a pH8 y EDTA 1mM, mientras que la solución TENS se preparó con 5 ml de Tris HCl 1M pH8, 12.5 ml de SDS 20 %, 5 ml de NaOH 10N y se aforó a 50 ml.

Primero se centrifugaron los tubos Falcon™ a 10,000 rpm durante 5 minutos, se desechó el medio y se agregaron 50 µl de solución TE con 0.5 µl de PureLink RNAsa A (Invitrogen) al pellet obtenido, se agregaron 300 µl de TENS y se mezcló hasta deshacer el pellet. Después se agregaron 100 µl de C₂H₃NaO₂ 3M y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm, se recuperó el sobrenadante en un

microtubo de 1.5 ml y se agregó 1ml de etanol puro y 1 µl de glucógeno para precipitar. Se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el contenido y se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70 % y se resuspendió el pellet en 40 µl de agua estéril libre de nucleasas.

VI.3.5. Análisis estadísticos

A partir de los datos obtenidos del conteo sobre hoja milimétrica del área teñida de la laminilla, se obtuvo la celularidad de cada tipo celular considerado en este estudio, medido en unidades arbitrarias (UA). La celularidad se calculó como se muestra a continuación:

$$\text{Celularidad} = \frac{n}{A}$$

n – número de células

A – área teñida (mm²)

Mediante histogramas de frecuencia se determinó la distribución de los datos sobre cada uno de los tipos celulares encontrados en el tracto genital de las crías de elefante marino del Norte. Para calcular la prevalencia de los patógenos analizados en este estudio, al igual que los diferentes tipos celulares presentados y el grado de displasia que mostraba cada individuo, se siguió la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{(n)(100)}{N}$$

n – número de datos que cumplen con el carácter a evaluar.

N – número total de individuos evaluados.

Para calcular el error estándar de las prevalencias obtenidas, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Error estándar} = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$

p – prevalencia.

N – número total de individuos evaluados.

Posteriormente se realizó la prueba de Chi² para determinar si existían diferencias significativas entre los datos obtenidos sobre la prevalencia y la celularidad de los tipos celulares encontrados. Así mismo, se usó la prueba de Chi² para investigar la asociación entre las infecciones por OtHV-1 y papilomavirus en el elefante marino del Norte. También se usó esta prueba para comparar la prevalencia de estos patógenos entre el elefante marino del Norte y el lobo marino de California. Los datos de la prevalencia de las infecciones por ambos patógenos en lobo marino de California se obtuvieron del estudio realizado por Barragán-Vargas (2015).

Todos los análisis fueron realizados en R, versión 3.5.2 (R Foundation for Statistical Computing).

VI.3.6. Secuenciación masiva

VI.3.6.1. Detección de ADN bacteriano

Del total de muestras de las cuales se extrajo el ADN, se seleccionaron cuatro muestras de elefante marino del Norte y dos muestras de lobo marino de California analizadas previamente por Barragán-Vargas (2015). La detección del ADN bacteriano se realizó a través de la técnica de PCR, con la cual se amplificó un fragmento de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16SrRNA. Los primers que se usaron fueron 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) y 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Herlemann et al., 2011), que amplifican un producto de 464 pb. Las reacciones de PCR contenían buffer 10X a una concentración final por muestra de 1X, dNTPs a 0.2 µM, MgCl₂ a 1.5 µM, BSA a 0.2 mg/ml, los primers 341F y 80R a 0.42 µM, Taq DNA polimerasa (Invitrogen) a 0.025u/µl, agua estéril libre de nucleasas y ADN previamente extraído de cada muestra a 2 µM, para obtener un volumen final de 10 µl por muestra. El programa para la amplificación del fragmento fue:

94 °C por 3 minutos

30 ciclos

94 °C por 45 segundos

58 °C por 40 segundos

72 °C por 60 segundos

72 °C por 10 minutos

4 °C hasta realizar la electroforesis

El control positivo que se usó para el análisis fue ADN obtenido a partir de cultivos bacterianos. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1 % teñido con 3 µl de bromuro de etidio, donde se cargaron los productos de la PCR, y se corrieron en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 30 minutos. En cada pozo se cargaron 4 µl del producto de PCR, 2 µl del buffer de carga (5x) y 4 µl de agua. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para determinar el tamaño de las bandas obtenidas a partir del PCR.

VI.3.6.2. Análisis del fragmento 16SrRNA

Una vez confirmada la presencia del gen 16SrRNA, se realizó la pirosecuenciación de las regiones hipervariables V3V4 mediante la plataforma MiSeq de Illumina. Las lecturas se analizaron inicialmente en la plataforma de Galaxy (usegalaxy.org), donde los adaptadores, primers residuales del PCR y aquellas secuencias de baja calidad fueron eliminadas. Las secuencias restantes se filtraron considerando un umbral de calidad de 25 (Galaxy Project), y posteriormente se eliminaron las quimeras encontradas entre dichas secuencias. Debido a los parámetros de calidad que mostraban las secuencias se eligió trabajar sólo con las secuencias forward y no las pareadas.

Posteriormente se descargaron las secuencias y se procesaron en R (v3.6.0), donde se volvió a comprobar la calidad de las secuencias y se observó la tasa de error de cada base usando el paquete *DADA2*. Usando el mismo paquete, las secuencias obtenidas fueron alineadas con la base de datos SILVA (versión 132) (Quast et al., 2013), para ser agrupadas en ASVs (Amplicon Sequence Variant, por sus siglas en inglés). Las secuencias se filtraron para identificar aquellos Phyla con más del 2 % de abundancia relativa en cada muestra (McMurdie y Holmes, 2013). De igual forma, las secuencias pertenecientes a células eucariotas, cloroplastos, mitocondrias y arqueas fueron eliminadas.

Para determinar el microbioma central de las muestras, inicialmente se usó el paquete *Microbiome* de R para obtener los datos de la cantidad de ASVs encontrados del 10 % al 100% de las muestras, y a un umbral de detección de 0.002, 0.01 y 0.02. Con los datos anteriores se realizó un modelo de líneas de tendencia, en el cual se obtuvo un R cuadrado de 0.96 y un valor de $p < 0.0001$. A partir de los datos obtenidos de manera gráfica en el modelo, se realizó un *heatmap* del microbioma bacteriano central considerando un umbral de detección de 0.02 en el 75 % de los individuos (Faust et al., 2015). Se realizaron análisis de riqueza considerando los índices de diversidad de Simpson y Shannon. Los gráficos realizados a partir de los datos obtenidos, se realizaron con el paquete *ggplot2* de R.

Las secuencias del microbioma genital del humano que se usaron en esta tesis fueron obtenidas a partir de la base de datos European Nucleotide Archive (ENA) con número de acceso: PRJEB21386 (Virtanen et al., 2017). Estas secuencias fueron procesadas en conjunto con las secuencias del elefante marino del norte y del lobo marino de California.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VII. RESULTADOS

VII.1. Descripción morfológica celular del epitelio genital del elefante marino del Norte

Se caracterizaron nueve tipos celulares en las muestras obtenidas de los frotis del tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte. Se encontraron células normales, pleomórficas, metaplásicas, neutrófilos, linfocitos, células coilocíticas, de metaplasia atípica, reactivas y binucleadas. Las células normales presentaban un contorno citoplasmático y nuclear bien definido, el tamaño del núcleo era característico al que poseen las células del epitelio escamoso y con una tinción homogénea (Figura 7A). Las células pleomórficas mostraban una estructura irregular, aunque los bordes del citoplasma y núcleo estaban bien definidos (Figura 7B). Las células metaplásicas al igual que las normales, tenían un contorno citoplasmático claro que presentaban elongaciones, el núcleo era circular, bien definido y su tamaño correspondía al esperado para epitelio escamoso (Figura 7C).

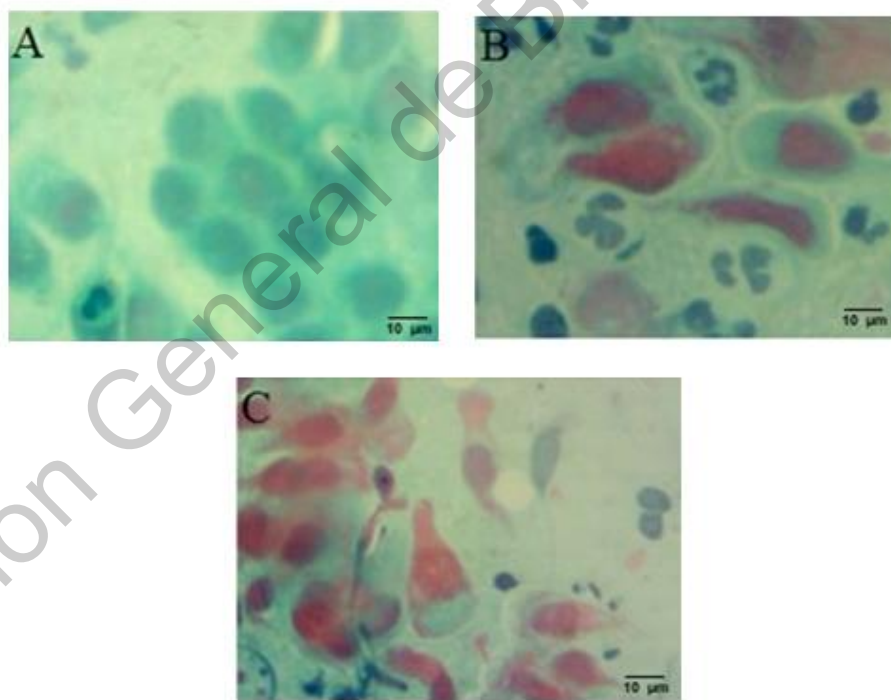


Figura 7. Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** células normales, **B** células pleomórficas, **C** células metaplásicas.

Una de las células del sistema inmune que se encontraron en las muestras son los neutrófilos, los cuales son células con contorno bien definido. Estos tenían un núcleo alargado y en forma de herradura o varios núcleos con diferentes morfologías (Figura 8A). También se observaron linfocitos, los cuales poseían un núcleo hipercromático bien definido, que ocupaba la mayor parte del espacio celular, lo que provocaba que la cantidad citoplasmática observada fuera mucho menor a la esperada (Figura 8B).

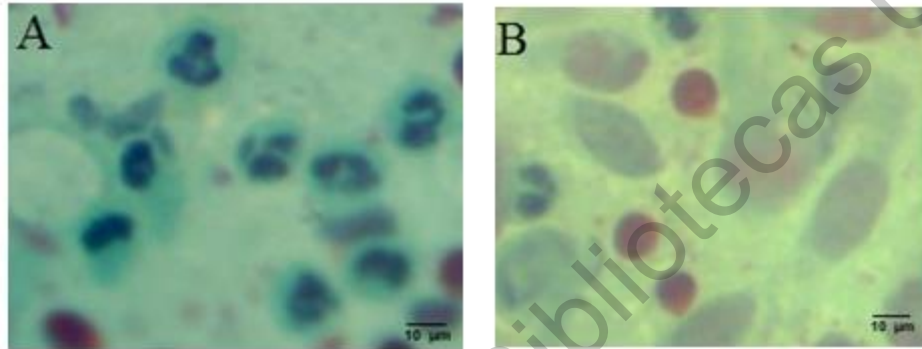


Figura 8. Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** neutrófilos, **B** linfocitos.

Las células coilocíticas mostraban un halo transparente alrededor del núcleo, el cual daba la apariencia de ser comprimido, sin contorno claro y con la cromatina agrupada de forma irregular, lo que le daba una apariencia rugosa (Figura 9A). Las células de metaplasia atípica carecían de contorno definido, donde el núcleo era amorfo e hiperpigmentado debido al estado en el que se encontraba su cromatina (Figura 9B). Las células reactivas mostraban la cromatina distribuida de forma heterogénea, lo que le daba la apariencia de un núcleo rugoso y con huecos en el interior (Figura 9C). Las células binucleadas tenían las características de una célula normal, aunque presentaban dos núcleos que se veían redondos y bien definidos (Figura 9D).

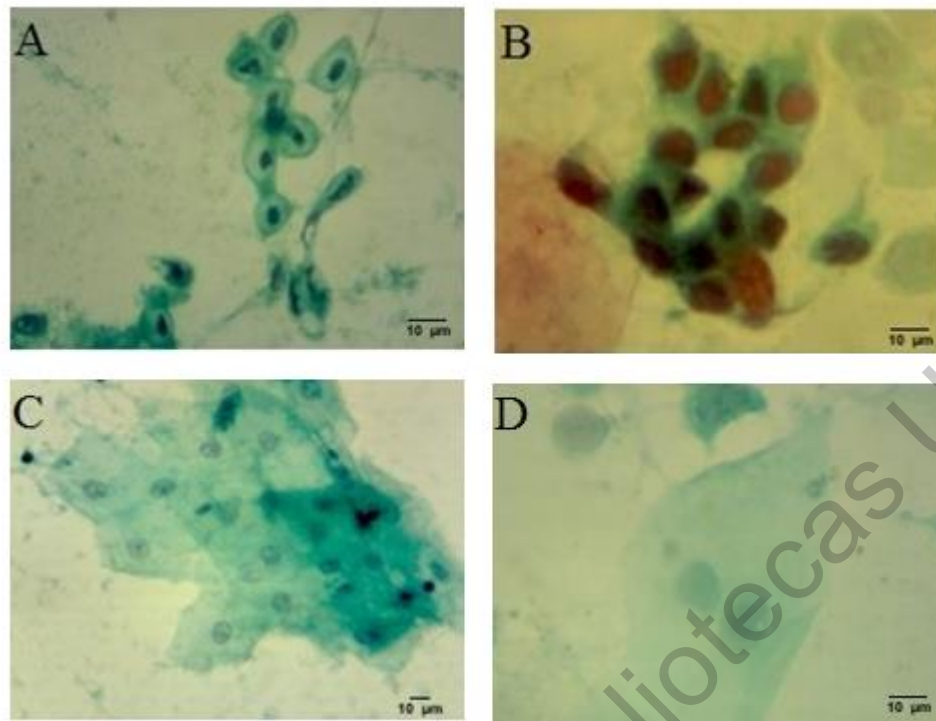


Figura 9. Imagen al 40X de la tinción de Papanicolaou de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. **A** coilocitos, **B** células de metaplasia atípica, **C** células reactivas, **D** células binucleadas.

VII.2. Prevalencia e intensidad de los tipos celulares del epitelio genital del elefante marino del Norte

La prevalencia de células normales, pleomórficas, metaplásicas, neutrófilos y linfocitos fue del 100 % en todas las muestras (Figura 10). Las células normales tuvieron una celularidad de 57.41 UA, la cual fue la más alta de todos los tipos celulares, seguida por 30.12 UA de células pleomórficas y 7.4 UA de neutrófilos (Figura 11).

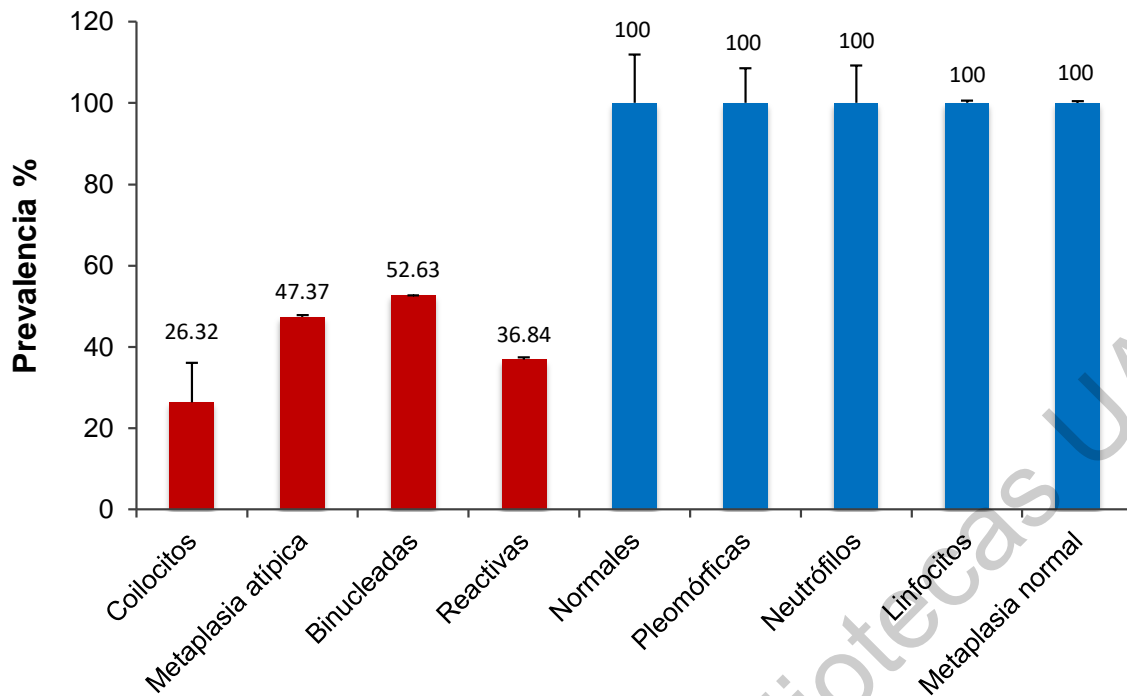


Figura 10. Prevalencia de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito. Las barras rojas corresponden a los tipos celulares relacionados con transformación pre-cancerígena, mientras que las barras azules son del resto de los tipos celulares encontrados.

En cuanto a los tipos celulares asociados con transformación pre-cancerígena, se observó que las células binucleadas tuvieron la mayor prevalencia (52.63 %) y una celularidad de 0.05 UA (Figura 10 y 11). Las células de metaplasia atípica tuvieron una prevalencia de 47.37 %, las células reactivas de 36.84 % y los coilocitos de 26.32 %, por lo que fueron los menos prevalentes en todas las muestras analizadas (Figura 10). Se encontraron diferencias en la prevalencia de los tipos celulares pre-cancerígenos ($\chi^2 = 10.014$, $gl = 3$, $p = 0.018$). La celularidad que mostraron las células coilocíticas fue de 2.28 UA en las muestras en las que estaban presentes, las células reactivas tuvieron una celularidad de 0.17 UA, mientras que en las células de metaplasia atípica fue de 0.12 UA (Figura 11).

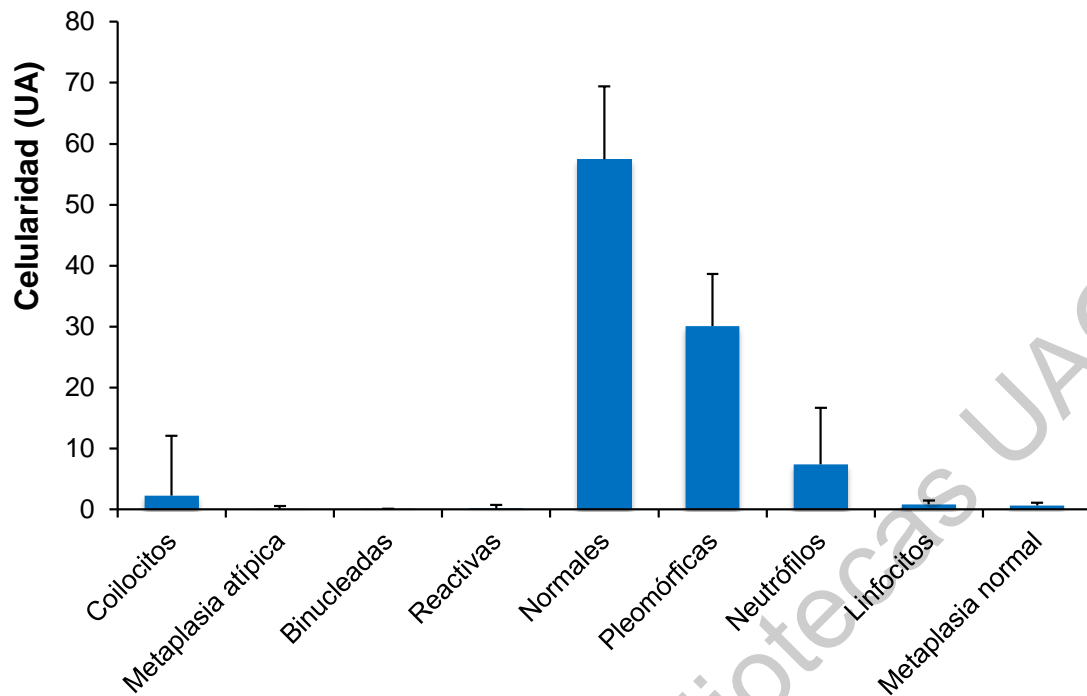


Figura 11. Intensidad medida en celularidad de los tipos celulares detectados en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.

VII.3. Prevalencia de displasia genital

El 31.57 % de los individuos mostraron algún grado de displasia de acuerdo al diagnóstico realizado. El tipo de displasia más común fue determinada (ASCUS) y, en menor frecuencia, displasia leve (LSIL). Ninguno de los individuos presentó displasia moderada o severa (HSIL) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prevalencia de displasia en epitelio genital del elefante marino del Norte.

Grado de displasia	Prevalencia %
Normal	47.36
Atipia (ASC)	21.05
Indeterminada (ASCUS)	26.31
Leve (LSIL)	5.26
Moderada/Severa (HSIL)	0
Displasia total %	31.57

VII.4. Prevalencia de agentes infecciosos con potencial oncogénico

Se encontró ADN viral en las muestras de crías hembra de elefante marino del Norte. El 47.37 % de los individuos muestreados mostraron presencia de ADN de OtHV-1, mientras que en el caso de papilomavirus se encontró una prevalencia de 36.16 % (Figura 12). De acuerdo a los análisis realizados, no se pudo detectar una correlación entre la presencia de OtHV-1 y papilomavirus en las muestras analizadas de elefante marino del Norte ($\text{Chi}^2 = 0.425$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.514$).

Los resultados obtenidos de la prevalencia de los agentes infecciosos en el elefante marino del Norte fueron comparados con datos previamente reportados por Barragán-Vargas (2015) en crías de lobo marino de California de la misma colonia reproductiva. Es importante considerar que en las 30 crías de lobo marino de California de esta isla no se encontró ninguna infección por OtHV-1 (Figura 12), lo que contrasta con la prevalencia de 43.37 % aquí encontrada ($\text{Chi}^2 = 18.844$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.00001419$). En cuanto a la presencia de papilomavirus en el lobo marino de California, se reportó una prevalencia del 12.19 % de las crías (Figura 12) siendo significativamente mayor en el elefante marino del Norte, lo que mostró una correlación significativa ($\text{Chi}^2 = 13.741$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.0002$).

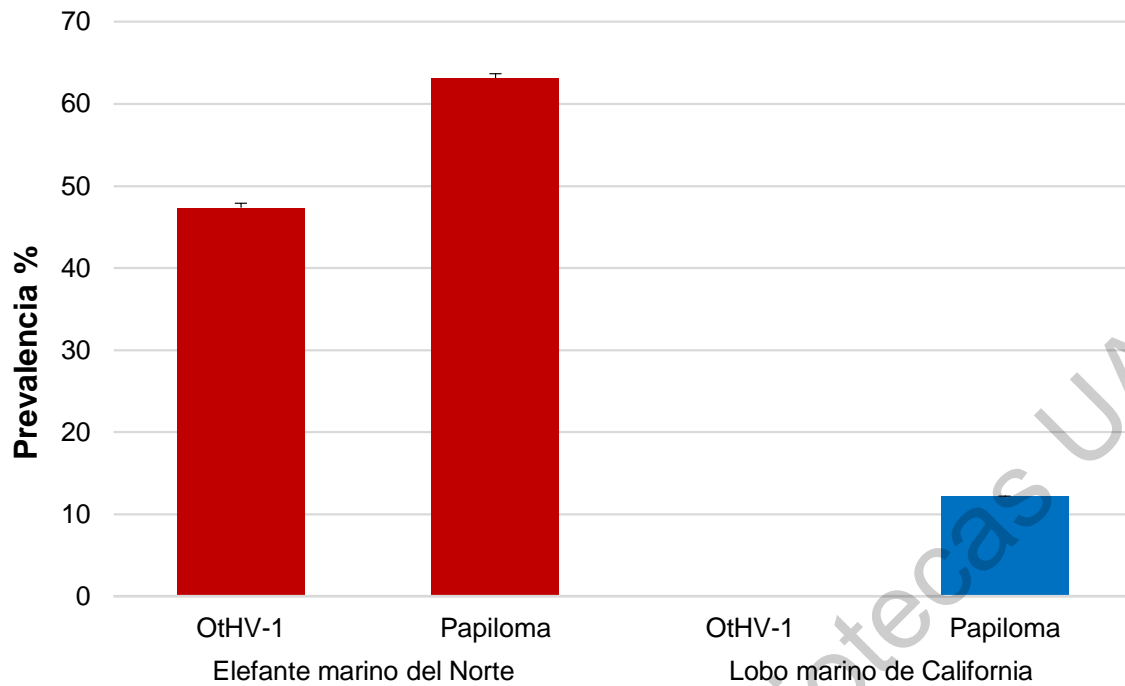


Figura 12. Prevalencia de ADN viral de OtHV-1 y papilomavirus en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte y lobo marino de California del Archipiélago de San Benito. Los datos del lobo marino de California se obtuvieron de Barragán-Vargas (2015).

VII.5. Caracterización del microbioma bacteriano genital

Se encontraron 1558 ASVs compartidos entre el lobo marino de California, el elefante marino del Norte y los humanos, aunque sólo 1460 ASVs forman parte del microbioma bacteriano del tracto vaginal del elefante marino del Norte. Los Phyla más representativos fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Epsilonbacteraeota, Firmicutes, Fusobacteria y Proteobacteria, de los cuales, el más abundante fue Firmicutes (25.53 %), seguido por Proteobacteria (15.5 %), y Epsilonbacteraeota el menos abundante (4.48 %) (ver Figura 13).

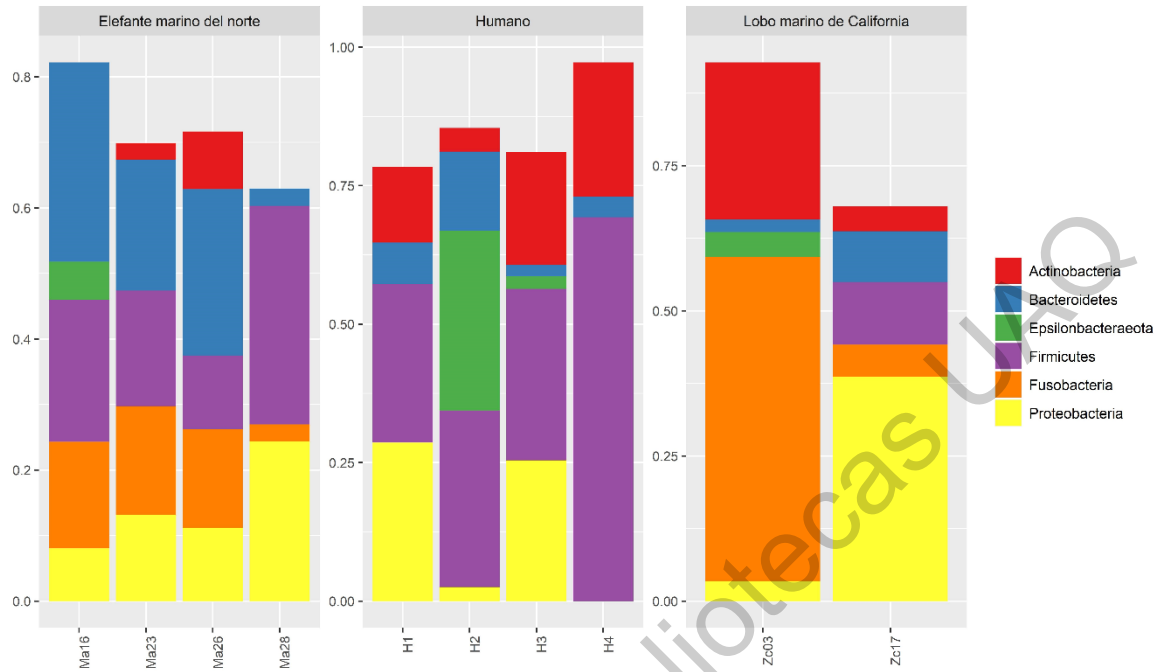


Figura 13. Abundancia de los Phyla del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano.

Las clases bacterianas más abundantes en el epitelio cervical del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago San Benito y del humano fueron Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Bacteroidia, Campylobacteria, Clostridia, Coriobacteria, Fusobacteria, Gammaproteobacteria y Negativicutes. Los más abundantes fueron Bacilli (21.44 %), Bacteroidia (11.69 %) y Clostridia (19.25 %), mientras que la clase menos abundante fue Campylobacteria (4.48 %) (Figura 14).

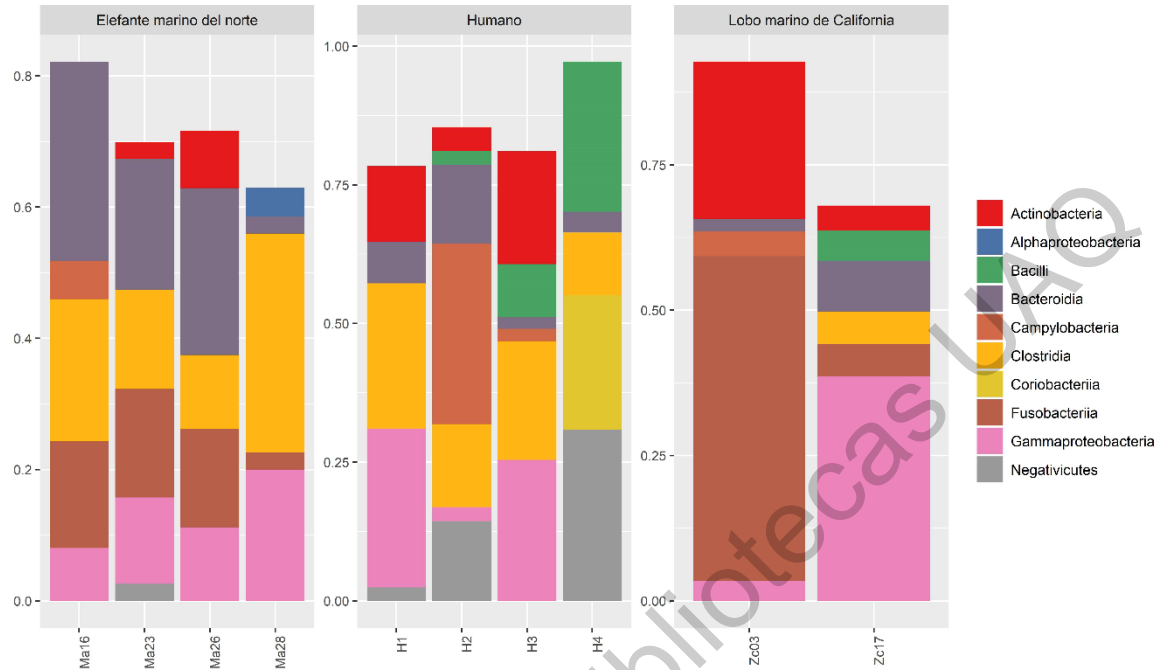


Figura 14. Abundancia de las clases del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano.

La diversidad promedio de especies en las muestras analizadas fue 265.4 (rango: 79-675) (Figura 15.A). El índice de Shannon fue de 3.61 (rango: 1.96-4.42) (Figura 15.B). En general el índice de Simpson fue mayor de 0.8 para el elefante marino del Norte, y la menor diversidad encontrada fue de 0.66 para una muestra de lobo marino de California (Figura 15C).

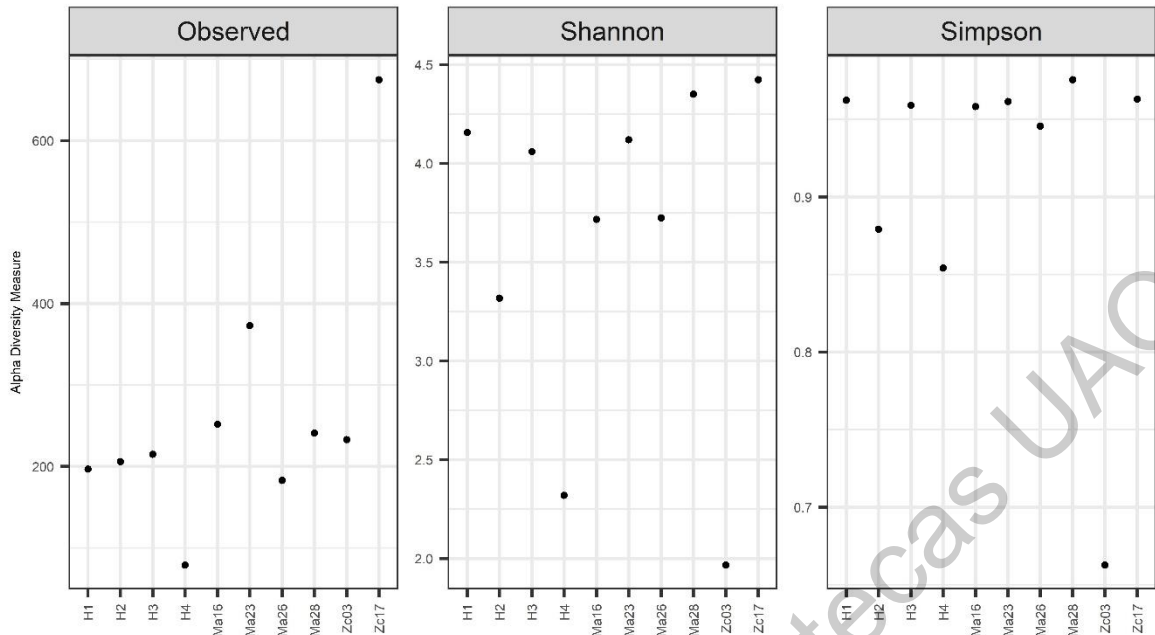


Figura 15. Diversidad del microbioma bacteriano del tracto genital del elefante marino del Norte, del lobo marino de California del Archipiélago de San Benito y del humano. **A.** diversidad observada, **B.** índice de Shannon, **C.** índice de Simpson.

Las curvas reflejan una tendencia en la que, a mayor prevalencia, la abundancia de los ASVs disminuye. De igual forma, se observa que cuando el umbral de detección que se considere para el análisis es menor, la detección de ASVs en las muestras analizadas se incrementa paulatinamente (Figura 16).

A un umbral de detección de 0.02, al menos el 75 % de los individuos compartieron 53 ASVs. En la figura 17 se puede observar que las familias que presentan mayor abundancia fueron Leptotrichiaceae, Dysgonomonadacear, Moraxellaceae y Veillonellaceae.

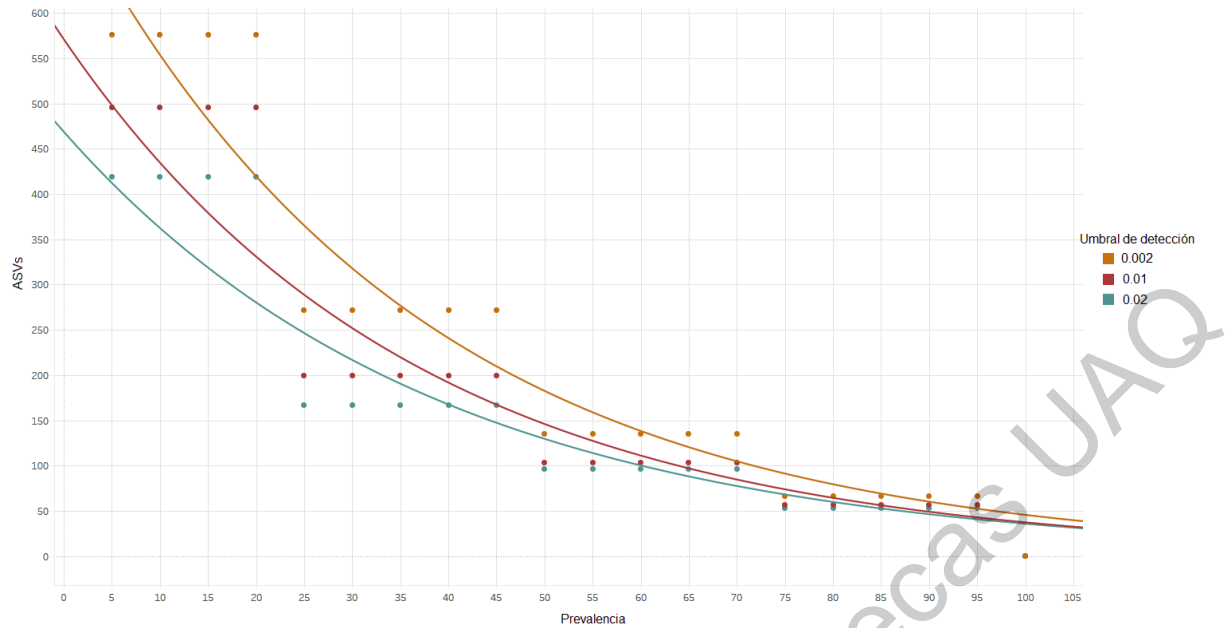


Figura 16. Tendencia de los ASVs que conforman el microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.

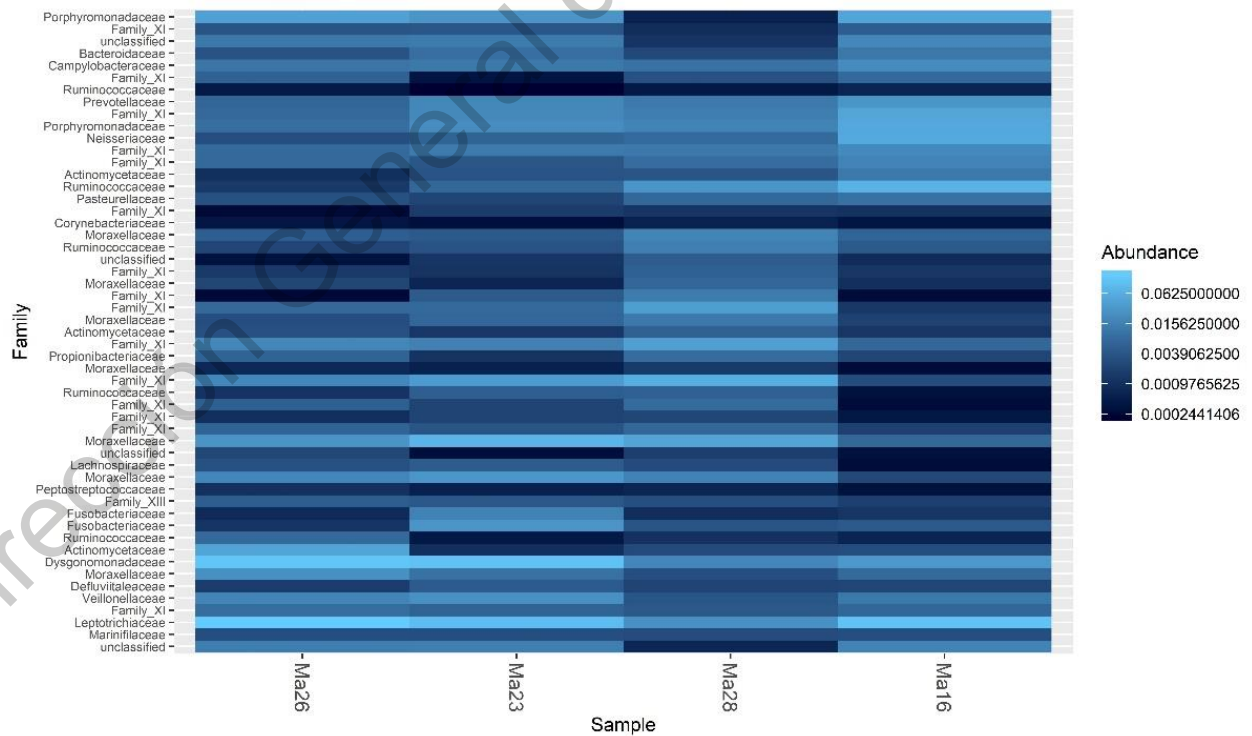


Figura 17. Heatmap de las familias que integran el microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.

En el cuadro 3, el desglose completo de la clasificación taxonómica de las bacterias que conforman el bacterioma central del elefante marino del Norte, donde los Firmicutes fueron el más representativo dentro de las comunidades bacterianas, seguido por Bacteroidetes y Proteobacteria.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica del microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género			
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces			
				Arcanobacterium			
				Mobiluncus			
					Corynebacteriales	unclassified	unclassified
					Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium_1
					Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	Cutibacterium
			Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
Dysgonomonadaceae	unclassified						
Marinifilaceae	Odoribacter						
Porphyromonadaceae	Porphyromonas						
Porphyromonadaceae	Porphyromonas						
Prevotellaceae	Prevotella						
unclassified	unclassified						
unclassified	unclassified						
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter			
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Defluviitaleaceae	Defluviitaleaceae_UCG-011			

Cuadro 4 (Continuación). Clasificación taxonómica del microbioma bacteriano central del tracto genital del elefante marino del Norte del Archipiélago de San Benito.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género		
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XI	Anaerococcus		
				Ezakiella		
				Ezakiella		
				Helcococcus		
				Helcococcus		
				Parvimonas		
				Peptoniphilus		
				Peptoniphilus		
				Peptoniphilus		
				unclassified		
				unclassified		
				unclassified		
				unclassified		
				unclassified		
				W5053		
				W5053		
				Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales
Lachnospiraceae	unclassified					
Peptostreptococceae	Peptostreptococcus					
Ruminococcaceae	Fastidiosipila					
	Fastidiosipila					
	Ruminococcaceae_UCG-014					
	unclassified					
unclassified	unclassified					
Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	unclassified			
			Fusobacteriaceae			
			Fusobacteriaceae	Fusobacterium		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Leptotrichiaceae	Oceanivirga		
			Betaproteobacteriales	Neisseriaceae	unclassified	
			Pasteurellales	Pasteurellaceae	unclassified	
			Moraxellaceae	Psychrobacter		
Psychrobacter						
Psychrobacter						
Psychrobacter						
Acinetobacter						
Psychrobacter						

VIII. DISCUSIÓN

Los diferentes tipos celulares que se encontraron en el tracto genital de crías hembras de elefante marino del Norte son iguales a los que se toman en cuenta para diagnosticar displasia del tracto cervical en humanos (Botella, 1997). Con esta misma aproximación, el estudio realizado por Barragán-Vargas en el 2013 mostró que el epitelio vaginal del lobo marino de California también presenta células normales, pleomórficas, de metaplasia, y los tipos celulares considerados como pre-cancerígenos, como coilocitos, células reactivas, de metaplasia atípica y binucleares. En conjunto, los resultados de ambos estudios podrían ser un reflejo de una tendencia de los mamíferos a desarrollar tipos celulares pre-cancerígenos en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, es importante destacar que existen diversos mecanismos para reparar y revertir el daño celular, lo que lleva a retomar la homeostasis del individuo (Yulin et al., 2012; Smetana et al., 2013).

El elefante marino del Norte mostró una prevalencia moderada de displasia en el epitelio genital de las crías, y en aquellos casos en los que ocurrió, lo más común fue la presencia de ASCUS (26.31 %), mientras que sólo el 5.26 % de los individuos tuvieron displasia LSIL. Además, no se observó ningún caso de HSIL, y si bien la prevalencia de los tipos celulares determinados como pre-cancerígenos fue de más del 20 % para cada morfotipo, es necesario tomar en cuenta que la intensidad en el caso de estas células pre-cancerígenas fue muy baja. Estos datos podrían ser un indicador de que la especie tiene una baja predisposición a desarrollar cáncer.

De acuerdo con los estudios realizados en el lobo marino de California, donde también se han encontrado crías con transformación pre-cancerígena (Barragán-Vargas, 2013), la prevalencia de los tipos celulares asociados al desarrollo de displasia es menor que la encontrada en el elefante marino del Norte (Barragán-Vargas, 2013). Sin embargo, cuando se comparó la intensidad o celularidad de estos fenotipos celulares entre ambas especies, fue mayor en el lobo marino de California. Por lo anterior, y fortaleciendo la idea propuesta anteriormente, parece que el elefante marino del Norte es capaz de contrarrestar la transformación pre-cancerígena de forma más eficiente que el lobo marino de California, en quien ocurren frecuentemente tumores cervicales en individuos adultos (Gulland et al., 1996), lo que no se ha reportado en el elefante marino del Norte.

Tal como se mencionó previamente, entre los tipos celulares que se observaron y clasificaron, se encuentran aquellos que se caracterizan por estar asociados con transformación pre-cancerígena, como lo son las células binucleadas (Nayar y Wilbur, 2015). Incluso se ha visto que existe una relación entre este tipo celular y la presencia de patógenos como *Candida* spp. (Safi Oz et al., 2015), a la cual también se le ha atribuido el riesgo de inducir el desarrollo de CCU en el humano (Kalantari et al., 2014). De hecho, la presencia de células binucleadas en muestras citológicas cervicales se ha considerado un buen indicador de la transformación pre cancerígena asociada a virus, en

especial cuando esta se observa en conjunto con la presencia de coilocitos, ya que las células binucleadas también pueden aparecer a partir de la infección por VPH (Oliveira et al., 2018; Washiya et al., 2013).

De igual forma, las células reactivas y de metaplasia atípica se encuentran estrechamente ligadas a la detección de transformación pre-cancerígena (Gupta et al., 2019), en especial si estas se encuentran en gran abundancia y a la par de los otros dos tipos celulares característicos de la transformación anormal del epitelio del tracto cervical (Alanbay et al., 2017; Nayar y Wilbur, 2015).

Las células coilocíticas además de estar asociadas a la transformación pre-cancerígena de los epitelios, se han relacionado con infecciones por papilomavirus desde 1977 (zur Hausen, 1977). Por ello, la presencia de células coilocíticas en el epitelio de las crías de elefante marino del Norte, aunada a la infección por papilomavirus, es interesante. Sin embargo, la presencia de estas células en el tejido puede ser transitoria, de acuerdo a la severidad de las lesiones presentadas en los individuos y a la abundancia de otras células pre-cancerígenas detectadas en la citología (Krause y Butler, 2019). También se debe considerar que la intensidad con la que se presentan las células coilocíticas fue menor que la reportada para el lobo marino de California, por lo que es plausible que los mecanismos de reparación celular sean más eficientes en esta especie para revertir este tipo de transformación celular y eliminar la infección. Este fenómeno está bien documentado para el humano, donde en un periodo aproximado de 18 meses puede revertir el daño, en especial cuando la infección se dio por una cepa de VPH de bajo riesgo (Groves y Coleman, 2015; Navarro Santana et al., 2018), ya que no todas las cepas inducen la aparición de tumores malignos (Nayar y Wilbur, 2015).

Como se ha mencionado, el papilomavirus puede llevar al desarrollo de tumores cancerígenos; esto se ha reportado en el lobo marino de California (Barragán-Vargas, 2015), y ahora se ve una tendencia similar en el elefante marino del Norte, con una prevalencia de 66.67 %, mientras que en el lobo marino de California es de 12.19 % (Barragán-Vargas, 2015). Si bien, el elefante marino del Norte presenta un mayor número de individuos infectados, es necesario considerar que hasta ahora, no se han reportado adultos con tumores en el tracto cervical en esta especie. Es posible que la cepa de papilomavirus que fue detectada en el epitelio de las crías de elefante marino sea de bajo riesgo, ya que a pesar de que se detectó ADN del patógeno en las muestras analizadas, y se encontraron coilocitos, ningún individuo tenía una displasia severa y no se ha reportado ninguna neoplasia genital en adultos de esta especie.

Encontrar papilomavirus en el elefante marino del Norte es algo que no se había reportado anteriormente. Sin embargo, en otras especies de mamíferos marinos sí se ha encontrado evidencia de infección y existen estudios donde asocian la infección por papilomavirus al desarrollo de tumores y verrugas genitales en cachalote (*Physeter macrocephalus*), delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) y marsopa común (*Phocoena phocoena*) (Lambertsen et al., 1987; Van Bresse et al., 1999; Rector et al., 2008). Las infecciones por herpesvirus también son comunes en mamíferos marinos (Newman y Smith, 2006). En fócidos, uno de los más estudiados es el herpesvirus de fócidos tipo 1 (PHHV-1), el cual se aisló en tejido respiratorio de foca de puerto, *Phoca vitulina* (Osterhaus et al., 1985), y posteriormente se encontró que también podía colonizar la mucosa genital (Goldstein et al., 2005; Roth et al., 2013), lo que concuerda con el hallazgo de herpesvirus en el tracto genital de las crías de elefante marino del Norte analizadas en esta tesis.

En el caso de OtHV-1, su prevalencia en el tejido cervical de las crías de elefante marino del Norte fue de 47.37 %. Esto contrasta con lo encontrado para crías de lobo marino de California, en la misma colonia reproductiva, ya que no presenta infección por este patógeno (Barragán-Vargas, 2015). En general, el desarrollo de CUG en lobo marino de California ha sido asociado a la presencia de OtHV-1 (Lipscomb et al., 2000; King et al., 2002). Sin embargo, la ausencia de OtHV-1 en individuos que presentan transformación celular pre-cancerígena sugiere que este no es el único agente asociado a la aparición de CUG. Por lo tanto, con base en los resultados observados aquí, es probable que la infección por OtHV-1 en crías de elefante marino del Norte no implica necesariamente un riesgo para el desarrollo de tumores pre-cancerígenos, y puede no estar relacionado con la transformación celular en este organismo.

Debido a la historia de vida de este tipo de animales, caracterizada por una dependencia absoluta en la leche materna durante 28 días después del nacimiento, un destete abrupto y un ayuno durante dos meses en los que no se adentran al mar (Costa et al., 1986; Habran et al., 2010), las crías neonatas reflejan en buena medida la salud de sus madres. Por esto, es probable que las infecciones de papilomavirus y OtHV-1 se estén dando mediante transmisión vertical, a diferencia de lo que se ha propuesto para el lobo marino de California, donde se propone que la mayor parte de las infecciones son horizontales, durante el coito, y pocas infecciones son detectadas en crías (Goldstein et al., 2004; Buckles et al., 2007). Estudios en humanos han demostrado la transmisión vertical de agentes virales, entre ellos herpes simplex (Berger y Doerr, 2018; Bhatta et al., 2018); de igual forma se ha descrito la transmisión de PHHV-1 en foca de puerto a crías nacidas prematuramente (Goldstein et al., 2004), por lo que es probable que este fenómeno ocurra frecuentemente en el elefante marino del Norte, y pone en duda su papel definitivo como agente causal del carcinoma urogenital, ya que implicaría que la mayor parte de las hembras adultas estarían infectadas, y a la fecha no se han reportado casos de CUG en esta especie. Se debe tomar

en cuenta que este estudio fue realizado en crías, por lo que este trabajo explora el estado del epitelio celular de individuos que aún no han madurado sexualmente. Al encontrar este tipo de transformación en el epitelio vaginal de crías y la presencia de virus oncogénicos se podría pensar que el elefante marino del Norte es un organismo propenso a desarrollar cáncer, no obstante, no hay reportes de CUG en adultos de esta especie. Por ello se sugiere que este organismo tiene alta tolerancia a la transformación celular, ya que a pesar de que las crías pueden tener tipos celulares asociados al desarrollo de displasia, son capaces de evitar la aparición de tumores en su etapa adulta.

El desarrollo y la progresión de la transformación cancerígena está estrechamente ligada a la inflamación del tejido, ya que es una de las principales características durante la invasión y la metástasis de los tumores (Zheng et al., 2016; Zhu et al., 2018). Al conocer la abundancia de neutrófilos y linfocitos presentes en muestras citológicas de pacientes sanos, es posible hacer predicciones del estado de salud del individuo (Lee et al., 2012; Zhu et al., 2018). Como primera aproximación de la abundancia de células del sistema inmune en la mucosa genital de crías de elefante marino del Norte, se observó que los linfocitos presentan una baja intensidad (0.86 UA), mientras que los neutrófilos eran ligeramente más abundantes (7.41 UA). Estos conteos son menores a los reportados en el lobo marino de California de la misma colonia reproductiva (Barragán-Vargas et al., 2016), y sugiere que la inflamación del tejido cervical es baja en las crías de elefante marino del Norte a esta edad. También es posible que el elefante marino del Norte presente cierta inmunotolerancia al establecimiento de ciertos patógenos en el epitelio genital, y que, en consecuencia, la ausencia de inflamación constante reduce el riesgo de transformación celular pre-cancerígena (Rosin et al., 1994; Zheng et al., 2016; Zhu et al., 2018).

De acuerdo a los resultados observados, las comunidades microbianas del epitelio cervical del elefante marino del Norte son muy parecidas a la del humano, quienes a pesar de no compartir los mismos hábitos ni el ambiente, al ser de la Clase Mamífera comparten parte de su historia evolutiva (Ley et al., 2008; Nelson et al., 2013). En cuanto a las comunidades microbianas encontradas en el lobo marino de California, es probable que esos individuos estuvieran sufriendo un proceso infeccioso donde ocurriera una disbiosis de las comunidades bacterianas, debido a que los Phyla más abundantes fueron Fusobacteria y Proteobacteria, los cuales incluyen algunas de las principales bacterias patógenas del tracto genital, tales como *Sneathia* spp. en el caso de Fusobacterium (Brennan y Garrett, 2019), o *E. coli* y *Neisseria gonorrhoeae* en el caso de Proteobacteria (Mendling, 2016; Donders et al., 2017; Tsevat et al., 2017; Quillin y Seifert, 2018).

El microbioma bacteriano del elefante marino del Norte se conformó principalmente por bacterias del filo Firmicutes, las cuales, de acuerdo a estudios realizados en humanos, son características de un epitelio vaginal sano (Motevaseli et al., 2013; Brotman et al., 2014a, 2014b). Por otro lado, la clase más abundante fue la de Bacilli, la cual incluye bacterias del género *Lactobacillus*, los cuales también forman parte del microbioma bacteriano genital normal (Motevaseli et al., 2013; Carda-Diéguez et al., 2019). La clase Bacteroidia es característica principalmente del tracto gastrointestinal, aunque se ha encontrado en el fondo marino (Brothers et al., 2018; Wang et al., 2018).

De acuerdo a los índices de diversidad de Shannon y Simpson, el epitelio genital del elefante marino del Norte fue muy diverso. En todas las muestras analizadas, sólo dos muestras (una de lobo marino de California y otra de humano) mostraron una diversidad baja, lo que coincide con lo observado en las gráficas de abundancia de los Phyla y las clases bacterianas. Entre las familias más abundantes que conforman el microbioma central del elefante marino del norte, se encuentra Veillonellaceae, la cual se ha encontrado en muestras de piel y del epitelio genital de humanos (Marchandin et al., 2010). De igual forma, la familia Moraxellaceae también ha sido vinculada con la colonización del tracto vaginal (Harmsen et al., 2001). La familia Leptotrichiaceae coloniza las mucosas, entre ellas, las mucosas del epitelio genital, además se ha encontrado en la piel de animales marinos (Eisenberg et al., 2016a, 2016b; Gonzalez-Martinez et al., 2018). Evidentemente, la caracterización del bacterioma fue una primera aproximación al entendimiento de los simbioses no antagonistas que colonizan el epitelio genital de esta especie. Se requerirán estudios futuros que amplíen el número de muestras e incluír animales de otras clases etarias para tener más completo este entendimiento.

IX. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que investiga la presencia de agentes pro-oncogénicos, la frecuencia de transformación pre-cancerígena y la conformación del microbioma bacteriano del epitelio cervical en animales de vida libre, en este caso, en el elefante marino del Norte. Por ello, esta tesis genera conocimiento importante para futuras investigaciones relacionadas con la salud del epitelio cervical de animales de vida libre, y en general, la salud de centinelas ambientales que reflejan el estado del ecosistema en el que se encuentran.

Se encontró transformación pre-cancerígena leve en las crías de elefante marino del Norte. Aunque este proceso atípico se vio en más del 30 % de los individuos analizados, ninguno mostró displasia de HSIL, lo que indica que sus mecanismos de oncovigilancia son capaces de detener la progresión de la transformación celular, y revertirla, y se propone que es por ello que no parecen ocurrir tumores malignos del epitelio genital en los adultos de esta especie, como ocurre en otras especies de pinnípedos.

Los dos virus oncogénicos fueron detectados molecularmente en un número alto de las muestras de epitelio cervical del elefante marino del Norte. Sin embargo, no todas las muestras que presentaban infección por alguno de estos virus presentaban evidencia de transformación pre-cancerígena, por lo que es posible que exista un mecanismo de tolerancia a la infección por estos virus, o a que el papel oncogénico de estos virus sea menor al que se ha considerado. Por otro lado, se debe considerar que las crías analizadas son un reflejo del estado de salud de sus madres debido a la transmisión vertical de estos patógenos, aunque de igual manera el sistema inmune de este organismo es capaz de detener la progresión de la transformación celular.

En cuanto a las comunidades bacterianas del tracto genital del elefante marino de Norte, se componen principalmente por microorganismos del Phylum de los Firmicutes, en especial del género *Lactobacillus*, lo cual es esperado para este tipo de mucosas. Además, hay evidencia de la presencia de microorganismos marinos, lo que concuerda con el ambiente en el que se desarrollan estos animales. No se encontró evidencia de que las comunidades bacterianas sean alteradas cuando hay infección por papilomavirus o por OtHV-1, probablemente debido a que la intensidad de la infección no ha llegado a provocar una disbiosis en este epitelio. Sin embargo, para determinar esto, será necesario ampliar el número de muestras.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F., Greig, D., Amos, W., 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422, 35–35.
- Aguirre, A.A., Lutz, PeterL., 2004. Marine Turtles as Sentinels of Ecosystem Health: Is Fibropapillomatosis an Indicator? *EcoHealth* 1.
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J.J., Hayes, R.B., Yang, L., 2013. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1907–1911.
- Alameda, F., Albert, S., Romero, E., Gimferrer, E., Soler, I., Ferrer, L., Conangla, M., Serrano, S., 2004. ASCUS sobre células metaplásicas Significado pronóstico de los cambios citológicos. *Rev Esp Patol* 37, 391–394.
- Alanbay, İ., Öztürk, M., Fıratlıgil, F.B., Karaşahin, K.E., Yenen, M.C., Bodur, S., 2017. Cytohistological discrepancies of cervico-vaginal smears and HPV status. *Ginekol. Pol.* 88, 235–238.
- Aschfalk, A., Bacciarini, L.N., 2002. Carcinoid in the lung of a hooded seal (*Cystophora cristata*). *Vet. Rec.* 151, 770–772.
- Audirac-Chalifour, A., Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Téllez-Sosa, J., Martínez-Barnetche, J., Cortina-Ceballos, B., López-Estrada, G., Delgado-Romero, K., Burguete-García, A.I., Cantú, D., García-Carrancá, A., Madrid-Marina, V., 2016. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS ONE*.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15718–15723
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., Williams, D.A., 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 9–25.
- Barragán-Vargas, C., 2015. Transformación celular epitelial y apoptosis: un marco ecológico y molecular para el lobo marino de California (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.
- Barragán-Vargas, C., 2013. Anormalidades celulares y prevalencia de OtHV-1 y estreptococos beta hemolíticos en tejido genital de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en la región de las grandes islas del Golfo de California, México. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Barragán-Vargas, C., Montano-Frías, J., Ávila Rosales, G., Godínez-Reyes, C.R., Acevedo-Whitehouse, K., 2016. Transformation of the genital epithelial tract occurs early in California sea lion development. *R. Soc. Open Sci.* 3, 150419.

- Bartholomew, G.A., Hubbs, C.L., 1960. Population growth and seasonal movements of the northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *Mammalia* 24, 313–324.
- Berger, A., Doerr, H.W., 2018. Preventing vertical virus infections: the role of serologic screening of pregnant women. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 207, 249–253.
- Bernabeu, A., Lledo, B., Díaz, Ma.C., Lozano, F.M., Ruiz, V., Fuentes, A., Lopez-Pineda, A., Moliner, B., Castillo, J.C., Ortiz, J.A., Ten, J., Llacer, J., Carratala-Munuera, C., Orozco-Beltran, D., Quesada, J.A., Bernabeu, R., 2019. Effect of the vaginal microbiome on the pregnancy rate in women receiving assisted reproductive treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.*
- Bhatta, A.K., Keyal, U., Liu, Y., Gellen, E., 2018. Vertical transmission of herpes simplex virus: an update. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 16, 685–692.
- Biancani, B., Lacave, G., Magi, G.E., Rossi, G., 2010. Ovarian Interstitial Cell Tumor in a South American Sea Lion (*Otaria flavescens*). *J. Wildl. Dis.* 46, 1012–1016.
- Boleij, A., Hechenbleikner, E.M., Goodwin, A.C., Badani, R., Stein, E.M., Lazarev, M.G., Ellis, B., Carroll, K.C., Albesiano, E., Wick, E.C., Platz, E.A., Pardoll, D.M., Sears, C.L., 2015. The *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 208–215.
- Bossart, G.D., Ghim, S., Rehtanz, M., Goldstein, J., Varela, R., Ewing, R.Y., Fair, P.A., Lenzi, R., Joseph, B., Hicks, C.L., Schneider, L.S., McKinnie, C.J., Reif, J.S., Sanchez, R., Lopez, A., Novoa, S., Bernal, J., Goretti, M., Rodriguez, M., Defran, R.H., Jenson, A.B., 2005. Urogenital Neoplasia in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Aquat. Mamm.* 31, 473–480.
- Botella, J., 1997. El útero: Fisiología y Patología. Ediciones Díaz de Santos.
- Bowen, L., Aldridge, B.M., DeLong, R., Melin, S., Buckles, E.L., Gulland, F., Lowenstine, L.J., Stott, J.L., Johnson, M.L., 2005. An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 56, 846–848.
- Brennan, C.A., Garrett, W.S., 2019. *Fusobacterium nucleatum* symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 156–166.
- Brothers, C.J., Van Der Pol, W.J., Morrow, C.D., Hakim, J.A., Koo, H., McClintock, J.B., 2018. Ocean warming alters predicted microbiome functionality in a common sea urchin. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285.
- Brotman, R.M., He, X., Gajer, P., Fadrosh, D., Sharma, E., Mongodin, E.F., Ravel, J., Glover, E.D., Rath, J.M., 2014a. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect. Dis.* 14, 471.

- Brotman, R.M., Shardell, M.D., Gajer, P., Tracy, J.K., Zenilman, J.M., Ravel, J., Gravitt, P.E., 2014b. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *J. Infect. Dis.* 210, 1723–1733.
- Brown, R.J., 1975. Renal fibrosarcoma in the Northern fur seal. *J. Wildl. Dis.* 11, 23–25.
- Browning, H.M., Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F.M.D., Hall, A.J., Finlayson, J., Dagleish, M.P., Billington, K.J., Colegrove, K., Hammond, J.A., 2014. Evidence for a genetic basis of urogenital carcinoma in the wild California sea lion. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20140240–20140240.
- Buckles, E.L., Lowenstine, L.J., DeLong, R.L., Melin, S.R., Vittore, R.K., Wong, H.-N., Ross, G.L., St Leger, J.A., Greig, D.J., Duerr, R.S., Gulland, F.M.D., Stott, J.L., 2007. Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. *Vet. Microbiol.* 120, 1–8.
- Buckles, E.L., Lowenstine, L.J., Funke, C., Vittore, R.K., Wong, H.-N., St Leger, J.A., Greig, D.J., Duerr, R.S., Gulland, F.M.D., Stott, J.L., 2006. Otarine Herpesvirus-1, not Papillomavirus, is Associated with Endemic Tumours in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *J. Comp. Pathol.* 135, 183–189.
- Carda-Diéguez, M., Cárdenas, N., Aparicio, M., Beltrán, D., Rodríguez, J.M., Mira, A., 2019. Variations in Vaginal, Penile, and Oral Microbiota After Sexual Intercourse: A Case Report. *Front. Med.*
- Chen, J., Domingue, J.C., Sears, C.L., 2017. Microbiota Dysbiosis in Select Human Cancers: Evidence of Association and Causality. *Semin. Immunol.* 32, 25–34.
- Colegrove, K.M., Greig, D.J., Gulland, F.M.D., 2005a. Causes of Live Strandings of Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina*) Along the Central California Coast, 1992-2001.
- Colegrove, K.M., Gulland, F.M.D., Naydan, D.K., Lowenstine, L.J., 2009. Normal Morphology and Hormone Receptor Expression in the Male California sea lion (*Zalophus californianus*) Genital Tract. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 292, 1818–1826.
- Colegrove, K.M., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M.D., 2005b. Leptospirosis in Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) Stranded along the California Coast. *J. Wildl. Dis.* 41, 426–430.
- Colston, T.J., Jackson, C.R., 2016. Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. *Mol. Ecol.* 25, 3776–3800.
- Colston, T.J., Noonan, B.P., Jackson, C.R., 2015. Phylogenetic Analysis of Bacterial Communities in Different Regions of the Gastrointestinal Tract of *Agkistrodon piscivorus*, the Cottonmouth Snake. *PLOS ONE* 10, e0128793.

- Coorevits, L., Traen, A., Bingé, L., Dorpe, J.V., Praet, M., Boelens, J., Padalko, E., 2018. Identifying a consensus sample type to test for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* and human papillomavirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 1328–1332.
- Costa, D.P., Boeuf, B.J.L., Huntley, A.C., Ortiz, C.L., 1986. The energetics of lactation in the Northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *J. Zool.* 209, 21–33.
- Dagleish, M.P., Barrows, M., Maley, M., Killick, R., Finlayson, J., Goodchild, R., Valentine, A., Saunders, R., Willoughby, K., Smith, K.C., Stidworthy, M.F., 2013. The First Report of Otarine Herpesvirus-1-Associated Urogenital Carcinoma in a South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*). *J. Comp. Pathol.* 149, 119–125.
- Dejea, C.M., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., White, J.R., Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Peterson, S.N., Snesrud, E.C., Borisy, G.G., Lazarev, M., Stein, E., Vadivelu, J., Roslani, A.C., Malik, A.A., Wanyiri, J.W., Goh, K.L., Thevambiga, I., Fu, K., Wan, F., Llosa, N., Housseau, F., Romans, K., Wu, X., McAllister, F.M., Wu, S., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Pardoll, D.M., Sears, C.L., 2014. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 18321–18326.
- Del Toro, L., Heckel, G., Camacho-Ibar, V.F., Schramm, Y., 2006. California sea lions (*Zalophus californianus*) have lower chlorinated hydrocarbon contents in northern Baja California, México, than in California, USA. *Environ. Pollut.* 142, 83–92.
- Deming, A.C., Colegrove, K.M., Duignan, P.J., Hall, A.J., Wellehan, J.F.X., Gulland, F.M.D., 2018. Prevalence of Urogenital Carcinoma in Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from 2005–15. *J. Wildl. Dis.* 54, 581–586.
- DOF [WWW Document], 2016. URL http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5464451&fecha=07/12/2016 (accessed 2.25.19).
- Donders, G.G.G., Bellen, G., Grinceviciene, S., Ruban, K., Vieira-Baptista, P., 2017. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Res. Microbiol.* 168, 845–858.
- Dos Santos, R., Martins, A., Torezani, E., Baptistotte, C., Farias, J., Horta, P., Work, T., Balazs, G., 2010. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Dis. Aquat. Organ.* 89, 87–95.
- Dubey, J.P., Lipscomb, T.P., Mense, M., 2004. Toxoplasmosis in an Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Parasitol.* 90, 410–411.
- Duff, R., Rapp, F., 1973. Oncogenic Transformation of Hamster Embryo Cells After Exposure to Inactivated Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 12, 209–217.

- Dutilh, B.E., Backus, L., van Hijum, S.A.F.T., Tjalsma, H., 2013. Screening metatranscriptomes for toxin genes as functional drivers of human colorectal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., The Gut Microbiome* 27, 85–99.
- Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., Doorbar, J., 2015. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 7, 3863–3890.
- Egert, M., Simmering, R., 2016. The Microbiota of the Human Skin. *Microbiota Hum. Body* 902, 61–81.
- Eisenberg, T., Fawzy, A., Nicklas, W., Semmler, T., Ewers, C., 2016a. Phylogenetic and comparative genomics of the family Leptotrichiaceae and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*. *BMC Genomics* 17.
- Eisenberg, T., Kämpfer, P., Ewers, C., Semmler, T., Glaeser, S.P., Collins, E., Rutledge, M., Palmer, R., 2016b. *Oceanivirga salmonicida* gen. nov., sp. nov., a member of the Leptotrichiaceae isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2429–2437.
- Elinav, E., Garrett, W.S., Trinchieri, G., Wargo, J., 2019. The cancer microbiome. *Nat. Rev. Cancer.*
- Elorriaga-Verplancken, F., Ferretto, G., Angell, O.C., 2015. Current status of the California sea lion (*Zalophus californianus*) and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) at the San Benito Archipelago, Mexico. *Cienc. Mar.* 41, 269–281.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* 1, 702–703.
- Ewald, P.W., Swain Ewald, H.A., 2015. Infection and cancer in multicellular organisms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140224.
- Fauquier, D., Gulland, F., Haulena, M., Spraker, T., 2003. Biliary Adenocarcinoma in a Stranded Northern Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Wildl. Dis.* 39, 723–726.
- Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W.M., Raes, J., 2015. Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 56–66.
- Flower, J.E., Gamble, K.C., Stone, M., Lyons, J.A., Maganti, R.J., Tuomi, P.A., Olds, J.E., Sims, M.A., Gauger, P., Tuttle, A.D., 2014. Esophageal squamous cell carcinoma in six harbor seals (*Phoca vitulina*). *J. Zoo Wildl. Med.* 45, 620–631.
- Foster, J.A., Neufeld, K.-A.M., 2013. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305–312.
- Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M.A., Pariente, K., Segondy, M., Burguière, A., Manuguerra, J.-C., Caro, V., Eloit, M., 2012. Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS ONE* .

- Galaxy Project, n.d. Phred - Quality Base Calling [WWW Document]. URL <https://www.phrap.com/phred/> (accessed 1.21.20).
- García-Velasco, J.A., Menabrito, M., Catalán, I.B., 2017. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reprod. Biomed. Online* 35, 103–112.
- Garrett, W.S., 2015. Cancer and the microbiota. *Science* 348, 80–86.
- Goldstein, T., Lowenstine, L.J., Lipscomb, T.P., Mazet, J.A., Novak, J., Stott, J.L., Gulland, F.M., 2006. Infection with a novel gammaherpesvirus in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *J. Wildl. Dis.* 42, 830–835.
- Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Gulland, F.M.D., Rowles, T., Harvey, J.T., Allen, S.G., King, D.P., Aldridge, B.M., Stott, J.L., 2004. The transmission of phocine herpesvirus-1 in rehabilitating and free-ranging Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) in California. *Vet. Microbiol.* 103, 131–141.
- Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M.D., Rowles, T.K., King, D.P., Aldridge, B.M., Stott, J.L., 2005. Tissue Distribution of Phocine Herpesvirus-1 (PhHV-1) in Infected Harbour Seals (*Phoca vitulina*) from the Central Californian Coast and a Comparison of Diagnostic Methods. *J. Comp. Pathol.* 133, 175–183.
- Gonzalez-Martinez, A., Sihvonen, M., Muñoz-Palazon, B., Rodriguez-Sanchez, A., Mikola, A., Vahala, R., 2018. Microbial ecology of full-scale wastewater treatment systems in the Polar Arctic Circle: Archaea, Bacteria and Fungi. *Sci. Rep.*
- Greenblatt, R.J., Work, T.M., Balazs, G.H., Sutton, C.A., Casey, R.N., Casey, J.W., 2004. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Virology* 321, 101–110.
- Groves, I.J., Coleman, N., 2015. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.* 235, 527–538.
- Guijon, F., Paraskevas, M., Rand, F., Heywood, E., Brunham, R., McNicol, P., 1992. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 37, 185–191.
- Gulland, F.M.D., Trupkiewicz, J.G., Spraker, T.R., Lowenstine, L.J., 1996. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *J. Wildl. Dis.* 32, 250–258.
- Gupta, R., Sodhani, P., Mehrotra, R., Gupta, S., 2019. Cervical high-grade squamous intraepithelial lesion on conventional cytology: Cytological patterns, pitfalls, and diagnostic clues. *Diagn. Cytopathol.* 47, 1267–1276.

- Habran, S., Debier, C., Crocker, D.E., Houser, D.S., Lepoint, G., Bouquegneau, J.-M., Das, K., 2010. Assessment of gestation, lactation and fasting on stable isotope ratios in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Mar. Mammal Sci.* 26, 880–895.
- Haines, H., Kleese, W.C., 1977. Effect of water temperature on a herpesvirus infection of sea turtles. *Infect. Immun.* 15, 756–759.
- Hall, A.J., Gulland, F.M.D., Ylitalo, G.M., Greig, D.J., Lowenstine, L., 2008. Changes in Blubber Contaminant Concentrations in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) associated with Weight Loss and Gain during Rehabilitation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4181–4187.
- Harmsen, D., Singer, C., Rothgänger, J., Tønjum, T., Sybren de Hoog, G., Shah, H., Albert, J., Frosch, M., 2001. Diagnostics of Neisseriaceae and Moraxellaceae by Ribosomal DNA Sequencing: Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39, 936–942.
- Hawkins, C.E., Baars, C., Hesterman, H., Hocking, G.J., Jones, M.E., Lazenby, B., Mann, D., Mooney, N., Pemberton, D., Pyecroft, S., Restani, M., Wiersma, J., 2006. Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. *Biol. Conserv.* 131, 307–324.
- Heath, C.B., Perrin, W.F., 2009. C - California, Galapagos, and Japanese Sea Lions: *Zalophus californianus*, *Z. wollebaeki*, and *Z. japonicus*, in: Würsig, B., Perrin, W.F., Thewissen, J.G.M. (Eds.), *Encyclopaedia of Marine Mammals*. Academic Press, London, pp. 170–176.
- Heintz-Buschart, A., Wilmes, P., 2018. Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends Microbiol.* 26, 563–574.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. h
- Hong, Y.-K., Foreman, K., Shin, J.W., Hirakawa, S., Curry, C.L., Sage, D.R., Libermann, T., Dezube, B.J., Fingerhuth, J.D., Detmar, M., 2004. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Genet.* 36, 683–685.
- Howard, E., Brit, J., Simpson, J., 1983. Neoplasm in marine mammals. In *Pathobiology of marine mammal diseases*. Boca Raton FL CRC Press 2, 95–107.
- IARC, n.d. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER [WWW Document]. URL <https://www.iarc.fr/> (accessed 9.18.19).
- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., Zhao, B., 2017. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 58, 1–15.
- Kalantari, N., Ghaffari, S., Bayani, M., 2014. *Trichomonas*, *Candida*, and *Gardnerella* in cervical smears of Iranian women for cancer screening. *North Am. J. Med. Sci.* 6, 25–29.

- Kaye, S., Johnson, S., Rios, C., Fletcher, D.J., 2017. Plasmatic coagulation and fibrinolysis in healthy and *Otostrongylus* -affected Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Vet. Clin. Pathol.* 46, 589–596.
- King, Donald P, Hure, M.C., Goldstein, T., Aldridge, B.M., Gulland, F.M.D., Saliki, J.T., Buckles, E.L., Lowenstine, L.J., Stott, J.L., 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol., Importance of Veterinary Herpesviruses in the Context of Pathogenesis, Immunology and Gene Therapy* 86, 131–137.
- King, Hure, M.C., Goldstein, T., Aldridge, B.M., Gulland, F.M.D., Saliki, J.T., Buckles, E.L., Lowenstine, L.J., Stott, J.L., 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 86, 131–137.
- Kong, H.H., 2011. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends Mol. Med.* 17, 320–328.
- Krause, K.A., Butler, S.L., 2019. Koilocytosis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kuhn, C.E., Crocker, D.E., Tremblay, Y., Costa, D.P., 2009. Time to eat: measurements of feeding behaviour in a large marine predator, the northern elephant seal *Mirounga angustirostris*. *J. Anim. Ecol.* 78, 513–523.
- Kurman, R.J., Solomon, D., 1994. *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes for Terminology and Specimen Adequacy*. Springer-Verlag, New York.
- Labrut, S., Wyers, M., Miclard, J., Colle, M.-A., 2007. Primary meningeal T-cell lymphoma in a harbor seal (*Phoca vitulina*). *J. Zoo Wildl. Med.* 38, 323–328.
- Lair, S., Measures, L.N., Martineau, D., 2016. Pathologic Findings and Trends in Mortality in the Beluga (*Delphinapterus leucas*) Population of the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, From 1983 to 2012. *Vet. Pathol.* 53, 22–36.
- Lambertsen, R.H., Kohn, B.A., Sundberg, J.P., Buergelt, C.D., 1987. Genital papillomatosis in sperm whale bulls. *J. Wildl. Dis.* 23, 361–367.
- Laniewski, P., Barnes, D., Goulder, A., Cui, H., Roe, D.J., Chase, D.M., Herbst-Kralovetz, M.M., 2018. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci. Rep.* 8, 7593.
- Laricchiuta, P., Campolo, M., Martelli, P., Cantore, A., Menga, G., Tortorella, G., Grillo, I.G., Ruvo, G. de, Gelli, D., Lai, O.R., 2013. Diagnosis and treatment considerations in a case of malignant mesenchymoma in a african fur seal (*Arctocephalus pusillus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 44, 466–469.

- Le Boeuf, B.J.L., Laws, R.M., 1994. Elephant Seals: Population Ecology, Behavior, and Physiology. University of California Press.
- Lee, Y.-Y., Choi, C.H., Kim, H.-J., Kim, T.-J., Lee, J.-W., Lee, J.-H., Bae, D.-S., Kim, B.-G., 2012. Pretreatment Neutrophil:Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in Cervical Carcinoma. *Anticancer Res.* 32, 1555–1561.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 219–232.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 776–788.
- Lipscomb, T.P., Scott, D.P., Garber, R.L., Krafft, A.E., Tsai, M.M., Lichy, J.H., Taubenberger, J.K., Schulman, F.Y., D. Gulland, F.M., 2000. Common Metastatic Carcinoma of California Sea Lions (*Zalophus californianus*): Evidence of Genital Origin and Association with Novel Gammaherpesvirus. *Vet. Pathol.* 37, 609–617.
- Lowe, J.S., Anderson, P.G., 2015. Stevens y Lowe. Histología humana. Elsevier España.
- Lowry, M., 2014. Abundance, Distribution, and Population Growth of the Northern Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*) in the United States from 1991 to 2010. *Aquat. Mamm.* 40, 20–31.
- Luo, X.M., Edwards, M.R., Mu, Q., Yu, Y., Vieson, M.D., Reilly, C.M., Ahmed, S.A., Bankole, A.A., 2017. Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus. *Appl. Environ. Microbiol.* 84.
- Lyons, E.T., DeLong, R.L., Nadler, S.A., Laake, J.L., Orr, A.J., DeLong, B.L., Pagan, C., 2011. Investigations of peritoneal and intestinal infections of adult hookworms (*Uncinaria* spp.) in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) pups on San Miguel Island, California (2003). *Parasitol. Res.* 109, 581–589.
- Mackintosh, C.E., Maldonado, J.A., Ikonomou, M.G., Gobas, F.A.P.C., 2006. Sorption of Phthalate Esters and PCBs in a Marine Ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3481–3488.
- Macnab, J.C.M., 1974. Transformation of Rat Embryo Cells by Temperature-sensitive Mutants of Herpes Simplex Virus. *J. Gen. Virol.* 24, 143–153.
- Macpherson, A.J., de Agüero, M.G., Ganai-Vonarburg, S.C., 2017. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 508–517.
- Malberg, S., Gregersen, H.A., Henrich, M., Herden, C., 2017. Epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma in harbor seal (*Phoca vitulina*). *J. Zoo Wildl. Med.* 48, 568–572.
- Marchandin, H., Teyssier, C., Campos, J., Jean-Pierre, H., Roger, F., Gay, B., Carlier, J.-P., Jumas-Bilak, E., 2010. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of *Negativicutes classis* nov., Selenomonadales ord. nov. and Acidaminococcaceae fam. nov. in the bacterial phylum Firmicutes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1271–1279.

- Marigliò, G., Koch, S., Schulz, T.F., 2017. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372.
- Martin, D.H., 2012. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. *Am. J. Med. Sci.* 343, 2–9.
- Martineau, D., Lemberger, K., Dallaire, A., Labelle, P., Lipscomb, T.P., Michel, P., Mikaelian, I., 2002. Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. *Environ. Health Perspect.* 110, 285–292.
- Mawdesley-Thomas, L.E., 1971. An Ovarian Tumour in a Southern Elephant Seal (*Mirounga leonina*). *Vet. Pathol.* 8, 9–15.
- McAloose, D., Newton, A.L., 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nat. Rev. Cancer* 9, nrc2665.
- McBride, A.A., Warburton, A., 2017. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathog.* 13, e1006211.
- McCann, J.C., Elolimy, A.A., Loor, J.J., 2017. Rumen Microbiome, Probiotics, and Fermentation Additives. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 33, 539–553.
- McGlynn, K.A., Abnet, C.C., Zhang, M., Sun, X.-D., Fan, J.-H., O'Brien, T.R., Wei, W.-Q., Ortiz-Conde, B.A., Dawsey, S.M., Weber, J.-P., Taylor, P.R., Katki, H., Mark, S.D., Qiao, Y.-L., 2006. Serum Concentrations of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl) ethane (DDT) and 1,1-Dichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl)ethylene (DDE) and Risk of Primary Liver Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1005–1010.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217.
- Mending, W., 2016. Vaginal Microbiota, in: Schwartz, A. (Ed.), *Microbiota of the Human Body*. Springer International Publishing, Cham, pp. 83–93.
- Mert, I., Walther-Antonio, M., Mariani, A., 2018. Case for a role of the microbiome in gynecologic cancers: Clinician's perspective: Role of the microbiome in gynecologic cancers. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 44, 1693–1704.
- Metcalfe, C., Metcalfe, T., Ray, S., Paterson, G., Koenig, B., 1999. Polychlorinated biphenyls and organochlorine compounds in brain, liver and muscle of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Arctic and St. Lawrence estuary. *Mar. Environ. Res.* 47, 1–15.
- Meyers, C., Andreansky, S.S., Courtney, R.J., 2003. Replication and interaction of herpes simplex virus and human papillomavirus in differentiating host epithelial tissue. *Virology* 315, 43–55.
- Mikaelian, I., Leclair, D., Inukpuk, J., 2001. Adenocarcinoma of the Small Intestine in a Ringed Seal from Hudson Bay. *J. Wildl. Dis.* 37, 379–382.
- Mitra, A., MacIntyre, D.A., Lee, Y.S., Smith, A., Marchesi, J.R., Lehne, B., Bhatia, R., Lyons, D., Paraskevaïdis, E., Li, J.V., Holmes, E., Nicholson, J.K., Bennett, P.R., Kyrgiou, M., 2015.

- Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci. Rep.* 5, 16865.
- Mitra, A., MacIntyre, D.A., Marchesi, J.R., Lee, Y.S., Bennett, P.R., Kyrgiou, M., 2016. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome* 4, 58.
- Morick, D., Jauernig, S., Whitbread, T.J., Osinga, N., Tjalsma, E.J., 2010. A Dermal Melanoma in a Young Common Seal (*Phoca vitulina*). *J. Wildl. Dis.* 46, 556–559.
- Motevaseli, E., Shirzad, M., Akrami, S.M., Mousavi, A.-S., Mirsalehian, A., Modarressi, M.H., 2013. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *J. Med. Microbiol.* 62, 1065–1072.
- Mumford, S.L., Patterson, C., Kelly-Ringel, B., Nelle, R.D., 2005. Summary of Pathological Findings from Subsistence Hunting of the Pacific Walrus (*Odobenus rosmarus divergens*) in Alaska from 1995-2004. *Int. Assoc. Aquat. Anim. Med.*
- Nadler, S.A., Lyons, E.T., Pagan, C., Hyman, D., Lewis, E.E., Beckmen, K., Bell, C.M., Castinel, A., DeLong, R.L., Duignan, P.J., Farinpour, C., Huntington, K.B., Kuiken, T., Morgades, D., Naem, S., Norman, R., Parker, C., Ramos, P., Spraker, T.R., Berón-Vera, B., 2013. Molecular systematics of pinniped hookworms (Nematoda: *Uncinaria*): species delimitation, host associations and host-induced morphometric variation. *Int. J. Parasitol.* 43, 1119–1132.
- Nagy, J.D., Victor, E.M., Cropper, J.H., 2007. Why don't all whales have cancer? A novel hypothesis resolving Peto's paradox. *Integr. Comp. Biol.* 47, 317–328.
- Nakagun, S., Watanabe, H., Ochiai, K., Kohyama, K., Goshima, W., Goto, Y., Kobayashi, Yumi, Watanabe, K., Horiuchi, N., Sasaki, J., Goryo, M., Kobayashi, Yoshiyasu, 2017. Extralobar pulmonary sequestration in two pinniped species. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1791–1794.
- Navarro Santana, B., Sanz Baro, R., Orozco, R., Plaza Arranz, J., 2018. Cervical vaporization in LSIL and persistent HPV infection. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 57, 475–478.
- Nayar, R., Wilbur, D.C., 2015. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*. Springer.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Brown, M.V., 2013. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. *PLoS ONE* 8, e83655.
- Newman, S.J., Smith, S.A., 2006. Marine Mammal Neoplasia: A Review. *Vet. Pathol.* 43, 865–880.
- Niño-Torres, C.A., Gardner, S.C., Zenteno-Savín, T., Ylitalo, G.M., 2009. Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from the Gulf of California, México. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 350–359.
- Noyes, N., Cho, K.-C., Ravel, J., Forney, L.J., Abdo, Z., 2018. Associations between sexual habits, menstrual hygiene practices, demographics and the vaginal microbiome as revealed by Bayesian network analysis. *PLOS ONE* 13, e0191625.

- Oliveira, G.G. de, Oliveira, J.M. da S.C. de, Eleutério, R.M.N., Barbosa, R. de C.C., Almeida, P.R.C. de, Eleutério Jr., J., 2018. Atypical Squamous Cells: Cytopathological Findings and Correlation with HPV Genotype and Histopathology. *Acta Cytol.* 62, 386–392.
- Onywera, H., Williamson, A.-L., Mbulawa, Z.Z.A., Coetzee, D., Meiring, T.L., 2019. Factors associated with the composition and diversity of the cervical microbiota of reproductive-age Black South African women: a retrospective cross-sectional study. *PeerJ* 7.
- Osterhaus, A.D., Yang, H., Spijkers, H.E., Groen, J., Teppema, J.S., van Steenis, G., 1985. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the harbor seal (*Phoca vitulina*). *Arch. Virol.* 86, 239–251.
- Pearse, A.-M., Swift, K., 2006. Transmission of devil facial-tumour disease. *Nature* 439, 549.
- Peñín, I., Figueroa-Cabañas, M.E., Guerrero-de la Rosa, F., Soto-García, L.A., Álvarez-Martínez, R., Flores-Morán, A., Acevedo-Whitehouse, K., 2019. Transcriptional Profiles of California Sea Lion Peripheral NK and CD+8 T Cells Reflect Ecological Regionalization and Infection by Oncogenic Viruses. *Front. Immunol.*
- Peñín, I., Levin, M., Acevedo-Whitehouse, K., Jasperse, L., Gebhard, E., Gulland, F.M.D., De Guise, S., 2018. Effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on California sea lion (*Zalophus californianus*) lymphocyte functions upon in vitro exposure. *Environ. Res.* 167, 708–717.
- Pervin, M., Izawa, T., Ito, S., Kuwamura, M., Yamate, J., 2016. Metastatic Liposarcoma in a South African Fur Seal (*Arctocephalus pusillus*). *J. Comp. Pathol.* 155, 72–75.
- Peterson, R.S., Bartholomew, G.A., 1969. Airborne vocal communication in the California sea lion, *Zalophus californianus*. *Anim. Behav.* 17, 17–24.
- Poole, L.J., Zong, J.-C., Ciuffo, D.M., Alcendor, D.J., Cannon, J.S., Ambinder, R., Orenstein, J.M., Reitz, M.S., Hayward, G.S., 1999. Comparison of Genetic Variability at Multiple Loci across the Genomes of the Major Subtypes of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Reveals Evidence for Recombination and for Two Distinct Types of Open Reading Frame K15 Alleles at the Right-Hand End. *J. Virol.* 73, 6646–6660.
- Probst, A.J., Auerbach, A.K., Moissl-Eichinger, C., 2013. Archaea on Human Skin. *PLOS ONE*
- Pye, R.J., Pemberton, D., Tovar, C., Tubio, J.M.C., Dun, K.A., Fox, S., Darby, J., Hayes, D., Knowles, G.W., Kreiss, A., Siddle, H.V.T., Swift, K., Lyons, A.B., Murchison, E.P., Woods, G.M., 2016. A second transmissible cancer in Tasmanian devils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 374–379.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.
- Quillin, S.J., Seifert, H.S., 2018. *Neisseria gonorrhoeae* host-adaptation and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 226–240.

- Rajagopala, S.V., Vashee, S., Oldfield, L.M., Suzuki, Y., Venter, J.C., Telenti, A., Nelson, K.E., 2017. The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 10, 226–234.
- Rawls, W.E., Tompkins, W.A., Figueroa, M.E., Melnick, J.L., 1968. Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* 161, 1255–1256.
- Rebell, G., Rywlin, A., Haines, H., 1975. A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture. *Am. J. Vet. Res.*, 0002-9645 36.
- Rector, A., Stevens, H., Lacave, G., Lemey, P., Mostmans, S., Salbany, A., Vos, M., Van Doorslaer, K., Ghim, S.-J., Rehtanz, M., Bossart, G.D., Jenson, A.B., Van Ranst, M., 2008. Genomic characterization of novel dolphin papillomaviruses provides indications for recombination within the Papillomaviridae. *Virology* 378, 151–161.
- Riedman, M., 1990. *The Pinnipeds: Seals, Sea Lions, and Walruses*. University of California Press.
- Rincón, O.L., Pareja, L.R., Jaramillo, S., Aristizábal, B.H., 2016. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 58, 202–212.
- Rincón, O.L., Pareja, L.R., Jaramillo, S., Aristizábal, B.H., 2007. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 58, 202–212.
- Rivera, R., Robles-Sikisaka, R., Hoffman, E.M., Stacy, B.A., Jensen, E.D., Nollens, H.H., Wellehan, J.F.X., 2012. Characterization of a novel papillomavirus species (ZcPV1) from two California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 155, 257–266.
- Rooks, M.G., Garrett, W.S., 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 341–352.
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2015. *Ross Histologia Texto y Atlas, Séptima. ed.* Wolters Kluwer.
- Roth, S.J., Tischer, B.K., Kovacs, K.M., Lydersen, C., Osterrieder, N., Tryland, M., 2013. Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1) in harbor seals from Svalbard, Norway. *Vet. Microbiol.* 164, 286–292.
- Rotstein, D.S., Stimmelmayer, R., Adams, B., Pederson, M., 2019. Metastatic testicular Sertoli cell tumor in a free-ranging cryptorchid adult spotted seal *Phoca largha* in North Slope, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Organ.* 133, 1–5.
- Rus Hoelzel, A., Le Boeuf, B.J., Reiter, J., Campagna, C., 1999. Alpha-male paternity in elephant seals. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46, 298–306.
- Safi Oz, Z., Dogan Gun, B., Ozdamar, S.O., 2015. Evaluation of Micronuclei, Nuclear Anomalies and the Nuclear/Cytoplasmic Ratio of Exfoliated Cervical Epithelial Cells in Genital Candidiasis. *Acta Cytol.* 59, 180–186.
- Saha, A., Robertson, E.S., 2019. Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 93.

- Sand, L., Jalouli, J., 2014. Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect.* 16, 371–378.
- Santag, S., Jäger, W., Karsten, C.B., Kati, S., Pietrek, M., Steinemann, D., Sarek, G., Ojala, P.M., Schulz, T.F., 2013. Recruitment of the tumour suppressor protein p73 by Kaposi's Sarcoma Herpesvirus latent nuclear antigen contributes to the survival of primary effusion lymphoma cells. *Oncogene* 32, 3676–3685.
- Sarita, C., Sarita, S., 2017. Incidencia de Cambios coilocíticos por el Virus del Papiloma Humano (VPH) :Hallazgos Citológicos confirmados con Biopsias.
- Sato, S., Kitamura, H., Mori, M., Fukazawa, M., Takeda, M., Kadota, K., 1998. Adenocarcinoma of the Lung in a Stellar Sea Lion (*Eumetopias jubatus*). *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1349–1351.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., Sanjosé, S. de, Fakhry, C., Monk, B.J., Stanley, M.A., Franceschi, S., 2016. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 1–20.
- Seguel, M., Stimmelmayer, R., Howerth, E., Gottdenker, N., 2016. Pulmonary Mast Cell Tumor and Possible Paraganglioma in a Free-ranging Pacific Walrus (*Odobenus rosmarus divergens*), Barrow, Alaska, USA. *J. Wildl. Dis.* 52, 407–410.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90, 46.
- Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J., Rodríguez-Iglesias, M., 2019. Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 37, 324–334.
- Sheldon, J.D., Hernandez, J.A., Johnson, S.P., Field, C., Kaye, S., Stacy, N.I., 2019. Diagnostic Performance of Clinicopathological Analytes in *Otostongylus circumlitis*-Infected Rehabilitating Juvenile Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*). *Front. Vet. Sci.*
- Sherwani, M.A., Tufail, S., Muzaffar, A.F., Yusuf, N., 2018. The skin microbiome and immune system: Potential target for chemoprevention? *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 34, 25–34.
- Smetana, K., Dvořánková, B., Lacina, L., 2013. Phylogeny, Regeneration, Ageing and Cancer: Role of Microenvironment and Possibility of Its Therapeutic Manipulation 59, 10.
- Smith, G.M., Coates, C.W., 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zool. Sci. Contrib. N. Y. Zool. Soc.*, 4 23, 93–98.
- Smith, J.S., Herrero, R., Bosetti, C., Muñoz, N., Bosch, F.X., Eluf-Neto, J., Castellsagué, X., Meijer, C.J.L.M., Van den Brule, A.J.C., Franceschi, S., Ashley, R., International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group, 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1604–1613.
- Song, J., Choo, Y.-J., Cho, J.-C., 2008. *Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family Moraxellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 97–102.

- Southam, C.M., Tanaka, S., Arata, T., Simkovic, D., Miura, M., Petropulos, S.F., 1969. Enhancement of responses to chemical carcinogens by nononcogenic viruses and antimetabolites. *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 194–212.
- Soverini, M., Turrone, S., Biagi, E., Brigidi, P., Candela, M., Rampelli, S., 2019. HumanMycobiomeScan: a new bioinformatics tool for the characterization of the fungal fraction in metagenomic samples. *BMC Genomics* 20, 496.
- Spraker, T.R., Lander, M.E., 2010. Causes of mortality in Northern fur seals (*Callorhinus ursinus*), St. Paul Island, Pribilof Islands, Alaska, 1986–2006. *J. Wildl. Dis.* 46, 450–473.
- Spraker, T.R., Lyons, E.T., Kuzmina, T.A., Tift, M.S., Raverty, S., Jaggi, N., Crocker, D.E., 2014. Causes of death in preweaned northern elephant seal pups (*Mirounga angustirostris*, Gill, 1866), Año Nuevo State Reserve, California, 2012. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 320–326.
- Stedham, M.A., Casey, H.W., 1977. Lymphosarcoma in an infant Northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *J. Wildl. Dis.* 13, 176–179.
- Steinbrück, L., Gustems, M., Medele, S., Schulz, T.F., Lutter, D., Hammerschmidt, W., 2015. K1 and K15 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Are Partial Functional Homologues of Latent Membrane Protein 2A of Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 89, 7248–7261.
- Stewart, B.S., DeLong, R.L., 1995. Double Migrations of the Northern Elephant Seal, *Mirounga angustirostris*. *J. Mammal.* 76, 196–205.
- Stroud, R.K., Stevens, D.R., 1980. Lymphosarcoma in a harbor seal (*Phoca vitulina richardii*). *J. Wildl. Dis.* 16, 267–270.
- Summers, J., Smolec, J.M., Snyder, R., 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4533–4537.
- Sweet, M., Kirkham, N., Bendall, M., Currey, L., Bythell, J., Heupel, M., 2012. Evidence of Melanoma in Wild Marine Fish Populations. *PLoS ONE* 7, e41989.
- Tamim, H., Finan, R.R., Sharida, H.E., Rashid, M., Almawi, W.Y., 2002. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 277–281.
- Tatti, S., 2011. Colposcopia y patologías del tracto genital inferior / Colposcopy and lower genital tract pathologies: En la era de la vacunación / In the Era of Vaccination. Ed. Médica Panamericana.
- Temte, J.L., Temte, J., 1993. Photoperiod Defines the Phenology of Birth in Captive California Sea Lions. *Mar. Mammal Sci.* 9, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00457.x>
- Thellman, N.M., Triezenberg, S.J., 2017. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. *Pathogens* 6.
- Tobar, P., Vega, M., Ordoñez, C., Rivera, L., Landivar, J., Zambrano, H., 2018. Detection of Zika Virus and Human Papilloma Virus in Cervical Cytology Samples using Two Real Time PCR

- Based Techniques in Ecuadorian Women diagnosed with ASCUS. P. R. Health Sci. J. 37, S96–S98.
- Tomlinson, C.C., Damania, B., 2004. The K1 Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Activates the Akt Signaling Pathway. J. Virol. 78, 1918–1927.
- Torcia, M.G., 2019. Interplay among Vaginal Microbiome, Immune Response and Sexually Transmitted Viral Infections. Int. J. Mol. Sci. 20.
- Tsevat, D.G., Wiesenfeld, H.C., Parks, C., Peipert, J.F., 2017. Sexually Transmitted Diseases and Infertility. Am. J. Obstet. Gynecol. 216, 1–9.
- Vallejo-Ruiz, V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., 2015. La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 6.
- Van Bresse, M.-F., Kastelein, R., Flamant, P., Orth, G., 1999. Cutaneous papillomavirus infection in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the North Sea. Vet. Rec. 144, 592–3.
- Van Houtan, K.S., Hargrove, S.K., Balazs, G.H., 2010. Land Use, Macroalgae, and a Tumor-Forming Disease in Marine Turtles. PLoS ONE 5, e12900.
- Velez, M.M., 2012. Identification of Accurate Sampling Techniques to Detect OtHV-1 in California sea Lions. San Francisco State University, San Francisco.
- Virtanen, S., Kalliala, I., Nieminen, P., Salonen, A., 2017. Comparative analysis of vaginal microbiota sampling using 16S rRNA gene analysis. PLoS ONE
- Wang, S., Yu, M., Wei, J., Huang, M., Shi, X., Chen, H., 2018. Microbial community composition and diversity in the Indian Ocean deep sea REY-rich muds. PLoS ONE
- Washiya, K., Motoi, M., Kobayashi, T., Yoshioka, H., Watanabe, J., 2013. Significance of Binucleated Cells with Compression in Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. Acta Cytol. 57, 599–603.
- Wassenaar, T.M., 2018. *E. coli* and colorectal cancer: a complex relationship that deserves a critical mindset. Crit. Rev. Microbiol. 44, 619–632.
- Williams, E.H., Bunkley-Williams, L., Peters, E.C., Pinto-Rodriguez, B., Matos-Morales, R., Mignucci-Giannoni, A.A., Hall, K.V., Rueda-Almonacid, J.V., Sybesma, J., de Calventi, I.B., Boulon, R.H., 1994. An Epizootic of Cutaneous Fibropapillomas in Green Turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of a Panzootic? J. Aquat. Anim. Health 6, 70–78.
- Yamaguchi, M.S., Ganz, H.H., Cho, A.W., Zaw, T.H., Jospin, G., McCartney, M.M., Davis, C.E., Eisen, J.A., Coil, D.A., 2019. Bacteria isolated from Bengal cat (*Felis catus* × *Prionailurus bengalensis*) anal sac secretions produce volatile compounds potentially associated with animal signaling. PLOS ONE 14, e0216846.
- Yamazaki, M., Koutaka, M., Une, Y., 2016. Gastric carcinoma in a South American sea lion (*Otaria flavescens*). J. Vet. Med. Sci. 78, 1201–1204.

- Ylitalo, G.M., Stein, J.E., Hom, T., Johnson, L.L., Tilbury, K.L., Hall, A.J., Rowles, T., Greig, D., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M.D., 2005a. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 30–39.
- Ylitalo, G.M., Stein, J.E., Hom, T., Johnson, L.L., Tilbury, K.L., Hall, A.J., Rowles, T., Greig, D., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M.D., 2005b. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 30–39.
- Yulin, X., Lizhen, L., Lifei, Z., Shan, F., 2012. Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells 58, 10.
- Zabka, T.S., Buckles, E.L., Gulland, F.M.D., Haulena, M., Naydan, D.K., Lowenstine, L.J., 2004. Pleomorphic Rhabdomyosarcoma with Pulmonary Metastasis in a Stranded Steller (Northern) Sea Lion (*Eumetopias jubatus*). *J. Comp. Pathol.* 130, 195–198.
- Zhang, Z., Chen, W., Sanders, M.K., Brulois, K.F., Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. The K1 Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Augments Viral Lytic Replication. *J. Virol.* 90, 7657–7666.
- Zheng, R., Huang, M., Jin, C., Wang, H., Yu, J., Zeng, L., Zheng, F., Lin, F., 2016. Cervical cancer systemic inflammation score: a novel predictor of prognosis. *Oncotarget* 7, 15230–15242.
- Zhu, H., Shen, Z., Luo, H., Zhang, W., Zhu, X., 2016. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 95, e3077.
- Zhu, M., Feng, M., He, F., Han, B., Ma, K., Zeng, X., Liu, Z., Liu, X., Li, J., Cao, H., Liang, Y., Jia, C., Zhang, L., 2018. Pretreatment neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratio predict clinical outcome and prognosis for cervical Cancer. *Clin. Chim. Acta* 483, 296–302.
- zur Hausen, H., 1977. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78, 1–30.