

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

ANÁLISIS MOLECULAR DEL FUNGOMA DE ESPECIES
MARINAS, CENTINELAS COSTEROS

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Mario Augusto Onofre Díaz

Dirigido por:

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Co-dirigido por:

Dra. Diane Gendron Laniel

Querétaro, Qro
Octubre, 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



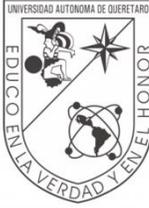
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS MOLECULAR DEL FUNGOMA DE ESPECIES MARINAS, CENTINELAS COSTEROS

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Mario Augusto Onofre Díaz

Dirigido por:

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Co-dirigido por:

Dra. Diane Gendron Laniel

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Presidente

Dra. Diane Gendron Laniel

Secretario

Dra. Fabiola Guerrero de la Rosa

Vocal

Dr. Roberto Álvarez Martínez

Suplente

Dr. Carlos Domínguez-Sánchez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Octubre, 2024

DEDICATORIAS

A mis papás, Rodolfo y Florina.

AGRADECIMIENTOS

A quienes me acompañaron durante el proceso de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la Facultad de Ciencias Naturales y la Maestría en Ciencias Biológicas por brindarme las instalaciones y herramientas para completar mi programa de estudios.

A CONAHCYT por el financiamiento para estudiar la maestría como estudiante de tiempo completo.

A Karina por confiar en mí, invitarme a desafiar mis capacidades, por su paciencia para acompañarme y explicarme, y por permitirme vivir experiencias increíbles en este camino.

A Diane por sus consejos, su paciencia y por estar siempre al pendiente de mí a pesar de la distancia.

A mis sinodales Fabiola, Roberto y Carlos, porque estar conmigo compartiéndome su experiencia y por su apoyo.

A la Cooperativa Pescadores Nacionales de Abulón por apoyarnos en las salidas a campo.

A Aldo, Ceci y Norma por enseñarme a hacer biología molecular y aguantarme en el laboratorio durante un buen tiempo.

A Carly, Pau, Ana, Fer, Yara, Ari, Andy y todos mis compañeros del laboratorio y miembros del LGMEE, que los hice partícipes de alguna forma de este proyecto, y quienes siempre me ayudaron o enseñaron cuando fue necesario.

Al doc Christian, Razi, Camila, Myriam, Gustavo, Rodrigo, Jasivi, Vladimir por siempre brindarme su apoyo, consejos, compartirme datos y acompañarme en este viaje.

A todos mis compañeros de maestría, porque hicimos buen equipo desde el primer día.

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y ÉTICA PROFESIONAL

Declaro que el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado por mí, a excepción de aquellas secciones que formaron parte de colaboraciones, mismas que se indican explícitamente en el texto.

Confirmando que las ideas originales aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dado crédito al trabajo de otros mediante el uso adecuado de las referencias.

Esta copia se ha sometido a la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el entendido de que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y ÉTICA PROFESIONAL	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE FIGURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Microbioma	6
2.1.1 Microbioma central	7
2.1.2 El fungoma	9
2.1.3 Características físicas de los hongos	10
2.1.4 El papel del fungoma en la salud del hospedero	11
2.2 Métodos para el estudio del fungoma	12
2.2.1 Métodos dependientes de cultivo	12
2.2.2 Métodos no dependientes de cultivo	13
2.3 Índices utilizados para el análisis del microbioma	17
2.4 Redes de co-ocurrencia	19
2.5 Respuestas inmunes en los epitelios	21
2.5.1 Respuestas inmunes mucosales contra hongos	21
2.5.2 Epitelio vaginal	22
2.5.3 Epitelio respiratorio	23
2.6 Hongos con potencial patogénico para los mamíferos marinos	24
2.7 La salud de los organismos modelo: procesos patológicos o fisiológicos conocidos	26
2.7.1 Carcinoma urogenital del lobo marino de California	26
2.7.2 Condición corporal de las ballenas azules	27

3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
5. METODOLOGÍA.....	32
5.1 Área de estudio.....	32
5.2 Selección de organismos modelo	33
5.2.1 Lobo marino de California (LMC)	34
5.2.2 Ballena azul (BA).....	36
5.3 Colecta de muestras	38
5.3.1 Colecta de muestras de lobo marino de California.....	38
5.3.2 Colecta de muestras de ballena azul	39
5.4 Evaluación del estado epitelial de muestras de lobo marino de California.....	40
5.5 Evaluación de la condición corporal de ballena azul	41
5.6 Extracción de ADN	41
5.7 Elección de marcador molecular y cebadores para ITS.....	42
5.8 Protocolo de PCR	42
5.8.1 Estandarización de protocolo utilizando ADN de un hongo: Sclerotinia sp. 42	
5.8.2 Estandarización de protocolo utilizando ADN de cultivos de hisopados genitales de lobo marino de California	43
5.8.3 Programa de PCR	45
5.8.4 Visualización de amplicones	46
5.9 Secuenciación	46
5.10 Análisis bioinformático del fungoma	47
5.10.1 Análisis de calidad, filtrado de las lecturas y asignación taxonómica.....	47
5.10.2 Análisis de fungoma central: ocurrencia y abundancia de hongos.....	48
5.10.3 Análisis de fungoma con el uso de redes de co-ocurrencia	48
5.10.4 Descripción del fungoma: alfa y beta diversidad	49
5.10.5 Análisis de fungoma-bacterioma	52
5.11 Análisis estadístico	52
6. RESULTADOS	55
6.1 Estandarización de protocolo de PCR	55
6.1.1 Estandarización de protocolo de PCR con ADN de Sclerotinia sp.: concentración mínima detectable.....	55

6.1.2	Estandarización de protocolo de PCR con ADN de cultivos de hisopados genitales de lobo marino de California	55
6.1.3	Potenciadores de PCR.....	61
6.2	Muestras de mamíferos marinos positivas a ITS1 o ITS2.....	62
6.2.1	Muestras positivas para ITS1 o ITS2 de lobo marino de California....	64
6.2.2	Muestras positivas para ITS1 o ITS2 de ballena azul	66
6.3	Secuenciación masiva de ITS.....	69
6.3.1	Muestras de hisopados genitales de LMC crecidas en medio PDA ...	69
6.3.2	Muestras de ADN de mamíferos marinos	70
6.4	Análisis de fungoma	71
6.4.1	Abundancia y prevalencia de ASVs en el fungoma en mamíferos marinos	71
6.4.2	Fungoma genital central del lobo marino de California con el filtro de abundancia y prevalencia.....	74
6.4.3	Fungoma central de la ballena azul con el filtro de abundancia y prevalencia	76
6.5	Análisis de redes de co-ocurrencia del fungoma	78
6.5.1	Red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California	78
6.5.2	Red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.....	81
6.6	Análisis de alfa diversidad	83
6.6.1	Alfa diversidad del fungoma genital de lobo marino de California	87
6.6.2	Alfa diversidad del fungoma respiratorio de la ballena azul	90
6.7	Análisis de beta diversidad	91
6.7.1	Análisis de beta diversidad en lobo marino de California	96
6.7.2	Análisis de beta diversidad en ballena azul.....	98
6.8	Abundancia diferencial de hongos en lobo marino de California	102
6.9	Abundancia diferencial de hongos en ballena azul.....	105
6.10	Análisis de co-ocurrencia de fungoma y bacterioma	105
6.10.1	Fungoma y bacterioma en el tracto genital del lobo marino de California	105
6.10.2	Fungoma y bacterioma en exhalado respiratorio de la ballena azul	111
7.	DISCUSIÓN	116
7.1	Estandarización de protocolo de PCR	116

7.1.1	Concentración mínima detectable	116
7.1.2	Medios selectivos para hongos: agar papa dextrosa (PDA).....	117
7.2	Subregión de ITS1 es más informativa para mamíferos marinos	121
7.3	Fungoma de los mamíferos marinos	122
7.3.1	Fungoma central del epitelio genital del lobo marino de California ..	123
7.3.2	Fungoma central respiratorio de la ballena azul.....	124
7.3.3	Fungoma central con análisis de redes.....	124
7.4	Alfa y beta diversidad del fungoma de mamíferos marinos	126
7.4.1	Alfa y beta diversidad del fungoma genital del lobo marino de California y sus variables eco-fisiológicas	131
7.4.2	Alfa y beta diversidad del fungoma respiratorio de la ballena azul y sus variables fisiológicas	136
7.5	La relación entre el fungoma y el bacterioma	139
8.	CONCLUSIONES.....	142
9.	REFERENCIAS.....	145
10.	ANEXOS	183

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de mamíferos marinos y tipo de muestras analizadas para ITS1 e ITS2.	35
Cuadro 2. Región genética y cebadores usados para identificar ADN de hongos.	42
Cuadro 3. Concentraciones de reactivos usados para las reacciones de PCR. ...	43
Cuadro 4. Programa de PCR utilizado para amplificar fragmentos del gen ITS. ...	46
Cuadro 5. Hisopados genitales de individuos de lobo marino de California aislados en medios de cultivos. Agar Papa-Dextrosa (PDA) y agar chocolate (ACH).	56
Cuadro 6. Concentración y calidad de ADN de las colonias crecidas en medio PDA y ACH.	59
Cuadro 7. Muestras de mamíferos marinos a las que se le analizó ADN en busca de ITS1 e ITS2.	63
Cuadro 8. Individuos de LMC positivos a ITS1 y sus variables de estudio.	65
Cuadro 9. Individuos de ballena azul positivos a ITS1 o ITS2 y sus variables de estudio.	67
Cuadro 10. Resultados de secuenciación de muestras de hongo aisladas en PDA.	70
Cuadro 11. Resultados de secuenciación de ITS1 de muestras de mamíferos marinos.	71
Cuadro 12. Fungoma genital central del lobo marino de California con criterios de 75% de prevalencia y >2% de abundancia.	75
Cuadro 13. Fungoma respiratorio central de la ballena azul con criterios de 75% de prevalencia y >2% de abundancia.	77
Cuadro 14. Características topográficas de la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.	79
Cuadro 15. Los cinco hongos con mayor grado (degree) en la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.	79
Cuadro 16. Los tres hongos con mayor interconectividad (betweenness) en la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.	79
Cuadro 17. Características topográficas de la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.	81
Cuadro 18. Los cinco hongos con mayor grado (degree) en la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.	82
Cuadro 19. Los tres hongos con mayor interconectividad (betweenness) en la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.	82
Cuadro 20. Los cinco hongos más abundantes en el fungoma de mamíferos marinos.	84
Cuadro 21. Promedio de los índices de diversidad alfa en los mamíferos marinos analizados.	86

Cuadro 22. Valor p de test PERMANOVA entre los índices de diversidad beta y las variables de estudio del lobo marino de California.....	97
Cuadro 23. Valor p de test PERMANOVA entre los índices de diversidad beta y la condición corporal y sexo de la ballena azul.....	99
Cuadro 24. Muestras de hisopado genital de lobo marino de California para las que se contó con información del bacterioma y fungoma.	106
Cuadro 25. Familias de hongos con mayor co-ocurrencia con familias de bacterias en el epitelio genital del lobo marino de California.....	107
Cuadro 26. Características topográficas de la red de co-ocurrencia de hongos y bacterias del epitelio genital del lobo marino de California.	110
Cuadro 27. Muestras de exhalado respiratorio de ballena azul para las que se contó con información del bacterioma y fungoma.	111
Cuadro 28. Familias de hongos con mayor co-ocurrencia con familias de bacterias en las muestras de exhalado respiratorio de ballena azul.	112
Cuadro 29. Características topográficas de la red de co-ocurrencia de hongos y bacterias del exhalado respiratorio de ballena azul.	114

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Espaciador Transcrito Interno (ITS)	15
Figura 2. Área de muestreo de los organismos modelo principales.....	40
Figura 3. Concentración mínima necesaria para detectar ADN micótico	55
Figura 4. Morfología macroscópica de colonia de los hisopados vaginales en PDA de lobo marino de California del Archipiélago de San Benito, BC.	56
Figura 5. Morfología macroscópica y microscópica de los hongos cultivados a partir de las muestras de hisopado genital de lobo marino de California del Archipiélago de San Benito	58
Figura 6. Calidad del ADN extraído de colonias aislada en medios de cultivo PDA y ACH	60
Figura 7. Pruebas de correlación de biomasa de hongo y ADN extraído para las muestras de hisopado genital de LMC en medio PDA.....	60
Figura 8. PCR para los genes ITS1, ITS2 y 16S de los cultivos de hisopado genital de LMC en PDA y ACH.....	61
Figura 9. Uso de potenciadores de PCR mejora la claridad de las bandas	62
Figura 10. Localización de los animales positivos con muestras positivas a ITS1	63
Figura 11. Geles de electroforesis de algunas muestras de mamíferos marinos. La etiqueta de la muestra positiva está resaltada en amarillo	64
Figura 12. Muestras e individuos de LMC positivos a ITS1	65
Figura 13. ITS1 y transformación epitelial en LMC	66
Figura 14. Muestras e individuos de BA cuyo exhalado amplificó ITS1 o ITS2. ...	67
Figura 15. ITS y su relación con el sexo y la condición corporal de la ballena azul.	69
Figura 16. Distribución de abundancias a nivel de género en muestras de hisopado genital de lobo marino de California aislados en medio PDA	70
Figura 17. Gráfico de Krona (www.usegalaxy.org) de la abundancia relativa por filogenia en todas las muestras de ADN epitelial de mamíferos marinos	72
Figura 18. Gráficos de barras de la abundancia relativa por clase de hongo en cada muestra de mamífero marino evaluado.	73
Figura 19. Gráfico de dispersión de ocurrencia y abundancia de ASVs por clase en epitelio vaginal del lobo marino de California.....	74
Figura 20. Gráfico de dispersión de ocurrencia y abundancia de ASVs por clase en exhalado respiratorio de la ballena azul.....	76
Figura 21. Red de co-ocurrencia de ASVs en tracto genital del lobo marino de California.....	78
Figura 22. Red de co-ocurrencia y sub-comunidades del fungoma genital del lobo marino de California.....	80
Figura 23. Red de co-ocurrencia de ASVs en exhalado respiratorio de ballena azul	81

Figura 24. Red de co-ocurrencia y sub-comunidades del fungoma respiratorio de la ballena azul.....	83
Figura 25. Curvas de Whittaker de mamíferos marinos	85
Figura 26. Curva de rarefacción de ballena azul (azul) y lobo marino de California (rojo).	86
Figura 27. Índices de diversidad alfa de la ballena azul (<i>B. musculus</i>), ballena gris (<i>E. robustus</i>), hisopado anal y piel de elefante marino del Norte (<i>M. angustirostris</i>), cachalote (<i>P. macrocephalus</i>) y lobo marino de California (<i>Z. californianus</i>).	87
Figura 28. Riqueza de hongos por muestra de hisopado genital de lobo marino de California.....	88
Figura 29. Índices de diversidad alfa del fungoma en las muestras genitales de lobo marino de California por región ecológica.....	88
Figura 30. Índices de diversidad alfa de hongos en el epitelio genital del lobo marino de California y sus variables eco-fisiológicas.....	89
Figura 31. Riqueza de hongos por muestra de exhalado respiratorio de ballena azul.	90
Figura 32. Índices de diversidad alfa del fungoma por muestra de exhalado respiratorio de ballena azul por condición corporal.....	91
Figura 33. Índices de diversidad alfa del fungoma de exhalado respiratorio de ballena azul por condición corporal y sexo	91
Figura 34. Heatmaps de los índices de diversidad beta de muestras de ADN de mamíferos marinos	92
Figura 35. Análisis de Principales Coordenadas de beta diversidad del fungoma de mamíferos marinos	93
Figura 36. Diagrama de Venn con ASVs del fungoma de las especies de mamíferos marinos estudiadas.....	94
Figura 37. Heatmaps de los índices de diversidad beta por muestra de elefante marino del Norte	95
Figura 38. Heatmaps de los índices de diversidad beta del fungoma genital del lobo marino de California.....	96
Figura 39. Análisis de Principales Coordenadas de beta diversidad del fungoma genital de lobo marino de California con distancia UniFrac por región ecológica. .	97
Figura 40. Diagrama de Venn con ASVs de hongos del epitelio genital de lobo marino de California por región ecológica.....	98
Figura 41. <i>Heatmaps</i> de los índices de diversidad beta del fungoma respiratorio de la ballena azul	99
Figura 42. Análisis de Principales Coordenadas de diversidad beta del fungoma respiratorio de la ballena azul	100
Figura 43. Diagrama de Venn con ASVs de hongos de exhalados respiratorios de ballenas azules	101

Figura 44. Diagrama de Venn con ASVs de hongos de exhalados respiratorios de mismos individuos de ballenas azules en diferentes años.....	102
Figura 45. Distribución y abundancia de ASVs en el epitelio genital del lobo marino de California.....	103
Figura 46. Abundancia diferencial de ASV en el lobo marino de California por grupo etario y condición epitelial.....	104
Figura 47. Abundancia diferencial de ASV Saccharomycetes de acuerdo con el sexo de ballenas azules.....	105
Figura 48. Heatmap de correlación de familias de hongos y familias de bacterias del tracto genital del lobo marino de California.	108
Figura 49. Red de co-ocurrencia de bacterias y hongos de epitelio genital de lobo marino de California.....	110
Figura 50. Heatmap de correlación de familias de hongos y familias de bacterias de exhalado respiratorio de ballena azul.	113
Figura 51. Red de co-ocurrencia de bacterias y hongos del exhalado respiratorio de la ballena azul.....	115

RESUMEN

El microbioma comprende a microorganismos simbiotes y sus interacciones con el hospedero que co-modulan su fisiología. Las bacterias se han estudiado más, y los hongos, el fungoma, se han explorado menos, pese a conocerse su papel regulador de otros microorganismos potencialmente patógenos. El fungoma puede ser estudiado a partir del Espaciador Transcrito Interno (ITS) o sus sub-regiones, ITS1 e ITS2, aunque cada gen influye en el tipo de comunidad descrita. En esta tesis se describió el fungoma epitelial de mamíferos marinos, principalmente el fungoma epitelial genital del lobo marino de California (LMC) y el epitelial respiratorio de la ballena azul (BA), pues nos permiten evaluar la influencia del entorno en su microbioma. La hipótesis central desafiada fue que el fungoma difiere entre hospederos y sus características eco-fisiológicas, como la transformación epitelial en el LMC y la condición corporal de la BA. Para desafiar la hipótesis se amplificaron mediante PCR las subregiones ITS1 e ITS2 en muestras de ADN de mamíferos marinos y se realizó secuenciación masiva. Después se determinó la diversidad alfa y beta, coocurrencia, asociación con características fisiológicas y con las bacterias de la microbiota del mismo epitelio en sus hospederos. Se observó que el gen ITS1 fue más informativo, y que el fungoma central del LMC y la BA estaba dominado por *Malassezia*, pero *Candida*, *Colletotrichum* y *Penicillium* son importantes para su estabilidad. Se observaron diferencias en la beta diversidad entre regiones ecológicas en el LMC, y entre sexos en la BA, pero no en relación con su condición corporal. Los Tremellomycetes fueron más abundantes en el epitelio genital del LMC con transformación celular. La coocurrencia de hongos y bacterias fue muy baja, pero la familia Malasseziaceae presentó más correlaciones positivas con bacterias de las familias Ruminococcaceae y Leptotrichiaceae en LMC, mientras que Cladosporiaceae tuvo más correlaciones positivas con la familia bacteriana Prevotellaceae en BA. Este es el primer estudio, a nivel mundial, que caracteriza el fungoma de epitelios de mamíferos marinos y lo relaciona con aspectos fisiológicos y otros componentes del microbioma, lo que nos permite comprender el microbioma desde una manera más integral.

Palabras clave: *Balaenoptera musculus*, fungoma, hongos, microbioma, *Zalophus californianus*

ABSTRACT

The microbiome comprises all symbiotic microorganisms, and their interactions that co-regulate host physiology. Bacteria have been the most studied components of the microbiome, while fungi, i.e. the fungome, have been less explored, despite their known regulatory role in other potentially pathogenic microorganisms. Fungal communities can be studied by the Internal Transcribed Spacer (ITS) or its sub-regions, ITS1 and ITS2, but each gene can influence the type of community described. In this thesis, the epithelial fungome of marine mammals was described, with particular emphasis on the genital epithelium of the California sea lion (LMC) and the respiratory tract of the blue whale (BA), as these species are ideal to allow us to evaluate the influence of the environment on the microbiome. The central hypothesis tested was that fungome differs between hosts and between their eco-physiological characteristics, such as epithelial transformation in the LMC and body condition in the BA. To challenge this hypothesis, ITS subregions were PCR amplified in marine mammal DNA samples, and mass sequencing was performed. Alpha and beta diversity, abundance, co-occurrence, and association with physiological characteristics and bacteria of their hosts were then determined. The ITS1 marker was found to be more informative to study the fungome. The core fungome of the LMC and BA is dominated by *Malassezia*, but *Candida*, *Colletotrichum* and *Penicillium* are important for its stability. Differences in beta diversity were observed between ecological regions in the LMC, and between sexes in the BA, but not in relation to body condition. Tremellomycetes were more abundant in the genital epithelium of LMC with cellular transformation. The co-occurrence of fungi and bacteria was very low in general, but the Malasseziaceae family had more positive correlations with bacterial families Ruminococcaceae and Leptotrichiaceae bacteria in LMC, while Cladosporiaceae had more positive correlations with Prevotellaceae in BA. This is the first study in the world to characterize the fungome of marine mammal epithelia and to relate it to physiological aspects and other components of the microbiome, allowing us to understand the microbiome in a more comprehensive way.

Keywords: *Balaenoptera musculus*, fungi, fungome, microbiome, *Zalophus californianus*

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés científico por estudiar y comprender la estrecha relación que guardan los microorganismos simbiotes con sus hospederos, es decir, el microbioma, ha crecido, pues se ha evidenciado cómo la dinámica simbiote-hospedero puede influir en la salud del segundo (Underhill e Iliiev 2014, Del Campo-Moreno *et al.* 2018, DeCandia *et al.* 2018). Particularmente, las bacterias (bacterioma) han sido más ampliamente estudiadas, y aún falta comprender el papel de otros componentes como los hongos, es decir, el fungoma (Underhill e Iliiev 2014).

Los hongos son organismos heterótrofos, ubicuos y que establecen fuertes interacciones biológicas con otros reinos, siendo piezas clave en el funcionamiento del nicho que ocupan (Arenas 2008, Bahram y Netherway 2022). En el contexto del microbioma, ayudan en la maduración de algunos órganos linfoides y regulan las poblaciones de otros microorganismos con potencial patógeno (Iliiev y Leonardi 2017, Lai *et al.* 2018, Bahram y Netherway 2022). No obstante, su estudio está lleno de limitaciones metodológicas, como la ausencia de un método universal de identificación taxonómica (Nash *et al.* 2017, Lücking *et al.* 2020).

A la fecha, gran parte del conocimiento sobre el fungoma se ha obtenido a través de estudios en humanos (Nilsson *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2022), y poco se ha explorado en mamíferos de vida libre (Barelli *et al.* 2020). Los mamíferos marinos son excelentes modelos para el estudio de comunidades microbianas por contar con adaptaciones anatomo-fisiológicas para realizar funciones biológicas en el entorno marino como alimentación, reproducción y crianza, exponiéndose a una gran variedad de microorganismos (Berta *et al.* 2006). Además, debido a su longevidad, fidelidad al sitio y alta posición trófica son considerados centinelas ecosistémicos, pues su salud refleja la condición del entorno que habitan (Aguirre y Tabor 2004, Bossart 2011).

Caracterizar el fungoma de los mamíferos marinos en vida libre nos puede ayudar a comprender mejor la relación que guarda el hospedero con su entorno, pues los hongos que colonizan los epitelios pueden provenir del ambiente o dieta, y responder a estímulos como cambios de temperatura, salinidad, pH entre otras, y tener impactos fisiológicos positivos o negativos (DeCandia et al. 2018). Si bien, pocos hongos tienen potencial patogénico en vertebrados (De Hoog et al. 2018), cuando se establece una micosis (infección por hongos) suele ser por organismos comensales y oportunistas en un hospedero que no es inmunocompetente (Tizard 1995, Arenas 2008).

El sistema inmunológico, el microbioma y la salud de los mamíferos marinos pueden verse comprometidos por fenómenos climatológicos, incluido el cambio climático, la presencia de contaminantes, el estado nutricional, factores antrópicos y otros disturbios del entorno (Acevedo-Whitehouse y Duffus 2009, Pardo et al. 2015, Puig et al. 2023). Todos estos factores pueden provocar una disbiosis (alteraciones del microbioma) que a su vez se relacionan con patologías más severas (Iliev y Leonardi 2017). La neoplasia urogenital del lobo marino de California (*Zalophus californianus*), por ejemplo, se ha correlacionado con altas concentraciones de organoclorados en el tejido adiposo subcutáneo (Ylitalo et al. 2005) y disbiosis bacterianas (Pereida-Aguilar et al. 2023). La baja condición corporal en animales en vida libre puede reflejar un sistema inmunitario subóptimo (Brock et al. 2013), que podría asociarse a disbiosis fúngicas (Wheeler et al. 2016).

Recientemente se ha empezado a caracterizar el bacterioma de algunas especies de cetáceos en vida libre (Acevedo-Whitehouse et al. 2010, Apprill et al. 2017, Robles-Malagamba et al. 2020, Vendl et al. 2020). También se ha estudiado el rol del bacterioma en procesos fisiológicos y patológicos en lobos marinos de California, ballenas azules (*Balaenoptera musculus*), ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) y elefantes marinos del Norte (*Mirounga angustirostris*) en vida libre (Apprill et al. 2014, Stoffel et al. 2019, Domínguez-Sánchez 2020, Pereida-Aguilar et al. 2023). En contraste, actualmente no existen investigaciones

acerca del fungoma y su papel en el microbioma en ninguna especie de mamífero marino en vida libre en el mundo.

Esta tesis identificó las especies de hongos simbiotes a partir de muestras de cinco especies de mamíferos marinos. Posteriormente se seleccionaron como modelos de estudio al lobo marino de California (LMC) y la ballena azul (BA) para estudiar el fungoma en relación con variables eco-fisiológicas y su bacterioma. Particularmente para el LMC se estudió el fungoma en relación con su distribución geográfica, estado de transformación epitelial genital, presencia de virus con potencial oncogénico y grupo etario; y para la BA se estudió el fungoma en relación con el sexo y su condición corporal.

1.1 Justificación

Los disturbios en ecosistemas marinos están ligados a la aparición de enfermedades en animales y una consecuente disminución en su eficacia biológica debido a la modificación de toda una compleja red de interacciones ecológicas con repercusiones en la biodiversidad (Smith *et al.* 2009, Bossart 2011, Gulland *et al.* 2020). Por este motivo es importante construir conocimiento sobre la ecología y fisiología de las especies, y así poder identificar a las poblaciones en potencial riesgo (Acevedo-Whitehouse 2009).

Tener acceso a muestras biológicas que permitan conocer el estado de salud de mamíferos marinos en vida libre es restringido por factores logísticos y éticos (Papastavrou y Ryan 2023). Gran parte del conocimiento adquirido proviene de un muestreo no sistemático u oportunista, como varamientos (p. ej. Groch *et al.* 2018, Soares-Castro *et al.* 2019), o extrapolado de animales en cautiverio (p. ej. Sidrim *et al.* 2015, Chiarello *et al.* 2017, Suzuki *et al.* 2020), por lo que se vuelve importante valerse de registros históricos y hacer un buen uso de muestras colectadas, que permitan conocer la historia de vida de los individuos. Esta tesis se realizó con material biológico de animales que fueron muestreados entre 2003 y 2023, para los que se conocían aspectos relacionados a su salud, edad, condición corporal o sexo, bajo el marco de proyectos de investigación registrados en la institución con el fin de comprender su dinámica eco-inmunológica.

El cáncer en animales de vida libre no es común, excepto para las poblaciones del LMC en las costas del oeste de Estados Unidos (Browning *et al.* 2015). Si bien, en territorio mexicano aún no se ha reportado, existen cambios citológicos pre-oncogénicos que pudieran estar vinculados con factores ambientales o del microbioma, mismos que serían difícilmente replicables en condiciones de laboratorio (Barragán-Vargas *et al.* 2016, Pereida-Aguilar *et al.* 2020). A la fecha no existen estudios que relacionen el fungoma genital con la transformación epitelial, por lo que este estudio se vuelve importante al brindar una aproximación a la comprensión del microbioma y su relación con la salud en los animales.

De igual forma, la importancia de conocer aspectos ecológicos de la BA se ha acrecentado al tratarse de una especie amenazada (según la IUCN, Cooke 2018). Una manera de poder comprender las redes ecológicas en las que se ve involucrada la especie es conociendo los componentes de su microbioma (Puig *et al.* 2023). Recientemente se caracterizó el bacterioma respiratorio de la BA (Domínguez-Sánchez 2020), pero el componente micótico permanece inexplorado. Mientras no se incremente el entendimiento del microbioma, es difícil comprender las relaciones eco-evolutivas de las simbiosis que ayudan a mantener un estado fisiológico sano en los hospederos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microbioma

El microbioma comprende a las especies de microorganismos que cohabitan en simbiosis, comensalismo o parasitismo con un hospedero, e incluye a bacterias, arqueas, virus, parásitos, hongos y levaduras y sus funciones biológicas (Del Campo-Moreno *et al.* 2018). Esta relación es resultado de años de coevolución adaptativa y beneficio mutuo (DeCandia *et al.* 2018).

Se sabe que el microbioma tiene un papel fundamental para la salud del hospedero en torno a la homeostasis y control de la respuesta inmune frente a enfermedades (Underhill e Iliev 2014, Suzuki *et al.* 2020), no obstante, su abordaje tiene la limitante de que la mayoría de las especies que lo constituyen no pueden ser aisladas y cultivadas *in vitro* (Rosenbaum *et al.* 2019). Esto se ha subsanado con las técnicas genómicas de secuenciación masiva, que permiten identificar las diferentes especies de microorganismos presentes en una muestra, aunque no es posible saber si son viables ni determinar su papel biológico en el organismo (Underhill e Iliev 2014, Nilsson *et al.* 2019).

La composición del microbioma está supeditada a variables genéticas, fisiológicas y ambientales (Tian *et al.* 2020) así como a señales epigenéticas y conductuales del hospedero (DeCandia *et al.* 2018, Coyte y Rakoff-Nahoum 2019). El ambiente externo y las interacciones entre microorganismos del microbioma también impactan la composición del mismo, y se considera que el microbioma de un animal es un indicador de la interacción de éste con su ambiente (Pannoni *et al.* 2022). A pesar de esta variabilidad, se ha buscado determinar el microbioma central común, que se refiere a los microorganismos que se encuentran presentes y abundantes en la mayoría de los individuos (Risely 2020, Neu *et al.* 2021). Sin embargo, existen microorganismos cuya presencia responde a etapas fisiológicas o de desarrollo específicos (microbioma central temporal) y otros microorganismos que desempeñan funciones biológicas importantes a pesar de tener una baja abundancia (microbioma central funcional) (Risely 2020).

El microbioma puede ser diferente en animales en vida libre respecto a animales en cautiverio, ya que los últimos suelen tener condiciones ambientales por lo general más controladas (Suzuki *et al.* 2020). Esto significa que los estudios del microbioma en animales en cautiverio no reflejan lo que acontece en vida libre (Turko *et al.* 2023). Afortunadamente, cada vez crece más el interés por conocer el microbioma de mamíferos marinos de vida libre. Godoy-Vitorino *et al.* (2017), por ejemplo, observaron diferencias en la composición del bacterioma oral, respiratorio, genital y del tracto gastrointestinal de un delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), sin embargo, se trataba de un animal varado, por lo que no es correcto inferir que el bacterioma observado sea representativo de especímenes vivos. Emami-Khoyi *et al.* (2019) describieron el bacterioma oral de crías de lobos finos de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*), pero no analizaron diferencias entre los hospederos como individuos sanos y enfermos, entre etapas de desarrollo o diferentes nichos ecológicos. Stoffel *et al.* (2019), por su parte, reportaron diferencias en el bacterioma gastrointestinal de *M. angustirostris* entre sexos, así como Domínguez-Sánchez (2020) con el bacterioma respiratorio de *B. musculus* entre sexos, edad y temporada de muestreo; Glaeser *et al.* 2022 caracterizaron el bacterioma de muestras de heces de *B. musculus*, *B. physalus*, *B. borealis* y *Physeter macrocephalus* y observaron diferencias a nivel familia y género en la composición de la comunidad entre los hospederos. Pereida-Aguilar *et al.* (2023) evidenciaron cómo el bacterioma genital de *Z. californianus* puede estar asociado a la transformación epitelial. Todos estos estudios indican que el microbioma puede ser específico para sus hospederos y su dinámica un factor clave en el desarrollo y fisiología para el hospedero. No obstante, del fungoma se sabe muy poco en general, pese a que las disbiosis micóticas también estén asociadas a algunas enfermedades (Iliev y Leonardi 2017).

2.1.1 Microbioma central

Definir los microorganismos centrales que componen al microbioma no suele tener una justificación universal entre diferentes estudios biológicos. Lo usual es que, si un determinado taxón está presente entre el 30 y el 95% de los individuos

analizados, sea considerado como un componente del microbioma central (Risely 2020). Sin embargo, otros consideran que un determinado taxón debe estar presente en todas las muestras analizadas para ser considerado parte del microbioma central, ya que indicaría que la interacción entre el microorganismo y su hospedero los convierte en simbioses obligados, sin embargo, este criterio depende del esfuerzo de muestreo (Neu *et al.* 2021).

En otros estudios, los taxones más abundantes en cada muestra analizada han sido considerados como parte del microbioma central, lo cual tiene sentido si el ambiente en el que se desarrollan favorece su crecimiento. No obstante, las abundancias de los microorganismos pueden cambiar dependiendo del estado fisiológico del hospedero (preñez, lactancia, crecimiento, dieta, etc.), además de que es posible que microorganismos poco abundantes también cumplan un rol importante en ese nicho (Neu *et al.* 2021). Esto explica el que otros estudios fijan un límite inferior de abundancia (p.ej. entre 0.001 y 4.5%) y todos aquellos microorganismos que tengan una mayor abundancia son considerados como parte del microbioma central, siempre y cuando su prevalencia esté dentro de un límite establecido previamente (p.ej. entre el 50 y el 100%) (Neu *et al.* 2021).

Para el caso particular de los hongos, dado que su abundancia total es baja (desde <0.1% en el tracto gastrointestinal hasta ca. 10% en la piel, Halwachs *et al.* 2017), algunos autores aún debaten si existe un fungoma central (Nash *et al.* 2017, Lai *et al.* 2018). El fungoma, además tiene cambios regidos por la dieta o el ambiente: en humanos se ha visto que una dieta rica en alimentos de origen vegetal favorece la proliferación de *Candida* spp. en el tracto gastrointestinal, mientras que *Penicillium* spp. prolifera más en individuos cuya dieta incluye alimentos de origen animal (Underhill e Iliev, 2014).

2.1.2 *El fungoma*

Las especies micóticas comensales de un hospedero, que cohabitan en un nicho determinado por características fisiológicas locales como pH, temperatura, irrigación y aporte de nutrientes es a lo que se le conoce como **fungoma** (Underhill e Iliev 2014, Sidrim *et al.* 2015). Esto implica que al igual que lo que ocurre con las bacterias que conforman al microbioma, la diversidad del fungoma depende de factores intrínsecos de su hospedero como su dieta, edad, sexo, genética, herencia y región anatómica, como consecuencia de largos procesos de coevolución entre el simbiote y el hospedero (Sidrim *et al.* 2015, Iliev y Leonardi 2017).

No obstante, las variables propias del hospedero no son las únicas que determinan la dinámica del fungoma ya que el medio ambiente y la manera en que el animal aprovecha su entorno también pueden moldear su abundancia. La región biogeográfica puede ser una variable importante para determinar la constitución del fungoma, puesto que a medida que se aproxima al ecuador, tiende a haber mayor diversidad y riqueza de hongos, así como de potenciales hospederos (Bahram y Netherway 2022). Además, el fungoma de animales acuáticos en cautiverio se ve modificado por el tratamiento químico que se le dé a su entorno (Sidrim *et al.* 2015).

No solamente es la composición del fungoma lo que puede verse alterada, sino también el tipo de relación que establecen los hongos comensales con otros taxones o incluso con el hospedero (Narunsky-Haziza *et al.* 2022). Esto es debido a que algunos cambios en el entorno pueden inducir modificaciones postraduccionales o epigenéticas en la producción de enzimas y metabolitos secundarios micóticos, con los cuales el tipo de relación que tendrán estos simbioses con su hospedero u otros taxones pueden modificarse y conducir a respuestas fisiológicas en el animal (Bahram y Netherway 2022). De lo que se conoce a la fecha, más de la mitad de esta actividad enzimática tiene funciones antagonistas hacia bacterias, otros hongos e incluso una actividad antitumoral (Keller 2019).

Todo lo anterior convierte al fungoma en un excelente indicador para estudiar cómo interactúa el hospedero con su ambiente y qué impactos puede tener en su salud (DeCandia *et al.* 2018). Un fungoma diverso proporciona beneficios inmunológicos a su hospedero, como influir en la madurez de los órganos linfoides periféricos (Lai *et al.* 2018). Además, ciertos factores inmuno-estresantes, como una baja condición corporal, o incluso la dieta, pueden afectar la dinámica micótica y asociarse a estados de enfermedad (Iliev y Leonardi 2017, Lai *et al.* 2018).

2.1.3 Características físicas de los hongos

Los hongos son organismos heterótrofos, es decir, se nutren a expensas de otros organismos o mediante la descomposición de organismos muertos o de sus metabolitos (McGinnis y Tying 1996). Por ejemplo, los saprotróficos o saprófitos se valen de compuestos orgánicos de otros organismos o los necrotróficos que pueden ser queratinofílicos, lipofílicos, osmofílicos, urofílicos o coprofílicos. Estas cualidades dictan su tropismo hacia órganos o sistemas en específico (Arenas 2008).

La célula fúngica consta de una pared resistente conformada de glucoproteínas y quitina (Frau *et al.* 2019), y obtienen nutrientes al absorber carbohidratos y péptidos/aminoácidos del sustrato (Arenas 2008). Por lo general, el tamaño de una célula fúngica es alrededor de 100 veces el de una bacteria, lo que se traduce en una biomasa y metabolitos que modifican directa o indirectamente el microhábitat de sus simbioses (Halwachs *et al.* 2017, Bahram y Netherway 2022).

Las colonias de hongos pueden ser filamentosas o unicelulares, como en las levaduras, y cuentan con una estructura o talo reproductivo que puede ser tabicado (hifas) o semi-tabicado (pseudo-hifas), y otro vegetativo cuya función es la de tomar nutrientes del medio y fijar el hongo al sustrato (Arenas 2008). En medios de cultivo especiales para hongos se pueden observar las características del talo de manera macroscópica: si el talo está interrumpido, se forman colonias de levaduras de consistencia cremosa, pero si el talo es filamentosas, crecen colonias de manera

concéntrica con pequeñas hebras cubriendo toda la superficie (McGinnis y Tyring 1996, Arenas 2008). Además, hay hongos dimórficos que tienen una fase levaduriforme o parasitaria a 37°C (en mamíferos), y otra saprófita y filamentosa a 20-25°C (Arenas 2008, Höft *et al.* 2019). Ejemplos de hongos termo-dimórficos son *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Talaromyces marneffe*, entre otros (Höft *et al.* 2019).

2.1.4 El papel del fungoma en la salud del hospedero

En muchos ecosistemas, los hongos crean asociaciones simbióticas permanentes o de larga duración con otros microorganismos, incluso creando productos simbióticos que solo son posibles de ocurrir por dicha asociación (p. ej. líquenes) (Bahram y Netherway 2022). En algunos casos permiten el intercambio de información genética entre reinos y contribuyen en mantener un equilibrio del ambiente en el que se desarrollan (Arenas 2008). Este hecho representa un reto cuando se estudia el fungoma, puesto que asignar roles funcionales definitivos a los hongos depende del tipo de asociación que existe, los organismos con los que están interactuando, la etapa fisiológica en la que se encuentra el hospedero o el ambiente en que ocurre la asociación (Bahram y Netherway 2022).

En rumiantes se ha estudiado relativamente más el papel fisiológico que desempeñan los hongos, y aunque su biomasa represente entre el 10 y 20%, tienen una función muy importante en el proceso digestivo, principalmente en la degradación de fibra (Newbold y Ramos-Morales 2020). En ratones y humanos, los hongos comensales promueven la maduración de órganos linfoides secundarios, la producción de inmunoglobulinas y participan en la respuesta de las células CD4+, además de controlar el crecimiento de colonias de otros microorganismos (Tizard 1995, Lai *et al.* 2018).

La relevancia de los hongos queda clara también en estudios experimentales, como el de Jiang *et al.* (2018) en el que fueron tratados ratones con antibióticos de amplio espectro y se reportó que las colonias de *Candida albicans* y *Saccharomyces*

cerevisiae no sólo reemplazaron a las colonias de bacterias entéricas en abundancia, sino que suplieron sus funciones, ya que los ratones no se mostraron perjudicados. Además, Wheeler *et al.* (2016) postulan que el equilibrio entre el fungoma gastrointestinal y el sistema inmunológico previene los procesos de inflamación crónicos, lo que abre la posibilidad de que en otros sistemas orgánicos exista un beneficio del mismo tipo.

2.2 Métodos para el estudio del fungoma

Dada la biología de los hongos, los estudios del fungoma se ven limitados por sus características estructurales (v.g. dificultad para degradar su pared celular), actividad metabólica (v.g. requerimientos nutricionales complejos y producción de metabolitos que inhiben su análisis molecular o que impiden su cultivo), y su relativa baja abundancia (Arenas 2008, Halwachs *et al.* 2017, Frau *et al.* 2019). Se pueden dividir los métodos de estudio del fungoma en dos: aquellos dependientes de cultivo y aquellos no dependientes de cultivo (Underhill e Iliiev 2014).

2.2.1 Métodos dependientes de cultivo

Una correcta identificación de los hongos en una muestra o ambiente dado requiere extraerlos de su entorno y analizarlos en laboratorio (Lücking *et al.* 2020). Para ello, se pueden usar medios de cultivo, que deben cumplir con los requerimientos fisiológicos de los hongos, como son una fuente de energía (glucosa o dextrosa), materia nitrogenada (peptonas) y un pH ácido (McGinnis y Tyring 1996). Normalmente a los medios de cultivo se le agrega algún antibacteriano para evitar el crecimiento de bacterias ambientales. Se pueden mantener a los hongos y levaduras en medios de cultivo como agar papa-dextrosa (PDA), agar Sabouraud o extracto de malta. La mayoría de los hongos pueden crecer a temperatura ambiente (20-30°C), pero las especies comensales de mamíferos crecen mejor a 37°C (Arenas 2008).

El medio PDA es de los más usados por su alto contenido de carbono disponible y porque permite mayor esporulación y pigmentación de los hongos (Griffith *et al.* 2007). Por otro lado, para aislar levaduras como *Saccharomyces* o *Candida*, un medio muy popular es el YPD (por sus siglas en inglés *Yeast Peptone Dextrose*) (Green y Moehle 2001).

Desafortunadamente, una gran cantidad de hongos que forman parte del fungoma por el momento no son cultivables (Underhill e Iliev 2014); aunado a esto, los requerimientos metabólicos de las diferentes especies convierten este método en un proceso muy lento y difícil de estandarizar por lo que un considerable número de taxones no pueden ser estudiados de esta forma (Lavrinienko *et al.* 2021).

2.2.2 Métodos no dependientes de cultivo

Uno de los métodos que no dependen de cultivo para la caracterización del fungoma es mediante la extracción de ADN, identificación de ADN micótico y secuenciación del mismo, que permiten una aproximación más real a la diversidad y abundancia del nicho (Limón *et al.* 2017). Sin embargo, para que este método sea de utilidad garantizar que el protocolo de extracción de ADN sea eficiente para los microorganismos a evaluar (Frau *et al.* 2019), ya que esto determina de manera directa la cantidad de material genético con el que se dispone (Rosenbaum *et al.* 2019). En el caso específico de la extracción de ADN de hongos, se debe considerar que la rigidez de la pared celular les confiere resistencia a algunos solventes químicos comúnmente utilizados para este propósito. Usar métodos físicos, como perlas de silicato de circonio para lisar la pared celular, pueden llegar a dañar la integridad del ADN extraído (Edwards *et al.* 2017). Particularmente, la extracción con fenol:cloroformo provee mayor cantidad de ADN cuando es comparado con métodos que usan disrupción mecánica (Rosenbaum *et al.* 2019).

Frau y colaboradores (2019) observaron que la abundancia relativa de hongos en muestras fecales de humanos cambia cuando se usan métodos con perlas, particularmente de *C. albicans* y *A. fumigatus*. Por el contrario, Rosenbaum *et al.*

(2019) no observaron diferencias significativas en la abundancia del fungoma oral de humanos cuando usaron métodos físicos y métodos químicos de extracción de ADN. En otras palabras, no existe un consenso sobre cuál es el mejor método para extraer ADN de alta calidad de muestras de hongos, de manera consistente.

A la extracción del material genético le sobreviene la elección de un marcador molecular que permita discriminar taxones para caracterizar la comunidad micótica (Edwards *et al.* 2017). Algunos estudios previos han usado el gen que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 18S de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU), de forma análoga al método empleado para identificar bacterias en estudios mediante el gen 16S del ARNr, pero estas regiones en el hongo carecen de suficiente variabilidad para poder realizar asignaciones taxonómicas con precisión (Monard *et al.* 2012, Edwards *et al.* 2017, Halwachs *et al.* 2017). Otros estudios han propuesto al espaciador transcrito interno (ITS) del ARNr nuclear, puesto que permite ser amplificada a partir de bajas concentraciones de ADN y permite identificar mayor riqueza de especies fúngicas con alta sensibilidad, además de que se cuenta con bases de datos suficientemente completas para poder realizar la asignación taxonómica (Monard *et al.* 2012, Schoch *et al.* 2012).

Dicha región genómica está subdividida en tres partes: ITS1 (ca. 290-350 pb), 5.8S que se encuentra altamente conservada en el reino fungi, e ITS2 (ca. 330-390 pb) (Halwachs *et al.* 2017) (**Fig. 1**) y la longitud de la región entera es muy variable dependiendo de la especie (Irinyi *et al.* 2015, Halwachs *et al.* 2017). Algunos autores recomiendan utilizar toda la región ITS para una correcta asignación taxonómica (ver Henry *et al.* 2000); sin embargo, eso obligaría a que la plataforma de secuenciación utilizada sea capaz de realizar lecturas largas sin perder calidad (de más de 500 pb), lo cual se complica cuando se usan plataformas de secuenciación de nueva generación como Illumina®.

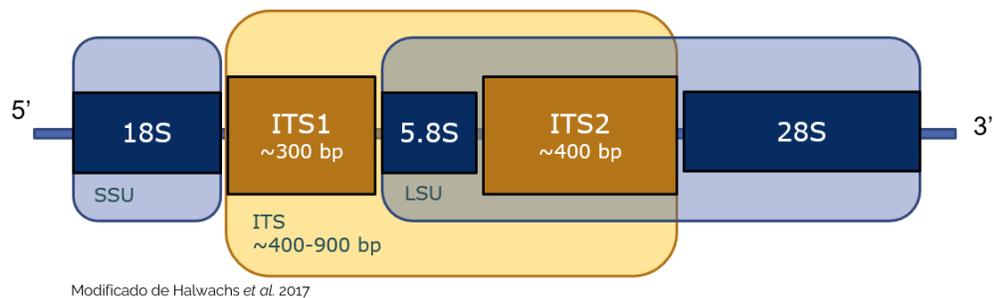


Figura 1. Espaciador Transcrito Interno (ITS). Esta región está subdividida en dos regiones variables, ITS1 e ITS2, separadas por un segmento altamente conservado, 5.8S.

Se ha mencionado que la sub-región ITS1 posee mayor variación que ITS2, por lo que sería posible identificar un mayor número de especies que con ITS2 (Frau *et al.* 2019), aunque otros autores reportan una mejor precisión con ITS2 (ver Ali *et al.* 2019, Nilsson *et al.* 2019). Algunos estudios han tenido mayor éxito encontrando ADN micótico al utilizar ITS1 (Mbareche *et al.* 2020) y otros con ITS2 (Halwachs *et al.* 2017), en tanto que también se han reportado tasas de amplificación similares usando cualquiera de los dos marcadores (Blaalid *et al.* 2013), así como otros mencionan que se obtienen resultados similares con ITS2 y 18S (Nash *et al.* 2017). Al igual que lo que sucede con la extracción, no hay un consenso acerca de cuál es la mejor región genómica para utilizar cuando se quiere realizar un análisis genómico del fungoma (Irinnyi *et al.* 2015, Nilsson *et al.* 2019).

2.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una herramienta molecular ampliamente usada para evidenciar la presencia de un segmento génico en una muestra es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Mullis *et al.* 1986). Consiste en desnaturalizar, es decir, separar la doble cadena de la molécula de ADN e hibridarlo con un par de cebadores o *primers* que flanquean el segmento de interés para que, con una enzima polimerasa, se produzcan copias de dicho segmento. Al término del primer ciclo se obtienen dos copias del gen de interés y por cada ciclo se incrementa de forma exponencial, de manera que, al concluir el protocolo, se cuente con 2^n copias del gen (siempre y cuando esté presente en la muestra), donde n es el

número de ciclos realizados. Todo esto se logra con cambios de temperatura específicos para cada paso y algunos dependen del tipo de cebadores utilizados (Wages Jr 2005, Khehra *et al.* 2023).

A pesar de su utilidad, la PCR tiene limitaciones. Algunas dependen de la calidad del ADN que será analizado, y otras se relacionan con la conformación del gen de interés. También puede ocurrir que la presencia de algunos inhibidores de la PCR, que son usados en el proceso de extracción y purificación del ADN, como el fenol, afecten el resultado de la reacción (Schrader *et al.* 2012).

La otra dificultad que se presenta al utilizar la PCR para analizar el fungoma es cuando la secuencia de interés tiene un alto contenido de guanina (G) y citosina (C) (>60%). Cuando esto ocurre se recomienda el uso de aditivos o '*PCR enhancers*' como el suero de albúmina bovina (BSA) o la formamida, que evitan la formación de estructuras secundarias en la molécula (Farell y Alexandre 2012).

2.2.2.2 *Asignación taxonómica: OTUs vs ASVs*

El uso de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) ha sido tradicionalmente empleado en estudios de fungoma (Monard *et al.* 2018, Li *et al.* 2018; Ali *et al.* 2019; Nilsson 2019), sin embargo, en los últimos años se han preferido las Variantes de Secuencia de Amplicones (ASVs) por tener menor porcentaje de falsos positivos y mayor poder estadístico en estudios del mismo tipo (Joos *et al.* 2020, Chun 2022, Drumond *et al.* 2022). Los análisis por OTUs generalmente agrupan secuencias que son similares hasta en un 97%, pero tienen como desventaja que no permiten identificar secuencias con poca variación biológica, de modo que especies con secuencias diferentes pueden quedar agrupadas dentro del mismo clado (Joos *et al.* 2020). Al utilizar ASVs se tiene la ventaja de que se agrupan secuencias idénticas y se eliminan tasas de errores mediante algoritmos (*v.g.* DADA2, Callahan *et al.* 2019) que filtran los posibles errores causados por la PCR (Tipton *et al.* 2021).

El algoritmo DADA2 utiliza la información de la calidad de las lecturas de la secuenciación para crear un modelo estadístico que filtre los errores que pudieron haberse formado durante la PCR o la secuenciación *per se*, y después identifica las secuencias que se repiten más veces que las que serían por azar y le asigna a cada ASV taxonomía más probable. Para el estudio del microbioma, cuando se esperan secuencias poco abundantes, los ASVs poseen mayor sensibilidad (Callahan *et al.* 2016, 2019).

2.2.2.3 Bases de datos de referencia

Las bases de datos de referencia para los hongos presentan, de manera general, más errores que las de bacterias, lo que limita la sensibilidad de una asignación taxonómica no ambigua. Esto hace que muchas asignaciones puedan hacerse solamente hasta el nivel de reino (Fungi sp.) o sin una clasificación certera (Nash *et al.* 2017).

Se estima que en el mundo puedan existir entre 2.2 y 3.8 millones de especies de hongos, aunque solamente se conocen ca. 140,000, y se tenga la secuencia descrita de ca. 45,000 (cerca del 30% de especies conocidas). Esto devela un gran porcentaje de especies que no se encuentran en las bases de datos todavía. La base de datos de UNITE tiene cerca de 2.5 millones de secuencias de ITS que corresponden a 100,000 especies, aunque muchas de esas secuencias no tienen nombre (Lücking *et al.* 2020).

2.3 Índices utilizados para el análisis del microbioma

El microbioma se puede estudiar a nivel local o individual, con la diversidad alfa, y a nivel poblacional con la diversidad beta (Baselga y Gómez-Rodríguez 2019).

La **diversidad alfa** se vale de diversos índices para describir la riqueza y distribución de abundancias de los componentes del microbioma en un solo hospedero (Willis 2019). Uno de los índices de diversidad alfa más utilizado es la

riqueza, definida como el número de entidades observadas (OTUs, ASVs, especies; Kers y Saccenti 2022). Otro índice es el de **Chao1**, el cual, a partir del número de especies observadas y el número de especies que sólo se observaron una vez (*singletons*) y dos veces (*doubletons*), estima cuál sería la riqueza real de la muestra (Hughes *et al.* 2001)

El problema con este índice es que en ocasiones los *singletons* y *doubletons* son filtrados del grupo de datos debido a la dificultad que implica diferenciar entre los errores de lectura y los verdaderos *singletons* y *doubletons* (Kers y Saccenti 2022).

Otro índice utilizado comúnmente para describir la diversidad alfa es el de **Shannon (H')**, que mide qué tan equitativa es la distribución de abundancias relativas de cada especie observada (Jost 2006, Moreno *et al.* 2011). Ya que el índice de Shannon cuenta con una escala diferente para cada sistema u hospedero, algunos autores sugieren que es mejor utilizar el índice de **Pielou (J)**, el cual es la normalización del índice de Shannon. De esta forma se obtienen valores entre 0 y 1 para cualquier caso, donde un valor cercano a 0 significa que una especie en particular es notablemente más abundante que el resto, y un valor cercano a 1 significa que todas las especies presentes tienen una abundancia similar (Brouwer *et al.* 2023).

El índice de **Simpson (λ)** también es usado con mucha regularidad. Mide la dominancia de una especie en una muestra, es decir, si en una muestra biológica existe una abundancia muy notoria de una especie en particular. Dicho de otra forma, mide la probabilidad de que al extraer al azar dos individuos (bacterias, por ejemplo), ambos pertenezcan a la misma especie. Para el índice de Simpson, un λ próximo a 1 significa que existe una especie dominante (López *et al.* 2017).

Por otro lado, la **diversidad beta**, se estima mediante el cálculo de cuán diferente es la diversidad y abundancia entre una comunidad *A* y una comunidad *B*. Al igual que la diversidad alfa, existen índices que nos ayudan a describirlas (Jost 2006).

Uno de los índices utilizado para calcular la diversidad beta es el de similitud de **Jaccard**, el cual se estima dividiendo el número de especies que comparten dos

comunidades entre el número de especies presentes en las dos muestras (Prokopenko *et al.* 2016; Vorontsov *et al.* 2013; Baharav *et al.* 2020).

Ya que el índice de similitud de Jaccard únicamente explica cuán iguales son dos sistemas en términos de presencia o ausencia de especies, más no de su abundancia, puede utilizarse el índice de **Bray-Curtis**, otro estimador de diversidad beta, que da valores entre 0 y 1 (siendo 1 el cálculo cuando no existe ninguna especie compartida entre ambas muestras) (Kers y Sacenti 2022).

También puede utilizarse la métrica de distancia **UniFrac**. Esta métrica toma en cuenta la distancia filogenética entre dos organismos a partir de un árbol filogenético. Cuando la métrica toma en cuenta la abundancia, además de la distancia filogenética, se le conoce como **UniFrac ponderada** (Kers y Sacenti 2022).

Por último, la **diversidad gamma** se utiliza para describir el total de las especies que se pueden encontrar en los hospederos en una región geográfica mayor (ecorregiones). Esto hace que, por definición, sea poco práctico obtener datos de microbioma de todos los individuos de una sola región, por lo que la mayoría de las veces se calcula mediante inferencias a partir de modelos matemáticos (Andermann *et al.* 2022).

2.4 Redes de co-ocurrencia

Estudiar el microbioma con el uso de redes nos permite conocer no sólo qué organismos lo constituyen sino también cómo se interrelacionan entre sí (Lázaro-Vidal y Alvarez-Martínez *in press*). En varios modelos biológicos, las redes tienen una característica de concentrar un gran número de conexiones en unos cuantos nodos, dejando a otros menos conectados. Los nodos con más conexiones son conocidos como *hubs* (Layeghifard *et al.* 2017).

Para encontrar las conexiones entre nodos existen algoritmos que estiman matrices de asociación, ya sea usando correlación o regresión simple, como SpiecEasi (*SParse InversE Covariance Estimation for Ecological Association Inference*) que usa el método de Meinshausen-Bühlmann para crear un modelo de regresión para seleccionar a los nodos vecinos de cada nodo (Layeghifard *et al.* 2017, Matchado *et al.* 2021). Este algoritmo indicaría una conexión entre nodos si la matriz estimada tiene un valor diferente a cero entre dos celdas, lo que podría indicar una posible interacción (Lázaro-Vidal y Alvarez-Martínez *in press*).

Las características topográficas de una red nos brindan información sobre la importancia de los nodos y sobre cuán estable puede ser la comunidad (Guo *et al.* 2022). Por ejemplo, identificar el nodo (o microorganismo) que actúa como *hub* puede develarnos su papel para mantener la estabilidad de la comunidad o conocer su papel en la interconectividad de la red. Algunos de estos índices incluyen el grado (*degree*) o la distancia entre nodos (*betweenness*) (Layeghifard *et al.* 2017). El *degree* nos indica con cuántos nodos más interactúa un nodo dado, mientras que el *betweenness* nos indica el grado en que un nodo se encuentra en el camino más corto entre dos nodos (Guo *et al.* 2022).

Otras métricas usadas para analizar la estructura de una red son el diámetro, la distancia promedio y el índice de clusterización, que nos describen cuán robusta puede ser una red (Guo *et al.* 2022). El índice de clusterización va de 0 a 1, siendo mayor cuando todos los nodos están interconectados entre sí, y el diámetro es la distancia que hay entre los dos nodos más alejados y la distancia promedio es la media de distancias entre cada par de nodos de la red (Kantarci *et al.* 2013).

A partir de esas características de la red es posible identificar cómo ciertos nodos tienden a tener mayor conectividad con ciertos nodos formando *clústers* (Kantarci *et al.* 2013). En cada *clúster* se pueden agrupar grupos de nodos que pueden tener alguna implicación biológica ya sea como grupo funcional o taxonómico, ya que

podrían tratarse de microorganismos que han coexistido juntos y la presencia de uno favorece la presencia del segundo (Layeghifard *et al.* 2017).

Existen diferentes métodos para identificar *clústers* o comunidades de nodos. *Edge betweenness* es un método popular que se basa en el índice de *betweenness* de los nexos y no excluye nodos con baja conectividad (Dunn *et al.* 2005). Por su parte, el algoritmo *walktrap* se basa en la idea de que, si se realizan recorridos aleatorios en la red, dichos recorridos permanecerían dentro del mismo *clúster* asumiendo que existe una mayor interconectividad entre ellos (Layeghifard *et al.* 2017). Otro algoritmo usado es el método Louvain, que asigna nodos a comunidades de manera en que se pueda conseguir una mayor modularidad, hasta que no sea posible mejorarla (Emmons *et al.* 2016).

2.5 Respuestas inmunes en los epitelios

Los epitelios sirven como ambientes que benefician a un determinado grupo de microorganismos, generalmente de baja patogenicidad que, por competencia, limitan el crecimiento de otros con mayor potencial patógeno (Tizard 1995).

Los epitelios se valen de inmunoglobulinas, principalmente IgA sintetizadas desde la submucosa para evitar la adherencia de microorganismos, pero cambios en el pH, su dinámica citológica, o incluso en la presencia y cantidad de metabolitos como ácidos grasos pueden propiciar una colonización de microorganismos oportunistas con potencial patógeno (Tizard 1995). Existen regiones anatómicas que son más propensas a sufrir disbiosis por estar más expuestas a cambios ambientales como ocurre en la dermatitis interdigital en perros, por colonización de *Malassezia* spp. (Mauldin y Peters-Kennedy 2016).

2.5.1 Respuestas inmunes mucosales contra hongos

Algunos hongos han evolucionado de manera que se adaptaron perfectamente al hospedero y sin perjudicarlo, puesto que obtienen humedad, temperatura y

nutrientes necesarios para su desarrollo (Iliev y Leonardi 2017). El crecimiento desmedido de sus colonias suele regularse por la vía alterna del sistema de complemento, y posteriormente por linfocitos citotóxicos (Tizard 1995). Esto explica por qué los hospederos con inmunodeficiencias del complemento o con linfocitopenias son más propensos a desarrollar micosis por hongos comensales (Tizard 1995, Lionnakis *et al.* 2023).

En algunas ocasiones, las disbiosis del fungoma pueden favorecer el desarrollo de cáncer, por ejemplo, un aumento en la proporción de basidiomycota:ascomycota fecal se observa en pacientes con cáncer colorrectal (Li *et al.* 2023).

2.5.2 Epitelio vaginal

El ambiente vaginal es idóneo para el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos (p.ej. *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Cladosporium*), aun tratándose de o, sobre todo en, animales sanos (Iliev y Leonardi 2017). El epitelio vaginal es plano, estratificado y no queratinizado y sin glándulas; las células epiteliales sufren modificaciones morfofuncionales dependientes del estrógeno en sangre y sintetizan y acumulan glucógeno a medida que migran excéntricamente y son descamadas (Ross y Pawlina 2012).

Mencionando específicamente a uno de los modelos de estudio de esta tesis, el LMC, su epitelio vaginal presenta ligeros cambios histológicos a lo largo del ciclo estral anual. Por lo general, existe un engrosamiento del epitelio durante el estro y en primavera (tres a ocho capas celulares), mientras que, en diapausa y otoño, es más delgado (tres a cinco capas celulares) (Colegrove *et al.* 2009-a). Esto puede favorecer el crecimiento de ciertas especies, como es el caso de *Candida* spp., que se beneficia por los niveles altos de estrógeno y glucógeno del epitelio, durante picos estrogénicos en animales sexualmente maduros (Tizard 1995, Iliev y Leonardi 2017).

No se han realizado muchos estudios sobre el fungoma de la mucosa genital de especies silvestres, y mucho menos de especies silvestres marinas. Sin embargo,

un estudio basado en hongos cultivables, realizado en manatíes del Amazonas (*Trichechus inunguis*) y manatíes del Caribe (*Trichechus manatus*) en cautiverio reportó que en la mucosa genital se encuentran *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula* sp. y *Trichosporon* sp. (Sidrim *et al.*, 2015).

2.5.3 Epitelio respiratorio

El sistema respiratorio se divide en tres por sus características funcionales y citológicas: el sistema de conducción, de transición y de intercambio gaseoso. Cada uno reacciona de manera diferente ante microorganismos (Trigo y Elizondo 2004).

Dada su función, todo el sistema respiratorio está en constante contacto con partículas, gases y agentes del exterior (Ross y Pawlina 2012). En los cetáceos, este sistema cobra particular relevancia ya que tienen que exhalar e inhalar en una exhibición fuera del agua para continuar con una apnea, por lo que el vacío e inhalación del contenido pulmonar debe ser rápido (Berta *et al.* 2006). En general, en los mamíferos, el sistema respiratorio cuenta con sistemas de filtrado para garantizar que el contenido inhalado sea lo más inocuo posible. Aun así, las partículas más pequeñas (~1 µm) pueden llegar hasta los alveolos (Tizard 1995).

El sistema de conducción respiratorio comprende desde los ollares hasta los bronquios principales (Trigo y Elizondo 2004). Los mysticetos (ballenas barbadas, como la ballena azul) poseen dos orificios nasales que migraron hacia la parte dorsal, dadas las presiones evolutivas que marcaron la historia de las especies (Berta *et al.* 2006). El epitelio en esta porción del aparato es pseudoestratificado, cilíndrico, ciliado, con células caliciformes que secretan moco rico en IgA, también se le conoce como mucociliar (Henk y Haldiman 1990, Ross y Pawlina 2012).

Al epitelio mucociliar le sucede un epitelio cúbico y monoestratificado en los bronquiolos y lobulillos pulmonares (Ross y Pawlina 2012), y finalmente, el sistema de intercambio, constituido por los alvéolos y el endotelio capilar, que está altamente

irrigado en mamíferos marinos y posee macrófagos alveolares como células inmunes locales (Henk y Haldiman 1990, Trigo y Elizondo 2004, Fischer 2007).

Antiguamente se pensaba que el ambiente pulmonar de los animales era estéril y que la presencia de microorganismos en él era consecuencia de infecciones, aunque ahora se sabe que existe una comunidad micótica pulmonar (al menos en humanos y animales terrestres) que se enriquece de hongos del ambiente, como *Aspergillus* spp. y que, durante procesos patológicos, se pueden observar alteraciones en la diversidad alfa (Iliev y Leonardi 2017). No obstante, para lidiar con un exceso de microorganismos, en el sistema respiratorio existen órganos linfoides secundarios, que albergan linfocitos T y B, así como macrófagos y células dendríticas (Trigo y Elizondo 2004).

2.6 Hongos con potencial patogénico para los mamíferos marinos

Las micosis generalmente ocurren por la proliferación de hongos comensales de las mucosas o tegumentos del hospedero pero que establecen un cuadro clínico cuando no hay inmunocompetencia, o durante procesos inflamatorios crónicos; y en menor número, por hongos exógenos y parásitos obligados (como *Mucor* spp.) (Arenas 2008, Li *et al.* 2023).

Dependiendo de la profundidad y diseminación de la colonización del hongo, las micosis se clasifican en superficiales, subcutáneas, sistémicas (o fungemia) y oportunistas (Arenas 2008). En mamíferos marinos es más común que se reporten micosis en animales en cautiverio como belugas (*Delphinapterus leucas*; Young *et al.* 1999, Higgins 2000), orcas (*Orcinus orca*; Ridgway 1979, Abdo *et al.* 2012), delfines mulares (*Tursiops truncatus*; Jensen *et al.* 1998, Higgins 2000, Vilela *et al.* 2016, Duignan *et al.* 2020, Miller *et al.* 2022, Shirakata *et al.* 2022), lobos marinos de California (Dunn *et al.* 1984, Guillot *et al.* 1998, Zwick *et al.* 2000, McLeland *et al.* 2012, Seyedmousavi *et al.* 2018-a, Hađina *et al.* 2019), elefantes marinos del Norte (Dunn *et al.* 1984), nutrias marinas (*Enhydra lutris*; Huckabone *et al.* 2015,

Morita *et al.* 2001, Burek-Huntington *et al.* 2014), manatíes (*Trichechus manatus*; Sidrim *et al.* 2015), entre otros. O como hallazgos *post mortem* durante necropsias de animales varados, como en marsopas comunes (*Phocoena phocoena*; Dunn *et al.* 1984, Seyedmousavi *et al.* 2015), ballena franca austral (*Eubalaena australis*; Mouton *et al.* 2009), foca de puerto (*Phoca vitulina*; Dunn *et al.* 1984, Huckabone *et al.* 2015, Seyedmousavi *et al.* 2018-b), rorcual tropical (*Balaenoptera edeni*; Groch *et al.* 2018) y lobos marinos de California (Huckabone *et al.* 2015), aunque pocas veces queda esclarecido si la causa de muerte fue la micosis o si fue una infección secundaria o colonización *post mortem*.

Dentro de las especies de hongos que se han identificado de lesiones micóticas o en necropsias de mamíferos marinos destacan los siguientes: en tracto respiratorio, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp. y *Rhodotorula* spp. (Joseph *et al.* 1986, Jensen *et al.* 1998, Young *et al.* 1999, Higgins 2000, Takahashi *et al.* 2010, Huckabone *et al.* 2015, Grattarola *et al.* 2018, Seyedmousavi *et al.* 2018-b, Shirakata *et al.* 2022); en piel, tegumentos y uniones mucocutáneas como oídos, genitales y ano, *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., (Dunn *et al.* 1984, Guillot *et al.* 1998, Dierauf y Gulland 2001, Mouton *et al.* 2009, Álvarez-Pérez *et al.* 2010, Mouton y Botha 2012, Sidrim *et al.* 2015, Hađina *et al.* 2019); de manera sistémica, *Blastomyces* spp., *Candida* spp., *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp. y *Mucor* spp., (Dunn *et al.* 1982, Higgins 2000, Morita *et al.* 2001, Abdo *et al.* 2012, Burek-Huntington *et al.* 2014, Huckabone *et al.* 2015).

El **Anexo 1** resume los casos reportados de micosis en mamíferos marinos, tanto en cautiverio como en vida libre o varados muertos.

2.7 La salud de los organismos modelo: procesos patológicos o fisiológicos conocidos

Los mamíferos marinos están expuestos a numerosas presiones evolutivas por el medio en el que se encuentran, por lo que han tenido que adaptarse para mejorar su eficacia biológica (Dierauf y Gulland 2001). Esto les ha conferido caracteres de historia de vida únicos entre los mamíferos. Algunos tienen que realizar grandes migraciones para reproducirse o buscar alimento (como la ballena azul), otros realizan largos periodos de ayuno (como el elefante marino del Norte) y unos han tenido que sortear con disturbios de origen antrópico más que otros (Berta *et al.* 2006). En esta sección se hablará del carcinoma urogenital que padecen los lobos marinos de California y de la condición corporal de las ballenas azules, dos de los modelos de estudio de esta tesis.

2.7.1 Carcinoma urogenital del lobo marino de California

El cáncer urogenital comienza de manera subclínica con lesiones citológicas (intraepiteliales) como anisonucleosis o binucleación. Se ha descrito este tipo de lesiones pre-oncogénicas en LMC en el Golfo de California (Barragán-Vargas *et al.* 2016, Nieves-Martínez 2022), aunque a la fecha no se han detectado casos de carcinoma urogenital en esta región de su distribución. Tras convertirse en tumor maligno, el cáncer puede hacer metaplasia a riñón, nódulos linfáticos, vejiga, hígado, bazo e incluso pulmones, y la edad promedio en que se ha detectado esta patología es de ocho años (Colegrove *et al.* 2009-b, Browning *et al.* 2015).

El carcinoma urogenital metastásico que afecta a las poblaciones de LMC es una patología de alta prevalencia y con alta complejidad etiológica, incluyendo disbiosis bacterianas (Pereida 2020, Pereida *et al.* 2023), virus oncogénicos (Otarine Herpesvirus-1) (King *et al.* 2002, Buckles *et al.* 2006, Gulland *et al.* 2020), contaminantes (organoclorados) (Ylitalo *et al.* 2005), reducción en receptores alfa de estrógenos (Colegrove *et al.* 2009-b), genéticos relacionados con la falta de diversidad en la población (Acevedo-Whitehouse *et al.* 2003, Browning *et al.* 2015),

genes específicos del MHC-Clase II (Bowen *et al.* 2005) e inmunológicos (Peñín *et al.* 2019), pero el papel del fungoma no ha sido dilucidado aún.

Se han reportado comunidades de hongos específicas desproporcionadamente presentes en diferentes tipos de tejido neoplásico en el humano, sin embargo, no ha podido ser determinada aún su causalidad (Narunsky-Haziza *et al.* 2022). Por ejemplo, una infección crónica con ascomicetos y basidiomicetos en el esófago puede promover el desarrollo de tumores epiteliales en el mismo órgano (Zhu *et al.* 2017), y *Malassezia* sp. está involucrado en la oncogénesis pancreática en ratones (Wang *et al.* 2020). Por otro lado, los hongos también producen metabolitos con actividad antitumoral (How *et al.* 2021), lo cual sugiere que su implicación con el cáncer es más compleja que, simplemente, la presencia o ausencia de hongos específicos.

En el microambiente intratumoral pueden coexistir bacterias y hongos, y activar diferentes tipos de respuesta inmunitaria como inflamación. Esto puede deberse en parte a inmunosupresión o que el ambiente intratumoral es particularmente rico en nutrientes. Dentro de los hongos que dominan este nicho destacan los basidiomicetos y ascomicetos (Narunski-Haziza *et al.* 2022).

2.7.2 Condición corporal de las ballenas azules

En modelos animales de vida libre se ha propuesto la condición corporal como indicador para relacionar el gasto energético que conlleva tener una apropiada respuesta inmune a factores estresantes (Brock *et al.* 2013). En mysticetos, se ha usado en repetidas ocasiones para evaluar el estado fisiológico y bioenergético del animal (Burnett *et al.* 2018, Christiansen *et al.* 2019), y se ha descrito que su condición corporal se relaciona indirectamente con factores ambientales como los periodos de surgencia y la temperatura superficial del mar, pues afectan la disponibilidad de su alimento (Wachtendonk *et al.* 2022).

Debido a que el funcionamiento del sistema inmunitario tiene un elevado costo energético, en ocasiones le puede costar recursos energéticos a otros tejidos como

la piel, la sangre o la propia condición corporal (Gilot-Fromont *et al.* 2012, Brock *et al.* 2013). Particularmente, la inmunidad innata es más costosa que la adaptativa, y es por ello que, las respuestas inmunes son diferentes dependiendo del estado nutricional del animal (Gilot-Fromont *et al.* 2012).

La condición corporal también está asociada con la eficacia biológica, pues se ha notado que el éxito reproductivo en hembras de mamíferos está correlacionado a sus reservas energéticas (Williams *et al.* 2013, Christiansen *et al.* 2013, Ross *et al.* 2021). Durante el parto, la lactogénesis y lactancia se consumen una gran parte de las reservas energéticas, incluso mayor que en la gestación en sí, haciendo que las hembras pierdan condición corporal como consecuencia de modificaciones metabólicas como movilización del tejido graso (Favorit *et al.* 2021). Estudios sobre la relevancia de la condición corporal hacia los parámetros reproductivos y de crianza se han podido realizar en vacas de ordeña, donde se ha visto que hembras con una condición corporal alta previa al parto producen más leche, pero tienden a perder más tejido graso durante la lactancia, es decir, decrece más notoriamente su condición corporal (Roche *et al.* 2015).

Se considera que las ballenas barbadas suelen alimentarse en los meses de verano y otoño con el fin de tener suficientes reservas energéticas para migrar, parir y lactar (Busquets-Vass *et al.* 2021). Las ballenas hembras, entonces, deben dedicar más tiempo a la búsqueda de alimento con la intención de abastecerse en preparación para el parto y lactancia ya que son las que suelen sufrir mayores pérdidas de su condición corporal al final de la temporada reproductiva (Oftedal 1997, Gendron, 2002, Casillas-López 2016, Wachtendonk *et al.* 2022, Würsig y Orbach 2023). No obstante, dadas sus altas demandas energéticas, existe evidencia que la ballena azul que visita el Golfo de California se alimenta de manera continua durante todo el año (Pardo *et al.* 2015, Busquets-Vass *et al.* 2021), y se estima que, al menos en el Pacífico Noreste, una ballena azul de aproximadamente 22 m de largo, consume de 10 a 22 toneladas de alimento al día durante la temporada de alimentación (Savoca *et al.* 2021). Sin embargo, la disponibilidad y concentración de su alimento

varía de acuerdo a la estacionalidad y área (Gendron 2002), condiciones climáticas (como el fenómeno de El Niño), las surgencias y las corrientes (Pardo *et al.* 2015).

La condición corporal de los mamíferos también puede verse afectada por su propio microbioma, pues se ha visto en que los microorganismos condicionan comportamientos relacionados con la alimentación y crecimiento (van Dijk *et al.* 2014). Los hongos comensales tienen el potencial de influir en la condición corporal también, o volverse patogénicos si el hospedero está subalimentado o bajo estrés (Tizard 1995, Mouton *et al.* 2009, Pang *et al.* 2021). Por ejemplo, *Histoplasma* spp. puede mantener una infección latente hasta el momento en que exista inmunosupresión, proceso que puede durar de semanas a años, y los primeros signos clínicos de histoplasmosis sistémica, al menos en perros y gatos, suelen ser inespecíficos como pérdida de peso e inapetencia, lo que puede repercutir de manera directa en la condición corporal (Seyedmousavi *et al.* 2018-b).

3. HIPÓTESIS

El fungoma epitelial de mamíferos marinos es diferente dependiendo de las características fisiológicas de su hospedero.

Para poder desafiar esta hipótesis, se desarrollaron las siguientes hipótesis específicas de trabajo, a partir de dos organismos modelo principales, el LMC y la BA:

- i. El fungoma del tracto genital de *Zalophus californianus* varía de acuerdo con el estado de transformación epitelial.
- ii. El fungoma del epitelio respiratorio de *Balaenoptera musculus* difiere dependiendo de la condición corporal del animal.
- iii. Los elementos que conforman al fungoma de *Zalophus californianus* y de *Balaenoptera musculus* se asocian a elementos específicos del bacterioma epitelial de cada especie.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Describir la diversidad micótica epitelial de especies de mamíferos marinos centinelas.

PARTICULARES

- Caracterizar los componentes del fungoma epitelial de mamíferos marinos.
- Caracterizar los componentes del fungoma urogenital de hembras de LMC.
- Caracterizar los componentes del fungoma respiratorio de BA.
- Investigar la asociación entre la composición del fungoma genital de LMC y el estado de transformación epitelial del hospedero.
- Investigar la asociación entre la composición del fungoma respiratorio de BA y la condición corporal del hospedero.
- Explorar las relaciones entre componentes específicos del fungoma y del bacterioma del LMC y de la BA.

5. METODOLOGÍA

Se usó ADN extraído de muestras colectadas como parte de diversos proyectos de investigación registrados en la Universidad Autónoma de Querétaro y que estaban disponibles para su análisis en el laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la institución (ver sección 5.3).

5.1 Área de estudio

Se trabajó con extractos de ADN de muestras colectadas de individuos en el Golfo de California, una región subtropical alargada en dirección noroeste de aproximadamente 1,130 km de largo por 80-222 km de ancho (Lluch-Cota *et al.* 2007), limitada al este por los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, y al oeste por la península de Baja California. Por su ubicación, el intercambio de materia con el Océano Pacífico está limitado, y la temperatura superficial del mar en invierno oscila entre los 13 y 21°C mientras que en verano fluctúa entre los 28 y 32°C (Wilkinson *et al.* 2009, López-Martínez *et al.* 2023).

La región cuenta con una de las productividades primarias más altas del mundo (Wilkinson *et al.* 2009), y se pueden encontrar 36 especies de mamíferos marinos (cuatro especies de pinnípedos, 31 de cetáceos y uno de quiróptero; Lluch-Cota *et al.* 2007). Además, es un área muy importante para actividades humanas como la pesca y el turismo (Wilkinson *et al.* 2009, Páez-Osuna *et al.* 2016). La costa este es la más afectada por la industria pesquera y agropecuaria, y de la región Norte se han podido encontrar residuos de pesticidas (Lluch-Cota *et al.* 2007) lo que puede exponer a los animales que habitan esas regiones a efectos antrópicos (Xia *et al.* 2022).

5.2 Selección de organismos modelo

Para estandarizar los protocolos de PCR para las subregiones de ITS y visualización de amplicones, se utilizaron muestras de diferentes especies de mamíferos marinos que estaban presentes en el grupo de investigación y posteriormente se realizaron análisis más profundos con las muestras de los organismos modelo principales (el LMC y la BA). En total, para realizar los PCR se trabajó con 10 hisopados genitales y dos biopsias de piel de lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendii*), 103 exhalados respiratorios, una muestra de heces de ballena azul y seis controles técnicos tomados al momento de la colecta de muestras de esta especie, cinco muestras de exhalado respiratorio y una de piel de ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), una biopsia de piel de lobo fino del norte (*Callorhinus ursinus*), una muestra de exhalado respiratorio de delfín común (*Delphinus capensis*), cuatro de ballena gris (*Eschrichtius robustus*), una de ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), 28 hisopados anales, nueve oculares y 19 biopsias de piel elefantes marinos del Norte, una biopsia de piel de foca común (*Phoca vitulina*), dos de lobo marino de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*), 19 muestras de heces de cachalote (*Physeter macrocephalus*), tres muestras de hisopado anal y cuatro de biopsia de piel de cuatro manatíes antillanos (*Trichechus manatus*), 138 muestras de hisopado genital y cinco biopsias de lobo marino de California y dos biopsias de piel de lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaecki*). El **Cuadro 1** resume el número de muestras usados y a cuántos individuos por especie corresponden para la estandarización del protocolo de PCR. Para la secuenciación masiva, se trabajó sólo con las muestras que amplificaron para ITS1 o ITS2 (ver Metodología 5.9). Para realizar los análisis profundos del fungoma y los aspectos fisiológicos del hospedero, se trabajó con el lobo marino de California y a la ballena azul como organismos modelos principales dado que se conocen aspectos relacionados a su salud como la transformación epitelial, edad y región geográfica (para el LMC), sexo y condición corporal (para la BA), y sus respectivos bacteriomas.

5.2.1 Lobo marino de California (LMC)

El LMC es un pinnípedo otárido que se distribuye en las islas de la costa este del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California, donde existen regiones usadas para la crianza. Cerca del 30% de su población se encuentra en colonias reproductivas en islas rocosas del territorio mexicano (Elorriaga-Verplancken *et al.* 2015, Heckel *et al.* 2020). Debido a la relativa facilidad con la que pueden ser encontrados y consecuentemente muestreados, esta especie ha sido considerada como especie modelo para investigaciones sobre efectos ambientales y ecológicos en especies marinas (Dierauf y Gulland 2001).

La especie, poligínica, tiene un comportamiento reproductivo cíclico y altamente sincronizado. Durante el estro, las hembras tienden a ser muy gregarias y pueden tener comportamientos agresivos en el parto (Peterson y Bartholomew 1967). El estro comienza en verano (julio-agosto), y en caso de concepción, el embrión permanece en diapausa por dos meses hasta que finalmente se implanta en el útero entre septiembre y octubre, para parir una cría entre mayo y junio tras nueve o 10 meses de gestación desde la implantación (Berta *et al.* 2006, Colegrove *et al.* 2009-a).

Cuadro 1. Especies de mamíferos marinos y tipo de muestras analizadas para ITS1 e ITS2.

Especies	Tipo de muestra	Núm. muestras	Núm. individuos
TOTAL		365	216
<i>Arctocephalus townsendi</i>		12	10
	Hisopado genital	10	10
	Piel	2	2
<i>Balaenoptera musculus</i>		104	37
	Exhalado respiratorio y moco	103	36
	Heces	1	1
Carlos Domínguez (CADS)	Control técnico	3	1
Agua de mar	Control ambiental	3	3
<i>Balaenoptera physalus</i>		5	5
	Exhalado respiratorio	4	4
	Piel	1	1
<i>Callorhinus ursinus</i>	Piel	1	1
<i>Delphinus capensis</i>	Exhalado respiratorio	1	1
<i>Eschrichtius robustus</i>	Exhalado respiratorio	4	4
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Exhalado respiratorio	1	1
<i>Mirounga angustirostris</i>		56	42
	Hisopado anal	28	28
	Hisopado ocular	9	9
	Piel	19	19
<i>Phoca vitulina</i>	Piel	2	2
<i>Phocarcos hookeri</i>	Piel	2	2
<i>Physeter macrocephalus</i>	Heces	19	18
<i>Trichechus manatus</i>		7	4
	Hisopado rectal	3	3
	Piel	4	4
<i>Zalophus californianus</i>		143	83
	Hisopado genital y moco cervical	138	81
	Piel	3	3
	Biopsia	2	2
<i>Zalophus wollebaecki</i>	Piel	2	2

La especie puede entrar en estro tan pronto como un mes después del parto (Peterson y Bartholomew 1967, Dierauf y Gulland 2001). Tras el parto, la hembra

intercala periodos de amamantamiento en tierra con periodos de alimentación en el mar, dejando a la cría vulnerable por lapsos. Este periodo de alimentación está relacionado con las condiciones ambientales, pues si hay disponibilidad de alimento de buena calidad en zonas aledañas a la colonia reproductiva, la hembra invertirá poco tiempo cazando y por consiguiente es menor el tiempo que la cría esté vulnerable. Por el contrario, si no hay suficiente alimento cerca, la hembra debe nadar más tiempo. Además, la calidad del alimento determina la calidad de la leche y por consiguiente la nutrición de la cría (Riet 2019).

Se han reportado numerosos agentes patógenos para la especie, desde bacterias (v.g., *Brucella* spp., *Listeria ivanovii*, Dierauf y Gulland 2001), nemátodos y céstodos (v.g., *Anisakis* sp., *Contracaecum* sp., *Parafilaroides decorus*, *Diphyllobothrium* spp.), coccidias (Kuzmina *et al.* 2018), toxinas (Scholin *et al.* 2000), y virus (por ejemplo, Herpesvirus-1, Gulland *et al.* 2020). Además, la especie es particularmente susceptible a desarrollar carcinoma urogenital (aunque hasta el momento esa patología sólo se ha reportado en las poblaciones de la costa oeste de los Estados Unidos (Gulland *et al.* 2020; Barragán-Vargas *et al.* 2015). El carcinoma urogenital tiene un carácter multietiológico, incluyendo disbiosis bacterianas (Pereida 2020, Pereida *et al.* 2023), virus oncogénicos (King *et al.* 2002, Buckles *et al.* 2006, Gulland *et al.* 2020), contaminantes (Ylitalo *et al.* 2005) y factores hormonales (Colegrove *et al.* 2009-b), genéticos (Acevedo-Whitehouse *et al.* 2003, Bowen *et al.*, 2005, Browning *et al.* 2015) e inmunológicos (Peñín *et al.* 2019). En esta tesis se eligió al lobo marino de California para estudiar el papel del fungoma en relación a la transformación epitelial, pues no hay estudios en el mundo que lo describan.

5.2.2 Ballena azul (BA)

La BA es el mamífero más grande que haya existido en la Tierra (de ca. 27 metros de longitud y entre 90 y 120 toneladas de peso) (Niño-Torres *et al.* 2011). Es una especie de cetáceo misticeto cosmopolita y migratoria que visita los litorales del Pacífico mexicano entre el invierno y primavera, aunque su distribución abarca desde Rusia hasta Costa Rica (Heckel *et al.* 2020). La BA está catalogada como

especie en peligro bajo el criterio A1abd ver 3.1, aunque su población va en aumento (Cooke 2018). Un censo publicado en 2004 estimó la población del Pacífico Noreste en 3,000 ejemplares (Calambokidis y Barlow 2004).

La BA se ha estudiado en México desde 1993, por lo que se conocen algunos aspectos de su taxonomía, morfología, ecología e historia de vida (Gendron y Ugalde de la Cruz 2012, Casillas-López 2016, Ortega-Ortiz *et al.* 2018, Atkinson *et al.* 2019, Blevins *et al.* 2022). En las aguas del Golfo de California realiza actividades de alimentación, crianza y reproducción. Aquí se le puede observar desde finales de otoño hasta la primavera, aunque cabe la posibilidad de que exista una población residente fuera de la costa occidental (Gendron 2002).

Normalmente la BA se encuentra solitaria, en pares o madres con cría, y muy ocasionalmente en grupos de tres, constituidos por madre con cría y una hembra adicional. Las hembras suelen preferir zonas neríticas, es decir, cercanas a la costa (Atkinson *et al.* 2019). Las hembras alcanzan la madurez sexual alrededor de los cinco años, se reproducen entre los meses de marzo y junio, antes de migrar al norte, su gestación dura de 10 a 11 meses y el periodo de lactancia ronda los siete meses. Pueden tener una cría cada dos o tres años (Gendron 2002, Atkinson *et al.* 2019).

Las demandas energéticas de esta especie, tomando en cuenta sus dimensiones, obligan al animal a tener una alimentación continua durante todo el año (Costa-Urrutia *et al.* 2013, Busquets-Vass *et al.* 2021), motivo por el cual la distribución de la BA responde a la disponibilidad y concentración de alimento (Pardo *et al.* 2015). Es por ello que su condición corporal puede ser un indicador de la productividad de las aguas (Wachtendonk *et al.* 2022)

Muchos aspectos de su salud clínica aún son enigmas, salvo reportes oportunistas de la presencia de epibiontes (diatomeas) (Berta *et al.* 2006) y ectoparásitos (p.ej., *Haematophagus megapterae*), o de eventos *post mortem* con escasas o nulas correlaciones al estado de salud (Dierauf y Gulland 2001, Groch *et al.* 2018). Con

análisis coprológicos se han identificado algunos helmintos (como *Diphyllobothrium* sp.) de animales vivos (Flores-Cascante y Gendron 2012, Flores-Cascante *et al.* 2019) y se ha descrito el bacterioma y arqueoma de las heces en dos individuos, donde destacan Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Tenericutes y Spirochaeta por parte de las bacterias, y Methanomassiliicoccales por parte de las arqueas (Glaeser *et al.* 2022). En improntas de exhalado se han detectado bacterias con potencial patógeno como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. y *Moraxella* spp., por mencionar algunas (Acevedo-Whitehouse *et al.* 2010), y con técnicas de secuenciación masiva del gen bacteriano 16S del ARNr se ha caracterizado su bacterioma respiratorio (Domínguez-Sánchez 2020), pero no existen, a la fecha, estudios que describan su diversidad micótica.

5.3 Colecta de muestras

Las muestras de exhalados, biopsia de piel, heces e hisopados de los mamíferos marinos indicados en el **Cuadro 1** fueron colectadas y trabajadas en proyectos de investigación registrados en la institución y que quedaron almacenadas. Algunas muestras datan de 2003 hasta 2020 (ver Acevedo-Whitehouse *et al.* 2010, Guerrero de la Rosa 2014, Morales 2018, Stoffel *et al.* 2019 para más detalles de metodología de colecta).

A continuación, se explica a detalle la colecta de los modelos de estudio principales de esta tesis: el LMC y la BA.

5.3.1 *Colecta de muestras de lobo marino de California*

Se trabajó con los extractos de las muestras usadas para los trabajos de tesis de maestría “Microbioma cervical y su relación con la transformación epitelial cervical en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (Pereida-Aguilar 2020) y “Expresión genética relacionada con la transformación epitelial genital del lobo marino de California” (Nieves-Martínez 2022) de epitelio cervical de hembras adultas, que fueron colectadas con cepillo citológico en colonias reproductivas de

12 islas del Golfo de California en 2016 y 2020 (**Fig. 2**). Los cepillos citológicos se almacenaron en viales de 1.5 mL con etanol al 96% a -80°C. También se contaron con 10 muestras de moco vaginal, tres biopsias de piel y dos de tejido epitelial genital de los animales, que fueron almacenadas de la misma manera descrita.

Para cada individuo se contó con información adicional sobre su condición epitelial genital, presencia de ADN de virus con potencial oncogénico (herpesvirus (OthV-1) y papilomavirus (Zc-PV-1); Pereida-Aguilar 2020).

En total se contó con 143 muestras correspondientes a 74 hembras adultas y nueve juveniles y crías para la presente tesis.

5.3.2 *Colecta de muestras de ballena azul*

Las muestras corresponden a aquellas colectadas para el trabajo de tesis doctoral “Microbioma bacteriano del tracto respiratorio de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California” (Dóminguez-Sánchez 2020) en el Parque Nacional Bahía de Loreto al suroeste del Golfo de California en las temporadas del 2016, 2017 y 2018 (**Fig. 2**). El exhalado de las ballenas se colectó con un dron Phantom 3 quadracóptero (DJI, China) que contaba con una caja Petri de 10 cm atada a la base del dron. La aproximación a la ballena se hizo de caudal a craneal y se voló a una altura promedio de 4.5 m sobre el animal (para más detalles de colecta de muestras ver Domínguez-Sánchez *et al.* 2018).

En total, para la presente tesis se contó con 103 muestras de exhalado respiratorio y moco de 36 individuos sexualmente maduros, así como una muestra de heces de un individuo extra, tres controles técnicos del operador del dron y tres controles ambientales (agua de mar).

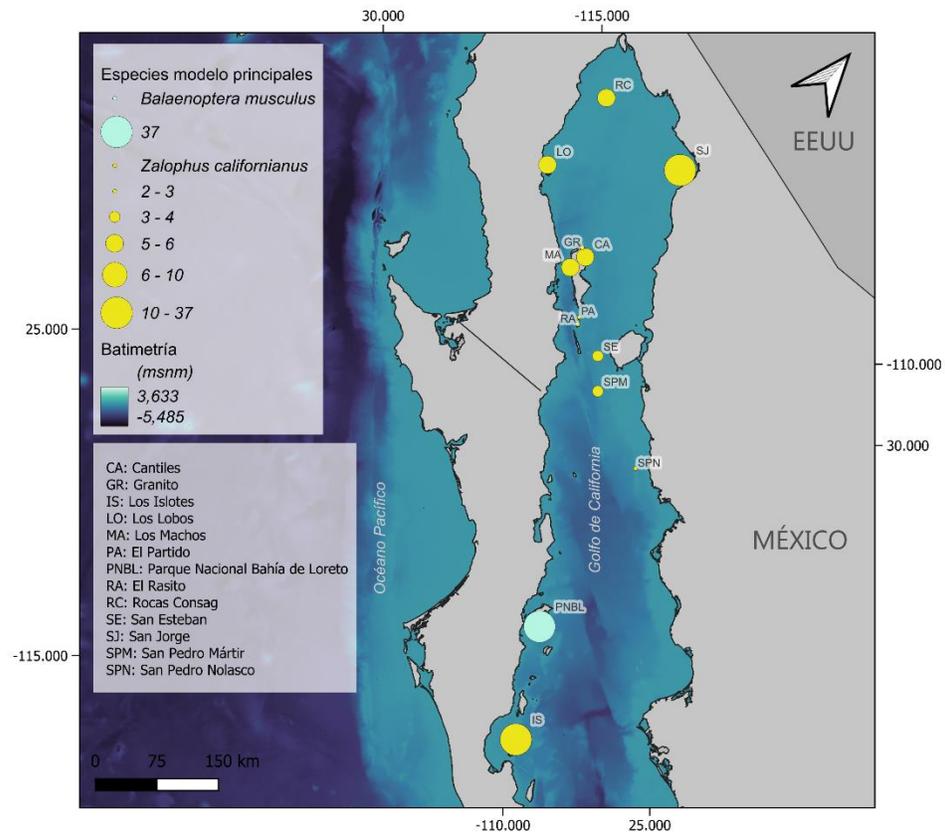


Figura 2. Área de muestreo de los organismos modelo principales. Ballena azul (*Balaenoptera musculus*) (azul celeste), y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (amarillo). El tamaño del círculo es relativo al número de muestras colectadas por sitio de muestreo.

5.4 Evaluación del estado epitelial de muestras de lobo marino de California

El estado citológico de las muestras fue evaluado mediante la tinción modificada de Papanicolau en improntas celulares, de acuerdo con Barragán-Vargas (2015) y se utilizó la clasificación acorde al sistema Bethesda (Nayar y Willbur 2015) donde las categorías comprenden células escamosas atípicas (ASC), células atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células atípicas con multinucleación e hiper cromasia y/o coilocitos (ASC-H), lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) y ausencia de daño citológico, dependiendo de la morfología observada (p. ej. hiper cromasia, binucleación, pleomorfía nuclear, anisonucleosis, etc.). Dichos diagnósticos se mencionan en los trabajos de Pereida-Aguilar (2020) y Nieves-Martínez (2022).

5.5 Evaluación de la condición corporal de ballena azul

La condición corporal (CC) de los individuos fue evaluada mediante un índice visual a partir de fotografías de identificación de las regiones corporales expuestas durante la exhalación (Casillas-Lopez 2016) y que infiere sobre la cantidad de grasa subcutánea observable. La evaluación consistió en asignar un puntaje acorde tres regiones anatómicas: columna vertebral, la región post-craneal y en los flancos. Cada región se evaluó por separado, otorgando valor de 3 para cuando la región evaluada es muy notable, 2 si es visible, 1 cuando no lo es y X en el caso de que la región a evaluar no estaba visible en la fotografía. Este método fue repetido al menos cuatro veces para eliminar sesgos y estandarizar la evaluación de la condición corporal del animal. De este modo la condición corporal del animal es el resultado de las combinaciones de cada región anatómica (ver Casillas-López 2016). Se contaba con esta información para la presente tesis.

5.6 Extracción de ADN

La extracción de ADN de los hisopados genitales del LMC que fueron muestreadas en 2016 está detallado en Pereida-Aguilar (2020). De manera general, se utilizó digestión enzimática con proteinasa k, EDTA 0.5 M y Tris HCl 1M. El ADN de las muestras de 2020 se extrajo usando el kit de extracción de QIAamp® DNA mini kit, como fue descrito por Nieves-Martínez (2022).

El ADN de los exhalados respiratorios de BA fue extraído y purificado de igual forma con el kit de extracción QIAamp® DNA Mini Kit, como se encuentra detallado en Domínguez-Sánchez (2020).

Todas las muestras se encontraban almacenadas a -20°C en el Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la institución y estaban disponibles para la presente tesis.

5.7 Elección de marcador molecular y cebadores para ITS

Se trabajó con los marcadores moleculares para las regiones ITS1 e ITS2 (Halwachs *et al.* 2017), que fueron sintetizados comercialmente por T4OLIGO (Irapuato, Gto, México). El **Cuadro 2** muestra las secuencias y el tamaño aproximado de la región diana.

Cuadro 2. Región genética y cebadores usados para identificar ADN de hongos.

Región	Forward	Reverse	Longitud aproximada
ITS1	ITS1-F	ITS2r	300 pb
	5'	5'	
	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
	3'	3'	
ITS2	ITS3	ITS4	330 pb
	5' GCATCGATGAAGAACGCA 3'	5'	
		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
		3'	
ITS2	gITS7	ITS4	330 pb
	5' GTGARTCATCGARTCTTTG	5'	
	3'	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
		3'	

Los cebadores se suspendieron en agua libre de nucleasas para obtener una concentración de trabajo de 10 μ M. Para la sub-región ITS2 se probaron las dos combinaciones (ITS3-ITS4 y gITS7-ITS4). Se optó por trabajar con el primer par (ITS3-ITS4).

5.8 Protocolo de PCR

5.8.1 Estandarización de protocolo utilizando ADN de un hongo: *Sclerotinia* sp.

Antes de proceder al análisis de las muestras se estandarizó la técnica utilizando ADN extraído de una muestra de un hongo. Específicamente, se utilizó un cultivo de *Sclerotinia* sp. que fue donado por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se efectuaron diluciones seriadas (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 y 1:10000000) con agua de grado molecular para conocer la

concentración mínima detectada por ambos pares de cebadores elegidos (para ITS1 e ITS2). Los reactivos usados para el coctel de la reacción de PCR se especifican en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Concentraciones de reactivos usados para las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración	Cantidad usada por reacción	Marca
Buffer PCR (-MgCl ₂)	10x	10%	Invitrogen ®
MgCl ₂	50 mM	3%	Invitrogen ®
dNTP	10 mM	2%	Invitrogen ®
BSA	20 mg/mL	2%	Thermo Scientific
Formamida Hi-Di	45.04 g/mol	1%	Qiagen ®
Cebador <i>Forward</i>	10 µM	5%	T4 OLIGO ®
Cebador <i>Reverse</i>	10 µM	5%	T4 OLIGO ®
Taq polimerasa	5 U/µL	1%	Invitrogen ®
Agua grado molecular	---	cbp	--
Muestra	< 100 ng/Rx	cbp	--

5.8.2 Estandarización de protocolo utilizando ADN de cultivos de hisopados genitales de lobo marino de California

Con el propósito de evaluar si los métodos de extracción de ADN usados en las muestras con las que se trabajó en esta tesis (ver Metodología 5.6), se trabajó con hisopados vaginales adicionales de 12 crías de LMC del Archipiélago de San Benito en 2023.

Cada hisopado fue sembrado en un medio selectivo para hongos (agar papa-dextrosa, PDA) y uno no selectivo, donde pueden crecer bacterias (agar chocolate, ACH). Los medios se prepararon de la siguiente manera:

- I. En una campana de extracción se prepararon 15 cajas de Petri con ca. 20 mL de PDA con ampicilina cada una y la misma cantidad con ACH.
- II. Después fueron tratados con radiación UV por 20 minutos para esterilizarlos.
- III. A continuación, se sellaron con parafilm para su transporte al Archipiélago de San Benito, Baja California Sur en verano de 2023.
- IV. Tras realizar el sembrado en *zig-zag*, cada caja fue sellada nuevamente mantenida en un lugar fresco y seco hasta su retorno al laboratorio.

- V. Una vez en el laboratorio se seleccionaron las cajas Petri en las que hubo crecimiento de microorganismos y se resembraron en nuevas cajas Petri con PDA. Paralelamente se preparó medio selectivo para levadura (YPD) para aquellas placas con colonias con apariencia levaduriforme
- VI. Se incubaron dos réplicas de cada colonia: una a temperatura ambiente y otra a 37°C.
- VII. Los microorganismos crecieron en una semana y luego fueron observados al microscopio con objetivo 40x y una gota de agua destilada para la descripción de sus estructuras microscópicas.

De cada caja con medio PDA se obtuvieron tres muestras que fueron pesadas para estimar su biomasa de hongo y se les extrajo el ADN usando un protocolo de fenol:cloroformo con las siguientes especificaciones:

- I. En un tubo de 1.5 mL se colocó la muestra del cultivo con etanol para igualar la forma en que se colectan las muestras en campo. Ese tubo se homogenizó con agitaciones suaves manualmente.
- II. Se extrajeron 250 µL de cada muestra
- III. Posteriormente se agregó 285 µL de Chelex al 5% a cada tubo
- IV. Se agregó 15 µL de SDS al 20% a 37°C a cada tubo
- V. Se homogenizó por 30" usando un agitador o vórtex
- VI. Se agregó 10 µL de proteinasa K (concentración 20mg/mL) a cada tubo
- VII. Se dejó incubando toda la noche en un rotor a 58°C por 24hrs
- VIII. Al día siguiente se agregaron 500 µL de solución de fenol:cloroformo:isoamil en proporción 25:24:1
- IX. Homogenizó por 30" en agitador o vórtex
- X. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15'
- XI. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo
- XII. Se agregaron 400 µL de etanol frío (-18°C) al 96% en cada tubo
- XIII. Se agregaron 120 µL de acetato de amonio (concentración 8M)
- XIV. Dejar incubando a -20°C por 30'

- XV. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10'
- XVI. Se retiró el sobrenadante
- XVII. Se agregaron 400 μL de etanol al 70%
- XVIII. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5'
- XIX. Se agregaron 400 μL de etanol al 70%
- XX. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5'
- XXI. Se retiró el sobrenadante y se dejó secando a temperatura ambiente en un lugar sin corrientes de aire que puedan contaminarlo
- XXII. Finalmente, se resuspendió cada tubo en agua libre de nucleasas (50 μL)

Después de la extracción, a cada alícuota se le hicieron cuatro mediciones con el espectrofotómetro NanoDrop 2000® y se promedió su concentración (ng/ μL) y calidad. Posteriormente se realizó un análisis de correlación lineal para estimar la relación biomasa:ADN extraído.

Se comparó la calidad e integridad del ADN extraído de bacterias con el de hongos con prueba no paramétrica de Wilcoxon.

5.8.3 Programa de PCR

Con el ADN extraído de las muestras de hongo (*Sclerotinia* spp. y las de los cultivos en PDA, YPD y ACH) se estandarizó el programa del termociclador de la manera en que serían trabajadas las muestras de ADN de los mamíferos marinos.

El volumen de reacción fue de 12 μL por alícuota. La cantidad de ADN agregada al coctel era variable, considerando la concentración de ADN y buscando que no fuera mayor a 100 ng por reacción, 1.2 μL de buffer 10x (Invitrogen®), 0.36 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.24 μL de dNTP (10 mM), 0.24 μL de BSA (20 mg/mL), 0.12 μL de formamida (45.04 g/mol), 0.6 μL de cebador *forward* y 0.6 μL de cebador *reverse* 10 μM), 0.12 μL de taq polimerasa (5 U/ μL), y el agua de grado molecular para completar los 12 μL de reacción (ver **Cuadro 3** para detalles de concentración). El **Cuadro 4** muestra las temperaturas, ciclos y tiempo de cada etapa.

Cuadro 4. Programa de PCR utilizado para amplificar fragmentos del gen ITS.

Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	95	60
	95	15
32	56.1* / 55**	30
	72	30
1	72	600
∞	4°	∞

*Temperatura de hibridación para los cebadores ITS1-F e ITS2r (subregión ITS1)

** Temperatura de hibridación para los cebadores ITS3 e ITS4 (subregión ITS2)
(Modificado de Schoch *et al.* 2012)

Para comprobar que no hubiera contaminación en los medios selectivos para hongos, así como evaluar la presencia de ADN viable en las muestras, se usaron pares de cebadores para la región hipervariable V₃-V₄ del gen 16S (Bakt_341F 5' CCTACGGGGGCWGCAG 3' y Bakt_805R 5'GACTACHVGGGTACTAATCC 3') de bacterias (Sinclair *et al.* 2015). El programa de PCR utilizado constó de una etapa de desnaturalización a 94°C por tres minutos; seguido de 32 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 40 segundos y 72°C por un minuto; después una etapa de elongación a 72°C por 10 minutos, el producto fue almacenado a 4° hasta realizar el gel de electroforesis en 1% de agarosa y teñida con bromuro de etidio

5.8.4 Visualización de amplicones

Se realizó la técnica de electroforesis de las reacciones en geles de agarosa al 1% (100 V por 26 minutos) teñidos con bromuro de etidio para comprobar la presencia de los productos de PCR, o amplicón, de ITS1 o ITS2. Cada gel se visualizó con ayuda del software *Image Lab* (Bio-Rad®).

5.9 Secuenciación

El ADN de las muestras positivas a material genético de hongos (es decir, las que amplificaron para ITS1 o ITS2) así como de las muestras de ADN de hongos aislados en PDA fueron enviadas al Instituto Nacional de Medicina Genómica

(INMEGEN, Cd. De México) siguiendo las especificaciones de entrega indicadas por el proveedor, y en donde fueron secuenciados en la plataforma Illumina MiSeq® (Nilsson *et al.* 2019). El laboratorio secuenció la región ITS1, que fue determinado como el más informativo (ver la sección de Resultados).

5.10 Análisis bioinformático del fungoma

5.10.1 *Análisis de calidad, filtrado de las lecturas y asignación taxonómica*

Se filtraron por calidad las secuencias pareadas con el software FASTQc (v0.12.1, Babraham Bioinformatics, www.bioinformatics.babraham.ac.uk). Se eliminaron las primeras 10 bases de las lecturas *Forward* (Fwd) y *Reverse* (Rvs). Después se truncaron las lecturas Fwd a 230 bases y las Rvs en 150 de acuerdo con su calidad en la escala Phred (Quality score <31) (O'Rawe *et al.* 2015).

Las lecturas fueron importadas al programa R (v4.3.2, R Core Team 2023) con el entorno gráfico de Rstudio (v2024.09.0.375, Posit team 2024). Se usó el paquete *DADA2* (v1.30.0; Callahan *et al.* 2016) para modelar los errores a partir de las tasas de error de las lecturas Fwd y Rvs. Posteriormente se realizó una derreplicación, se parearon las secuencias y se eliminaron lecturas quiméricas (Callahan *et al.* 2016). La asignación taxonómica se llevó a cabo tomando como base de referencia la base de datos de UNITE (versión `sh_general_release_dynamic_25.07.2023`).

5.10.2 Análisis de fungoma central: ocurrencia y abundancia de hongos

Usando el paquete *Phyloseq* (v1.46.0; McMurdie y Holmes 2013) se filtraron las secuencias que la base de datos identificó como especies micóticas y se crearon objetos *Phyloseq* para cada especie que fue positiva a ITS1 y que se secuenció (ballena azul, lobo marino de California, ballena gris, cachalote, elefante marino del Norte y las muestras de hisopados genitales de LMC en PDA). En el caso de las muestras de BA, al contar con más de una muestra de soplo por individuo, se seleccionó una muestra ITS1 positiva por ballena y por año para realizar análisis individuales y después se creó otro *subset* de datos para analizar el fungoma por soplos. Para los estudios de alfa y beta diversidad (ver Metodología 6.10.4) se continuó con el *subset* que corresponde a una muestra de ITS1 por individuo y por año para

Se realizaron gráficos de Krona en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) para analizar la composición del fungoma por especie. En el caso de la BA, para construir este gráfico se omitieron los datos de fungoma de los controles técnicos (agua de mar y estornudo de CADS). También se construyeron gráficos de barras con las abundancias relativas de cada hongo (agrupados a nivel de Clase) para observar la abundancia relativa de los hongos por muestra.

Posteriormente se crearon gráficos de dispersión para visualizar la ocurrencia y abundancia de hongos para cada especie con el paquete *ggplot2* (v3.5.1; Wickham 2016). Para el LMC y la BA se usó como límite de prevalencia el 75% y lecturas mayores al 2% en abundancia para establecer los taxones centrales (Neu *et al.* 2021). El fungoma por muestra se analizó con gráficos de barras apiladas transformando las abundancias en porcentajes con el paquete *ggplot2* (v3.5.1; Wickham 2016).

5.10.3 Análisis de fungoma con el uso de redes de co-ocurrencia

Debido al número de individuos que pudieron ser secuenciados, el análisis de redes de co-ocurrencia de ASVs sólo se pudo realizar para las muestras de LMC y BA a

partir de una matriz de adyacencia calculada con el paquete *SpiecEasi* (v1.1.3; Kurtz *et al.* 2015) usando el método Meinshausen-Bühlmann (mb) que estima una matriz inversa de covarianza para seleccionar los nodos vecinos de cada ASV (Matchado *et al.* 2021). Posteriormente se usó el paquete *igraph* (v2.0.3; Csardi y Nepusz 2006) para convertir la matriz de adyacencia en una red no dirigida y no ponderada. Se estimaron las características topográficas de las redes de co-ocurrencia (*Degree*, diámetro, distancia media e índice de clusterización) y se usó el método de *Edge betweenness* para identificar las comunidades de ASVs que más co-ocurren en los hospederos.

5.10.4 Descripción del fungoma: alfa y beta diversidad

Se construyeron gráficos de rarefacción con el paquete BiodiversityR (v2.16-1) para visualizar si el tamaño de muestra empleado fue el adecuado (Zou *et al.* 2023) sólo para el caso del LMC y la BA, debido a que en las otras especies hubo menor o igual a tres muestras secuenciadas.

Se ordenaron los ASVs del más abundante al menos abundante para crear curvas de Whittaker (*rank abundance curves*; Bastow 1991). Se usó su abundancia relativa dado el tamaño heterogéneo de las muestras por hospedero.

Para describir la diversidad alfa se usaron los índices de riqueza (o número de especies observadas), Chao1, Shannon, Pielou y Simpson. El índice de **Chao 1** se calcula de la siguiente manera:

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

donde:

S_{obs} = El número de especies observadas en la muestra (riqueza de la muestra).

n_1 = El número de especies que solamente se observaron una vez en la muestra (*singletons*).

n_2 = El número de especies que se observaron dos veces en la muestra (*doubletons*) (Hughes *et al.* 2001).

El índice de **Shannon (H')** se calcula con la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i * \log (p_i)$$

donde:

P_i = probabilidad de encontrar a la especie *i* en la muestra

S = la riqueza de la muestra (Brouwer *et al.* 2023).

El índice de **Pielou (J)**, que es la normalización del índice H', se calcula con la fórmula:

$$J = \frac{H'}{\log (N)}$$

Siendo N el número de especies encontrados en la muestra (Brouwer *et al.* 2023).

Y, finalmente, el índice de **Simpson (λ)**, que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\lambda = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

siendo:

p_i= la probabilidad de la especie *i*

S = la riqueza de la muestra (López *et al.* 2017).

Estos índices de diversidad alfa fueron estimados con el paquete *Vegan* (vers. 2.6-4). Se hicieron dos aproximaciones para evaluar la riqueza: la primera considerando los datos por especie y la segunda por muestra individual.

Para la diversidad beta se construyeron matrices de distancia UniFrac, UniFrac ponderada, Bray-Curtis y Jaccard. La distancia **UniFrac** se calcula como:

$$UF = \sum_i^n b_i * \left[\frac{A_i}{A_T} - \frac{B_i}{B_T} \right]$$

donde:

n = número de ramas del árbol filogenético

b_i = la longitud de la rama i

A_i = número de secuencias que descienden de la rama i en la comunidad A

B_i = número de secuencias que descienden de la rama i en la comunidad B

A_T = número de secuencias totales en la comunidad A

B_T = número de secuencias totales en la comunidad B (Kers y Sacenti 2022).

La medida **UniFrac ponderada** le asigna peso a cada rama del árbol filogenético dependiendo de su abundancia relativa, pero se calcula de la misma forma que UniFrac (Kers y Sacenti 2022).

Siendo A y B dos comunidades diferentes, la distancia de **Jaccard** se puede obtener con la siguiente fórmula (Kers y Sacenti 2022):

$$Jacc_{similitud}(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Finalmente, la distancia de Bray-Curtis se calcula de la siguiente manera:

$$BC = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

donde:

C_{ij} = es la suma de los valores mínimos de individuos de especies presentes en ambas comunidades i y j .

S = es la riqueza tanto del sistema i como del j (Kers y Sacenti 2022).

Las matrices de distancia de la diversidad beta fueron estimadas con el comando *vegdist* del paquete *vegan* (v2.6-4) y posteriormente visualizados en *heatmaps* (paquete *pheatmap* v1.0.12; Kolde 2018). A continuación, se realizaron análisis de coordenadas principales (PCoA) con la función *ordinate* del paquete *phyloseq* (v1.46.0; McMurdie y Holmes 2013), y para conocer la cantidad de ASVs que

compartieron los organismos modelo, se usó el paquete *ggVennDiagram* (v1.5.2; Gao *et al.* 2021) para construir un diagrama de Venn.

5.10.5 Análisis de fungoma-bacterioma

Con los datos de bacterioma de LMC disponibles a partir del estudio de Pereida-Aguilar *et al.* (2023), que corresponden a los mismos individuos de 2016 usados en esta tesis, así como los datos del bacterioma de BA de 2016 y 2017 de Domínguez-Sánchez (2020) se analizó la relación entre hongos y bacterias en los epitelios de los individuos muestreados. Para esto, se construyeron *heatmaps* a partir de una matriz de adyacencia ponderada que se calculó con la opción *getOptBeta* del paquete *SpiecEasi* (v1.1.3; Kurtz *et al.* 2015). Cada celda se agrupó por familia de bacterias y hongos, y su nivel de asociación se graficó visualmente en un *heatmap*. Posteriormente se construyeron redes de co-ocurrencia de hongos y bacterias usando el método de Meinshausen-Bühlmann del paquete *SpiecEasi* (v1.1.3; Kurtz *et al.* 2015) en el software R (v4.3.2, R Core Team 2023). En este caso, la identificación de las comunidades de co-ocurrencia de hongos y bacterias se intentó estimar con el método de *Edge betweenness*, sin embargo, requirió de mayor poder computacional que no fue posible estimarlo, por lo que se realizó la aproximación con el método Louvain.

A continuación, se calculó una matriz de adyacencia ponderada (*getOptBeta*) con la que se construyó un *heatmap* con el paquete *pheatmap* (v1.0.12; Kolde 2018) para observar las familias de hongos que más co-ocurren con las familias de bacterias de los hospederos.

5.11 Análisis estadístico

Para evaluar qué marcador molecular tuvo mayor sensibilidad para detectar ADN fúngico se realizaron pruebas de proporciones en RStudio (v2024.09.0.375, Posit team 2024). Además, para el caso del LMC y BA se realizaron pruebas de Fisher y

Chi cuadrada para determinar si la condición epitelial o la condición corporal se relacionaban con la sensibilidad de la PCR. Para estos casos se excluyeron los individuos que no contaban con diagnóstico citológico (para LMC) o evaluación de su condición corporal (para la BA).

Se hizo una transformación logarítmica de las abundancias de cada ASV y se compararon entre diferentes condiciones para conocer qué grupos de hongos tienen mayor abundancia en cada caso usando pruebas T de Student o de Wilcoxon para las variables binarias y ANOVA o Kruskal-Wallis para las variables de más de tres categorías después de identificar si la distribución de las abundancias era normal o no con la prueba de Shapiro y plots Q-Q.

a) En el caso del LMC las variables respuesta fueron:

1. Estado del epitelio genital (incluyendo la clasificación ASC, ASC-US, LSIL o HSIL como una que comprenda a todas “ASCLSIL”) y epitelio sano.
2. Presencia de ADN de herpesvirus (OthV-1).
3. Presencia de ADN de papilomavirus (zcPV-1).

Las co-variables fueron:

Por grupo etario: adultos y crías/juveniles

Por región ecológica: Región Norte (Rocas Consag, San Jorge e Isla Lobos), Región de las Grandes Islas (Granito, Cantiles, Los Machos y Partido), Región Central (San Esteban, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco y El Rasito), y Región Sur (Farallón de San Ignacio y Los Islotes) (Szteren y Auriolos 2011).

b) Para la BA las variables respuesta fueron:

1. Condición corporal (buena, mala y regular. Se excluyeron los individuos para los que no se contó con información de condición corporal).

Las covariables fueron:

Sexo (macho y hembra). Se excluyeron los individuos para los que no se conoció el sexo.

Se estimó una tasa de abundancia de Basidiomycota:Ascomycota y se evaluó si dicha relación era diferente en LMC con cambios epiteliales y sin cambios (Li *et al.* 2023).

Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro y plots Q-Q) para los índices de diversidad alfa y se compararon entre sí de acuerdo a las variables mencionadas, considerando un 95% IC y 5% de error tipo I.

Se realizó una prueba de ANOVA para estimar diferencias entre los índices de alfa diversidad entre cada uno de los mamíferos marinos de esta tesis y se visualizó con gráficos de cajas y bigotes.

La diversidad beta se calculó mediante un análisis de PERMANOVA (función `adonis2` del paquete *vegan*, v2.6-4; Oksanen *et al.* 2022) usando matrices de distancia (UniFrac, UniFrac ponderada, Bray-Curtis y Jaccard) (Pannoni *et al.* 2022) con base en las mismas variables antes mencionadas.

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de protocolo de PCR

6.1.1 Estandarización de protocolo de PCR con ADN de *Sclerotinia* sp.: concentración mínima detectable

Tras las diluciones seriadas del ADN del hongo *Sclerotinia* sp. se observó que son necesarios, al menos, 0.003 ng/ μ L de ADN fúngico en la muestra para que pueda ser detectado por ambos pares de cebadores para las regiones ITS1 e ITS2 (**Fig. 3A y 3B**). Respecto a los pares para la región ITS2 (ITS3-ITS4 y gITS7-ITS4) los pesos moleculares son diferentes. El par gITS7-ITS4 amplifica una región ligeramente menor que el par ITS3-ITS4 (**Fig. 3C**). Para el resto de los análisis de ITS2 en las muestras de ADN de los mamíferos marinos se optó por los pares ITS3 e ITS4.

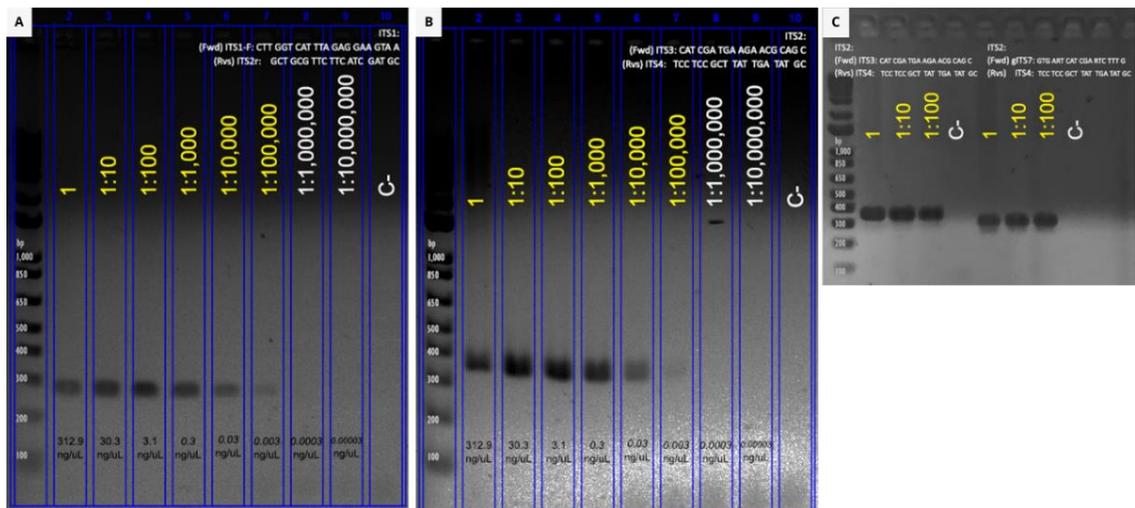


Figura 3. Concentración mínima necesaria para detectar ADN micótico. Para ITS1 (A) y para ITS2 (B), diluyendo ADN de *Sclerotinia* sp. como control. Se observa también diferente peso de la banda de una misma región, ITS2, usando set de primers distintos (C).

6.1.2 Estandarización de protocolo de PCR con ADN de cultivos de hisopados genitales de lobo marino de California

Hubo crecimiento de hongos en cuatro cajas de Petri con PDA, y en ocho cajas de Petri con ACH (**Cuadro 5**). Las colonias en PDA tenían morfologías diferentes: dos eran algodonosas (23BE06, **Fig. 4A**; y 23BE35, **Fig. 4B**), una con apariencia

mucoide, rosa brillante (23BE36, **Fig. 4C**) y la cuarta tenía pequeñas colonias negras diseminadas (23BE39, **Fig. 4D**); por otro lado, las colonias en ACH tenían coloración amarillenta, mucoide y brillante.

Cuadro 5. Hisopados genitales de individuos de lobo marino de California aislados en medios de cultivos. Agar Papa-Dextrosa (PDA) y agar chocolate (ACH).

PDA	ACH
23BE04	
23BE05 ✓	23BE05 ✓
23BE06	
23BE15	23BE15 ✓
23BE17	23BE17 ✓
23BE20	23BE20 ✓
	23BE28 ✓
	23BE28A ✓
23BE30	23BE30 ✓
23BE35 ✓	23BE35 ✓
23BE36 ✓	
23BE39 ✓	

Las muestras marcadas con palomilla (✓) indican que hubo crecimiento de colonias de microorganismos

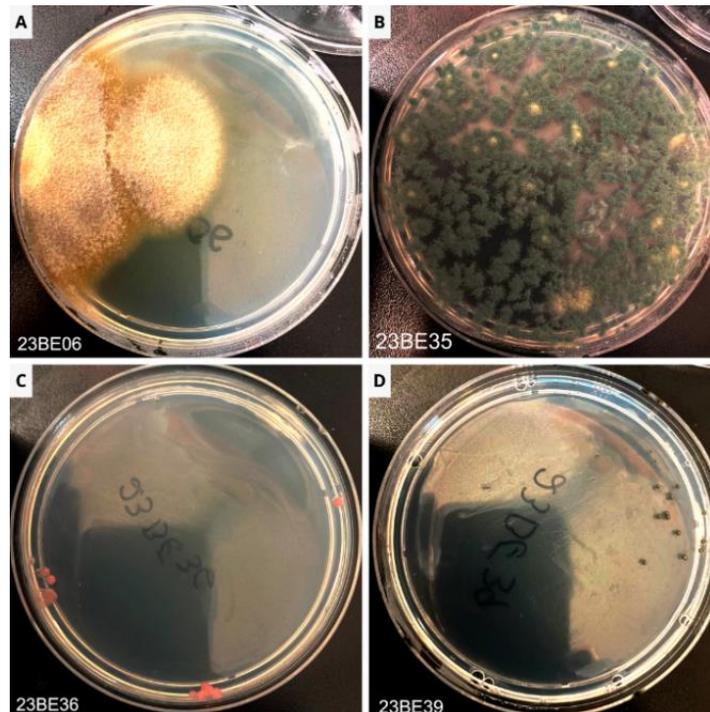


Figura 4. Morfología macroscópica de colonia de los hisopados vaginales en PDA de lobo marino de California del Archipiélago de San Benito, BC.

Después de la resiembra de cada morfotipo, donde sólo hubo crecimiento de colonias en las que fueron cultivadas a temperatura ambiente, se pudo observar al microscopio las estructuras reproductivas de los hongos (**Fig. 5**). De la muestra 23BE35 se aislaron cuatro morfologías diferentes (**Fig. 5D a 5O**).

Tras las mediciones de concentración y calidad del ADN de cada muestra y sus réplicas (**Cuadro 6**), se encontró una concentración significativamente mayor de ADN (ng/ μ L) en las muestras de bacterias que en las de hongos (Prueba de Wilcoxon, $p=0.0001$), aunque no se estimó la biomasa de las bacterias previo al protocolo de extracción; no se encontraron diferencias significativas en la pureza del ADN extraído con la relación de absorbancia 260/280 (Prueba de Wilcoxon, $p>0.05$), pero sí con la relación 260/230 (Prueba de Wilcoxon, $p=0.002$), siendo este valor más bajo para los hongos usando el mismo protocolo de extracción para ambos casos (**Fig. 6**).

A partir de la biomasa y de las mediciones de ADN extraído se observó una correlación negativa significativa entre ambas variables (Cor = -0.27, $r^2 = 0.073$, $p = 0.0307$, **Fig. 7A**). Cuando se realizó la misma prueba para cada morfotipo por separado, para tres muestras (23BE35P1, 23BE35P3 y 23BE36P) la correlación fue estadísticamente significativa (**Fig. 7C, 7D y 7F**).

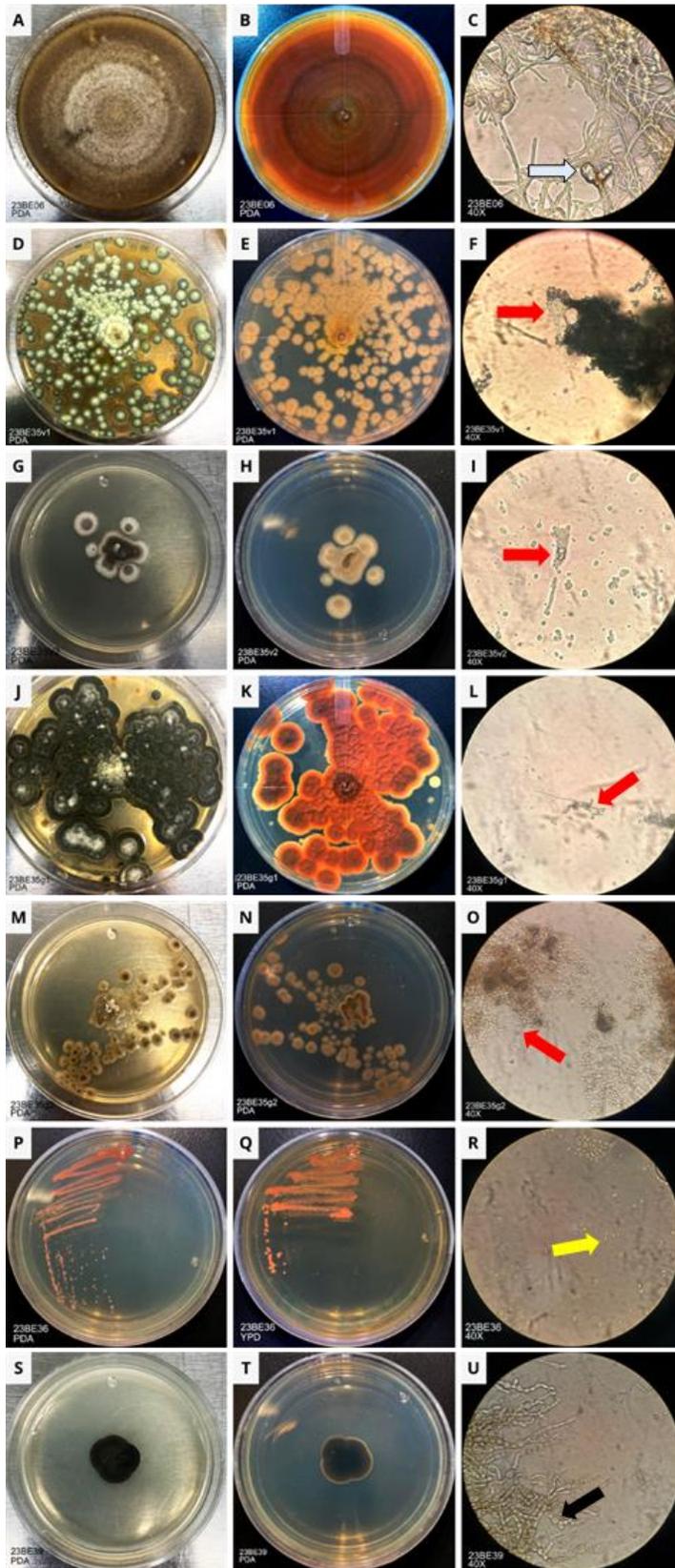


Figura 5. Morfología macroscópica y microscópica de los hongos cultivados a partir de las muestras de hisopado genital de lobo marino de California del Archipiélago de San Benito. Se observa un crecimiento concéntrico, de apariencia algodonosa y color marrón: vista superior (A) y vista inferior (B); vista al microscopio objetivo 40x (C). Se aprecia un cuerpo fructífero (flecha azul con borde negro). Muestra 23BE35 morfología P1 al día 9 crecido a temperatura ambiente en PDA. Tiene un crecimiento diseminado multifocal, de centro blanquecino y borde verde: vista superior (D), y vista inferior (E); vista al microscopio objetivo 40x (F). Muestra 23BE35 morfología P2 al día 9 crecido a temperatura ambiente en PDA. De crecimiento lento, con seis colonias con tendencia a fusionarse, algodonoso y con gotas de exudado, de centro oliváceo y bordes blanquecinos: vista superior (G), vista inferior (H) y al microscopio objetivo 40x (I). Muestra 23BE35 morfología P3 al día 9 crecido a temperatura ambiente en PDA. Múltiples focos que coalescen, de apariencia ligeramente algodonosa, de centro blanquecino seguido por un anillo anaranjado y un halo verde oscuro: vista superior (J), inferior (K) y al microscopio objetivo 40x (L). Muestra 23BE35 morfología P4 al día 9 crecido a temperatura ambiente en PDA. Múltiples focos, pero no cubren la placa, de apariencia brillante, centro marrón y un halo amarillento: vista superior (M), inferior (N), y al microscopio objetivo 40x (O). Se observan cuerpos fructíferos con numerosas esporas en las regiones terminales de las hifas (flechas rojas). Muestra 23BE36 al día 5 crecida en PDA (P) y en YPD (Q), en ambos casos a temperatura ambiente. La colonia es color rosa brillante y de apariencia mucóide. Al microscopio, objetivo 40x (R) se observan las levaduras y una pseudohifa (flecha amarilla). Muestra 23BE39 al día 10 en PDA crecida a temperatura ambiente. Se observan al menos tres colonias de crecimiento muy lento, hiperpigmentadas y que coalescen: vista superior (S) e inferior (T). Al microscopio, 40x (U), se observan hifas tabicadas de apariencia globosa (flecha negra) y no se observaron esporas.

Cuadro 6. Concentración y calidad de ADN de las colonias crecidas en medio PDA y ACH.

Muestra	Biomasa (mg)	ng/ μ L	260/280	260/230
23BE06P	12	508.35	1.95	1.61
	56	249.83	1.80	1.10
	11	61.25	1.90	1.00
23BE35P1	5	38.05	1.66	0.70
	10	28.70	1.77	0.78
	6	72.47	1.77	0.90
23BE35P2	<1	139.15	1.97	1.62
	<1	118.10	1.91	0.96
	1	309.65	2.02	1.75
23BE35P3	7	68.05	1.72	0.69
	3	62.47	1.46	0.62
	8	37.00	1.77	0.57
23BE35P4	13	108.08	1.66	0.78
	6	26.92	1.71	0.52
	2	23.05	1.55	0.35
23BE36P	7	156.50	1.98	1.15
	3	138.80	1.98	1.27
	1	151.70	1.99	1.30
23BE39P	<1	28.53	1.47	0.59
	<1	18.78	1.52	0.30
	<1	43.95	1.41	0.43
ACH_23BE05	ND	756.90	1.84	1.79
ACH_23BE15	ND	253.60	1.85	1.71
ACH_23BE17	ND	696.00	1.49	1.11
ACH_23BE20-1	ND	311.10	1.76	1.65
ACH_23BE20-2	ND	131.20	1.52	1.01
ACH_23BE28	ND	231.90	1.63	1.47
ACH_23BE28-A	ND	477.10	1.80	1.52
ACH_23BE30	ND	138.90	1.93	1.19
ACH_23BE33	ND	327.10	1.92	1.39
ACH_23BE35	ND	341.40	1.89	1.73

ND= Sin datos. Mediciones hechas con el espectrofotómetro NanoDrop 2000®.

NOTA: en negritas se resalta el vial utilizado para la secuenciación por tener más alta concentración de ADN y calidad.

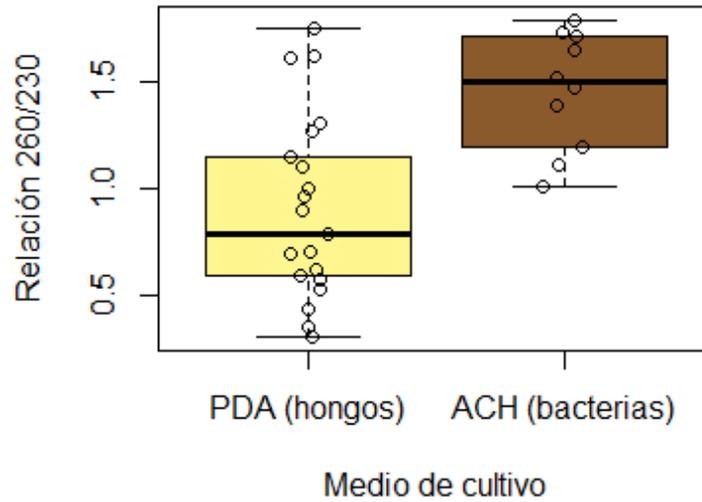


Figura 6. Calidad del ADN extraído de colonias aislada en medios de cultivo PDA y ACH

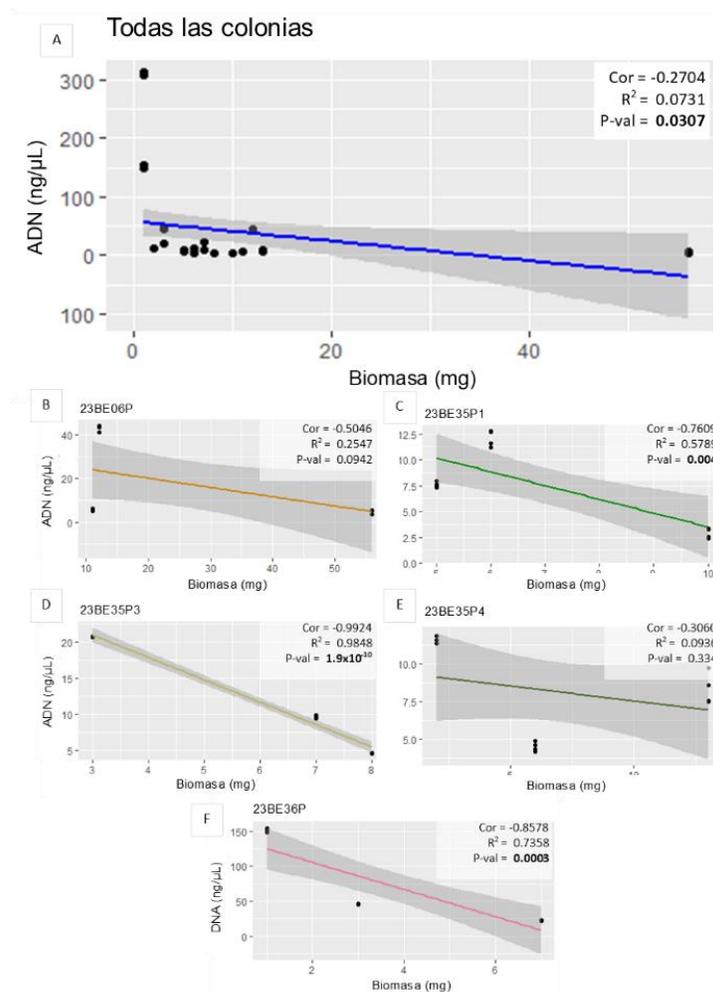


Figura 7. Pruebas de correlación de biomasa de hongo y ADN extraído para las muestras de hisopado genital de LMC en medio PDA. No fue posible detectar biomasa para las muestras 23BE35v2 ni 23BE39.

Finalmente, se constató que el ADN extraído en medios PDA pertenecía a hongos y no a bacterias pues amplificó para ITS1 e ITS2, pero no para el gen bacteriano 16S, y de igual manera las colonias crecidas en ACH amplificaron para el gen bacteriano 16S pero no para ITS1 o ITS2 (**Fig. 8**).

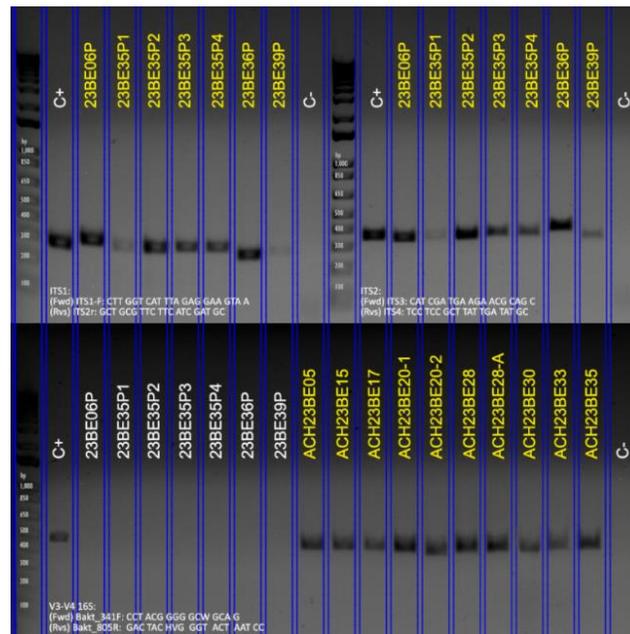


Figura 8. PCR para los genes ITS1, ITS2 y 16S de los cultivos de hisopado genital de LMC en PDA y ACH. Se observa que algunas muestras tienen más afinidad por un marcador que otro (ITS1, superior izquierda; ITS2, superior derecha). Las colonias de hongos no amplificaron para 16S y las colonias de ACH sí (abajo).

6.1.3 Potenciadores de PCR

Una vez que se estandarizó el protocolo de PCR, se observó que en algunas muestras no era evidente la presencia de bandas de amplicón pese a estar presente. Para subsanar esto, se adicionaron potenciadores de PCR como albúmina de suero bovino (BSA) y formamida, resultando en bandas más visibles (**Fig. 9**). Por ese motivo, para las pruebas con ADN de muestras de mamíferos marinos se continuó utilizando ambos potenciadores en las reacciones de PCR.

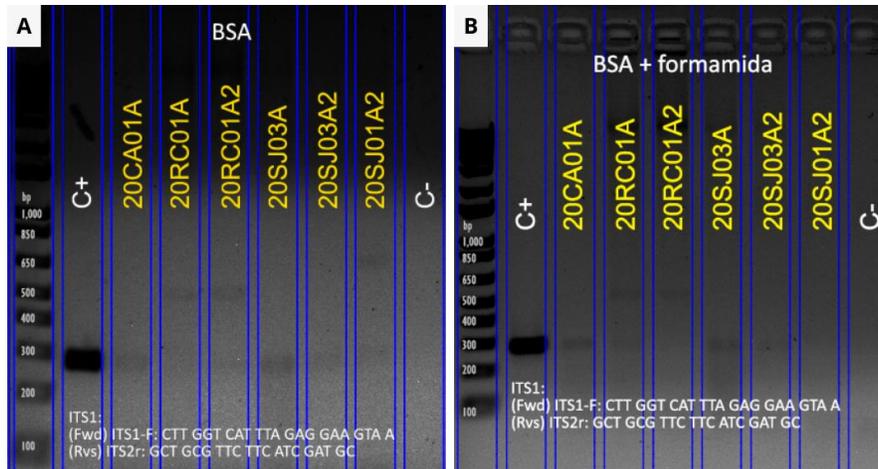


Figura 9. Uso de potenciadores de PCR mejora la claridad de las bandas. La adición de BSA + formamida a la reacción de PCR mejora la nitidez de las bandas (derecha).

6.2 Muestras de mamíferos marinos positivas a ITS1 o ITS2

Tras las reacciones de PCR para ITS1 e ITS2 se obtuvieron 16 ballenas azules positivas a ITS1 y nueve para ITS2; una muestra de ballena gris positiva a ITS1; dos de cachalote positivas a ITS1; cinco muestras positivas a ITS1 y dos a ITS2 de elefante marino del Norte; una muestra positiva para ITS1 e ITS2 de manatí del Caribe; 19 lobos marinos de California positivos a ITS1, y tres controles técnicos positivos a ITS1 y dos a ITS2 como se observa en el **Cuadro 7** y **Figura 10**. Debido a la escasez del material genético disponible para las muestras de manatí del Caribe no fue posible secuenciar estas muestras.

Las dos muestras de heces de cachalote, positivas a ITS1, presentaron una banda muy tenue (**Fig 11A**); la muestra de soplo de ballena gris mostró una banda tenue para ITS1, pero no para ITS2, y al reamplificar el amplicón de ITS1 fue posible observar dos bandas bien delimitadas (**Fig 11B**). De manera general, comparando todas las muestras con las que se trabajó, se observó una mayor proporción de individuos positivos a ITS con la subregión ITS1 que con ITS2 (prueba de proporciones, $p=1.319 \times 10^{-5}$) (**Fig. 11E**).

Cuadro 7. Muestras de mamíferos marinos a las que se le analizó ADN en busca de ITS1 e ITS2.

Especie	Número de muestras	Número de individuos	Individuos positivos a ITS1	Individuos positivos a ITS2
<i>Arctocephalus townsendii</i>	12	10	0	0
<i>Balaenoptera musculus</i>	104	37	16	9
<i>Balaenoptera physalus</i>	5	5	0	0
<i>Callorhinus ursinus</i>	1	1	0	0
<i>Delphinus capensis</i>	1	1	0	0
<i>Eschrichtius robustus</i>	4	4	1	0
<i>Megaptera novaeangliae</i>	1	1	0	0
<i>Mirounga angustirostris</i>	56	42	5	2
<i>Phoca vitulina</i>	2	2	0	0
<i>Phocarcctos hookari</i>	2	2	0	0
<i>Physeter macrocephalus</i>	19	18	2	0
<i>Trichechus manatus</i>	7	4	1	1
<i>Zalophus californianus</i>	143	83	19	0
<i>Zalophus wollebaecki</i>	2	2	0	0
CADS	3	1	2	1
Agua de mar	3	3	1	1
TOTAL	365	216	47	14

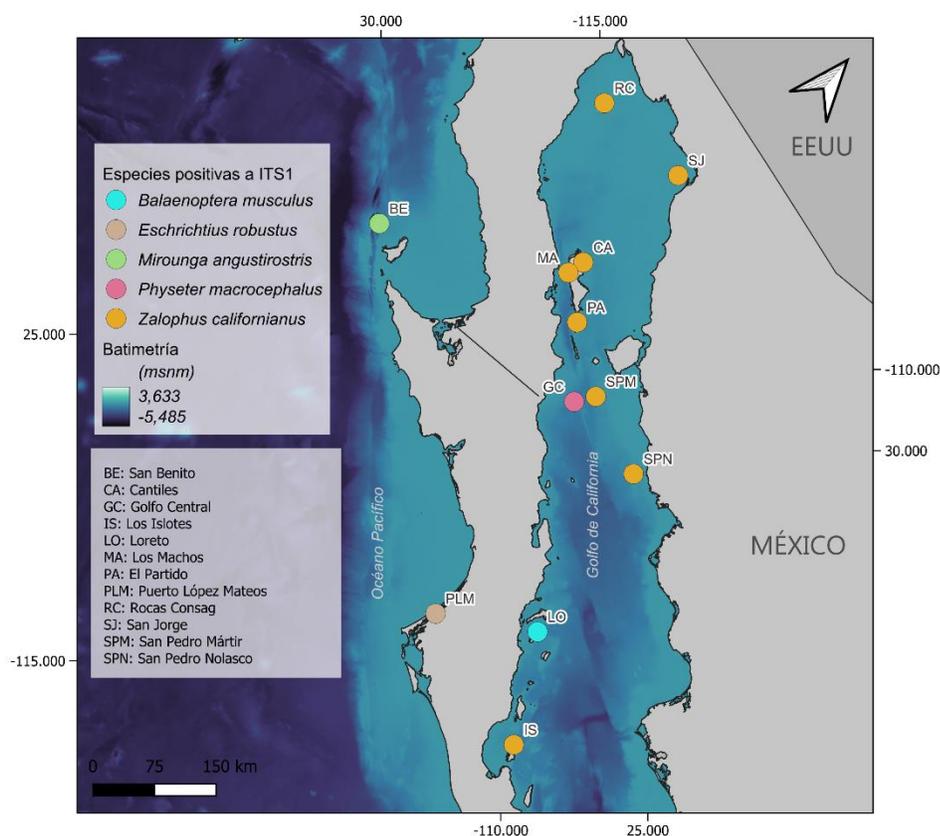


Figura 10. Localización de los animales positivos con muestras positivas a ITS1.

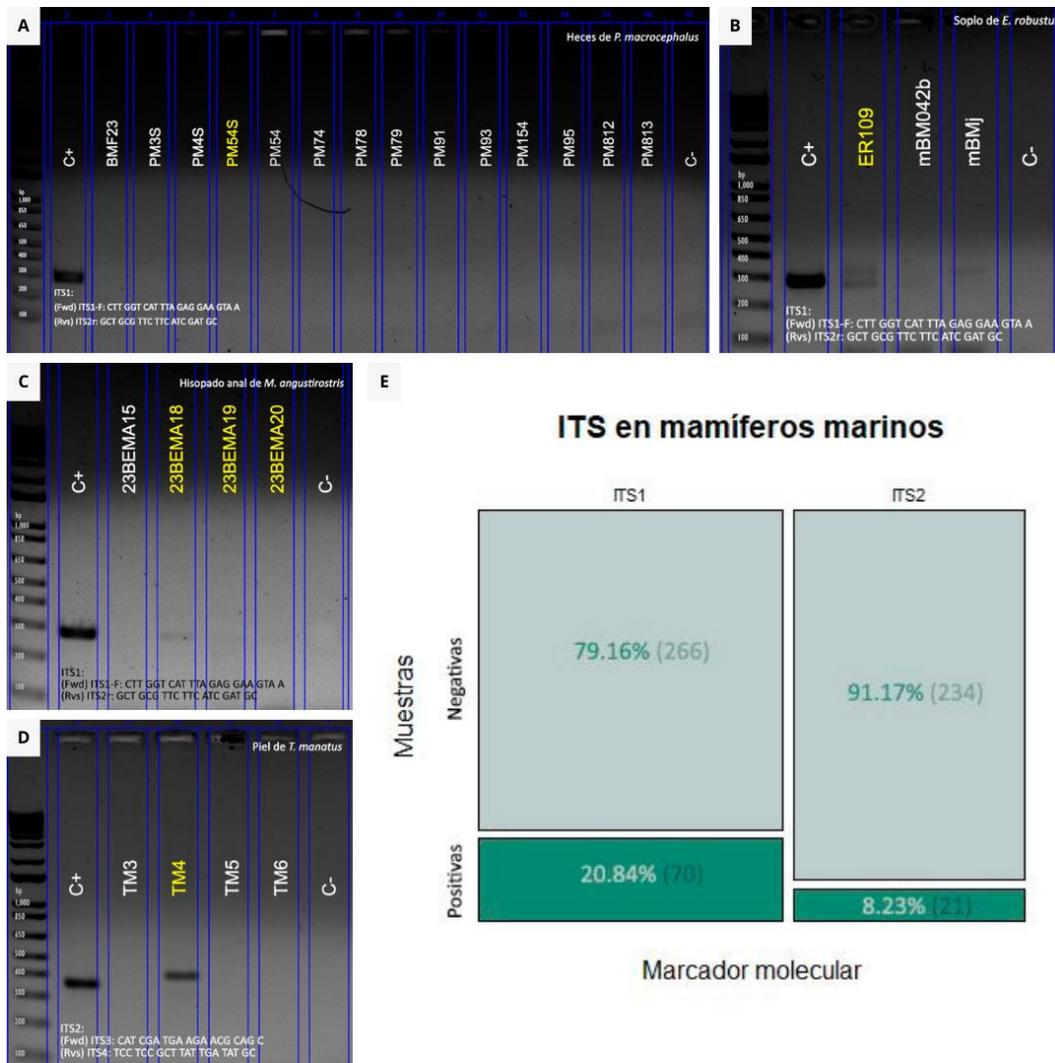


Figura 11. Geles de electroforesis de algunas muestras de mamíferos marinos. La etiqueta de la muestra positiva está resaltada en amarillo. (A) Muestra PMS54 de heces de *P. macrocephalus* positiva a ITS1. (B) Muestra ER109 de soplo de *E. robustus*. Las muestras mBM042b y mBMj pertenecen a mocos de dos individuos *B. musculus*, también positivas a ITS1. (C) Muestras 23BEMA18, 23BEMA19 y 23BEMA20 de hisopado anal de *M. angustirostris* positivas a ITS1. (D) Muestra TM4 de piel de *T. manatus* positiva a ITS2. (E) Gráfica de mosaico del porcentaje de detección de ITS para los dos tipos de cebadores ITS1 e ITS2.

6.2.1 Muestras positivas para ITS1 o ITS2 de lobo marino de California

Se utilizaron 143 muestras de LMC que incluían 128 de hisopado vaginal, 10 de moco vaginal, 2 biopsias de epitelio vaginal, y 3 de piel correspondientes a 83 individuos. Se obtuvieron 21 muestras positivas a ITS1 (14.7%), correspondientes a 19 individuos de las colonias reproductivas de los Islotes, Los Machos, El Partido, Rocas Consag, San Jorge, San Pedro Nolasco, San Pedro Mártir y Cantiles

(Cuadro 8) y ninguna para ITS2 (Fig. 12). Se develó que ITS1 es más informativo que ITS2 (prueba de proporciones, $p=9.115 \times 10^{-6}$).

Cuadro 8. Individuos de LMC positivos a ITS1 y sus variables de estudio.

ID	Año	Colonia	Región	Grupo etario	OtHV-1 ¹	zcPV1 ²	Bethesda
16IS03AG	2016	Islotes	Sur	Adulto	P	P	ND
16MA02AG	2016	Los Machos	Media	Adulto	P	P	ASC
16MA04AG	2016	Los Machos	Media	Adulto	P	N	ASC
16PA01AG	2016	Partido	Media	Adulto	P	P	N
16RC01AG	2016	Rocas	Norte	Adulto	P	P	LSIL
16RC03AG	2016	Consag Rocas	Norte	Adulto	P	P	LSIL
16SJ03AG	2016	San Jorge	Norte	Adulto	P	P	ASC
16SJ04AG	2016	San Jorge	Norte	Adulto	P	P	N
16SJ06AG	2016	San Jorge	Norte	Adulto	P	P	ND
16SJ07AG	2016	San Jorge	Norte	Adulto	P	P	ASC
16SJ18CG	2016	San Jorge	Norte	Cría	ND	ND	ND
16SJ19CG	2016	San Jorge	Norte	Cría	ND	ND	ND
16SJ20CG	2016	San Jorge	Norte	Cría	ND	ND	ND
16SN01AG	2016	San Pedro	Central	Adulto	P	N	ASC
16SPM03AG	2016	Nolasco San Pedro	Central	Adulto	P	N	ASC
20CA01A	2020	Cantiles	Media	Adulto	N	N	N
20RC01A	2020	Rocas	Norte	Adulto	N	N	N
20SJ01A	2020	Consag San Jorge	Norte	Adulto	N	N	ND
20SJ03A	2020	San Jorge	Norte	Adulto	N	N	N

¹ Otarine Herpesvirus-1; ² *Zalophus californianus* Papillomavirus-1; (P) positivo; (N) negativo; (ND) no determinado

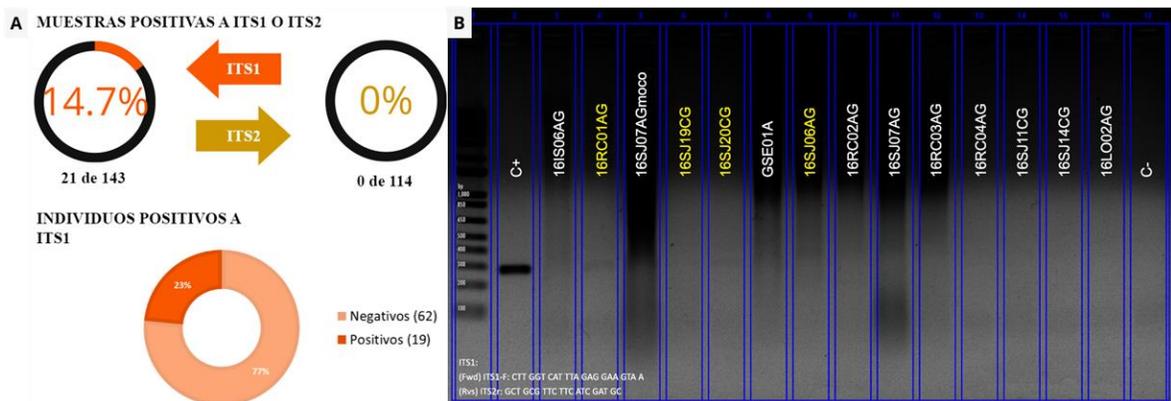


Figura 12. Muestras e individuos de LMC positivos a ITS1. (A) Porcentaje de muestras e individuos positivos a ITS1 e ITS2. (B) Gel de electroforesis de algunas muestras positivas a ITS1.

La condición epitelial no se asoció a la detección de la subregión ITS1 en los individuos muestreados (prueba Chi cuadrada, $p=0.08396$, **Fig. 13**).

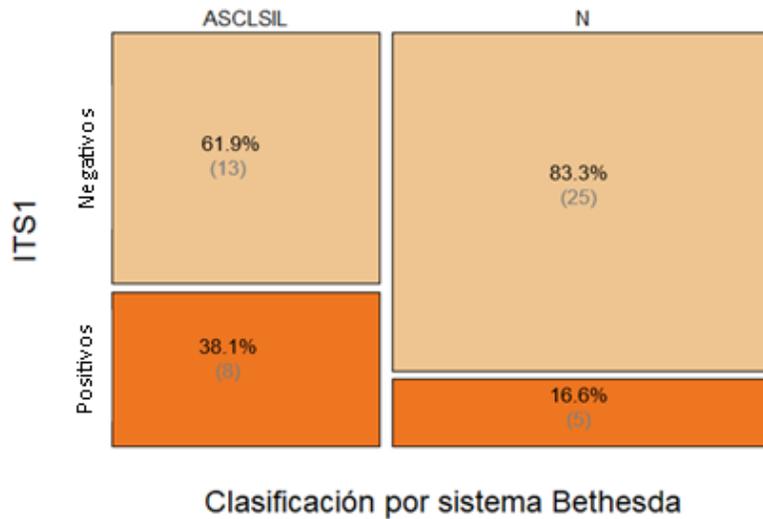


Figura 13. ITS1 y transformación epitelial en LMC. Porcentaje de individuos positivos a ITS1 en relación a su diagnóstico citológico del epitelio genital. Se excluyeron 30 individuos (seis positivos y 24 negativos) que no contaban con diagnóstico epitelial.

6.2.2 Muestras positivas para ITS1 o ITS2 de ballena azul

Se contó con 104 muestras de esta especie (99 de exhalado respiratorio, cuatro de moco y una de heces), correspondientes a 37 individuos. Además, se contó con seis controles técnicos que incluían agua de mar (tres) y estornudo del operador del dron (tres) (CADS). Se detectaron 24 de 104 muestras positivas a ITS1 o ITS2 (23.08%) que corresponden a 16 individuos, además de dos controles técnicos y uno ambiental positivos (**Cuadro 9**), y con una prueba de proporciones se pudo estimar que el marcador ITS1 detectó significativamente más ADN de hongos que el ITS2 (prueba de proporciones, $p=0.0069$) (**Fig. 14**).

Cuadro 9. Individuos de ballena azul positivos a ITS1 o ITS2 y sus variables de estudio.

ID	Muestra	Año	Sexo	Tipo de muestra	ITS 1	ITS 2	V	DPC	C	CC
325	BM025B	2016	Hembra	Exhalado	P	P	2	2	2	REGULAR
	BM051B	2017			P	P	1	1	1	BUENA
329	BM026	2016	Hembra	Exhalado	P	N	3	2	2	MALA
540	BM027	2016	No ID	Exhalado	P	N	3	3	3	MALA
012	BM033	2016	Macho	Exhalado	P	P	2	2	2	REGULAR
900	BM040B	2016	No ID	Exhalado	P	N	ND	ND	ND	DESC.
	BM040C				ND	P				
240	BM041A	2017	Macho	Exhalado	P	N	1	1	1	BUENA
	BM041B				ND	P				
304	BM043C	2017	Hembra	Exhalado	P	N	1	1	1	BUENA
	BM044A				N	P				
144	BM045A	2017	Macho	Exhalado	P	N	1	1	1	BUENA
	BM088	2018			P	ND	ND	ND	ND	DESC.
049	BM048B	2017	Hembra	Exhalado	P	P	1	1	1	BUENA
885	BM055	2017	No ID	Exhalado	P	P	1	1	1	BUENA
480	BM057	2017	Hembra	Exhalado	P	P	2	2	2	REGULAR
523	BM042ma	2017	Hembra	Moco	ND	P	1	2	1	BUENA
	BM042mc				P	N				
NO ID	BMJUVm	2017	No ID	Moco	P	N	ND	ND	ND	DESC.
398	BM085	2018	Hembra	Exhalado	P	ND	1	ND	ND	DESC.
667	BM086	2018	Hembra	Exhalado	P	ND	2	1	2	REGULAR
067	BM099	2018	Macho	Exhalado	P	ND	ND	ND	ND	DESC.
CADS		2016		Estornudo	P	P				
		2017			N	N				
		2018			P	ND				
MAR		2016		Agua de mar	P	P				
		2017			ND	N				
		2018			N	ND				

ID = número de identificación de la ballena; NO ID = no identificado;

P = positivo; N = negativo;

V = región vertebral; DPC = depresión post craneal; C = región de las costillas; CC = condición corporal; DESC. = desconocido;

Evaluación de la CC: 3 = la región es muy notoria; 2= la región es visible; 1 = la región no es visible; ND= no determinado.

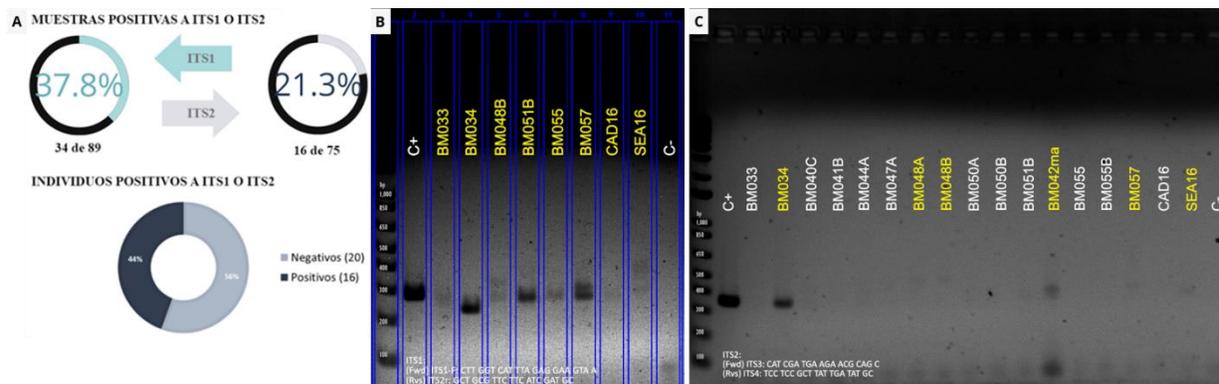


Figura 14. Muestras e individuos de BA cuyo exhalado amplificó ITS1 o ITS2. (A) porcentaje de muestras e individuos positivos a ITS1 e ITS2. (B) gel de electroforesis de algunas muestras positivas para ITS1. (C) Gel de electroforesis de algunas muestras positivas para ITS2.

No fue posible observar una asociación entre el sexo del individuo y la capacidad de detectar ITS1 o ITS2 mediante PCR (prueba de Fisher, $p=0.6687$) (**Fig. 15A**). No se observaron asociaciones al analizar los resultados por marcador molecular (ITS1, prueba de Fisher $p=1$, **Fig. 15B**; ITS2, prueba de Fisher $p=1$ **Fig. 15C**). No se observaron asociaciones entre la condición corporal y la detección de ADN de hongos con ningún marcador (ITS1 o ITS2) (prueba de Fisher $p=0.178$, **Fig. 15D**). Es importante mencionar que para los tres años de muestreo, un considerable número de individuos no contaban con la evaluación de su condición corporal (**Fig. 15E**).

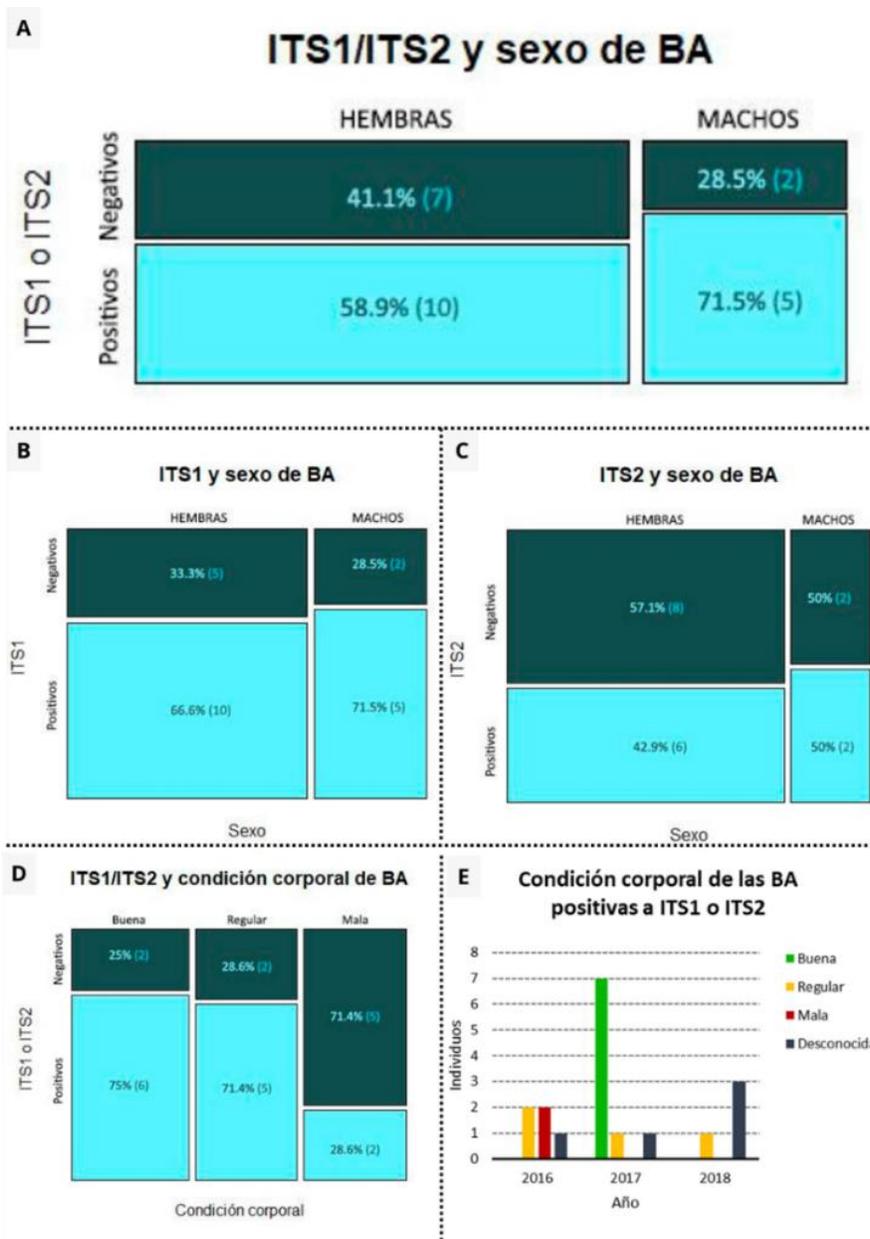


Figura 15. ITS y su relación con el sexo y la condición corporal de la ballena azul.

6.3 Secuenciación masiva de ITS

6.3.1 *Muestras de hisopados genitales de LMC crecidas en medio PDA*

La secuenciación masiva de muestras aisladas en PDA mostró, en cinco de ellas, una pureza de entre 90-100%, correspondientes a *Alternaria* spp., *Malassezia* spp.,

Penicillium spp, *Symmetrospora* spp. y *Cladosporium* spp. (Fig. 16). El Cuadro 10 resume el número de lecturas y ASVs por muestra.

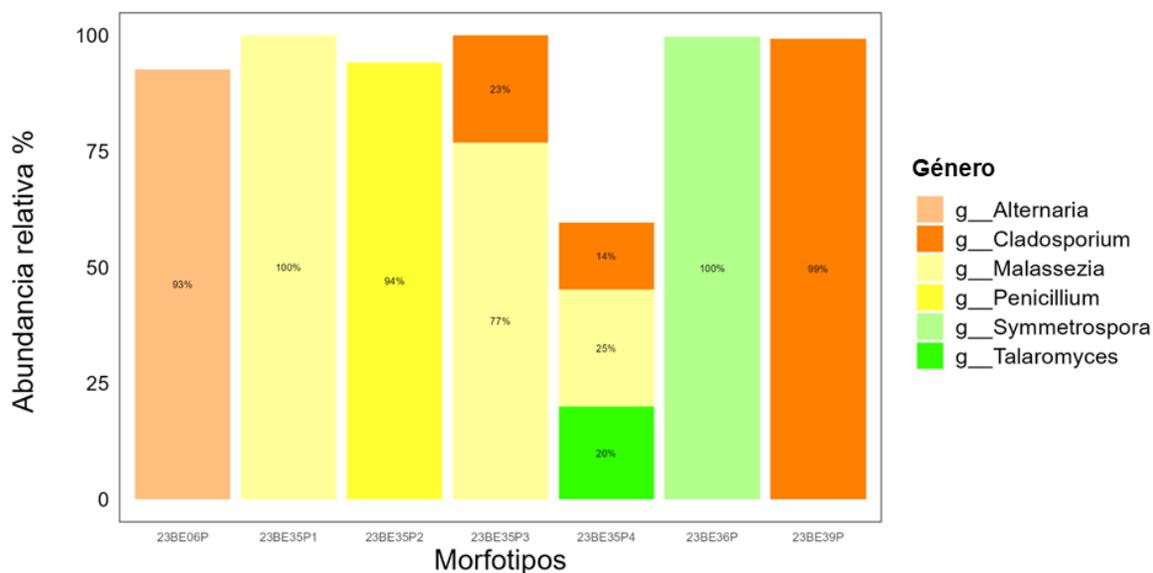


Figura 16. Distribución de abundancias a nivel de género en muestras de hisopado genital de lobo marino de California aislados en medio PDA. Se seleccionaron los géneros de hongos con abundancia mayor a 10% como los hongos más dominantes en los cultivos para identificarlos mediante sus secuencias. La muestra 23BE06 pertenece al género *Alternaria* mayormente (93%), la muestra 23BE35P1 al género *Malassezia* (100%); 23BE35P2 *Penicillium* mayormente (94%); 23BE35P3 a los géneros *Malassezia* (77%) y *Cladosporium* (23%); 23BE35P4 contenía secuencias de los géneros *Malassezia* (25%), *Talaromyces* (20%) y *Cladosporium* (14%); 23BE36 al género *Symmetrospora* (100%), y 23BE39 al género *Cladosporium* (99%).

Cuadro 10. Resultados de secuenciación de muestras de hongo aisladas en PDA.

Número de muestras secuenciadas	7
Número total de lecturas	268,513
Número total de ASVs	108
ASVs por muestra	Min. = 1
	Mediana = 24
	Media = 28.14
	SD = 25.79
	Max. = 75

6.3.2 Muestras de ADN de mamíferos marinos

La secuenciación mostró que, dejando de lado la muestra de ballena gris por ser sólo una, las heces de cachalote tuvieron en promedio más lecturas por muestra. El Cuadro 11 resume el número de muestras que se secuenciaron por especie, así como el número de ASVs en total y por especie.

Cuadro 11. Resultados de secuenciación de ITS1 de muestras de mamíferos marinos.

	Soplos de <i>B. musculus</i>		Soplo de <i>E. robustus</i>	Hisopados anales de <i>M. angustirostris</i>	Biopsias de piel de <i>M. angustirostris</i>	Heces de <i>P. macrocephalus</i>	Hisopados genitales de <i>Z. californianus</i>
	Un soplo por <i>B. musculus</i>	Una muestra de ADN por soplo de <i>B. musculus</i>					
Muestras secuenciadas	18	28	1	3	2	2	19
Total de lecturas	665,052	1,094,841	45,297	119,142	86,857	87,151	812,613
Lecturas por muestra							
Mediana	36,982.5	37,978	45,297	40,061	43,428.5	43,575.5	44,515
Media	36,947.3	39,101.46	45,297	39,714	43,428.5	43,575.5	42,769.11
Singletons	2 (0.51%)	6 (1.18%)	2 (1.91%)	1 (0.64%)	1 (0.81%)	1 (0.69%)	5 (1.74%)
ASVs	389	510	105	157	124	144	286
ASVs por muestra							
Mínimo	48	48	105	93	66	109	14
Mediana	94	94	105	103	73	109.5	47
Media	93.33	90.46	105	102.7	73	109.5	47.21
SD	18.52	21.25	0	9.504	9.9	0.71	20.36
Máximo	126	126	105	112	80	110	81

6.4 Análisis de fungoma

6.4.1 *Abundancia y prevalencia de ASVs en el fungoma en mamíferos marinos*

En general, el fungoma de los mamíferos marinos estuvo sobrerrepresentado por dos filos principalmente con Ascomycota y Basidiomycota abarcando del 88% al 95% de abundancia relativa, y el filo Mucoromycota entre el 5% y el 12% (**Fig. 17**). En todas las muestras analizadas la familia de los Malasseziaceae (Basidiomycota) fue la más abundante, llegando a superar el 40% de abundancia en cada especie analizada

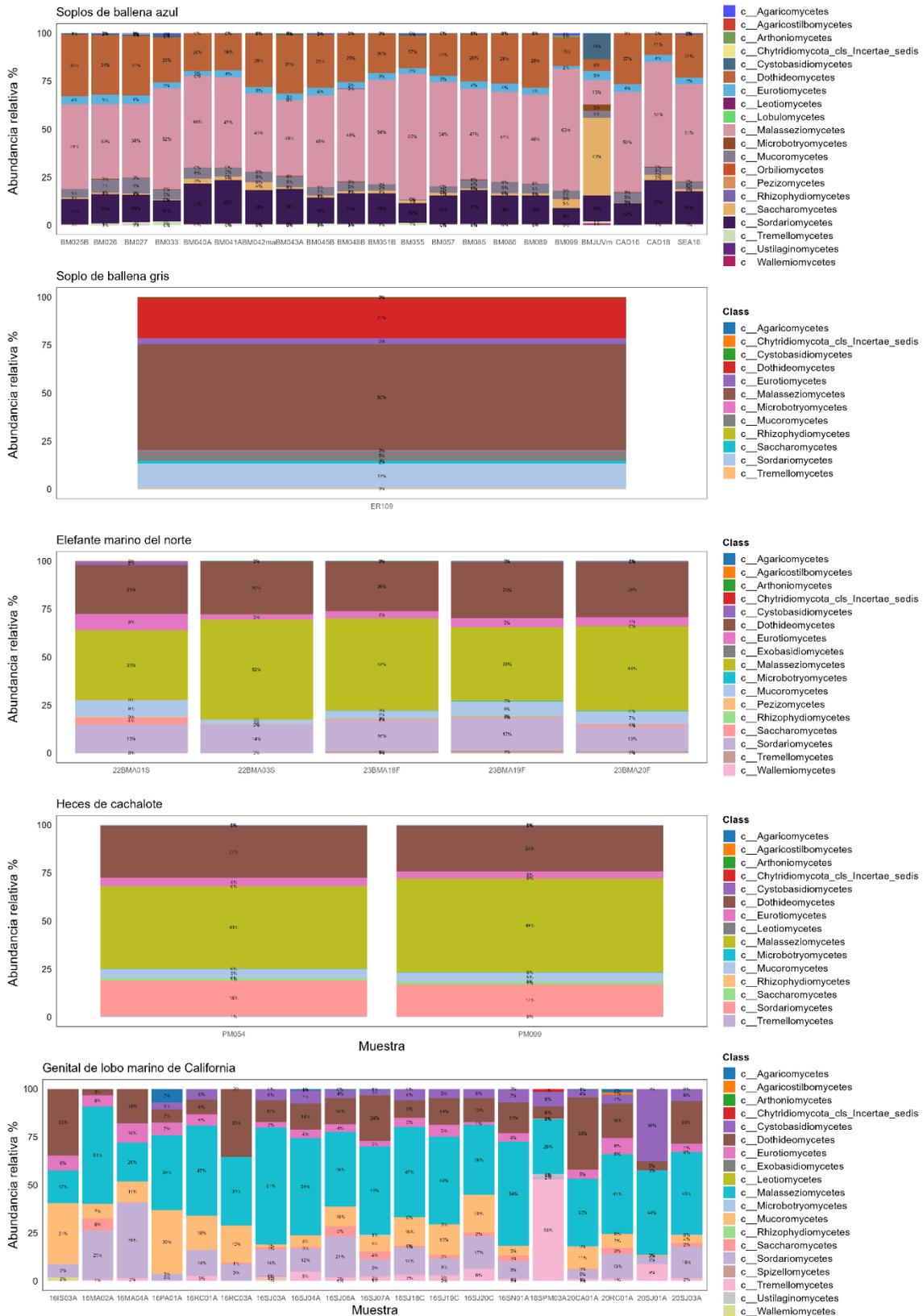


Figura 18. Gráficos de barras de la abundancia relativa por clase de hongo en cada muestra de mamífero marino evaluado.

6.4.2 *Fungoma genital central del lobo marino de California con el filtro de abundancia y prevalencia*

La clase Malasseziomycetes fue la más prevalente y abundante. También destacan las clases de los Sordariomycetes y los Dothideomycetes. Las clases con menos abundancia y representación en las muestras fueron la de los Ustilaginomycetes, Spizellomycetes y los Arthoniomycetes, como puede observarse en la **Fig. 19**.

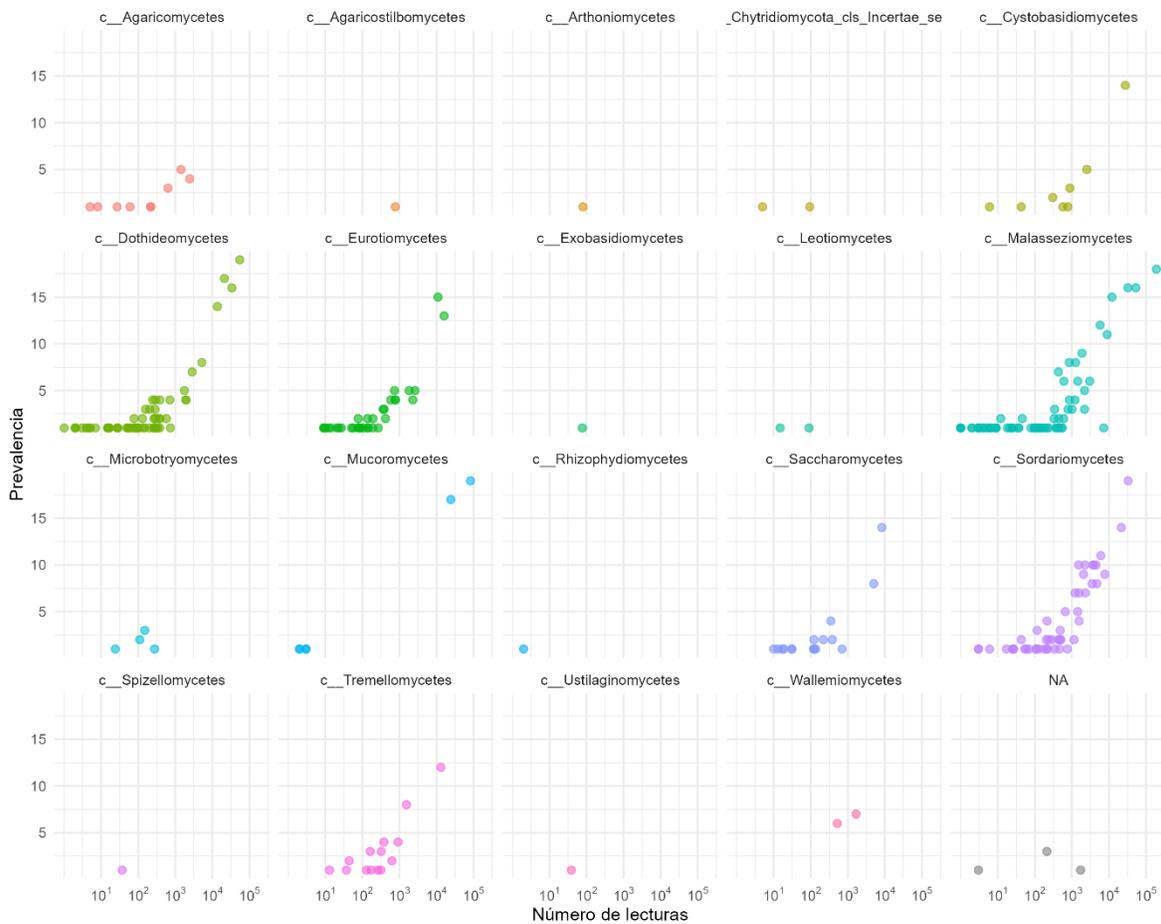


Figura 19. Gráfico de dispersión de ocurrencia y abundancia de ASVs por clase en epitelio vaginal del lobo marino de California.

La familia Malasseziaceae fue la más abundante en general, comprendiendo un 41% de las lecturas. Tras el criterio del 75% de prevalencia y >2% de abundancia (número de lecturas) sólo once ASVs logran pasar el filtro como puede observarse en el **Cuadro 12**. Eso, en otras palabras, podría indicar que el fungoma central del epitelio genital lo constituyen los géneros *Malassezia*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Symmetrospora* y *Albifimbria*.

Cuadro 12. Fungoma genital central del lobo marino de California con criterios de 75% de prevalencia y >2% de abundancia.

ASV	Taxonomía	Prevalencia	Abundancia
ASV1	<i>Malassezia restricta</i>	18	190,396
ASV4	<i>Rhizopus arrhizus</i>	19	82,212
ASV3	<i>Cladosporium basi-inflatum</i>	19	54,803
ASV5	<i>Malassezia globosa</i>	16	53,129
ASV7	<i>Alternaria spp</i>	16	33,617
ASV9	<i>Chaetomium pahypocoides</i>	19	33,006
ASV10	<i>Symmetrospora foliicola</i>	16	32,387
ASV8	<i>Malassezia restricta</i>	14	27,643
ASV16	<i>Rhizopus arrhizus</i>	17	24,388
ASV21	<i>Albifimbria verrucaria</i>	14	21,603
ASV12	<i>Cladosporium basi-onflatum</i>	17	21,141

La abundancia está dada por número de lecturas.

6.4.3 *Fungoma central de la ballena azul con el filtro de abundancia y prevalencia*

Las Clases Malasseziomycetes, Dothideomycetes y Sordariomycetes fueron las que más prevalentes y abundantes, y las que menos representación tuvieron fueron de la clase Agaricostilbomycetes, Arthoniomycetes, Leotiomycetes, Lobulomycetes, Pezizomycetes y Ustilaginomycetes (**Fig. 20**).



Figura 20. Gráfico de dispersión de ocurrencia y abundancia de ASVs por clase en exhalado respiratorio de la ballena azul.

La clase Malasseziomycetes fue la más abundante en general, comprendiendo un 46% de las lecturas, y la clase de los Dothideomycetes fue la segunda más abundante, con un 24%. Tras el filtro de prevalencia del 75% y de abundancia absoluta >2%, quedan 13 ASVs como fungoma central incluyendo los géneros *Malassezia*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Lectera*, *Aspergillus*, *Debaryomyces* y Pleosporaceae, como puede observarse en el **Cuadro 13**.

Cuadro 13. Fungoma respiratorio central de la ballena azul con criterios de 75% de prevalencia y >2% de abundancia.

ASV	Taxonomía	Prevalencia	Abundancia
ASV1	<i>Malassezia restricta</i>	18	154,926
ASV3	<i>Cladosporium basi-inflatum</i>	18	48,130
ASV4	<i>Rhizopus arrhizus</i>	18	22,581
ASV5	<i>Malassezia globosa</i>	16	23,954
ASV7	<i>Alternaria</i> spp.	17	20,105
ASV9	<i>Chaetomium pahypocoides</i>	17	22,279
ASV10	<i>Malassezia restricta</i>	16	23,979
ASV11	<i>Lectera</i> spp.	16	32,392
ASV12	<i>Cladosporium basi-inflatum</i>	18	21,960
ASV13	<i>Malassezia restricta</i>	17	20,855
ASV15	<i>Aspergillus mottae</i>	18	15,291
ASV20	Pleosporaceae	15	15,012
ASV24	<i>Debaryomyces</i> spp.	17	22,464

La abundancia está dada por número de lecturas

6.5 Análisis de redes de co-ocurrencia del fungoma

6.5.1 Red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California

La red de co-ocurrencia fue poco densa (**Fig. 21, Cuadro 14**). Los ASVs de mayor grado (*degree*), esto es, que funcionan como *hubs* fueron *Colletrotichum* spp., *Malassezia* spp. y *Cladosporium* spp. (**Cuadro 15**). Los ASVs con mayor índice de interconectividad, o *betweenness*, fueron *Colletrotichum truncatum*, *Malassezia restricta* y *Candida albicans* (**Cuadro 16**).

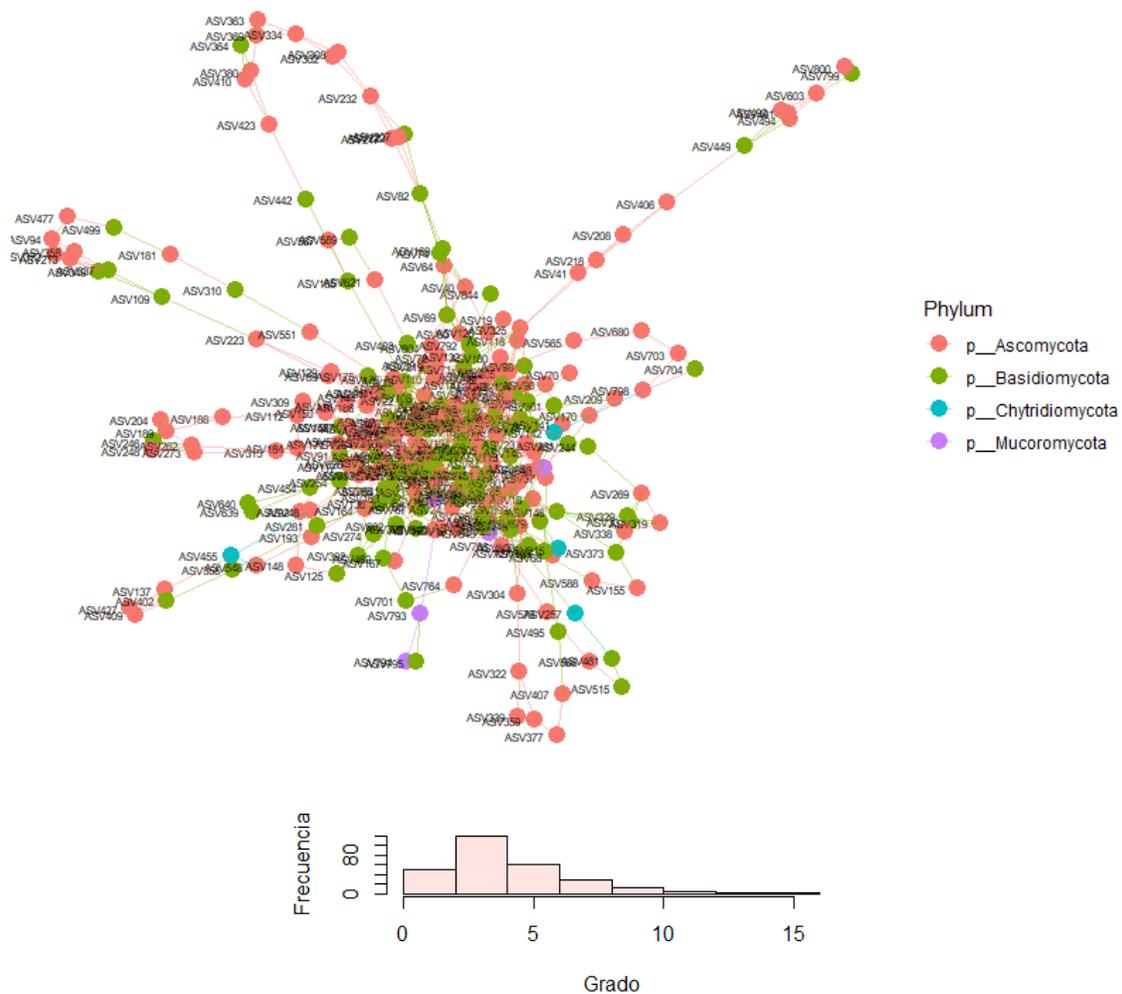


Figura 21. Red de co-ocurrencia de ASVs en tracto genital del lobo marino de California. Nodos clasificados por *phylum* (arriba). Histograma de degree de la red (abajo).

Cuadro 14. Características topográficas de la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.

Características topográficas de la red	Valor
Distribución del <i>degree</i>	Mediana: 4 Min: 1 Max: 15
Diámetro	14
Distancia promedio	5.079
Coefficiente de clusterización	0.209

Cuadro 15. Los cinco hongos con mayor grado (*degree*) en la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.

ASV	<i>Degree</i>	Taxonomía
ASV67	16	<i>Colletrotichum truncatum</i>
ASV796	15	<i>Malassezia</i> spp.
ASV897	14	<i>Malassezia</i> spp
ASV898	14	<i>Malassezia</i> spp
ASV247	13	<i>Cladosporium</i> spp.

Cuadro 16. Los tres hongos con mayor interconectividad (*betweenness*) en la red de co-ocurrencia del fungoma genital del lobo marino de California.

ASV	<i>Betweenness</i>	Taxonomía
ASV67	3,903.95	<i>Colletrotichum truncatum</i>
ASV13	3,489.46	<i>Malassezia restricta</i>
ASV325	3,243.71	<i>Candida albicans</i>

Con el método de *Edge betweenness* se identificaron 31 sub-comunidades conformadas por 9.2 ASVs en promedio (mediana = 6, max = 36). Se ajustó el tamaño de los nodos dependiendo de su número de conexiones y se construyó nuevamente la red (**Fig. 22**).

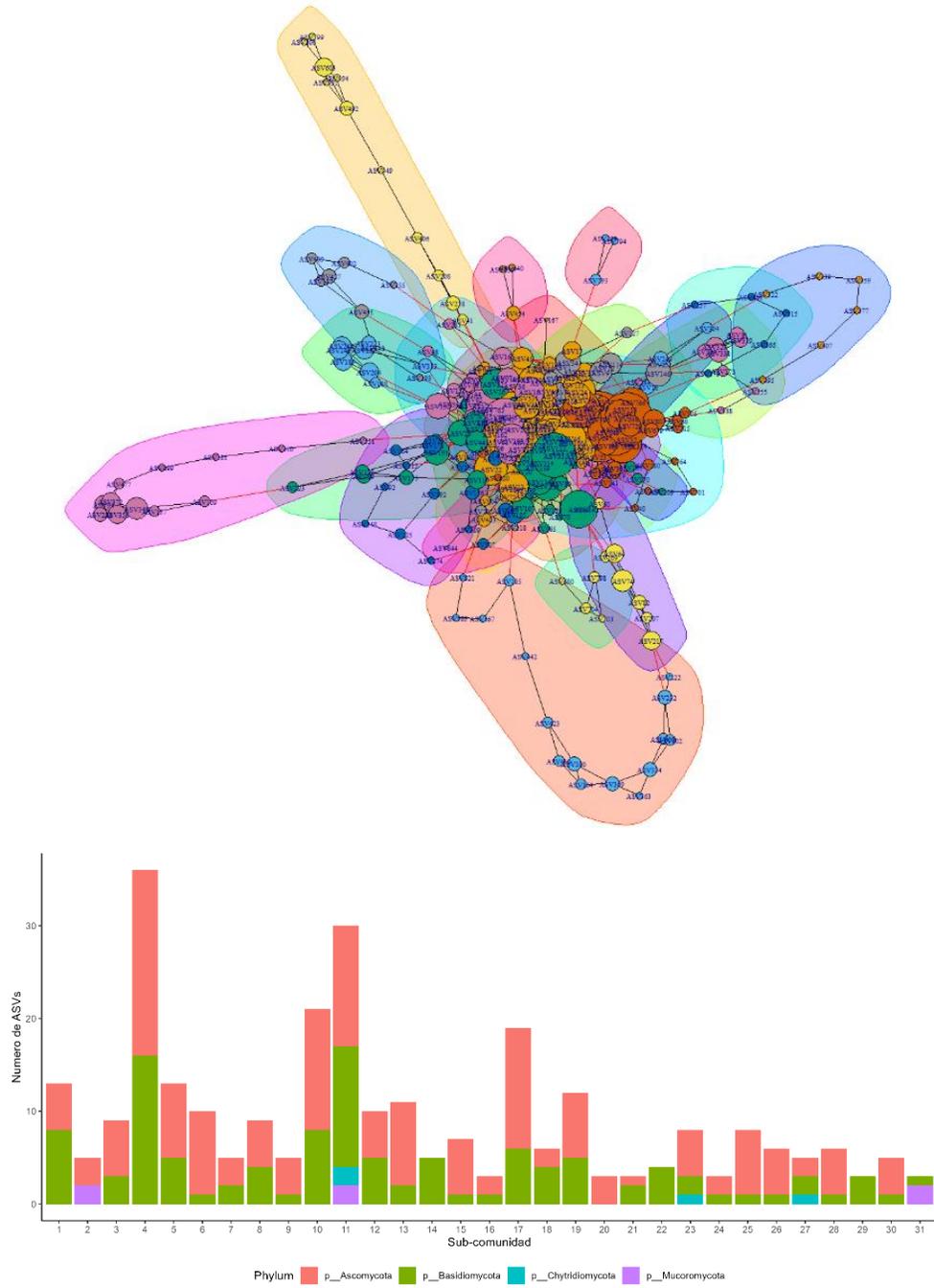


Figura 22. Red de co-ocurrencia y sub-comunidades del fungoma genital del lobo marino de California. El tamaño del nodo depende de su *degree* (arriba). Composición de las sub-comunidades de la red (abajo).

6.5.2 Red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul

La red de co-ocurrencia, construida a partir de un soplo por individuo, tuvo un diámetro de 19 y un coeficiente de clusterización de 0.236 (**Fig. 23, Cuadro 17**).

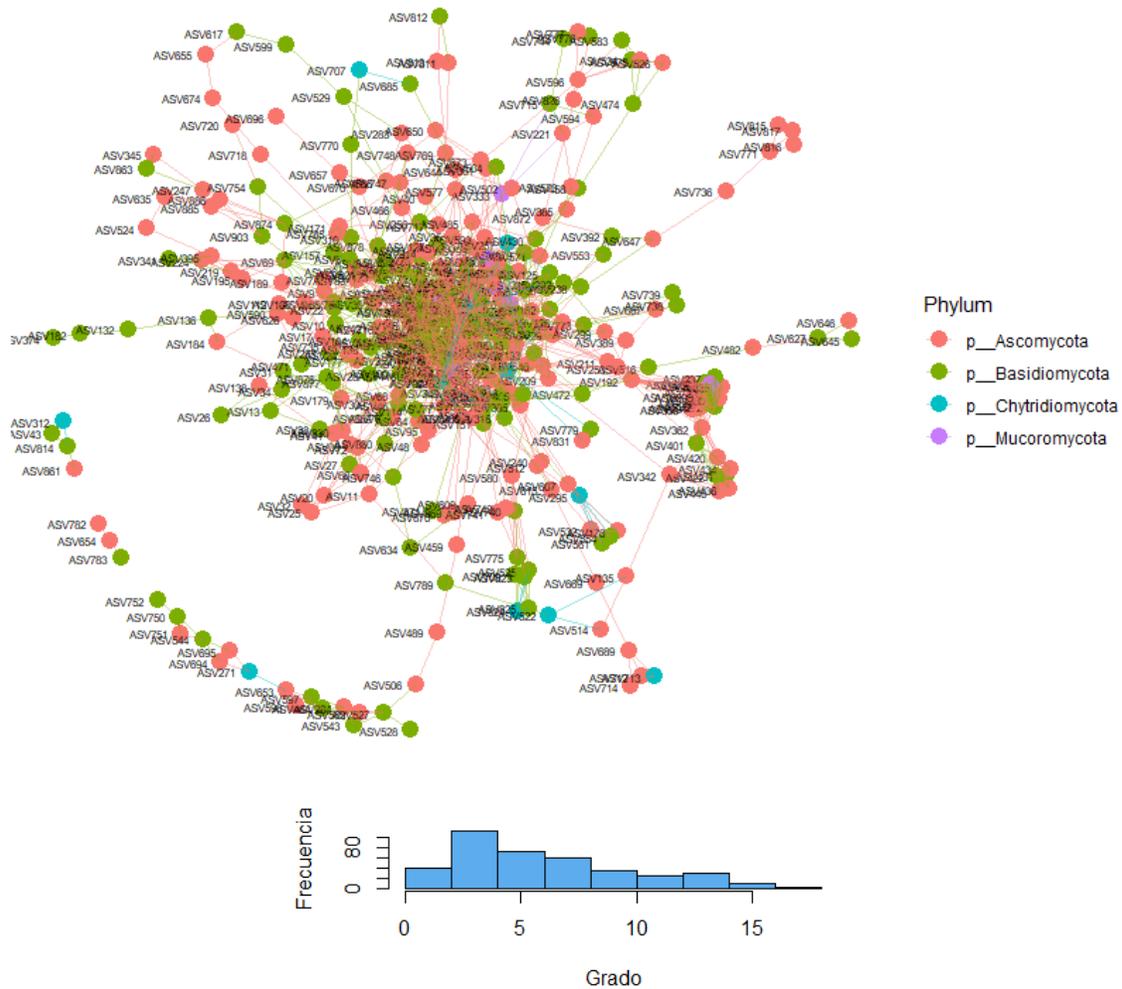


Figura 23. Red de co-ocurrencia de ASVs en exhalado respiratorio de ballena azul. Nodos clasificados por *phylum* (arriba). Histograma de degree de la red (abajo).

Cuadro 17. Características topográficas de la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.

Características topográficas de la red	Valor
Degree distribution	Mediana: 6 Min: 1 Max: 18
Diámetro	19
Distancia promedio	4.68
Coefficiente de clusterización	0.236

Los hongos con mayor grado fueron *Candida zeylanoides*, *Penicillium terrigenum*, *Hortaea* spp., *Malassezia restricta* y *Fusarium verticilloides* (16) (**Cuadro 18**). Por su parte, los hongos con mayor grado de interconectividad fueron de la familia Coniothyriaceae, *Penicillium* spp. y *Alternaria multirostrata* (**Cuadro 19**).

Cuadro 18. Los cinco hongos con mayor grado (*degree*) en la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.

ASV	Degree	Taxonomía
ASV84	18	<i>Candida zeylanoides</i>
ASV118	17	<i>Penicillium terrigenum</i>
ASV192	17	<i>Hortaea</i> spp.
ASV1	16	<i>Malassezia restricta</i>
ASV92	16	<i>Fusarium verticillioides</i>

Cuadro 19. Los tres hongos con mayor interconectividad (*betweenness*) en la red de co-ocurrencia del fungoma respiratorio de la ballena azul.

ASV	Betweenness	Taxonomía
ASV266	7,214.57	Coniothyriaceae
ASV459	6,534.00	<i>Penicillium</i> spp
ASV489	6,188.00	<i>Alternaria multirostrata</i>

Con el método de *Edge betweenness* se identificaron 52 sub-comunidades constituidas por 7.481 ASVs en promedio (mediana = 4, max = 155). Se graficó nuevamente la red ajustando el tamaño de los nodos dependiendo de su número de conexiones (**Fig. 24**).

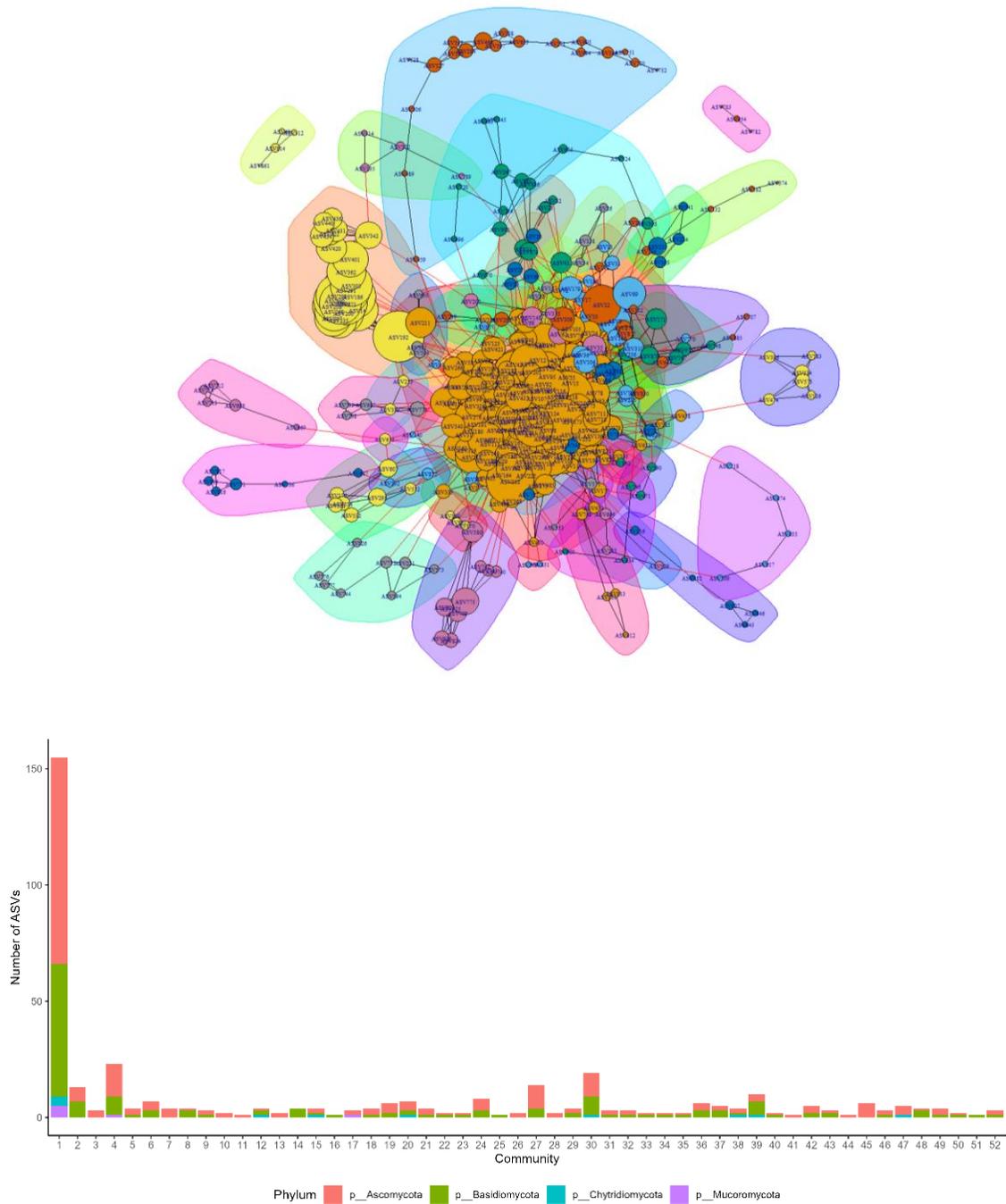


Figura 24. Red de co-ocurrencia y sub-comunidades del fungoma respiratorio de la ballena azul. El tamaño de nodo depende de su *degree* (arriba). Composición de las sub-comunidades de la red (abajo).

6.6 Análisis de alfa diversidad

En las cinco especies bajo estudio, el ASV1 (*Malassezia restricta*) fue el más abundante (**Fig. 25** y **Cuadro 20**). También destacaron *Cladosporium basi-inflatum* y *Rhizopus arrhizus*.

Cuadro 20. Los cinco hongos más abundantes en el fungoma de mamíferos marinos.

Ranking de abundancia						
Especie		1°	2°	3°	4°	5°
<i>B. musculus</i>	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Lectera</i> spp. (ASV11)	<i>Malassezia restricta</i> (ASV10)	<i>Malassezia restricta</i> (ASV5)
	Lecturas	154,926	48,130	32,392	23,979	23,954
<i>E. robustus</i>	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Malassezia globosa</i> (ASV5)	<i>Chaetomium pachypodioides</i> (ASV9)	<i>Lectera</i> spp (ASV11)
	Lecturas	12,530	3,039	2,635	1,858	1,796
<i>M. angustirostris</i> (anal)	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Lectera</i> spp. (ASV11)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV12)	<i>Rhizopus arrhizus</i> (ASV4)
	Lecturas	29,052	12,116	6,532	5,631	5,481
<i>M. angustirostris</i> (piel)	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV12)	<i>Rhizopus arrhizus</i> (ASV4)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV11)
	Lecturas	22,993	7,842	4,199	4,006	3,201
<i>P. macrocephalus</i>	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Lectera</i> spp (ASV11)	<i>Malassezia globosa</i> (ASV5)	<i>Chaetomium pachypodioides</i> (ASV9)
	Lecturas	20,195	7,943	5,624	4,086	3,675
<i>Z. californianus</i>	Especie	<i>Malassezia restricta</i> (ASV1)	<i>Rhizopus arrhizus</i> (ASV4)	<i>Cladosporium basi-inflatum</i> (ASV3)	<i>Malassezia globosa</i> (ASV5)	<i>Alternaria</i> spp (ASV7)
	Lecturas	190,396	82,212	54,803	53,129	33,617

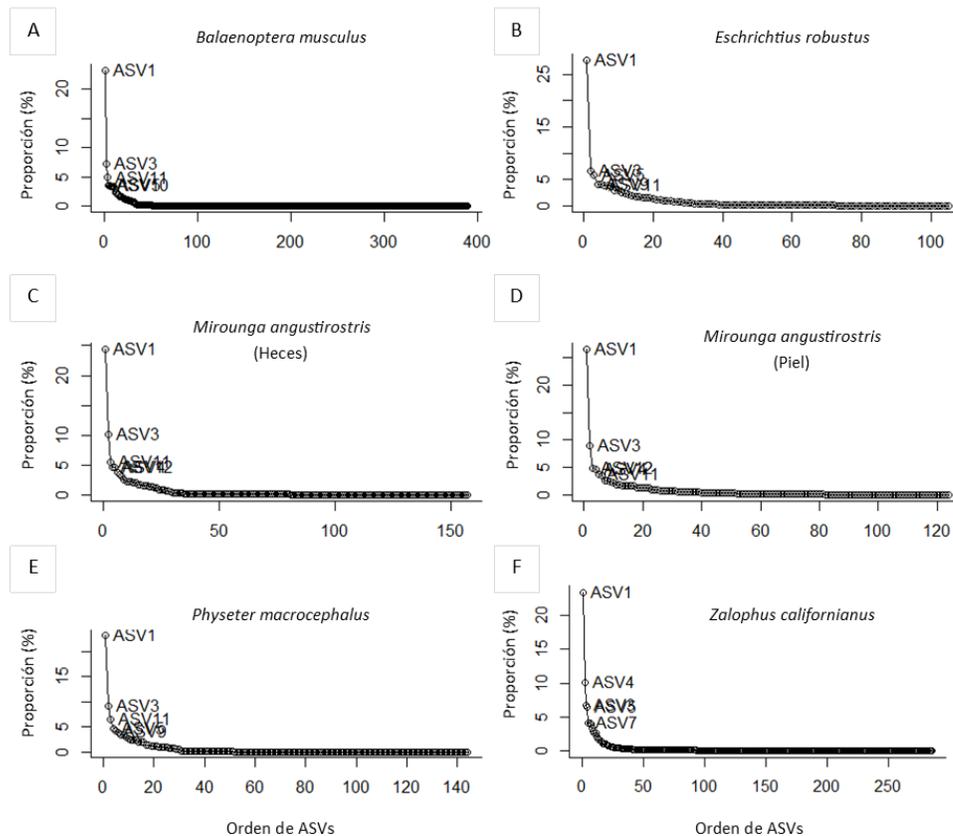


Figura 25. Curvas de Whittaker de mamíferos marinos. (A) Exhalado de ballena azul, (B) exhalado de ballena gris, (C) heces de elefante marino del Norte, (D) piel de elefante marino del Norte, (E) heces de cachalote, y (F) hisopado genital de lobo marino de California.

La cantidad de ASVs únicos por cada especie fue muy heterogénea: para la ballena azul se detectaron 389 ASVs (Chao1 = 389.13), para la ballena gris 105 ASVs (Chao1 = 105.66), para el epitelio rectal y las muestras de piel del elefante marino del Norte 157 ASVs (Chao1 = 157.16) y 124 (Chao1 = 124.1), respectivamente, para el cachalote 144 ASVs (Chao1 = 144.25), y para el lobo marino de California 286 (Chao1 = 287.56).

Las curvas de rarefacción del LMC y la BA, los organismos modelo principales, no alcanzaron la meseta, lo que podría indicar que el tamaño de muestra del lobo marino de California, 19, y el de ballena azul, 16, podría no ser suficiente para describir completamente sus fungomas (**Fig. 26**).

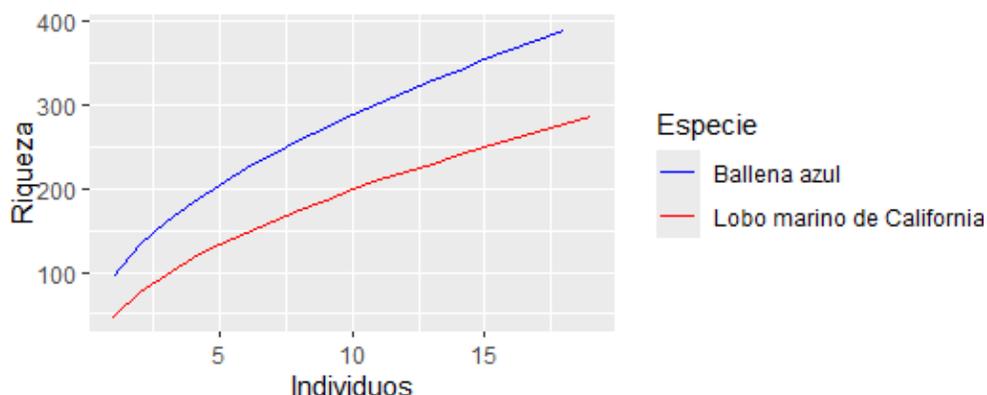


Figura 26. Curva de rarefacción de ballena azul (azul) y lobo marino de California (rojo).

Respecto a los índices de diversidad alfa, de todos los organismos modelo (**Cuadro 30**), solo en riqueza existieron diferencias significativas (ANOVA, $p=2.979 \times 10^{-8}$). La riqueza promedio más alta se encontró en las heces de cachalote (109.5) y la más baja en el hisopado genital de LMC (47.21) (**Fig. 21**). El índice de Pielou promedio (Shannon normalizado) más alto lo tuvieron el hisopado genital de LMC y la biopsia de piel de elefante marino del norte (0.71), y el índice de Simpson más alto lo tuvieron las muestras fecales de cachalote.

Cuadro 21. Promedio de los índices de diversidad alfa en los mamíferos marinos analizados.

Especie	N	Riqueza				Shannon				Pielou				Simpson			
		min	\bar{X}	max	sd	min	\bar{X}	max	sd	min	\bar{X}	max	sd	min	\bar{X}	max	sd
<i>B. musculus</i>	18	48	93.3	126	18.5	2.4	3.1	3.3	0.2	0.6	0.7	0.7	0.02	0.8	0.9	0.9	0.03
<i>E. robustus</i>	1	105	105.0	105	0	3.2	3.2	3.2	0	0.7	0.7	0.7	0	0.9	0.9	0.9	0
<i>M. angustirostris</i>	3	93	102.7	112	9.5	3.2	3.2	3.2	0	0.7	0.7	0.7	0.01	0.9	0.9	0.9	0.01
<i>M. angustirostris</i>	2	66	73.0	80	9.9	2.9	3.0	3.2	0.2	0.7	0.7	0.7	0.06	0.9	0.9	0.9	0.02
<i>P. macrocephalus</i>	2	109	109.5	110	0.7	3.2	3.3	3.3	0	0.7	0.7	0.7	0	0.9	0.9	0.9	0
<i>Z. californianus</i>	19	14	47.2	81	20.4	2.1	2.7	3.2	0.4	0.6	0.7	0.8	0.05	0.8	0.9	0.9	0.04

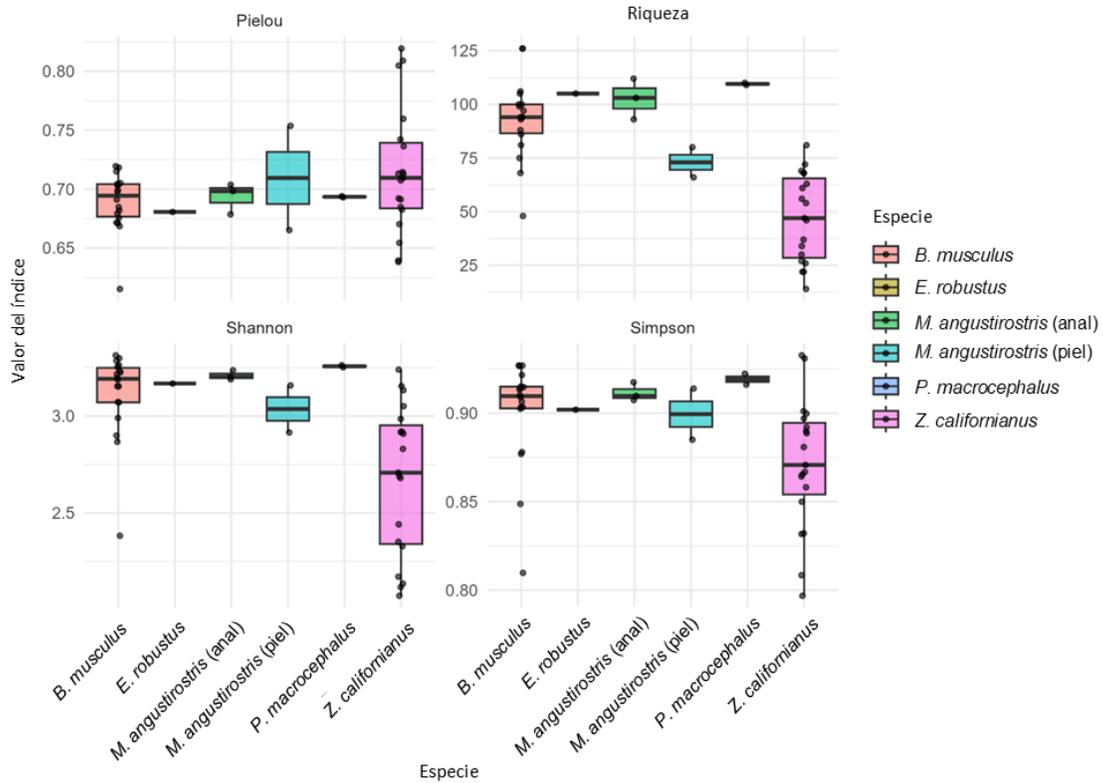


Figura 27. Índices de diversidad alfa de la ballena azul (*B. musculus*), ballena gris (*E. robustus*), hisopado anal y piel de elefante marino del Norte (*M. angustirostris*), cachalote (*P. macrocephalus*) y lobo marino de California (*Z. californianus*).

6.6.1 Alfa diversidad del fungoma genital de lobo marino de California

De todas las muestras de LMC se identificaron 286 ASVs. Al examinar por cada muestra, la que menor riqueza tuvo, 14, corresponde al individuo 16IS03AG, de Los Islotes. Por el contrario, la muestra con mayor riqueza, 81, corresponde a la muestra 16SJ07AG, de la isla San Jorge (**Fig. 28**).

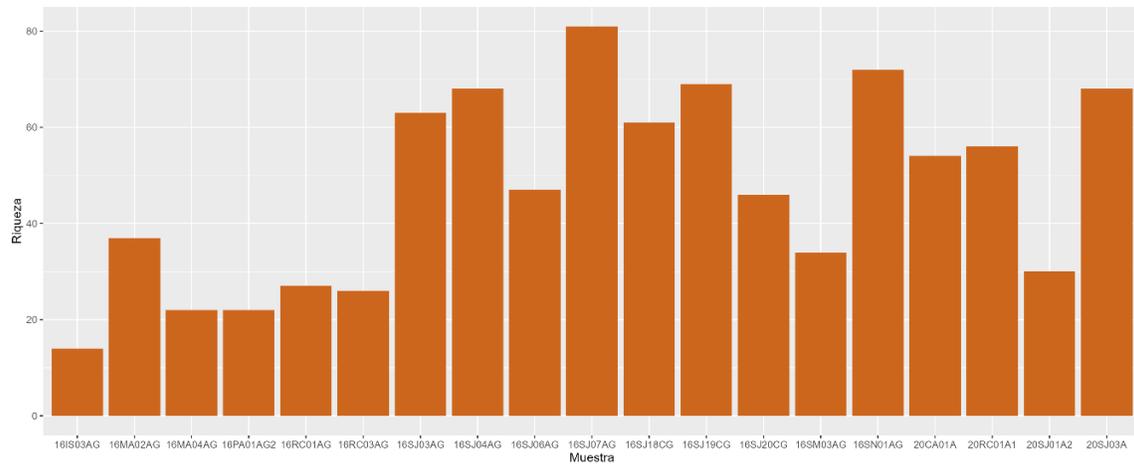


Figura 28. Riqueza de hongos por muestra de hisopado genital de lobo marino de California.

Se estimó que el índice de Shannon en conjunto fue de 3.33 y el de Pielou (Shannon normalizado) de 0.59. El índice de Simpson calculado fue de 0.92. El siguiente gráfico muestra la riqueza, el índice de Shannon y el de Simpson por muestra. El índice de Shannon más bajo lo tuvo la muestra 16PA01AG2 y el más alto 20RC01A1. El índice de Simpson más bajo fue de 16PA01AG2 y el más alto de 20RC01A1 (**Fig. 29**).

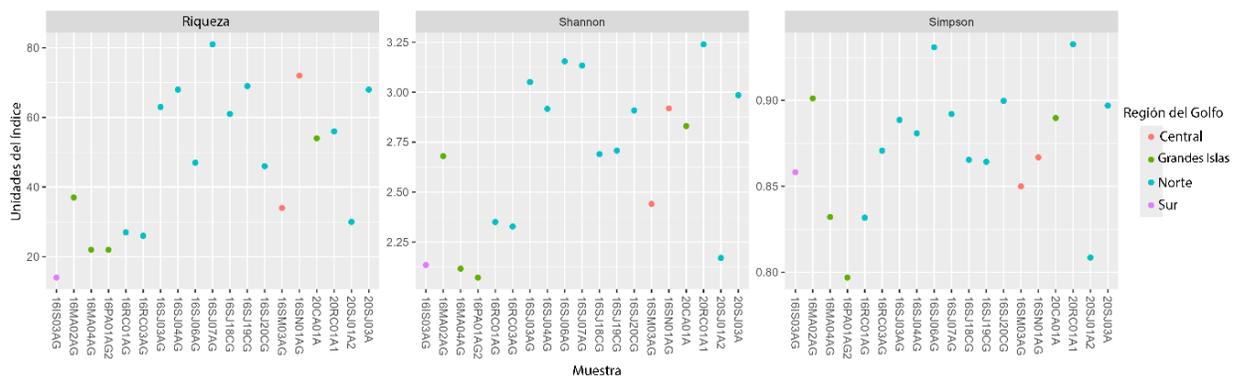


Figura 29. Índices de diversidad alfa del fungoma en las muestras genitales de lobo marino de California por región ecológica.

Se realizaron pruebas ANOVA, T de Student y de Wilcoxon para estimar diferencias entre los índices de diversidad alfa dependiendo de las variables fisiológicas y ecológicas usadas en este estudio para LMC. No hubo diferencias significativas entre ninguna variable ($p > 0.05$) (**Fig. 30**).

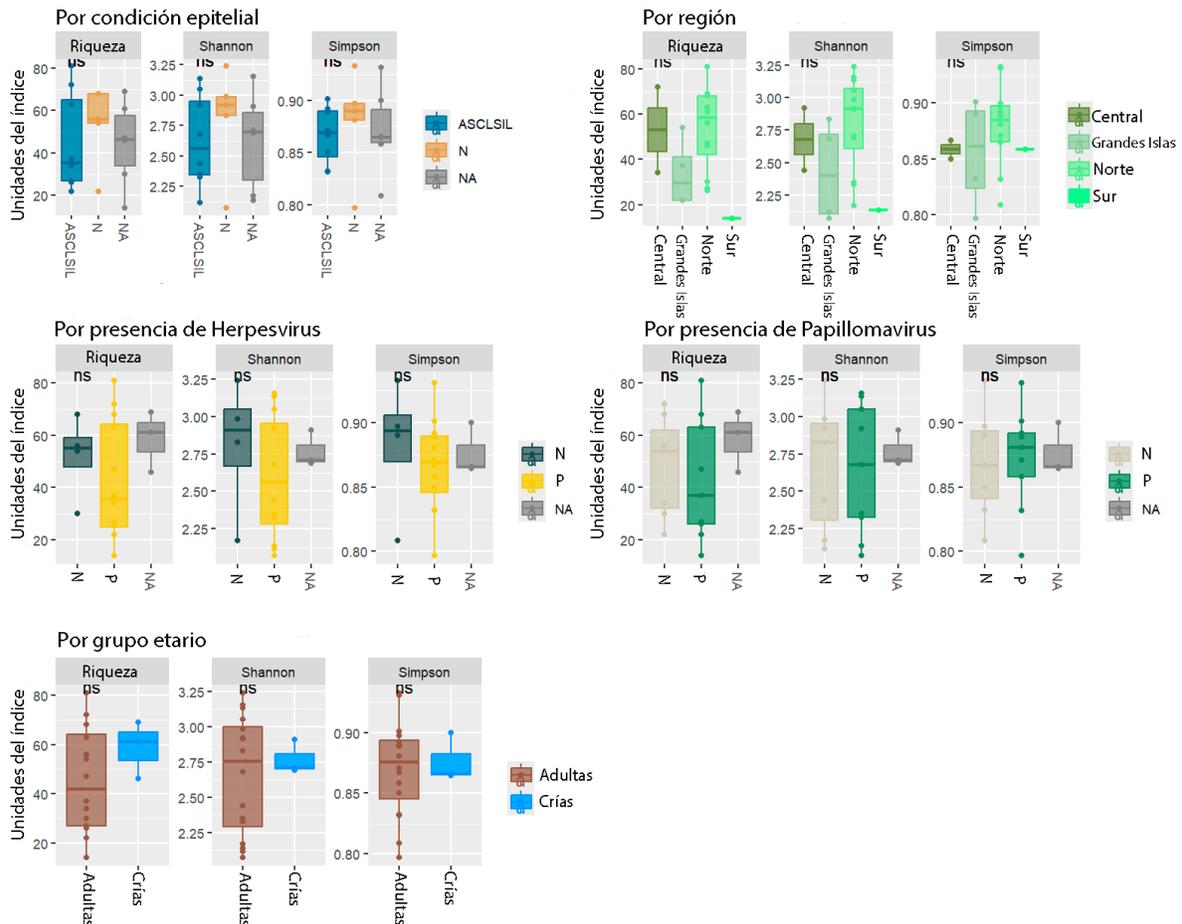


Figura 30. Índices de diversidad alfa de hongos en el epitelio genital del lobo marino de California y sus variables eco-fisiológicas. Condición epitelial (se excluyeron los NA): prueba t de Student para Riqueza $p=0.49$, Shannon $p=0.46$, Simpson $p=0.62$. Región ecológica: ANOVA para Riqueza $p=0.12$, Shannon $p=0.17$, Simpson $p=0.63$. Herpesvirus (O_tHV1, se excluyeron los NA): prueba t de Student para Riqueza $p=0.39$, Shannon $p=0.477$, Simpson $p=0.61$. Papilomavirus (zCPV-1, se excluyeron NA): prueba t de Student para Riqueza $p=0.63$, Shannon $p=0.91$, Simpson $p=0.84$. Grupo etario: prueba de Wilcoxon para Riqueza $p=0.34$, Shannon $p=0.95$, Simpson $p=0.95$. N = negativo; P = positivo.

6.6.2 Alfa diversidad del fungoma respiratorio de la ballena azul

Las muestras de BA albergaron 389 ASVs diferentes. La muestra con menor riqueza corresponde a una ballena juvenil sin registro (BMJUVm) en la cual se obtuvo información de 48 ASVs. Mientras que las muestras con mayor riqueza corresponden a BM043A (hembra, Número de identificación 304, buena condición corporal) y BM057 (hembra, número de identificación 480, condición corporal regular), con 126 ASVs cada una (**Fig. 31**).

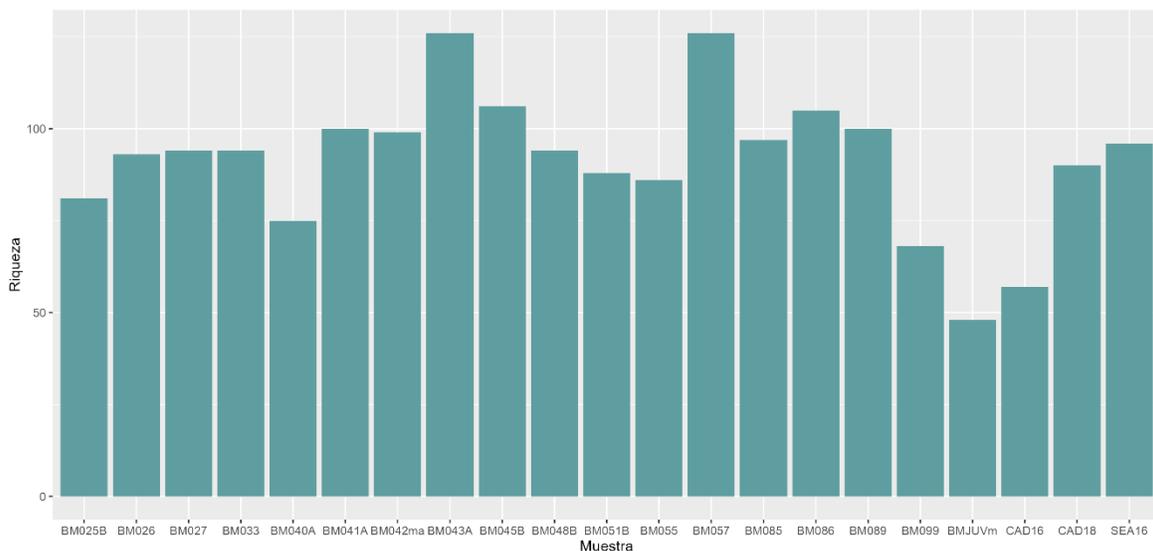


Figura 31. Riqueza de hongos por muestra de exhalado respiratorio de ballena azul.

El índice de Shannon de todo el set de datos (sin los controles técnicos) fue de 3.49 y el de Pielou de 0.58. El índice de Simpson fue de 0.92. La muestra que tuvo los índices de Shannon, Pielou y Simpson más altos fue BM041A (macho, número de identificación 240, buena condición corporal) con 3.31, 0.72 y 0.93, respectivamente, mientras que los más bajos fueron de BMJUVm con 2.38, 0.62 y 0.81, respectivamente (**Fig. 32**).

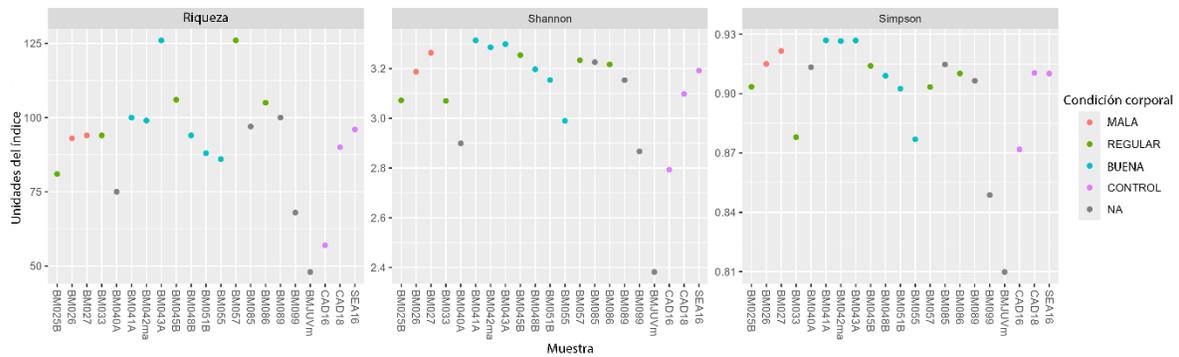


Figura 32. Índices de diversidad alfa del fungoma por muestra de exhalado respiratorio de ballena azul por condición corporal.

No se identificaron diferencias significativas en los valores de alfa diversidad entre condición corporal (ANOVA, $p > 0.05$) y sexo (Wilcoxon, $p > 0.05$) (**Fig. 33**).

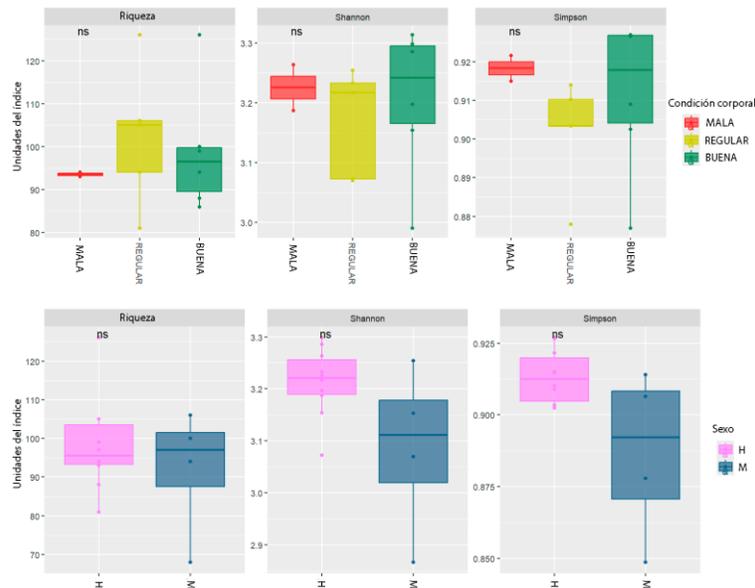


Figura 33. Índices de diversidad alfa del fungoma de exhalado respiratorio de ballena azul por condición corporal y sexo. Condición corporal: ANOVA para Riqueza $p = 0.76$, Shannon $p = 0.77$, Simpson $p = 0.461$. Sexo: prueba de Wilcoxon para Riqueza $p = 0.94$, Shannon $p = 0.105$, Simpson $p = 0.105$. H = Hembra; M = Macho

6.7 Análisis de beta diversidad

Se realizaron *heatmaps* a partir de matrices de distancias UniFrac, UniFrac ponderada, Bray-Curtis y Jaccard para observar las muestras más diferentes en su fungoma (**Fig. 34**).

Se observaron diferencias significativas en diversidad de las especies estudiadas con análisis PERMANOVA con las distancias UniFrac ($p=0.001$, **Fig. 35A**), Bray-Curtis ($p=0.008$, **Fig. 35C**) y Jaccard ($p=0.001$, **Fig. 35D**), pero no en el caso de la distancia UniFrac ponderada ($p=0.07$, **Fig. 35B**).

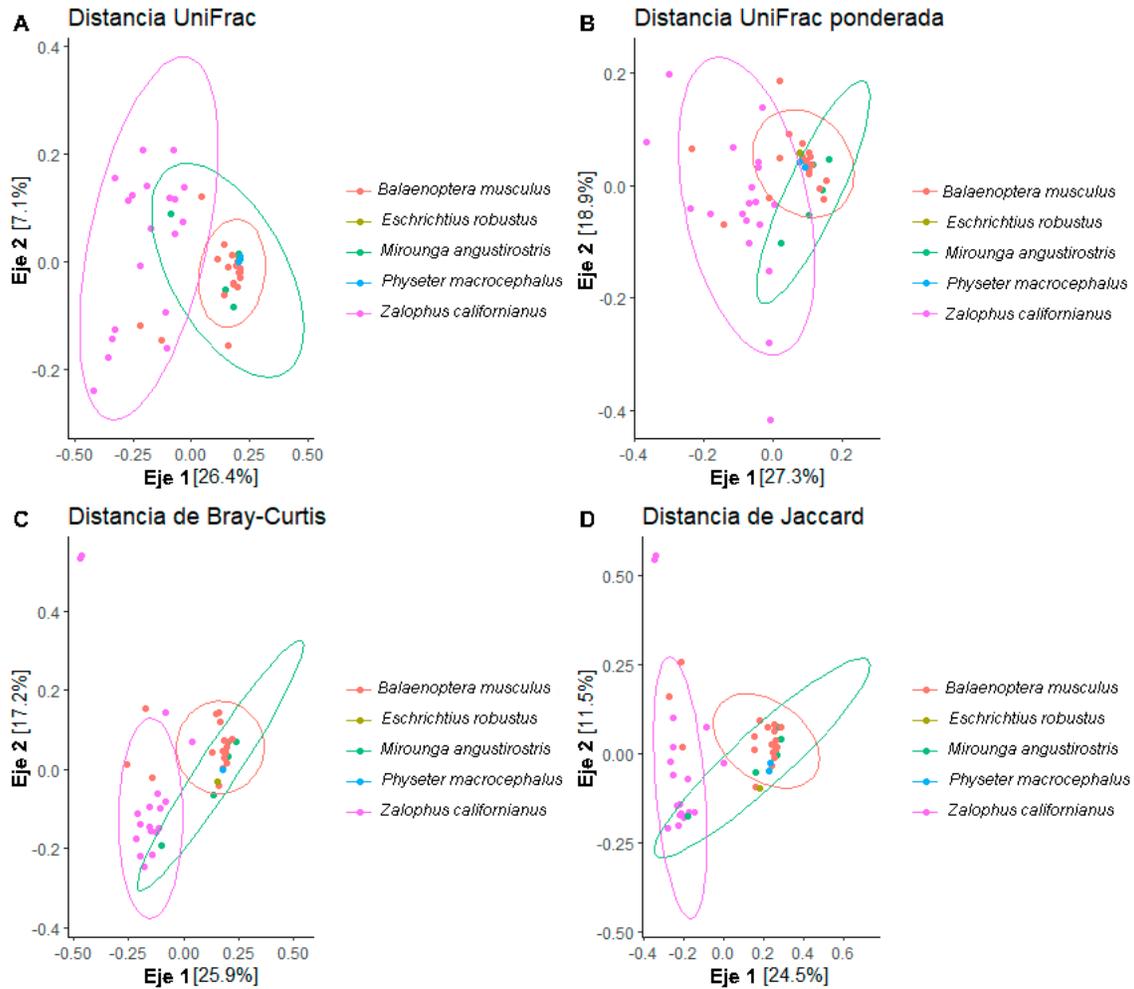


Figura 35. Análisis de Principales Coordenadas de beta diversidad del fungoma de mamíferos marinos. Distancias (A) UniFrac, (B) UniFrac ponderada, (C) Bray-Curtis, y (D) Jaccard.

Las muestras de soplos de BA tuvieron 346 ASVs únicos, las de LMC 149, las muestras de elefante marino del norte (hisopado anal y piel) tuvieron 46 ASVs únicos, las de cachalote 20 y la de ballena gris 14. En total, todos los mamíferos compartieron 72 ASVs (9% del total, **Fig. 36**).

Diagrama de Venn de ASVs

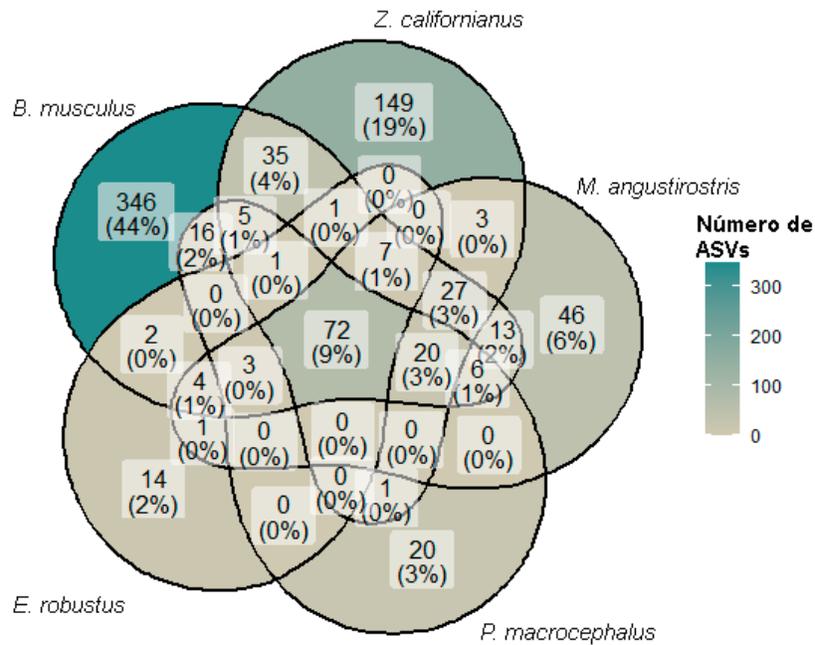


Figura 36. Diagrama de Venn con ASVs del fungoma de las especies de mamíferos marinos estudiadas.

En las muestras de hisopado anal y biopsia de piel de elefante marino del Norte, se observó que la muestra 22BMA01S, de piel, es la más diferente a las demás (**Fig. 37**). No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre los dos epitelios con ninguna métrica de disimilitud (PERMANOVA, $p > 0.05$).

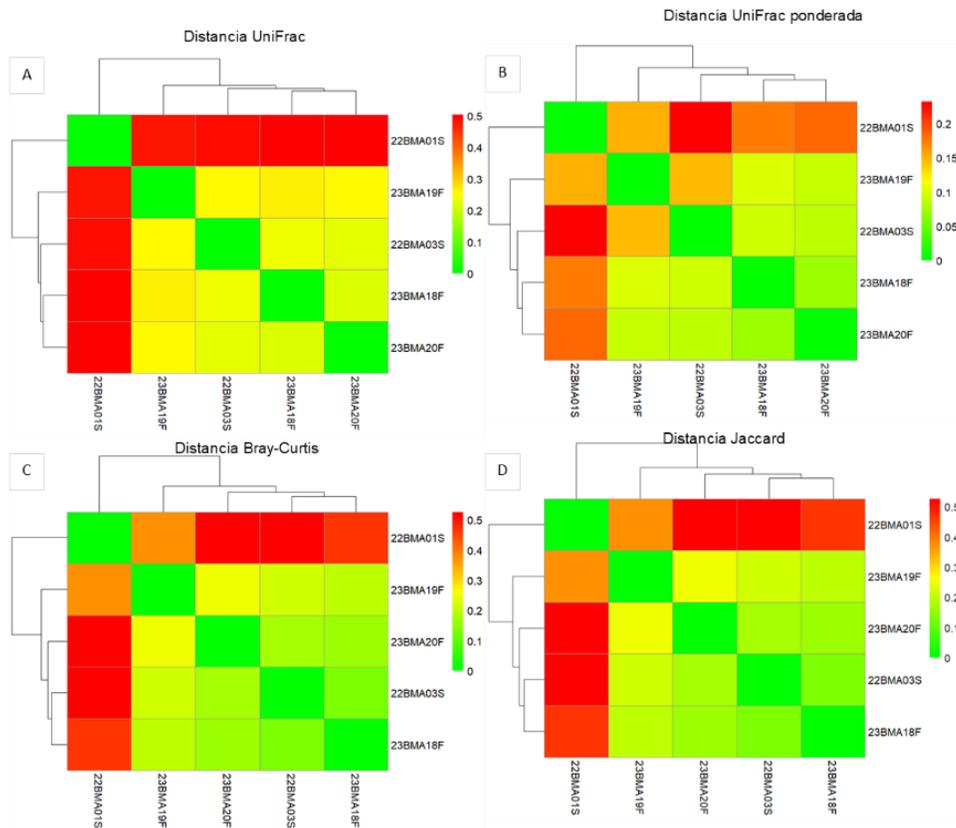


Figura 37. Heatmaps de los índices de diversidad beta por muestra de elefante marino del Norte. Distancias (A) UniFrac, (B) UniFrac ponderada, (C) Bray-Curtis y (D) Jaccard.

La distancia entre las dos muestras fecales de cachalote fue UniFrac = 0.25, UniFrac ponderada = 0.05, Bray-Curtis 0.09, y Jaccard = 0.17, aunque no hubo significación estadística.

6.7.1 Análisis de beta diversidad en lobo marino de California

La beta diversidad por muestra se puede observar gráficamente en la **Fig. 38**. Usando la disimilitud UniFrac, se observó una mayor heterogenicidad (**Fig. 38A**).

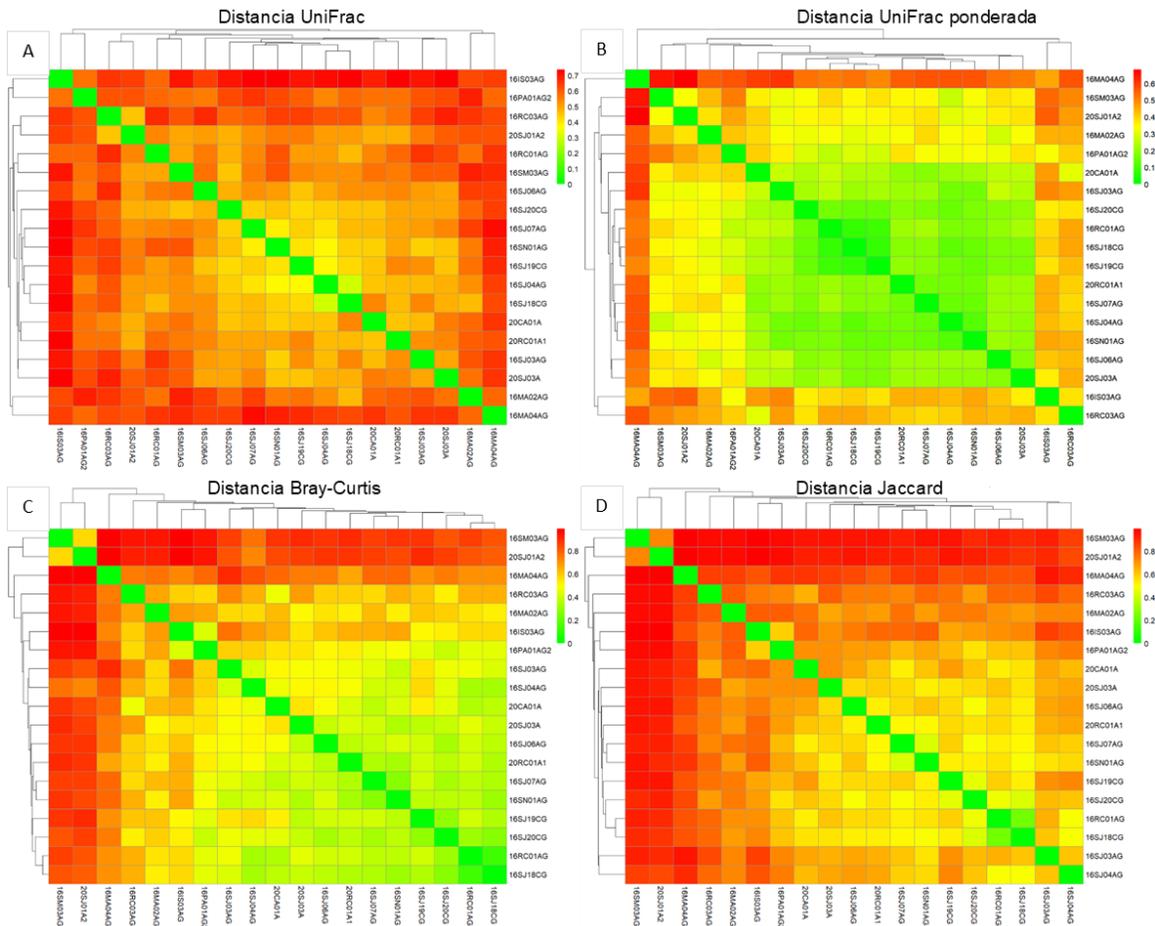


Figura 38. Heatmaps de los índices de diversidad beta del fungoma genital del lobo marino de California. Distancias (A) UniFrac, (B) UniFrac ponderada, (C) Bray-Curtis y (D) Jaccard.

El análisis PERMANOVA entre las variables y covariables mostró diferencias significativas con la medida UniFrac cuando fue comparado entre regiones ecológicas ($p=0.035$). El **Cuadro 22** resume el valor p de las comparaciones de cada variable estudiada. La **Fig. 39** muestra el PCoA de la distancia UniFrac por regiones ecológicas.

Cuadro 22. Valor p de test PERMANOVA entre los índices de diversidad beta y las variables de estudio del lobo marino de California.

Variable	UniFrac	UniFrac ponderada	Bray-Curtis	Jaccard
Cambios epiteliales	0.841	0.971	0.996	1
Región ecológica	0.035	0.089	0.261	0.261
OtHV-1	0.660	0.565	0.936	0.962
zcPV-1	0.766	0.423	0.191	0.242
Grupo etario	0.548	0.930	0.803	0.575

NOTA: resaltado en negritas donde se obtuvo un valor <0.05

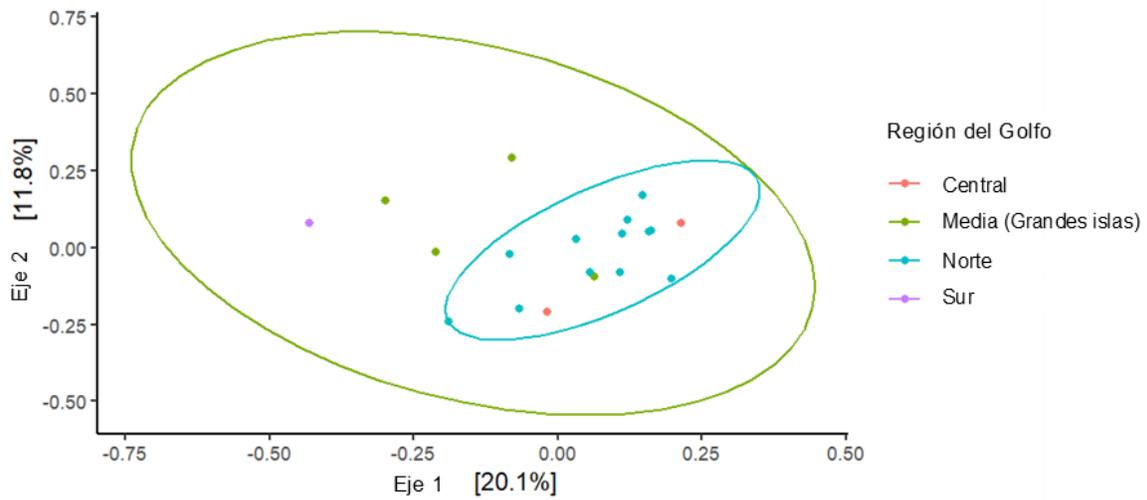


Figura 39. Análisis de Principales Coordenadas de beta diversidad del fungoma genital de lobo marino de California con distancia UniFrac por región ecológica.

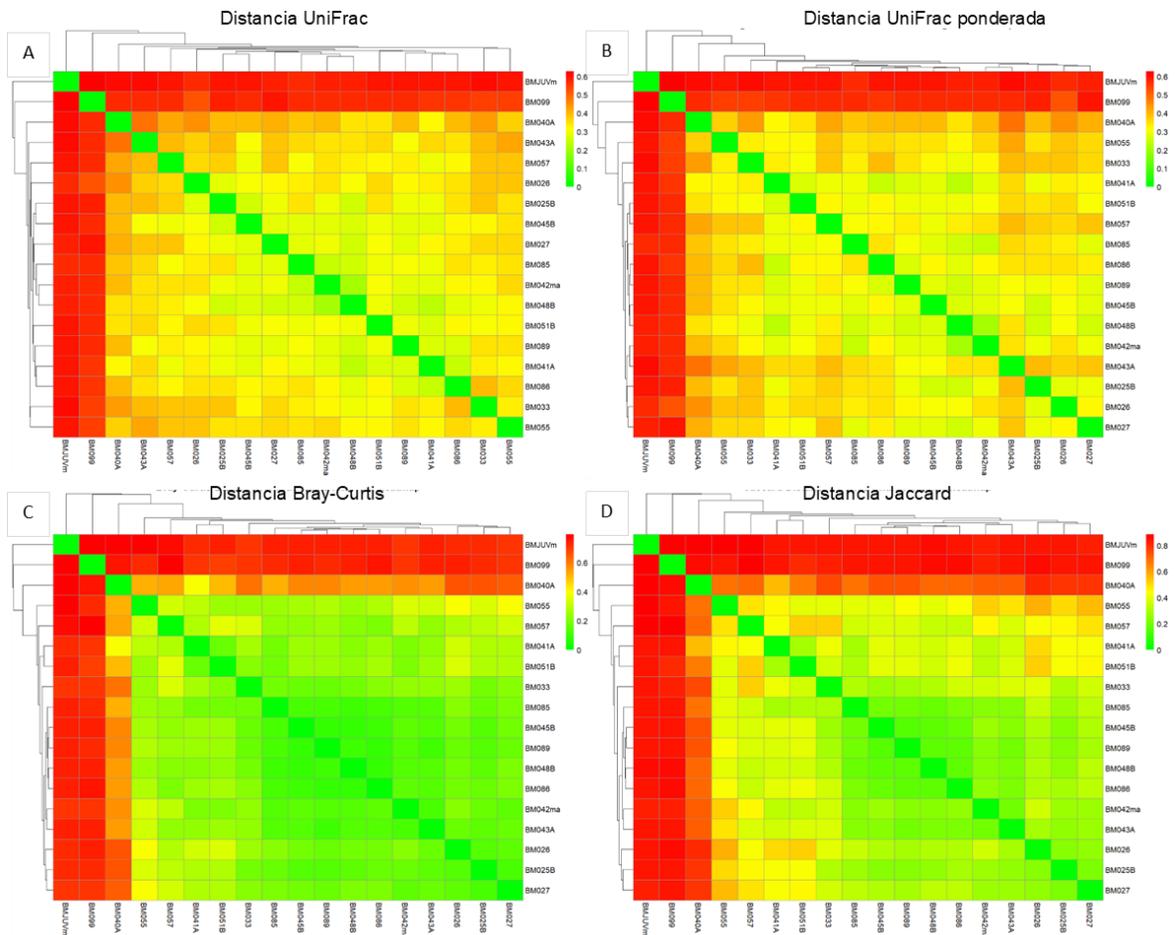


Figura 41. Heatmaps de los índices de diversidad beta del fungoma respiratorio de la ballena azul. Distancias (A) UniFrac, (B) UniFrac ponderada, (C) Bray-Curtis y (D) Jaccard.

Se observaron diferencias significativas entre sexos con una distancia UniFrac ponderada (PERMANOVA, $p=0.025$). Mientras que con las distancias de Bray-Curtis y Jaccard se obtuvieron valores $p = 0.05$. El **Cuadro 23** resume los valores p del análisis PERMANOVA entre las variables de sexo y condición corporal, con las distancias. Además se realizó un PCoA con las distancias para las que hubo diferencia significativa (PERMANOVA, $p<0.05$, **Fig. 42A**) y para las que $p=0.05$ (**Fig. 42B, 42C**).

Cuadro 23. Valor p de test PERMANOVA entre los índices de diversidad beta y la condición corporal y sexo de la ballena azul.

Variable	UniFrac	UniFrac ponderada	Bray-Curtis	Jaccard
Condición corporal	0.478	0.157	0.053	0.059
Sexo	0.179	0.025	0.087	0.117

NOTA: Se resalta en negritas donde se obtuvo un valor <0.05

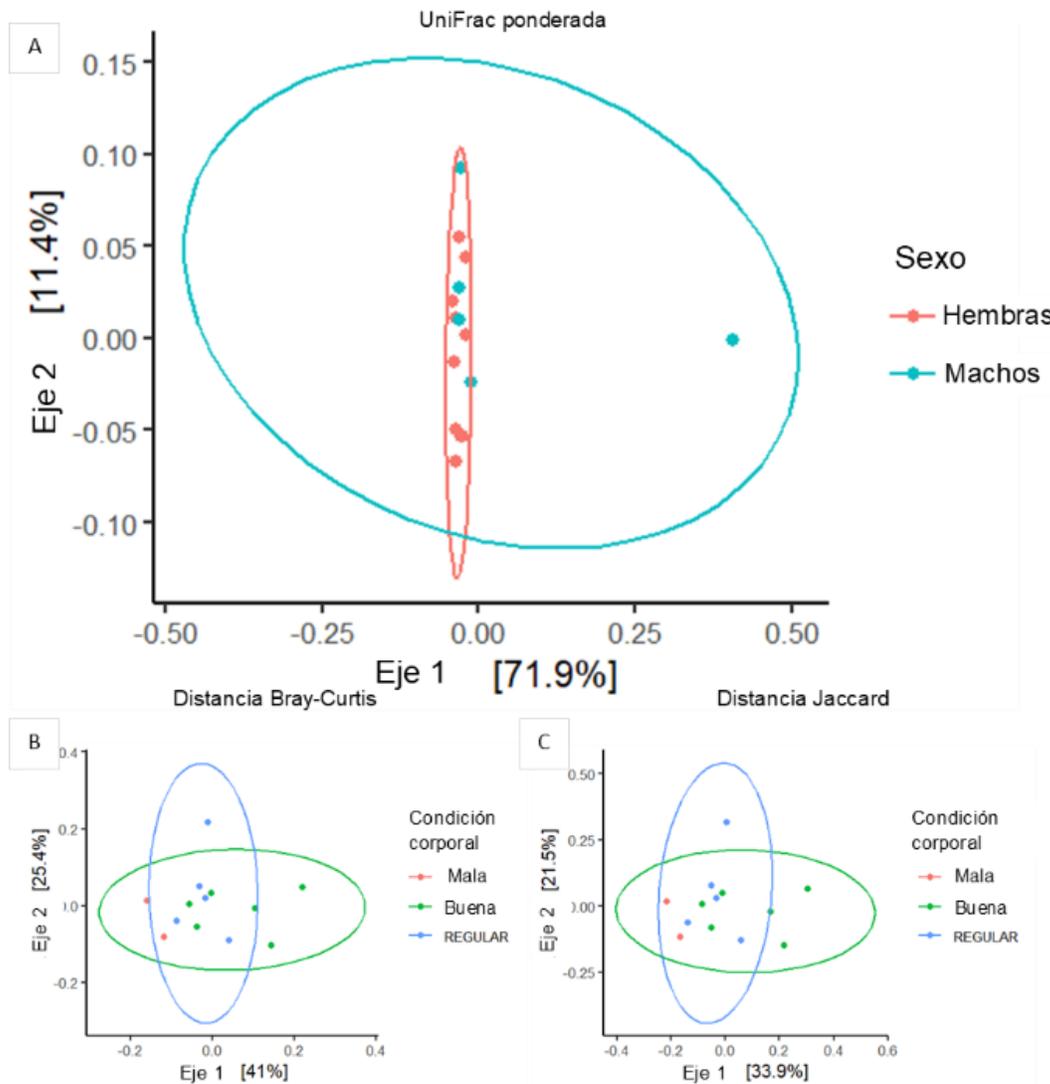


Figura 42. Análisis de Principales Coordenadas de diversidad beta del fungoma respiratorio de la ballena azul. Distancias (A) UniFrac ponderada por sexo, (B) Bray-Curtis por condición corporal, y (C) Jaccard por condición corporal.

Las ballenas con baja condición corporal tuvieron 19 ASVs únicos y las que tenían buena condición corporal tuvieron 87. Hubo más ASVs compartidos entre ballenas con condición buena y regular que entre éstas y mala condición corporal. Además, los ASVs de los órdenes Hypocreales fam *incertae sedis*, Rhizophydiales y de las familias Sistotremastraceae, Trichosporonaceae y Trichomeriaceae estuvieron presentes en las ballenas con buena condición corporal, pero no en las que tenían mala condición corporal.

En cuanto al sexo, los machos tuvieron 70 ASVs únicos y las hembras 136. Tomando en cuenta ambos sexos se observaron 148 ASVs (42% del total) (**Fig. 43**).

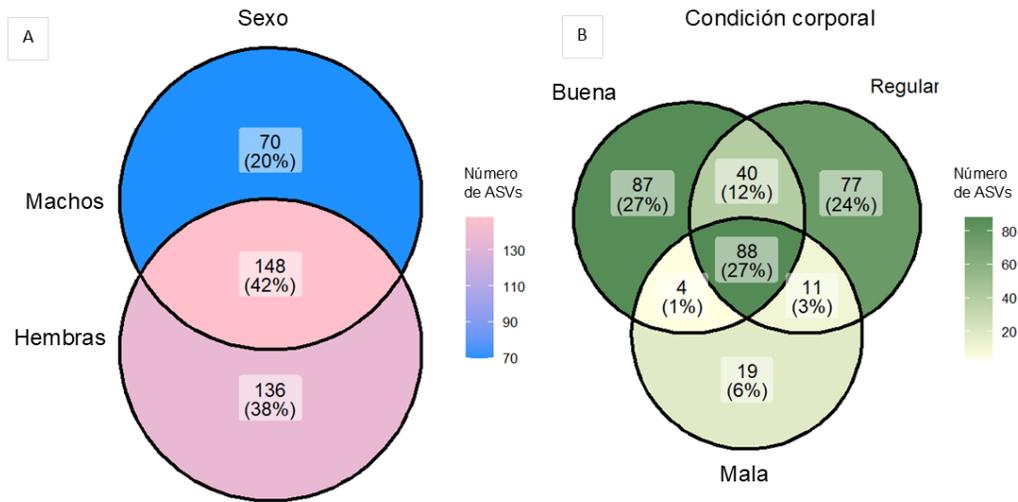


Figura 43. Diagrama de Venn con ASVs de hongos de exhalados respiratorios de ballenas azules. Por sexo (A) y por condición corporal (B).

Dos individuos de BA tuvieron dos muestras en diferentes años. La hembra con el ID325, tuvo dos muestras en 2016 (BM025B y BM034, condición corporal regular) y tres en 2017 (BM050A, BM050B, BM051B, condición corporal buena); y el macho con el ID144 tuvo muestra en 2017 (BM045A, condición corporal buena) y cinco en 2018 (BM088, BM089, BM090, BM095 y BM096, condición corporal desconocida).

La ballena 325 tuvo, en 2016, 31 (19%) ASVs que no tuvo en 2017, y en 2017 tuvo 53 (32%) nuevos ASVs. La ballena 144, en 2017, tuvo 18 (8%) ASVs que no estaban en 2018 y en 2018 año tuvo 125 (54%) nuevos ASVs (**Fig. 44**). Se evaluó la diferencia entre años de cada uno con las cuatro medidas de distancia (UniFrac, UniFrac ponderada, Bray-Curtis y Jaccard), pero en ningún caso las diferencias en su beta diversidad fueron significativas (PERMANOVA, $p > 0.05$).

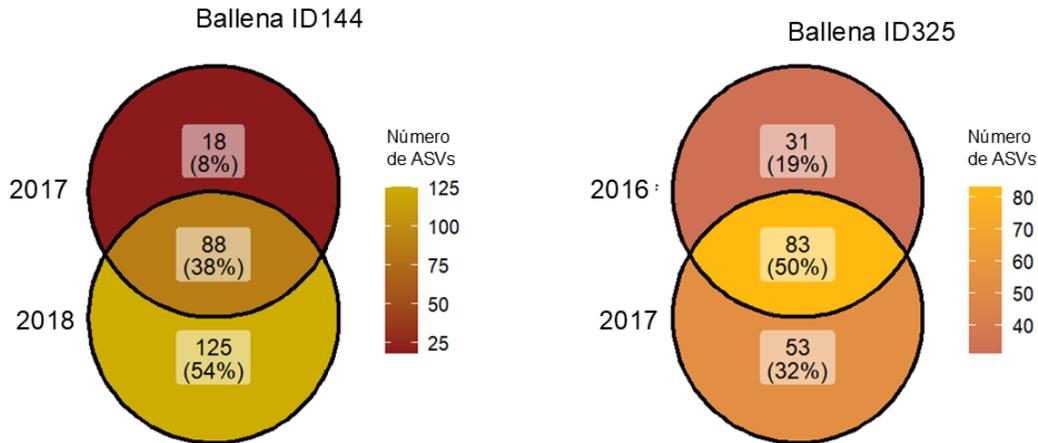


Figura 44. Diagrama de Venn con ASVs de hongos de exhalados respiratorios de mismos individuos de ballenas azules en diferentes años. (A) Ballena 144 en 2017 y 2018. (B) Ballena 325 en 2016 y 2017.

6.8 Abundancia diferencial de hongos en lobo marino de California

Los ASVs del *phylum* Ascomycota encontradas en las muestras de epitelio genital del LMC tuvieron abundancias diferentes respecto a las regiones del Golfo en las que se encuentra su hospedero (**Fig. 45A, 45B** ANOVA, $p= 1.47 \times 10^{-7}$), específicamente las familias Cladosporiaceae (clase Dothideomycetes, Kruskal-Wallis $p=0.005$, **Fig. 45C**), Aspergillaceae (clase Eurotiomycetes, ANOVA $p=0.026$, **Fig. 45D**) y la familia de los Hypocreales (clase Sordariomycetes, ANOVA $p=0.0004$, **Fig. 45E**). Del *phylum* Basidiomycota sólo hubo diferencias en la clase Tremellomycetes (ANOVA, $p=0.042$, **Fig. 45F**). El **Anexo 2** resume las abundancias de los ASV por familia entre las cuatro regiones estudiadas.

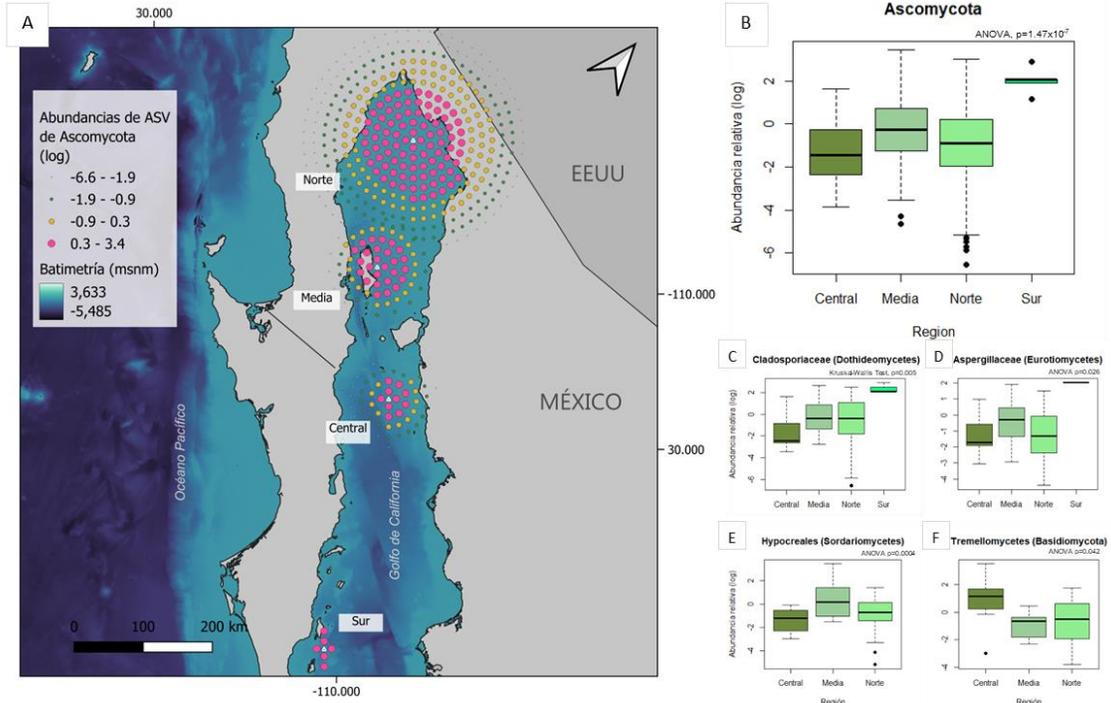


Figura 45. Distribución y abundancia de ASVs en el epitelio genital del lobo marino de California. (A) y (B) Ascomycota, (C) Cladosporiaceae, (D) Aspergillaceae, (E) Hypocreales, (F) Tremellomycetes.

Por grupo etario se encontraron diferencias entre las abundancias de los ASVs de Ascomycetos, habiendo ASVs con mayor abundancia en adultos que en crías (t de Student, $p=0.002$, **Fig. 46A**). De éstos ASVs, la abundancia de los Sur que pertenecen a la clase de los Dothideomycetes fue mayor en las hembras adultas que en crías (Wilcoxon, $p=0.001$, **Fig. 46B**). Los ASV Tremellomycetes tuvieron mayor abundancia en lobos que presentaban cambios epiteliales, (ASC o LSIL), respecto a los que no tenían ningún tipo de anomalía epitelial (Student, $p=0.016$, **Fig. 46C**). La razón Basidiomycota:Ascomycota no varió de acuerdo con la condición epitelial genital del LMC (t de Student, $p=0.855$, **Fig. 46D**).

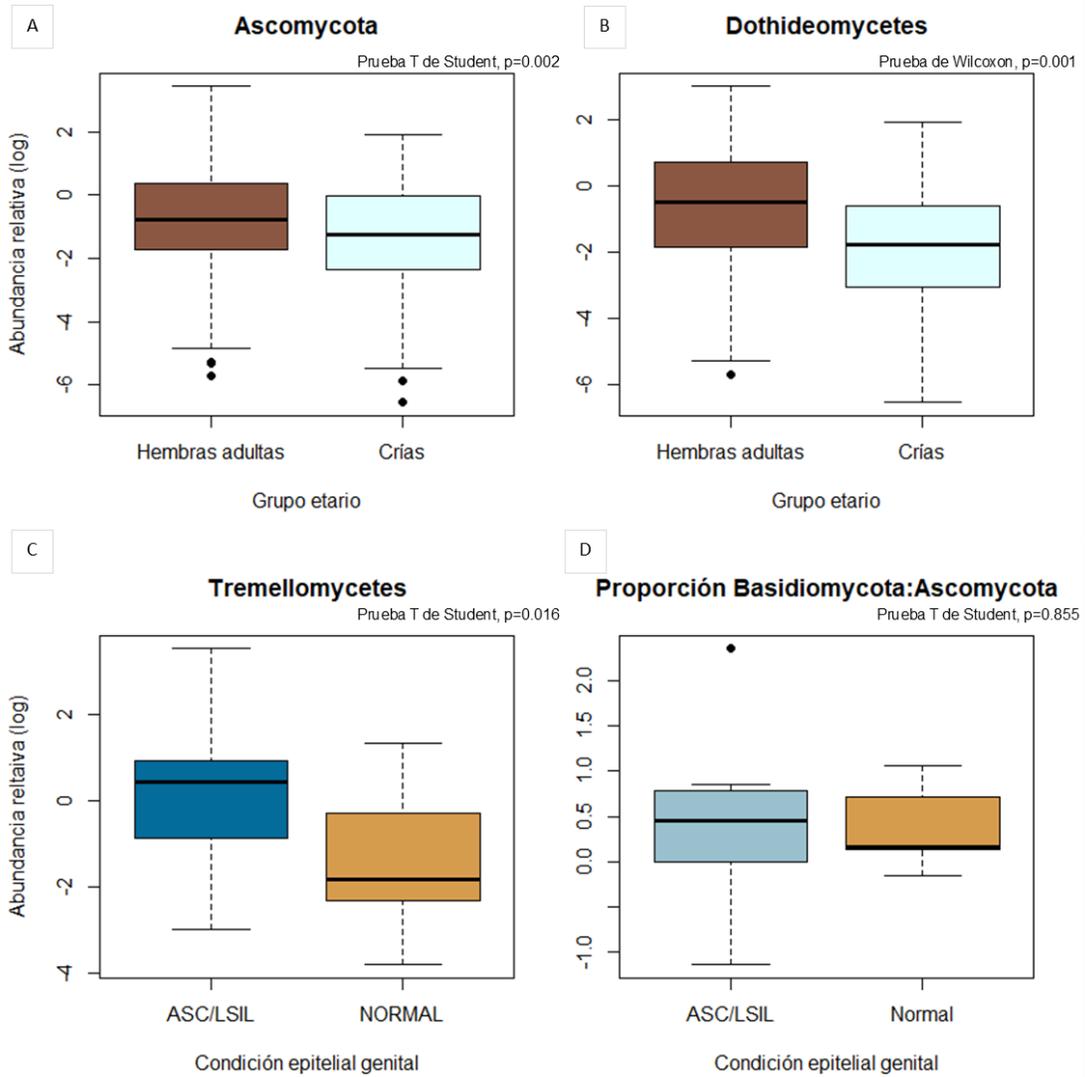


Figura 46. Abundancia diferencial de ASV en el lobo marino de California por grupo etario y condición epitelial. *Phylum* Ascomycota (A) y clase Dothideomycetes (B) entre grupo etario. Abundancia diferencial de clase Tremellomycetes (C) entre individuos LMC con cambios y sin cambios. Proporción de la abundancia de *Phylla* Basidiomycota y Ascomycota entre LMC con cambios y sin cambios.

6.9 Abundancia diferencial de hongos en ballena azul

El **Anexo 3** resume las abundancias de los ASVs por condición corporal, y el **Anexo 4** por condición corporal y sexo de la ballena azul. El siguiente gráfico resume las abundancias de los ASVs dependiendo de la condición corporal y el sexo de las BA. Se observó una diferencia en la abundancia de los ASV de la clase Saccharomycetes entre machos y hembras, siendo mayor en los machos (Prueba T de Student, $p=0.0213$) (**Fig. 47**).

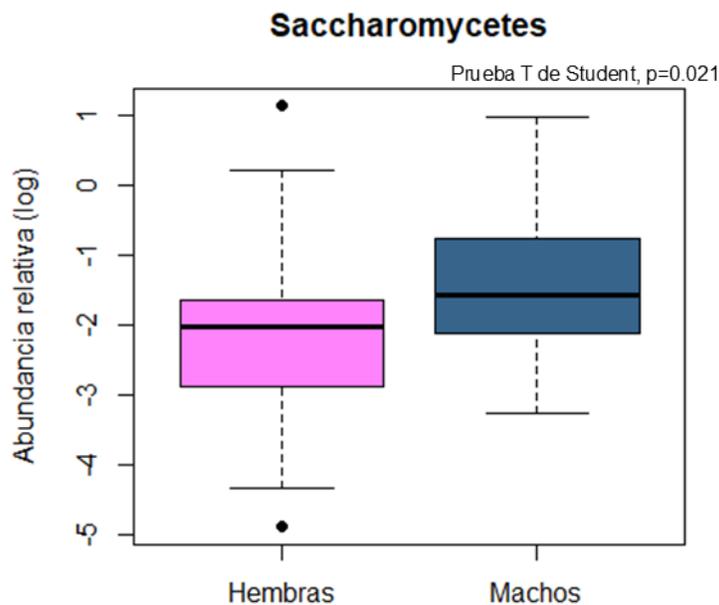


Figura 47. Abundancia diferencial de ASV Saccharomycetes de acuerdo con el sexo de ballenas azules.

6.10 Análisis de co-ocurrencia de fungoma y bacterioma

6.10.1 *Fungoma y bacterioma en el tracto genital del lobo marino de California*

Se compilaron los datos del bacterioma genital de 23 LMC de 2016 (Pereira-Aguilar *et al.* 2023) y se juntaron con los datos del fungoma genital de las hembras adultas de 2016 de esta tesis. Solamente cinco individuos tuvieron muestras que amplificaron tanto para el gen 16S (bacterias) como para el gen ITS1 (hongos) como se puede observar en el **Cuadro 24**.

Cuadro 24. Muestras de hisopado genital de lobo marino de California para las que se contó con información del bacterioma y fungoma.

Bacterioma	Fungoma	Bethesda	OtHV-1	ZcPV1
16CA01AG		ASC	N	P
16CA02AG		ASC	N	N
16GR02AG		N	N	P
16GR03AG		LSIL	N	N
16IS01AG		N	P	P
	16IS03AG	ND	P	P
16IS05AG		N	N	P
16LO03AG		ASC	P	N
16MA01AG		N	P	P
16MA02AG	16MA02AG	ASC	P	P
	16MA04AG	ASC	P	N
16MA05AG		N	P	N
	16PA01AG	N	P	P
16RA01AG		N	P	N
16RA03AG		ASC-US	P	P
16RC01AG	16RC01AG	LSIL	P	P
16RC02AG		LSIL E	P	P
	16RC03AG	LSIL	P	P
16SE02AG		ASC	P	P
16SE03AG		N	P	N
16SJ01AG		LSIL	P	N
16SJ02AG		N	P	P
	16SJ03AG	ASC	P	P
	16SJ04AG	N	P	P
	16SJ06AG	ND	P	P
16SJ07AG	16SJ07AG	ASC	P	P
16SN01AG	16SN01AG	ASC	P	N
16SN02AG		ASC	P	P
16SPM02AG		LSIL	P	N
16SPM03AG	16SPM03AG	ASC	P	N

Todas las muestras de epitelio genital de hembras de LMC de las que pudo amplificarse ADN de bacterias y de hongos tenían diagnóstico de ASC o LSIL, sin embargo, no se encontró asociación entre el diagnóstico epitelial y si fueron positivas a ADN de bacterias u hongos (Test de Fischer, $p=0.1282$).

La matriz de adyacencia ponderada mostró en general baja co-ocurrencia entre los dos dominios, con las familias Malasseziaceae, Cryptococcaceae y Cladosporiaceae las que más co-ocurrencia tienen con bacterias de las familias Rhodobacteriaceae, Leptotrichiaceae, Corynebacteriaceae, entre otros, como se observa en el **Cuadro 25**, que resume las 15 asociaciones más fuertes de co-ocurrencia entre familias de hongos con familias de bacterias.

Cuadro 25. Familias de hongos con mayor co-ocurrencia con familias de bacterias en el epitelio genital del lobo marino de California.

Familia de hongos	Familia de bacterias	Asociación
Malasseziaceae	Leptotrichiaceae	3.267
Malasseziaceae	Rhodobacteriaceae	2.785
Cryptococcaceae	Peptostreptococcales-Tissierellales	2.371
Stachybotryaceae	Peptostreptococcales-Tissierellales	2.194
Cryptococcaceae	Corynebacteriaceae	1.799
Cryptococcaceae	Peptostreptococcaceae	1.791
Cladosporiaceae	Unclassified	1.708
Cladosporiaceae	Rhodobacteriaceae	1.683
Stachybotryaceae	Unclassified	1.647
Aspergillaceae	Ruminococcaceae	1.581
Malasseziaceae	Lachnospiraceae	1.578
Aspergillaceae	Lachnospiraceae	1.571
Cladosporiaceae	Xenococcaceae	1.431
Cladosporiaceae	Fusobacteriaceae	1.424
Malasseziaceae	Unclassified	1.383

De manera general, la coocurrencia de familias de hongos y bacterias fue baja (Fig 48).

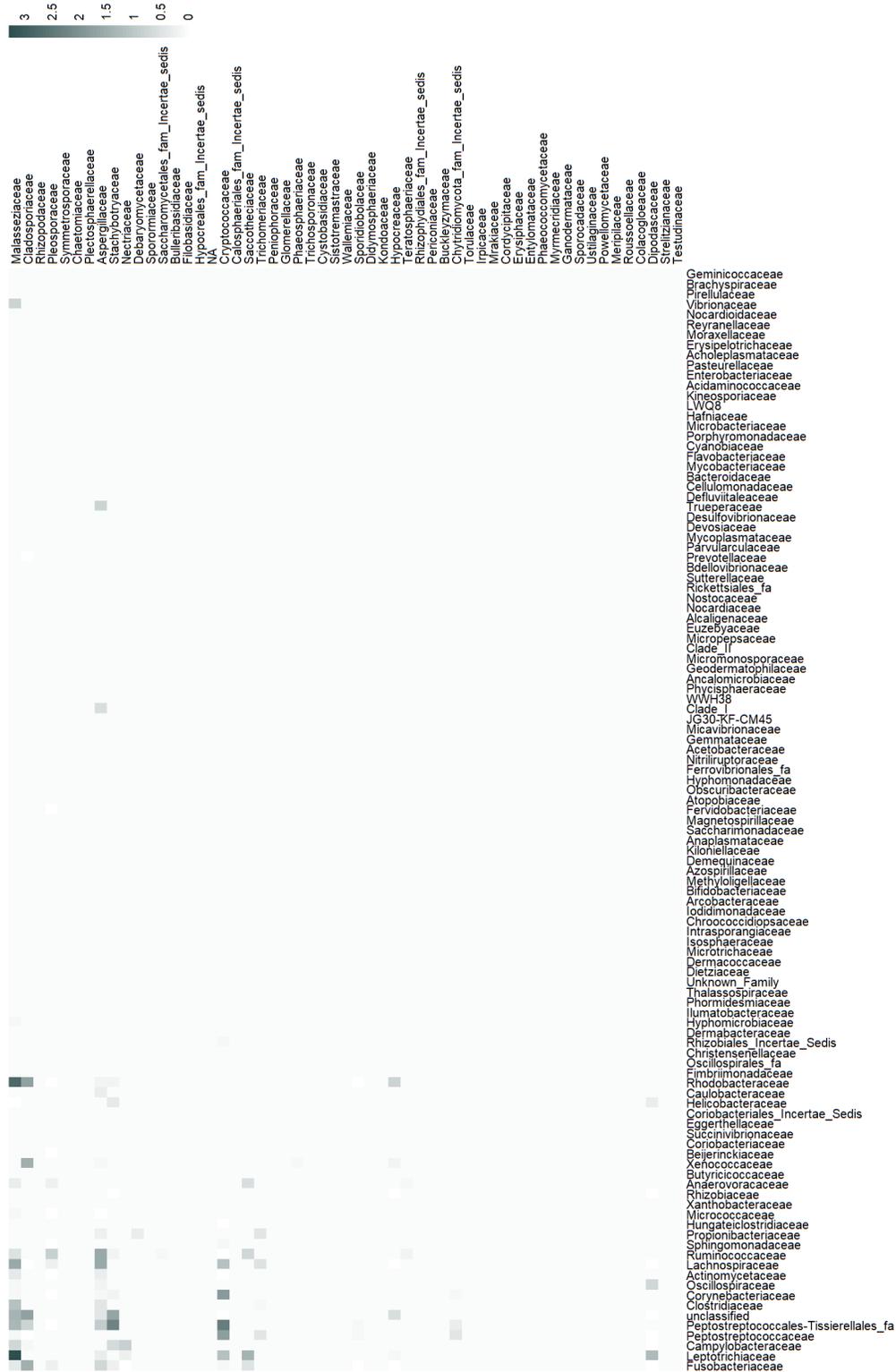


Figura 48. Heatmap de correlación de familias de hongos y familias de bacterias del tracto genital del lobo marino de California.

La red de co-ocurrencia hongo-bacteria identificó 27 comunidades en total y se puede observar que tanto hongos como bacterias tienden a agruparse más entre su propio dominio. De estas, la comunidad con más ASVs en el LMC fue la comunidad 4 con 655 (96.89%) ASVs de bacterias y 21 (3.11%) ASVs de hongos; seguida de la comunidad 1 con 34 ASVs (12.59%) de bacterias y 236 (87.41%) de hongos. De las 27 comunidades de co-ocurrencia, solo seis estaban constituidas por bacterias y hongos, y en todas, a excepción de la comunidad 1, con una mayoría de bacterias (**Fig. 49**). A pesar de ello, la interconectividad mejoró ligeramente al incluir bacterias y hongos. El **Cuadro 26** describe las propiedades topográficas de la red de co-ocurrencia de bacterias y hongos.

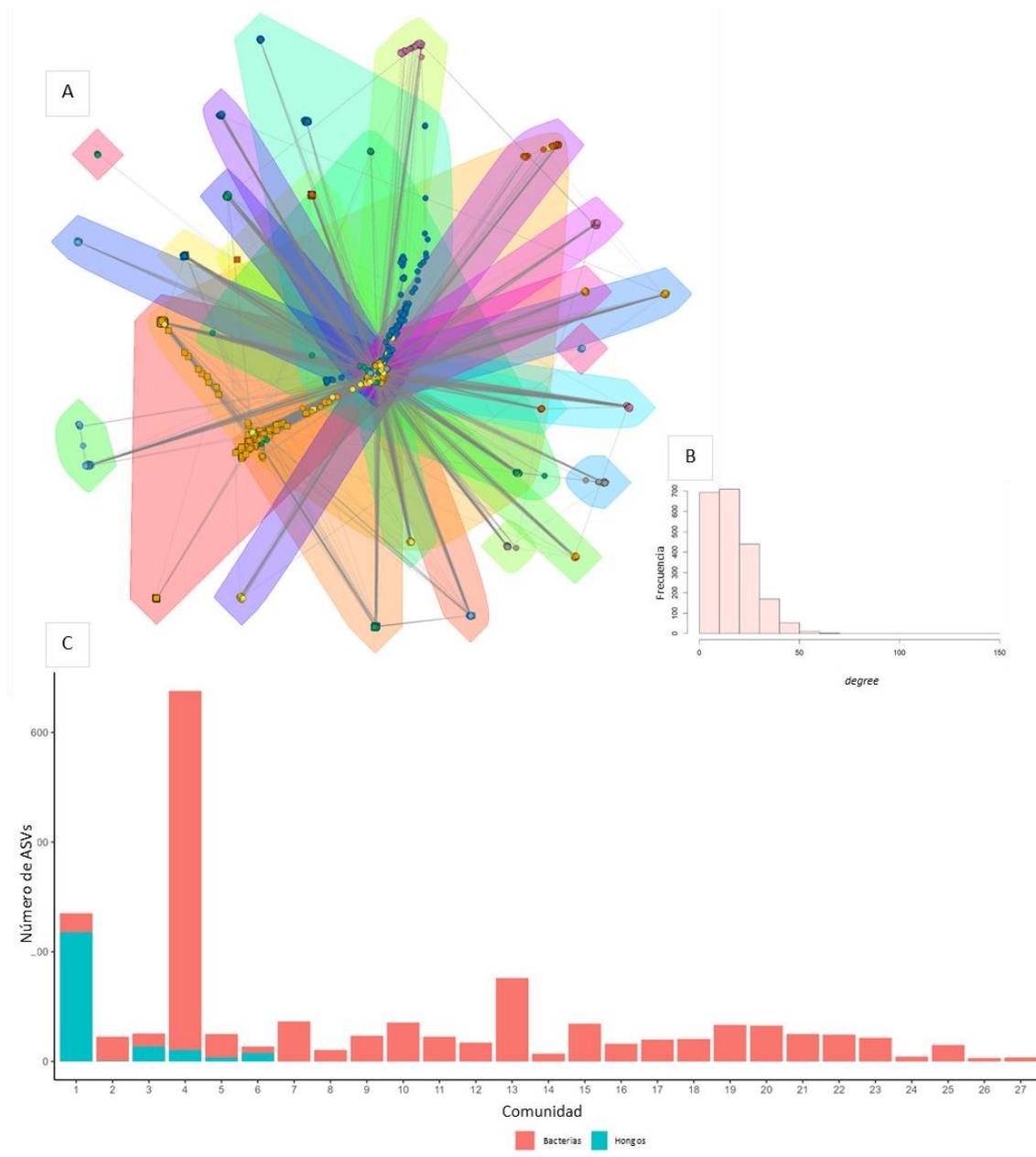


Figura 49. Red de co-ocurrencia de bacterias y hongos de epitelio genital de lobo marino de California. (A) agrupado por comunidades. (B) Histograma de distribución de *degree* de la red del lobo marino de California. (C) Composición de las comunidades de la red.

Cuadro 26. Características topográficas de la red de co-ocurrencia de hongos y bacterias del epitelio genital del lobo marino de California.

Características topográficas de la red	Valor
<i>Degree</i> distribution	Mediana: 15 Media: 16.95 Min: 1 Max: 144
Diámetro	9
Distancia promedio	3.877905
Coefficiente de clusterización	0.4207669

6.10.2 Fungoma y bacterioma en exhalado respiratorio de la ballena azul

Se compilaron los datos del bacterioma respiratorio de 15 soplos de BA (Domínguez-Sánchez 2020) y se juntaron con los datos del fungoma respiratorio de esta tesis, pero sólo aquellas muestras que fueron examinadas para 16S (bacterias) e ITS1 o ITS2 (hongos). Ocho individuos tuvieron muestras que amplificaron tanto para el gen 16S como para el gen ITS1 como se puede observar en el **Cuadro 27**.

Cuadro 27. Muestras de exhalado respiratorio de ballena azul para las que se contó con información del bacterioma y fungoma.

Bacterioma	Fungoma	Año	ID de la ballena	Sexo	CC
BM014		2016	132	Hembra	DESC.
	BM025B	2016	325	Hembra	REGULAR
	BM026	2016	329	Hembra	MALA
	BM027	2016	540	Hembra	MALA
	BM033	2016	12	Macho	REGULAR
	BM034	2016	325	Hembra	REGULAR
BM037		2016	819	NA	DESC.
BM040	BM040A	2016	900	NA	DESC.
BM041	BM041A	2017	240	Macho	BUENA
BM042		2017	523	Hembra	BUENA
BM043	BM043A	2017	304	Hembra	BUENA
BM044	BM044A	2017	304	Hembra	BUENA
BM045	BM045B	2017	144	Macho	REGULAR
	BM048B	2017	49	Hembra	BUENA
BM050	BM050A	2017	325	Hembra	BUENA
BM051	BM051B	2017	325	Hembra	BUENA
BM052		2017	366	Hembra	DESC.
BM054		2017	885	NA	BUENA
	BM055	2017	885	NA	BUENA
BM056		2017	885	NA	BUENA
BM057	BM057	2017	480	Hembra	REGULAR
BM059		2017	NA	NA	DESC.

Ni el sexo ni la condición corporal parecieron influir en que fueran detectables tanto hongos como bacterias en las mismas muestras (Test de Fisher, $p=0.374$ y $p=0.784$, respectivamente).

El **Cuadro 28** resume las 15 asociaciones más altas de co-ocurrencia entre familias de hongos con familias de bacterias. Destaca la familia Cladosporiaceae con mayor correlación con bacterias.

Cuadro 28. Familias de hongos con mayor co-ocurrencia con familias de bacterias en las muestras de exhalado respiratorio de ballena azul.

Familia de hongos	Familia de bacterias	Asociación
Cladosporiaceae	Lachnospiraceae	12.009
Cladosporiaceae	Moraxellaceae	9.423
Cladosporiaceae	Unclassified	4.803
Cladosporiaceae	Oscillospiraceae	4.786
Cladosporiaceae	Pasteurellaceae	4.118
Pleosporaceae	Lachnospiraceae	3.666
Cladosporiaceae	Veillonellaceae	3.591
Cladosporiaceae	Ruminococcaceae	3.476
Cladosporiaceae	Pseudomonaceae	3.354
Malasseziaceae	Flaviobacteriaceae	3.255
Cladosporiaceae	Comamonadaceae	3.093
Pleosporaceae	Moraxellaceae	2.920
Malasseziaceae	Cardiobacteriaceae	2.795
Cladosporiaceae	Christensenellaceae	2.735
Cladosporiaceae	Prevotellaceae	2.734

Pocas familias de hongos y bacterias co-ocurrieron en el soplo de la ballena azul (**Fig. 50**).

Con la red de co-ocurrencia se identificaron 24 comunidades. La mayoría de las comunidades constituidas por hongos y bacterias. La comunidad con más ASVs en la BA fue la comunidad 2, con 130 (43.04%) ASVs de bacterias y 172 (56.95%) ASVs de hongos; seguido de la comunidad 15, con 296 (98.34%) ASVs de bacterias y 5 ASVs (1.66%) de hongos; y la comunidad 1, con 24 (11.21%) ASVs de bacterias y 190 (88.78%) ASVs de hongos. De las 24 comunidades, solo tres estuvieron constituidas únicamente por bacterias y sólo la comunidad 2 tuvo estuvo constituida casi en partes iguales por ambos dominios (**Fig. 51**). Las características topográficas de la nueva red se resumen en el **Cuadro 29**.

Cuadro 29. Características topográficas de la red de co-ocurrencia de hongos y bacterias del exhalado respiratorio de ballena azul.

Características topográficas de la red	Valor
<i>Degree distribution</i>	Mediana: 12 Media: 13.06 Min: 1 Max: 334
Diámetro	9
Distancia promedio	3.692032
Coefficiente de clusterización	0.0916

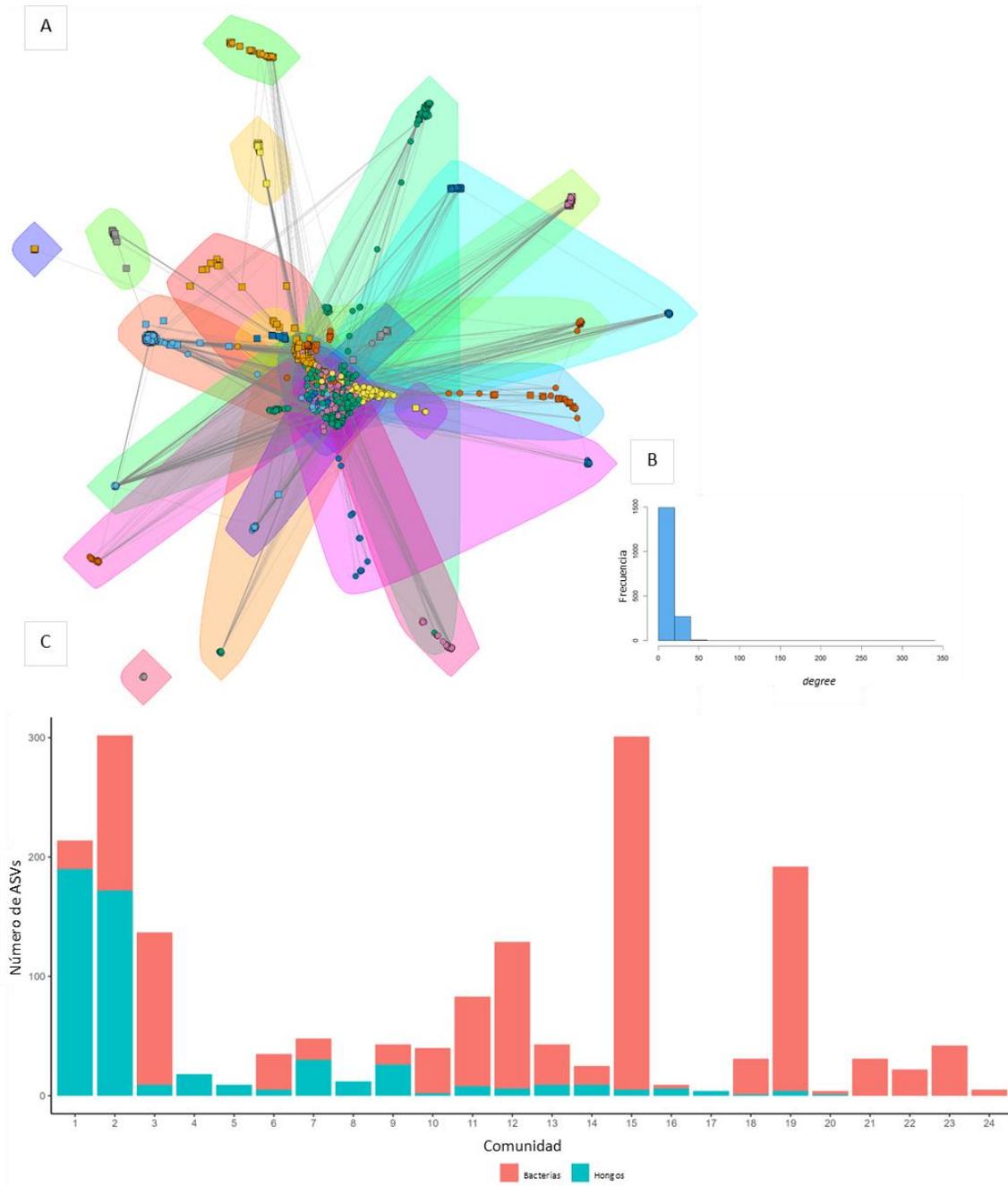


Figura 51. Red de co-ocurrencia de bacterias y hongos del exhalado respiratorio de la ballena azul. (A) agrupado por comunidades. (B) Histograma de distribución de degree de la red de la ballena azul (C) Composición de las comunidades de la red.

7. DISCUSIÓN

7.1 Estandarización de protocolo de PCR

Dado que la técnica de PCR es usada para realizar miles de copias de un gen de interés (amplificar), y tiene aplicaciones diagnósticas (Khera *et al.* 2023), en esta tesis se utilizó para investigar la presencia de hongos en las muestras y caracterizar el fungoma. Si bien, en este trabajo se usaron extractos de ADN que ya se encontraban disponibles para su uso, antes fue necesario realizar una serie de experimentos iniciales para encontrar, incluso, la concentración de ADN mínima que pueda ser detectada mediante PCR, que, si bien es una técnica sensible, tiene un límite de detección.

7.1.1 *Concentración mínima detectable*

Tras diluir el ADN purificado de *Sclerotinia* sp. se identificó que es necesario que la muestra a analizar tenga por lo menos 0.003 ng/ μ L de ADN de hongos de buena calidad para que pueda ser detectado con los cebadores para ITS1 (ITS1-F e ITS2r) e ITS2 (ITS3 e ITS4). En diluciones mayores, aunque teóricamente cuenten con moléculas de ADN todavía, son indetectables tras la visualización en gel de electroforesis al 1% teñidas con bromuro de etidio.

Esta información es importante tenerla en cuenta antes de efectuar el resto de las reacciones ya que, tratándose de estudios del microbioma, el ADN de hongos puede ser muy escaso, incluso menor al 0.1% del total de ADN (Halwachs *et al.* 2017). Por ello es importante tener presente que una reacción de PCR negativa no es criterio por sí solo para asumir completa ausencia del segmento de interés (Khera *et al.* 2012).

La cantidad de ADN de hongos puede verse influenciada por varios factores: en primer lugar, si el hongo es metabólicamente activo en el tejido muestreado, es de esperarse una mayor cantidad de ADN que si se tratase de una célula muerta o de un hongo que de manera circunstancial estuvo presente en la muestra, pero no coloniza el epitelio normalmente (Nash *et al.* 2019). En segundo lugar, existen condiciones fisiológicas o fisiopatológicas que puedan favorecer o limitar la

colonización de hongos, y con ello intervenir en la cantidad de ADN que pueda ser extraído (Frau *et al.* 2019). Por ejemplo, *Candida* spp. puede aumentar su abundancia en el epitelio vaginal durante el estro o en procesos inflamatorios como la enfermedad inflamatoria intestinal (Tizard 1995, Lai *et al.* 2018). Y, por último, debido a su rígida pared celular, los protocolos de extracción de ADN usados para bacterias pueden no ser los más efectivos para obtener suficiente material genético fúngico para las PCR (Frau *et al.* 2019).

7.1.2 Medios selectivos para hongos: agar papa dextrosa (PDA)

Es importante mencionar que una gran parte del fungoma está representada por especies no cultivables lo que hace que este método no nos permita describir ampliamente las especies de hongos (Underhill e Iliev 2014, Lavrinienko *et al.* 2021), sin embargo, sí provee de información como su apariencia macroscópica y microscópica (Arenas 2008). Además, dadas las condiciones de muestreo y que se trabaja con animales de vida libre, el transporte de las placas a condiciones de laboratorio dificulta su procesamiento. De las 10 placas en las que se sembraron hisopados en el medio selectivo de hongos (PDA), sólo hubo crecimiento en cuatro de ellas. Por el contrario, en el medio agar-chocolate, selectivo para bacterias, hubo crecimiento en todas.

Esta aproximación se realizó con la intención de evaluar si los métodos de extracción de ADN con los que se trabajaron las muestras de los mamíferos marinos evaluadas en esta tesis, como el protocolo de fenol:cloroformo:isoamil, son suficientes para tener buena calidad y altas concentraciones de ADN fúngico para ser amplificados mediante PCR.

7.1.2.1 Identificación de los hongos de hisopados genitales de lobo marino de California aislados en PDA

La morfología macroscópica (coloración marrón o anaranjado) y microscópica (hifas tabicadas y cuerpo fructífero en forma de racimo) de la muestra 23BE06 la hace compatible con los géneros *Stemphylium* sp. (Ascomycota) (Hong *et al.* 2012, Elkhateeb y Daba 2021) y *Alternaria* sp. (Ascomycota) (Li *et al.* 2023). Tras la secuenciación de ITS1, se develó, con un 93% de pureza, que la cepa aislada se

trataba, efectivamente, del género *Alternaria*. Este hongo ya ha sido reportado en el tracto gastrointestinal en humanos, y se observa un aumento en su abundancia en pacientes con colitis ulcerativa (Li *et al.* 2023), y con neuropatías como enfermedad de Alzheimer (Tiew *et al.* 2020). Por otra parte, se conocen las propiedades inmunomoduladoras, antitumorales, antibacterianas e incluso antifúngicas de sus metabolitos secundarios, aunque aún falta mucho por conocer sobre dichos biocompuestos (Zhao *et al.* 2022).

La caja Petri más difícil de aislar y caracterizar fue la que pertenecía al individuo 23BE35. Tras observar sus morfologías macro- y microscópicas, con abundantes esporas, se pensó que se trataban de hongos de los géneros *Penicillium* spp. y *Talaromyces* spp. El primero ha sido descrito en ambientes costeros (Park *et al.* 2019), como comensal del tracto gastrointestinal en humanos (Strati *et al.* 2016) y comensal en cavidad oral de mamíferos (Lai *et al.* 2018), por lo que no sería extraño considerarlo un componente del fungoma genital del LMC. *Talaromyces* spp., por su parte, antes de 2012 se pensaba que se trataba de una forma sexuada de *Penicillium* por sus características morfológicas y metabólicas similares, sin embargo, recientemente se han dividido en dos clados diferentes (Yilmaz *et al.* 2014). Su papel funcional en el microbioma no se ha estudiado a profundidad, pero existen reportes de que en pacientes humanos un aumento en su abundancia en el intestino está vinculado a enfermedad hepática (Wang *et al.* 2023).

Tras la secuenciación de los morfotipos aislados de la muestra 23BE35, los géneros de hongo identificados con ITS1 fueron *Malassezia*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Talaromyces*. *Malassezia* es un género de levaduras comensal en uniones mucocutáneas, lo que explicaría su presencia en los hisopados genitales (Guillot *et al.* 1998). *Cladosporium*, por su parte, tiene características halotolerantes, por lo que no es de extrañarse que pueda encontrarse en ambientes marinos costeros (Lee *et al.* 2023). Particularmente, *Penicillium* y *Talaromyces*, han pasado por varias re-clasificaciones taxonómicas dado que cada vez que se estudian a partir de sustratos específicos como heces de herbívoros o playas se describan nuevas especies o metabolitos (Park *et al.* 2019, Guevara-Suárez *et al.* 2020). Debido a

esto, es posible que muchos aspectos de su ecología *in situ* (como asociaciones con otros hongos) puede que aún no se hayan descrito en otros nichos ecológicos, como el tracto genital del LMC analizado en esta tesis.

La muestra aislada del individuo 23BE36 desde su apariencia macroscópica, mucoide y rosa brillante, hasta su apariencia microscópica, con pseudohifas, indicó que se trataba de una levadura. Debido a esto, en un principio se pensó que se trataba de *Rhodotorula mucilaginosa*, ya que esta levadura ha sido aislada de tracto genital de manatíes en cautiverio (Sidrim *et al.* 2015), pero también fue detectada en un caso de dermatitis en lobo marino del sur (*Otaria flavescens*, Álvarez-Pérez *et al.* 2010), lo que evidencia que es halotolerante y que también pueda ser comensal en otros mamíferos marinos. Sin embargo, la secuenciación demostró, con un 100% de pureza, que se trataba del género *Symmetrospora*. Esta levadura se ha reportado en agua marina, esponjas de mar y el tracto gastrointestinal de animales terrestres en cautiverio (Haelewaters *et al.* 2021, James *et al.* 2022, Wang *et al.* 2022).

Finalmente, la muestra aislada del individuo 23BE39 mostró pequeñas colonias oscuras, de crecimiento lento. Su morfología macro- y microscópica sugirió que se trataba de hongos Cladosporiales. Estos hongos suelen tener baja afinidad para los cebadores comúnmente usados para identificar ITS (Lee *et al.* 2023), y después de hacer la extracción de ADN y reacción de PCR para ITS1 e ITS2, esta muestra fue la que tuvo las bandas más tenues. Con la secuenciación de ITS1 se confirmó que el hongo aislado de este individuo pertenecía al género *Cladosporium*, que se describe como comensal en cavidad oral, tracto gastrointestinal y vaginal en humanos (Lai *et al.* 2018), y al ser halotolerante (Lee *et al.* 2023), es factible que también sea comensal en mamíferos marinos.

Si bien, la literatura menciona que los hongos simbiotes de mamíferos crecen mejor a 37°C, sólo en casos de micosis profundas se recomienda aislar a 37°C (Arenas 2008). Dado que los hisopados genitales se realizan de una manera mínimamente invasiva para no estresar al animal, es posible que las especies de

hongos colectadas estuvieran en una temperatura menor y por ello hayan crecido mejor a temperatura ambiente y no a 37°C.

7.1.2.2 *Extracción de ADN*

Para el estudio de comunidades micóticas el protocolo de extracción de ADN usado debe proveer de suficiente material genético y de buena pureza, representativo de la presencia y abundancia de cada taxón en la muestra. Al respecto, los métodos con digestión enzimática con fenol:cloroformo proveen buenas cantidades de ADN de hongos para analizar sus comunidades (Rosenbaum *et al.* 2019).

En esta tesis se observó que, usando el mismo protocolo de extracción de ADN para hongos y bacterias, se obtenía más concentración de ADN en bacterias que en hongos, aunque este resultado debe tomarse con cautela dado que la biomasa o densidad de células de las bacterias no se estimó previo a la extracción. También hubo diferencias en la pureza del ADN. El ADN de hongos tuvo una relación de 260/230 más baja que el de bacterias, lo que podría indicar la presencia de reactivos como fenol o EDTA (Thermo Scientific, 2016).

Dado que los reactivos usados en la extracción y purificación de ADN como el fenol o la proteinasa K pueden interferir con la reacción de PCR (Farell y Alexandre 2012), se recomienda realizar un paso extra de lavado con etanol (Shin 2012).

Respecto a la relación de biomasa:ADN de hongos, se observó una correlación negativa. Esto tiene sentido partiendo desde el hecho que, de todo el ADN del microbioma, entre <0.1-10% puede ser de hongos (Halwachs *et al.* 2017, Lavrinienko *et al.* 2021), aunque su biomasa puede llegar a ser del 20% (Edwards *et al.* 2017), lo que significa, en resumen, que la biomasa del hongo no necesariamente influye en la cantidad del ADN extraído.

7.1.2.3 *Potenciadores de PCR*

Pese a la baja pureza del ADN extraído de los medios de cultivo en PDA, fue posible amplificar las regiones ITS1 e ITS2 de todos los morfotipos, y usando una región específica para bacterias se comprobó que no hubo contaminación de las colonias en PDA a las de ACH o viceversa. Sin embargo, dada la posibilidad de que

permanecieran compuestos fenólicos en el ADN extraído, se agregaron potenciadores de la PCR al mix de reacción para las muestras de los mamíferos marinos.

El suero de albúmina bovina (BSA) y la formamida brindan mayor estabilidad térmica a la taq polimerasa e interactúan con los inhibidores de la PCR (como el fenol) para evitar que éstos se peguen a la polimerasa (Farell y Alexandre 2012), y la formamida, por su parte, aumenta la especificidad de la reacción (Sarkar *et al.* 1990). Esto se comprobó en las reacciones de ADN genital del LMC, donde fue posible ver con más claridad bandas de amplicón. Esto es relevante porque significa que en estudios de fungoma, se debe contemplar entonces: baja concentración y calidad de ADN para disminuir el riesgo de los falsos negativos, y ajustar el protocolo en función a eso.

7.2 Subregión de ITS1 es más informativa para mamíferos marinos

En esta tesis se observó que ITS1 es más sensible para identificar ADN de hongos que ITS2 en hisopados genitales y anales, muestras de piel, heces y soplos de pinnípedos y cetáceos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la preferencia del marcador puede variar dependiendo del tipo de muestra analizada o al tipo de estudio. Esto se ha visto antes en estudios realizados en rumen (Edwards *et al.* 2017), bioaerosoles (Mbareche *et al.* 2020), biopsias de piel en humanos (Ali *et al.* 2019) o para la identificación de especies de *Aspergillus* en particular (Henry *et al.* 2000). Por ejemplo, Edwards *et al.* (2017) encontraron mejor resolución usando ITS1 para describir hongos anaeróbicos ruminales; por su parte, Nilsson *et al.* (2019) mencionan que ITS2 tiene menor variación y más pares de cebadores universales, por lo que resultaría conveniente esta subregión sobre ITS1. En el caso de Blaaid *et al.* (2013) no encontraron diferencias *in silico* entre ambos marcadores, y Schoch *et al.* (2012) sugieren trabajar con ambas regiones. Finalmente, Frau *et al.* (2019) mencionan que la comunidad de hongos descrita será diferente, no mejor o peor, dependiendo del marcador molecular utilizado.

Esto se explica dado el rango tan variable en tamaño de la región completa de ITS (desde 285 pb hasta 900 pb) (Iriyini *et al.* 2015, Halwachs *et al.* 2017) y su secuencia *per se*. Algunos hongos, como, por ejemplo, cepas de *Cryptococcus* y *Fusarium*, sólo pueden ser identificados correctamente con un marcador adicional como el gen de la ARN polimerasa II (Iriyini *et al.* 2015).

El par de cebadores usado también puede interferir en la abundancia de ciertas especies. Los pares ITS1F e ITS2 (usados en esta tesis) no emparejan de manera perfecta con la región ITS1 de *Galactomyces geotrichum* (Malasseziales) y *Yarrowia lipolytica* (Tremellales) (Nash *et al.* 2017). ITS1F no es sensible para todos los Saccharomycetales por lo que su abundancia puede subestimarse al usar este cebador, mientras que el cebador ITS2 suele no amplificar algunos Ustilaginales y Exobasidiales (Tedersoo y Lindahl 2016, Frau *et al.* 2019).

Este resultado podría tomarse como indicativo de que las comunidades de hongos que se encuentran en el epitelio de los mamíferos marinos, sin importar su estado de transformación epitelial (para el caso del LMC) o su condición corporal (para el caso de la BA) podrían estar sobrerrepresentados por especies cuya región ITS1 empareja con los cebadores ITS1F e ITS2 como *Malassezia* o *Aspergillus*, que tienen baja afinidad para la región ITS2 (Tedersoo y Lindahl 2016, Frau *et al.* 2019).

7.3 Fungoma de los mamíferos marinos

Tras la secuenciación masiva de ITS1 y la construcción de los gráficos de Krona de cada hospedero (ballena azul, ballena gris, elefante marino del Norte, cachalote y lobo marino de California) se encontró que en el fungoma están sobrerrepresentados algunos grupos, como hongos malasseziales (Basidiomycota), seguido por hongos de la clase Sordariomycetes y Dothideomycetes (Ascomycota), y se observó una baja abundancia de otros hongos como *Candida* spp. (Saccharomycetes). En muchos estudios se considera a *Candida* spp. (Saccharomycetes) como un hongo comensal en varios epitelios (Tizard 1995, Iliev y Leonardi 2017, Higgins 2000, Shirakata *et al.* 2022, Takahashi *et al.* 2010). Sin

embargo, en esta tesis, la mayoría de los ASVs de la clase Saccharomycetes tuvieron baja prevalencia (por ejemplo, en el LMC sólo estuvo presente en 5 de las 19 muestras). Esto pudiera explicarse dada la baja sensibilidad de ITS1 descrita para este clado (Tedersoo y Lindahl 2016, Frau *et al.* 2019).

En el caso del LMC y de la BA, hubo especies infrecuentes de hongos con baja ocurrencia y abundancia, como los hongos de clase Pezizomycetes, Ustilaginomycetes, Leotiomyces y Agaricostilbomycetes. Algunas de estas especies (p.ej. Ustilaginomycetes), se han incluso reportado como componentes centrales del microbioma de la mucosa del colon en humanos, no obstante, su rol ecológico no se ha esclarecido (Sam *et al.* 2017). Además de los Ustilaginomycetes otras, como Leotiomyces y Agaricostilbomycetes se han aislado de muestras de lodo en plantas tratadoras de agua (Assress *et al.* 2019).

7.3.1 *Fungoma central del epitelio genital del lobo marino de California*

El uso de secuenciación masiva para describir la comunidad de hongos en la vagina es muy reciente. En humanos comenzó a realizarse en 2013 (Bradford y Ravel 2017), en animales bajo cuidado humano se ha estudiado el fungoma vaginal del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*; Ma *et al.* 2024) y en mamíferos marinos no existen estudios. En los humanos se determinó una riqueza media de 7.8 ± 4 OTUs con la región ITS1 usando la base de datos de UNITE (Drell *et al.* 2013), y en posteriores estudios se ha determinado una riqueza que varía de 11 a 20 géneros, incluidos *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Underhill e Iliiev 2014). En pandas gigantes el fungoma vaginal central no supera los 20 géneros (Ma *et al.* 2024). Por el contrario, el epitelio vaginal del lobo marino de California, mostró por el contrario una mayor riqueza media (47.21 ASVs), y tras aplicar el filtro de abundancia y ocurrencia destacaron siete géneros (*Malassezia*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Chateomium*, *Symmetrospora* y *Albifimbria*). De éstos, sólo se comparten *Alternaria* y *Cladosporium* entre humanos, pandas y LMC, lo que podría significar que el epitelio vaginal de estos tres hospederos favorece su colonización.

7.3.2 *Fungoma central respiratorio de la ballena azul*

El fungoma respiratorio de mamíferos no humanos no ha sido estudiado (Hamm *et al.* 2020). Este trabajo representa entonces el primer reporte del fungoma respiratorio de mamíferos en vida libre. En la ballena azul, el fungoma central consistió en 13 ASVs de nueve géneros principales (*Malassezia*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Lectera*, *Aspergillus*, Pleosporaceae y *Debaryomyces*). El fungoma respiratorio en humanos ha sido poco explorado, pese a tener un intercambio constante de partículas y microorganismos con el exterior (Underhill e Iliiev 2014). Algunas especies de hongos que han sido identificadas a partir de secuenciación de ITS en pulmón de humanos sanos incluyen *Ceriporia lacerata*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Penicillium brevicompactum*, *Scedosporium* sp. y, principalmente *Aspergillus* sp. (Underhill e Iliiev 2014, Tiew *et al.* 2020). El último está presente en humanos y en BA. Esto podría explicarse dado que es un hongo que se disemina fácilmente vía aerógena (Joseph *et al.* 1986, Young *et al.* 1999, Romano *et al.* 2020, Grattarola *et al.* 2018).

7.3.3 *Fungoma central con análisis de redes*

Determinar el fungoma central únicamente con los criterios de abundancia y ocurrencia puede tener sus limitaciones ya que dependen del tamaño de la muestra (Neu *et al.* 2021). En el caso de mamíferos marinos, esto puede ser una gran limitante, ya que no siempre es posible tener al tamaño de muestra deseado (Domínguez-Sánchez *et al.* 2018). Además, taxones con baja abundancia (que serían excluidos del fungoma central) pueden ser claves para mantener un equilibrio ecológico (Neu *et al.* 2021), pues no es necesaria la colonización de un microorganismo para que éste cumpla funciones biológicas en el hospedero (Risely 2020). Por este motivo los métodos de conteo de secuencias no permiten evaluar el rol ecológico de los hongos (Underhill e Iliiev 2014).

Aunado a lo arriba discutido, los cambios que experimenta el hospedero (conductuales, fisiológicos o dietéticos) alteran directamente las abundancias de los microorganismos (Del Campo-Moreno *et al.* 2018). Si bien, no todos estos cambios

conducen a enfermedad, es la falta de un método universal para determinar el fungoma central lo que abre el debate sobre la existencia de uno (Nash *et al.* 2017).

Una aproximación cada vez más explorada para comprender el microbioma es a través del uso de redes de coocurrencia (Lázaro-Vidal y Alvarez-Martínez *in press*). Dado que más de un microorganismo está presente en un epitelio dado, el espacio y nutrientes se vuelven limitados, por lo que pueden surgir relaciones sinérgicas o antagónicas entre los microorganismos (Matchado *et al.* 2021), y en el caso de los hongos de ambientes marinos, se conoce que muchas especies tienen simbiontes obligados (Stal y Cretoiu 2022). De este modo, se pueden usar las características topográficas de la red para inferir un rol del nodo (microorganismo), o agrupar en comunidades a los comensales que más frecuentemente se asocian (Guo *et al.* 2022).

Por ejemplo, un coeficiente de clusterización alto, junto con distancias promedio entre nodos baja puede indicar que la comunidad es compacta y sus interacciones son fuertes (Guo *et al.* 2022). En el caso de los ASVs de LMC y de BA, sus índices de clusterización, 0.209 y 0.236, y sus distancias promedio, 5.078 y 4.68 respectivamente, indican que para ambos casos las comunidades de hongos descritas en este estudio tienen baja interconectividad, es decir, no son robustas.

Dentro de una misma red se pueden identificar unidades de nodos o subcomunidades y predecir patrones de coocurrencia (Layeghifard *et al.* 2017). Se identificaron 31 subcomunidades de coocurrencia de hongos para LMC, y 52 para BA. La comunidad más grande de LMC incluyó 52 ASVs que pertenecían a los *phyla* Ascomycota y Basidiomycota. En el caso de BA la comunidad más grande incluyó 155 ASVs de los *phyla* Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Mucoromycota. Esto podría sugerir que dichos módulos o *clústers* contienen a los hongos que son más probable encontrarlos juntos cada vez. En promedio, las comunidades o *clusters* no superaron los 10 ASVs (tamaño de comunidad no tan diferente al determinado con filtros de abundancia y ocurrencia, 11 para el LMC y 13 para la BA). Este método podría funcionar como una alternativa para determinar

el fungoma central considerando especies clave para la comunidad (Guo *et al.* 2022).

Los nodos con más conectividad (*degree*) pueden fungir como *hubs* (Guo *et al.* 2022). Esto es, van a estar presentes junto con otros hongos, más veces que otros. En el caso del LMC, *Colletrotichum truncatum* spp tuvo el mayor *degree* (16) y en BA fue *Candida zeylanoides* (18). Particularmente en el caso *C. zeylanoides*, que se reporta como un comensal del tracto respiratorio en muchos mamíferos, así como otros hongos del mismo género (Pang *et al.* 2021) pero que en este estudio su abundancia no fue de las más altas en el soplo de BA.

Los nodos con mayor índice de *betweenness* actúan en la red como nodos clave para mantener la integridad de la red al ser intermediarios de la conectividad entre otros nodos (Guo *et al.* 2022). Para LMC esos nodos son *Colletrotichum truncatum*, *Malassezia restricta* y *Candida albicans*, y para la BA son Coniothyriaceae, *Penicillium* spp y *Alternaria multirostrata*. Nuevamente, especies de *Candida*, conocidas por colonizar epitelio vaginal en mamíferos (Tizard 1995, Iliiev y Leonardi 2017) no estuvieron dentro de las especies con mayor abundancia en el tracto genital del LMC en este estudio, sin embargo, su presencia en la red de co-ocurrencia es clave para mantener la comunidad (Guo *et al.* 2022).

7.4 Alfa y beta diversidad del fungoma de mamíferos marinos

La diversidad alfa busca describir cómo está constituida una comunidad en relación con su riqueza y especies dominantes (Kers y Saccenti 2022, Brouwer *et al.* 2023). Para el caso del fungoma, la diversidad alfa puede verse afectada directamente por los métodos de extracción de ADN (Rosenbaum *et al.* 2019), el marcador molecular (Frau *et al.* 2019), la base de datos de referencia (Tedersoo y Lindahl 2016, Nash *et al.* 2017), el uso de OTUs o ASVs (Joos *et al.* 2020) y la profundidad de la secuenciación (Nash *et al.* 2017), por lo que las diferencias entre valores de alfa diversidad con otros estudios pueden verse exacerbadas por factores externos al fungoma *per se*. Mbareche *et al.* (2020), por ejemplo, reportaron diferencias en el

índice de Shannon del fungoma de biocompostas animales usando ITS1 e ITS2 (Shannon = 5 y 4.5, respectivamente) y en la riqueza (1,208 OTUs con ITS1 *versus* 772 OTUs con ITS2), por lo que con ITS2 observaron menor diversidad que con ITS1 de un mismo sustrato.

En esta tesis se observó que la riqueza media en las heces de cachalote e hisopado anal de elefante marino del Norte supera los 100 ASVs de riqueza. En muestras fecales de humanos se ha descrito una riqueza tan baja como 14 (mínimo 2, máximo 92) (Nash *et al.* 2017), y aún tras una dieta rica en carbohidratos, no supera los 100 (Szóstak *et al.* 2023, Tian *et al.* 2023). En roedores silvestres (*Myodes glareolus*, *Apodemus sylvaticus*, *A. agrarius* y *A. flavicollis*) la riqueza tampoco supera los 100 ASVs (Lavrinienko *et al.* 2021). También se vio que el índice de Shannon promedio estimado para las muestras de heces de cachalote e hisopado anal de elefante marino del Norte fue de 3.26 y 3.21, respectivamente, mientras que, para el mismo tipo de epitelio, en humanos, se ha reportado menor a 2.0 (Nash *et al.* 2017, Szóstak *et al.* 2023, Tian *et al.* 2023). Si bien, los estudios del fungoma intestinal en humanos usaron diferentes marcadores moleculares, metodologías y bases de datos (ITS2, OTU y *NCBI GenBank Plant and environmental database*, Nash *et al.* 2017; ITS2, ASV y UNITE v8.2 Tian *et al.* 2023; metagenoma, OTUs y Kraken2, Szóstak *et al.* 2023), no se observa de ninguna forma que sus valores de alfa diversidad superen a las observadas en el mismo tipo de epitelio del cachalote y el elefante marino, sugiriendo que en éstos últimos el fungoma gastrointestinal sea potencialmente más diverso que en humanos. Esto podría deberse a la diversidad inherente del fungoma, como también a la ingesta incidental de hongos simbioses de sus fuentes de alimento o de microorganismos con los que interactúan (Lavrinienko *et al.* 2020). No obstante, son necesarios estudios comparativos entre marcadores moleculares para estimar qué tanto de la variación del fungoma pueda deberse a la metodología aplicada.

Tomando el índice de Pielou (Shannon normalizado), el fungoma de las cinco especies modelo estudiadas va de 0.68 a 0.71 lo que implica una equidad moderada, y el de Simpson se mantuvo entre 0.8 y 0.92, indicando en todos los

casos que unos cuantos ASVs son los que dominan en el fungoma (Brouwer *et al.* 2023). Esto se ha visto en otros estudios en humanos, donde, de manera general, las comunidades de hongos están sobrerrepresentadas sólo por unos cuantos taxones (Underhill e Iliev 2014, Nash *et al.* 2017).

El fungoma de las cinco especies estudiadas presentó diferencias en su diversidad con las distancias UniFrac, Bray-Curtis y Jaccard. Esto puede explicarse por tres principales motivos: el primero puede ser porque el microbioma tiene componentes que son específicos para su hospedero por años de coevolución. Este microbioma adaptado al hospedero (especie-específico) puede ser transmitido verticalmente, incluir especies simbiotes obligadas, y se cree que pueden influir en la eficacia biológica de su hospedero. De este modo, se puede hablar de microbioma que comparte una especie en particular o incluso subpoblaciones (Risely 2020). Además, especies relacionadas filogenéticamente tienden a compartir microbiomas muy similares (Rojas *et al.* 2021). Hay cerca de 30 millones de años de divergencia filogenética entre cetáceos y pinnípedos (Berta *et al.* 2006), por lo que es esperado encontrar divergencia en su microbiota considerando su filogenia únicamente.

La segunda explicación tiene que ver con la actividad ecológica que realiza el hospedero. Esto es, su distribución geográfica, su dieta y su comportamiento, por mencionar ejemplos (Rojas *et al.* 2021). Los animales a los que se les pudo analizar el fungoma en esta tesis provienen de diferentes partes del Golfo de California y del Pacífico Noreste. Algunas especies de hongos simbiotes responden a patrones de distribución geográficos similares a aquellos de sus potenciales hospederos, en la que su diversidad aumenta a medida que se aproximan al ecuador (Bahram y Netherway 2022). La temperatura superficial del mar también tiende a aumentar alrededor del ecuador y se ha visto que algunas oscilaciones pueden alterar patrones de buceo y movimiento en algunos cetáceos (Berta *et al.* 2006). Por ejemplo, la ballena azul del Pacífico realiza migraciones desde zonas de alta productividad como el ecosistema marino de la Corriente de California hasta zonas de baja productividad de manera estacional como el domo de Costa Rica o el Golfo de California (Bailey *et al.* 2009, Busquets-Vass *et al.* 2021).

La dieta por sí sola ya influye en el fungoma, particularmente en el tracto gastrointestinal (Underhill e Iliiev 2014). Por ejemplo, el elefante marino del norte y el cachalote tienen una dieta mayormente teutófaga, lo que los obliga a realizar buceos profundos (200-1,000 m) para conseguir sus presas (Berta *et al.* 2006, Davis *et al.* 2007). La BA en el Golfo de California se alimenta generalmente engullendo densas agregaciones de eufáusidos, *Nyctiphanes simplex*, frecuentemente en la superficie o cerca de ella (Gendron 1992), pues las concentraciones de alimento influyen directamente en su distribución y patrones de buceo (Acevedo-Gutiérrez *et al.* 2002, Hazen *et al.* 2015, Pardo *et al.* 2015, Busquets-Vass *et al.* 2017, Busquets-Vass *et al.* 2021). También se ha reportado que se alimentan de peces linterna (Myctophidae), por lo que no se trata de una especie estrictamente estenófaga (Jiménez-Pinedo 2010, Delgado-Rodríguez 2022). Por otro lado, la ballena gris filtra del sedimento marino su presa (anfípodos bentónicos) (Berta *et al.* 2006, Bierlich *et al.* 2023), aunque se especula que la ballena gris del este se alimenta también durante la temporada reproductiva (principalmente en Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur) (Gelippi *et al.* 2022). El LMC, por su parte, tiene una dieta más generalista y que incluso es diferente entre zonas del Golfo de California, pero destacan peces de la familia serranidae, ophidiidae, haemulidae y sciaenidae, algunos moluscos y crustáceos (Porrás-Peters *et al.* 2008).

Finalmente, en algunos animales con comportamiento social, como los chimpancés, se ha observado que comparten un microbioma (pan-microbioma) debido a que las interacciones sociales facilitan el intercambio de microorganismos entre un hospedero a otro (Moeller *et al.* 2016). Los lobos marinos tienden a hacinarse durante la época reproductiva (Peterson y Bartholomew 1967, Berta *et al.* 2006), y se ha reportado que su bacterioma genital comparte algunos elementos entre individuos de las mismas poblaciones pero que son diferentes entre poblaciones distintas (Pereida-Aguilar 2020). En cetáceos, por el contrario, parecen influir factores anatómo-fisiológicos (v.g. capacidad pulmonar) más que su comportamiento social en la riqueza de su microbioma (Vendl *et al.* 2020).

La tercera explicación de las diferencias en la diversidad del fungoma de los mamíferos marinos observadas en esta tesis puede deberse al tipo de epitelio. Los hongos son microorganismos heterótrofos, es decir, se nutren a expensas de otros organismos o tras la descomposición de materia orgánica. Esto dicta su tropismo en el ecosistema o incluso en el hospedero. Los hongos pueden ser saprotróficos, queratinofílicos, urofílicos, coprofílicos, etc. (Arenas 2008). *Malassezia* spp, por ejemplo, es un hongo lipofílico que se encuentra muy bien adaptado a ambientes sebáceos (Iliev y Leonardi 2017).

En esta tesis se analizó el fungoma del epitelio genital, respiratorio, piel y heces o hisopados anales, cada uno con características diferentes de irrigación, temperatura, humedad, pH y contacto con el exterior. El epitelio vaginal, en el caso del LMC, por su localización, puede compartir componentes del microbioma de la piel o de la región perianal (Pereida-Aguilar *et al.* 2023). El epitelio respiratorio, para el caso de las muestras de BA y ballena gris, está en constante intercambio con partículas y microorganismos del exterior (Ross y Pawlina 2012); y la mucosa gastrointestinal se ve directamente influenciada por microorganismos provenientes de la dieta del animal (Nash *et al.* 2017).

En conjunto, los caracteres de historia de vida pueden determinar a qué microorganismos están expuestos los animales (Rojas *et al.* 2021), y dado el grupo tan heterogéneo de este trabajo de tesis, es complicado esclarecer qué condiciones en particular rigen las diferencias en el fungoma observadas. En los PCoA con las distancias UniFrac, Bray-Curtis y Jaccard, es posible observar una mayor modularidad en la beta diversidad de la BA, es decir, que sus diferencias entre sí son menores que entre las otras especies. El LMC tiene mayor variabilidad en su beta diversidad, pero corresponde a animales muestreados a lo largo del Golfo. El elefante marino del norte también tiene una modularidad dispersa, aunque la beta diversidad se calculó con datos de su fungoma anal y de la piel. Para el cachalote y ballena gris, por ser dos y una muestra, es difícil determinar sus diferencias con los otros modelos de estudio.

7.4.1 Alfa y beta diversidad del fungoma genital del lobo marino de California y sus variables eco-fisiológicas

7.4.1.1 Transformación epitelial

Las diversidades alfa y beta no tuvieron diferencias significativas entre LMC con transformación epitelial y sin transformación. Esto contrasta con un estudio realizado en humanos, donde se observó que las mujeres con ASC-US (células escamosas atípicas de origen indeterminado) presentan mayor diversidad fúngica comparado con LSIL, HSIL y sin cambios, aunque los autores mencionan que pueda deberse a la influencia del tracto gastrointestinal y prácticas sexuales que puedan alterar su microbioma (Godoy-Vitorino *et al.* 2018).

En ocasiones, es el tipo de interacción, y no la composición de la comunidad lo que puede originar una disbiosis con repercusiones a la salud (Coyte y Rakoff-Nahoum 2019). Por ejemplo, un aumento en la tasa de Basidiomycota:Ascomycota se ha reportado en humanos con cáncer colorrectal (Li *et al.* 2023). Sin embargo, no se encontraron diferencias en esta tesis al analizar el epitelio genital con cambios precancerígenos y sin ellos. No obstante, se observó que los ASVs de la clase de los Tremellomycetes tuvieron una mayor abundancia promedio en los LMC con cambios epiteliales que en aquellos sin cambios. Esto podría indicar que un entorno que favorece la transformación epitelial también puede favorecer el crecimiento de estos hongos (Liu *et al.* 2023).

Los tremellomycetes incluyen especies micoparásitas que requieren nitratos para crecer (Gams *et al.* 2004, Boekhout *et al.* 2011). Su presencia en microambientes tumorales se ha reportado previamente, e incluso se han propuesto como parte de biomarcadores para algunos tipos de cáncer, como el de mama y el de ovario (Narunsky-Haziza *et al.* 2022, Liu *et al.* 2023). Si bien, ningún LMC de este estudio presentó lesiones compatibles con cáncer, sino lesiones indicadoras de transformación epitelial (Pereida-Aguilar *et al.* 2023), las alteraciones precancerígenas metabólicas y moleculares de las células epiteliales pueden facilitar la colonización de algunos microorganismos (Narunsky-Haziza *et al.* 2022).

Un estudio realizado por Sowjanya *et al.* (2015) observaron que mujeres diagnosticadas con HSIL o cáncer invasivo presentaron niveles séricos más altos de nitritos y nitratos, así como una expresión aumentada del gen que codifica para la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) comparado con mujeres sin anomalías citológicas. Esto puede deberse a procesos inflamatorios crónicos que aumentan la concentración de óxido nítrico con potencial riesgo oncogénico si la inflamación no remite. Sin embargo, serían necesarios estudios específicos que evalúen las concentraciones séricas de nitratos y nitritos en LMC, así como la actividad enzimática de la iNOS en relación con la abundancia de los Tremellomycetes para conocer si esta clase de hongos se ve favorecida en el tracto genital del LMC por el aumento de nitratos y nitritos séricos.

7.4.1.2 *Región ecológica*

No se detectaron diferencias en la diversidad alfa de los hongos del epitelio genital entre LMC por regiones, pero sí en su beta diversidad. Esto significa que los componentes del fungoma del LMC son diferentes entre regiones, lo que concuerda con lo reportado para otras características ecológicas del LMC, como diferencias anatomofisiológicas, genéticas y de comportamiento entre colonias reproductivas (Szteren y Auriol-Gamboa 2011).

Es posible que los resultados obtenidos reflejen la susceptibilidad del microbioma de ser alterado por el entorno de su hospedero, ya que dictamina a qué microorganismos (en este caso, hongos) estará expuesto (Nash *et al.* 2017). Por ejemplo, los hábitos de forrajeo de la especie son diferentes entre regiones: los LMC del norte y del centro tienden a realizar viajes relativamente cortos (no más de 20 km de distancia de su colonia o islote), mientras que los del sur bucean más profundo (Porras-Peters *et al.* 2008, Schramm *et al.* 2009), lo que significa que aquellos animales que bucean superficialmente y nadan distancias más cortas, podrían tener bajas probabilidades de interactuar con los microorganismos más pelágicos o abisales (Stal y Cretoiu 2022).

Otra posible explicación a las diferencias en el fungoma genital entre regiones puede deberse a las características oceanográficas que las delimitan (Szteren y

Aurioles-Gamboa 2011). Por ejemplo, la región Norte, debido a la desembocadura del río Colorado, puede tener salinidad diferente a las demás regiones (Wilkinson *et al.* 2009), y la productividad primaria, que es alta en la región de las grandes islas y baja en la región sur (Álvarez-Borrego y Lara-Lara 1991, Escalante *et al.* 2013), pueden influir en el tipo de microorganismos metabólicamente activos que se encuentren (Stal y Cretoiu 2022).

También se observaron diferencias entre regiones con la abundancia de los ASVs del *phylum* Ascomycota. Más particularmente, los de la familia Aspergillaceae (v.g. *Aspergillus*, *Penicillium*, *etc.*) y Cladosporiaceae (v.g. *Cladosporium*), que tuvieron mayor abundancia en los LMC de la región del sur. En el Golfo de California, el LMC es una especie muy importante para el ecoturismo, especialmente en la región de Los Islotes (Golfo Sur) (French *et al.* 2011, Cisneros-Montemayor *et al.* 2020), y se ha reportado en otros modelos de estudio, como en el macaco tibetano (*Macaca tibetana*), que la beta diversidad intestinal es diferente entre animales involucrados en actividades turísticas, animales en cautiverio y animales en vida libre (Xia *et al.* 2022). También se ha visto que la diversidad de enterobacterias cultivables del intestino de crías de lobo marino de California es diferente en animales que se encuentran en colonias con afluencia turística que en colonias alejadas de asentamientos humanos y sin turismo (Hernandez-Martínez & Acevedo-Whitehouse, datos no publicados). Sin embargo, aún faltan estudios para evaluar el impacto de las actividades turísticas en el microbioma de los LMC.

Respecto a los basidiomicetos, se encontraron diferencias entre regiones con los hongos de la clase Tremellomycetes, siendo en la región Central (San Esteban, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco y El Rasito) donde fueron más abundantes. Esto resulta interesante dado que Nieves-Martínez (2022) encontró una mayor expresión en el tracto genital de los genes que codifican para el factor de transcripción STAT-1 y para el gen que codifica para la perforina. STAT-1 es un gen que, en respuesta al interferón gamma (IFN- γ), modula la actividad de los linfocitos CD4⁺ en un entorno proinflamatorio (Kaplan 2013), y las perforinas son enzimas producidas por las células NK y por los linfocitos CD8⁺ para eliminar células tumorales (Guan *et al.*

2024). Los resultados encontrados en esta tesis podrían reflejar que los LMC de la región central se encuentran con un estado proinflamatorio más que en otras regiones, e incluso tienen mayor evidencia de transformación epitelial precancerígena (ASC/LSIL) que esté induciendo respuestas anti-tumorales, y a su vez creando un ambiente que favorezca a los Tremellomycetes, dado que esta clase de hongo también fue más abundante en LMC con ASC/LSIL y, en particular, en esta región del Golfo.

El trabajo realizado por Pereida-Aguilar *et al.* (2023), con las mismas muestras utilizadas en la presente tesis, también reportó diferencias en el bacterioma genital del LMC entre regiones ecológicas. Esto, en conjunto con los resultados sobre el fungoma que encontró la presente tesis, es evidencia de que el microbioma vaginal se ve influenciado por la región ecológica en la que se encuentra el LMC.

7.4.1.3 *El fungoma y su relación con virus con potencial oncogénico*

Los herpesvirus son virus de doble cadena de ADN que una vez que infectan a su hospedero, permanecen por grandes periodos o incluso toda la vida, volviéndose infecciones activas en cuanto disminuye la inmunocompetencia del hospedero (Carter y Saunders 2007). Por ejemplo, durante disbiosis bacterianas, aumenta el riesgo de infección por herpesvirus en humanos (Mehta *et al.* 2022). En LMC que son positivos a ADN de herpesvirus, hay una mayor diversidad alfa, pero no hay diferencias en la diversidad beta del bacterioma (Pereida-Aguilar *et al.* 2023). En contraste, en esta tesis no se observaron diferencias en la diversidad alfa y beta, ni se detectaron taxones que tuvieran diferencias significativas en su abundancia entre LMC positivos o negativos al virus.

Tampoco se encontró evidencia de que el fungoma del epitelio genital se viera influenciado por la presencia de papilomavirus (zcPV-1). Esto es semejante a lo reportado por Pereida-Aguilar *et al.* (2023), pero contrasta con lo reportado para humanos, en donde el índice de Shannon para fungoma vaginal se ve incrementado en mujeres infectadas con papilomavirus tipo 16 y 18, es decir, vuelve al fungoma más equitativo (Godoy-Vitorino *et al.* 2018). Al igual que los herpesvirus, los papilomavirus tienen ADN de doble cadena, pero a diferencia de ellos, no suelen

producir infecciones persistentes a menos que el hospedero no pueda limitar la infección y se formen verrugas o incluso cáncer (Carter y Saunders 2007).

La evidencia en humanos parece indicar relaciones antagonistas entre hongos y virus, pues al colonizar un epitelio, puede atraer células inmunes al sitio y proteger contra la severidad de infecciones virales (Kapitan *et al.* 2018, Fiorito *et al.* 2022). El hecho que no se hayan podido observar diferencias en el LMC y la presencia de herpesvirus y/o papilomavirus de pinnípedos podría deberse a que sus interacciones vayan más allá de sólo analizar la presencia/ausencia, sino de la abundancia, como se ha empezado a hacer recientemente con el bacterioma (Nishijima *et al.* 2022) Este tipo de estudios está empezando a tener mayor popularidad con el bacterioma, pero su aplicación con el fungoma aún no se ha explorado.

7.4.1.4 Grupo etario

La edad es un factor importante para el microbioma. En el caso de los mamíferos, la dieta y las interacciones sociales van cambiando a medida que crece el animal, y eso constituye un factor para diferenciar entre clases de edad sus microbiomas (Szóstak *et al.* 2023). Por ejemplo, en focas manchadas juveniles (*Phoca largha*) se ha reportado una mayor riqueza y diversidad de la microbiota intestinal comparado con otros grupos etarios (Tian *et al.* 2010). En humanos los taxones dominantes en el tracto gastrointestinal van cambiando a medida que la dieta se vuelve más diversa, cambia el estilo de vida y se exponen a antibióticos (Lai *et al.* 2023, Turunen *et al.* 2023). En esta tesis, para el LMC, no se observaron diferencias en la diversidad alfa y beta, pero se observó que los ASV del *phylum* Ascomycota tienen mayor abundancia en adultos que en crías y juveniles. Más particularmente los ASV de la clase Dothideomycetes (géneros como *Cladosporium*, *Alternaria*, *Forliomyces*, *Curvularia*, etc.). Estos grupos de hongos han sido reportados como comensales vaginales en mujeres adultas (Drell *et al.* 2013, Bradford y Ravel 2017). Sin embargo, es un grupo de hongos muy diverso que comprende muchas especies (más de 19,000) que pueden ser incluso parásitas de otros hongos (Taylor *et al.*

2015) y no fue posible identificar específicamente las familias o géneros más abundantes en adultos que en crías.

Es importante considerar que el epitelio vaginal sufre modificaciones durante el ciclo estral, incluyendo el pH, la irrigación y con ello el aporte de nutrientes al epitelio (Tizard 1995), por este motivo también el microbioma vaginal en mujeres adultas puede ser diferente dependiendo de su actividad hormonal (Yoshikata *et al.* 2021), y pudieran observarse diferencias entre animales sexualmente maduros e inmaduros (Sidrim *et al.* 2015).

Si bien, en esta tesis no se comparó el estado de salud de las crías, es posible que éstas no hayan sido expuestas aún a todos los hongos, particularmente los Dothideomycetes, de la misma manera que las hembras adultas, puesto que el microbioma se va moldeando durante los primeros años de vida por sus interacciones con el entorno (Zhu *et al.* 2024).

7.4.2 Alfa y beta diversidad del fungoma respiratorio de la ballena azul y sus variables fisiológicas

7.4.2.1 Condición corporal

No se encontraron asociaciones significativas entre la sensibilidad de la prueba de PCR para ITS1 o ITS2 y la condición corporal, y tampoco se observaron diferencias en la diversidad alfa entre ballenas con mala, regular o buena condición corporal. Esto contrasta con estudios realizados en perros, que relacionan el microbioma intestinal con la condición corporal en perros, donde observaron que animales obesos tenían menor alfa diversidad (Chun *et al.* 2020), sin embargo, extrapolar resultados de animales bajo cuidado humano a aquellos en vida libre no es adecuado, puesto que los animales en vida libre están expuestos a mayor variabilidad (Turko *et al.* 2023). Además, que la obesidad en animales es un problema de salud que sólo experimentan los animales bajo cuidado humano (Holst y Gustavsson 2016). Un estudio en parúlidos silvestres tampoco encontró asociación entre la alfa diversidad de su microbioma gastrointestinal y su condición corporal (Worsley *et al.* 2021).

Es altamente probable que el bajo número de ballenas con condición corporal mala (dos) que se incluyeron en esta tesis no permitiera observar diferencias en la diversidad alfa comparado con ballenas en buena condición, ya que, con la beta diversidad, con los índices de Bray Curtis y de Jaccard se observaron valores p de 0.05. Posiblemente, un tamaño de muestra mayor permitiría brindar mayor poder estadístico a las comparaciones (Gómez-de-Mariscal *et al.* 2021).

Los Rhizophydiales *incertae sedis* (Chytridiomycota) son un orden de hongos flagelados que incluyen especies parásitas de algas (Gleason *et al.* 2014, Powell 2016) que estuvo ausente en las ballenas con mala condición corporal. Es posible que estos hongos cumplan un papel en el control del florecimiento algal potencialmente tóxico para mamíferos marinos (Häussermann *et al.* 2017). No obstante, los datos de esta tesis no permiten inferir si existe algún efecto protector del fungoma respecto a florecimientos algas tóxicas.

En esta tesis se identifica por primera vez la presencia del hongo *Sistotremastrum guttuliferum* en animales. Este hongo pertenece a la familia Sistotrematraceae, y se ha reportado principalmente en madera en descomposición en bosques, sedimento de manglares y en islas del Atlántico Noreste (Arfi *et al.* 2012, Telleria *et al.* 2013)., Este hongo se encontró en dos soplos de ballena azul con condición corporal buena (BM055, ID 885) y regular (BM033, ID 12). Este hongo pertenece a la familia Sistotrematraceae, y se ha reportado principalmente en madera en descomposición en bosques, sedimento de manglares y en islas del Atlántico Noreste (Arfi *et al.* 2012, Telleria *et al.* 2013).

Al menos un ASV de las familias Mucoraceae y Wallemiaceae se encontraron solo en soplos de ballenas con mala condición corporal. Los mucorales comprenden especies de hongos saprófitas, parásitas facultativas y patógenas, y se han reportado como importantes agentes etiológicos en cuadros clínicos del tracto respiratorio en humanos con mortalidad desde el 46 al 96% (Tiew *et al.* 2020). La familia Wallemiaceae (que sólo comprende al género *Wallemia*) se ve asociada con reacciones de hipersensibilidad en los pulmones (Skalski *et al.* 2018). Esto podría

sugerir que su presencia en ballenas con mala condición corporal, aún en baja abundancia, sea indicador de un sistema inmunológico comprometido.

Las ballenas con baja condición corporal fueron muestreadas en 2016, un año después del fenómeno climatológico (La Mancha) que afectó la zona del Pacífico Noreste y que coincidió con el ENSO (El Niño – Oscilación del Sur, por sus siglas en inglés, *El Niño-Southern Oscillation*), donde la temperatura del mar se elevó (p.ej. 3.5°C arriba de la media en el norte y centro de la península de Baja California) y, al menos en California, se observó que el periodo de surgencia se redujo, lo cual, probablemente ocasionó una disminución en la disponibilidad de alimento de la BA por lo menos en la costa occidental (Lavaniegos *et al.* 2019) y llevó a un decremento en su condición corporal (Casillas-López 2016, Wachtendonk *et al.* 2022). Además, estos cambios climáticos tienen el potencial de modificar las poblaciones de otros microorganismos (Lluch-Cota *et al.* 2007, McCabe *et al.* 2016, Stal y Cretoiu 2022) y por consiguiente su probabilidad de alterar el fungoma. Se propone que los resultados de la tesis son reflejo de estos cambios, pero debido al bajo poder estadístico, se requeriría de un mayor número de muestras para poder comprobarlo.

7.4.2.2 Sexo

Se analizó si la cantidad de ADN fúngico detectable por PCR podía relacionarse con el sexo del animal, pero no se encontró una asociación. Tampoco se observaron diferencias en ningún índice de diversidad alfa entre machos y hembras.

Los resultados de diversidad beta en este estudio contrastan con lo reportado en el estudio del bacterioma del sistema respiratorio de la ballena azul, en el cual no se identificaron diferencias en la composición del bacterioma entre machos y hembras (Domínguez-Sánchez 2020). De igual forma, se observó que los ASV de la clase Saccharomycetes tuvieron más abundancia en machos que en hembras. Esto podría sugerir que el fungoma respiratorio sea menos estable que el bacterioma y se vea influenciado por variables propias del hospedero, como el sexo (Nash *et al.* 2017, Bambi *et al.* 2024). Diferencias conductuales entre sexos que tienen que ver con comportamiento reproductivo pudieran explicar que los machos y las hembras presentaran diferencias en su beta diversidad. Las hembras, por ejemplo, suelen

segregarse durante la crianza y preferir aguas más someras, y en ocasiones se han visto hembras no migrar al norte durante algunas temporadas, probablemente para ahorrar energía. Los machos, por su parte, tienen patrones migratorios diferentes a los de las hembras adultas, que podrían deberse a competencia, donde los machos más pequeños o juveniles sean desplazados a migrar distancias más largas (Costa-Urrutia *et al.* 2013, Blevins *et al.* 2022).

7.4.2.3 *El fungoma respiratorio de la ballena azul en el tiempo*

Un individuo hembra que fue muestreado en 2016 y en 2017, mantuvo el 50% de sus ASVs entre los dos años. Para otro individuo macho, se observó que compartió solo el 38% de sus ASVs entre 2017 y 2018. Sin embargo, al evaluar la beta diversidad no se observaron diferencias significativas. Nash *et al.* (2017) observaron que principalmente tres especies, *S. cerevisiae*, *M. restricta* y *C. albicans*, mantienen su ocurrencia en un estudio longitudinal en heces de humanos, lo que podría sugerir que esos taxones forman parte del fungoma central en los individuos analizados. Extrapolando esa observación a los resultados de esta tesis, se propone que, a nivel individual, los hongos conservados en cada ballena sean parte de su fungoma central. No obstante, para validar esta idea sería necesario realizar un estudio longitudinal con más muestras de la misma ballena.

7.5 La relación entre el fungoma y el bacterioma

De manera experimental, las relaciones de hongos y bacterias se han estudiado induciendo disbiosis en sus hospederos. Es posible inferir que estos microorganismos compiten por los recursos, casi siempre limitados, en el nicho que ocupan, y por ese motivo se espera una colonización de hongos en individuos con bacterioma reducido (Sam *et al.* 2017, Jiang *et al.* 2018).

Por ejemplo, *Lactobacillus*, *Malassezia* y *Candida* suelen tener baja co-ocurrencia en el ambiente vaginal. Esto podría significar que la disminución de un grupo favorece la colonización de otro (Godoy-Vitorino *et al.* 2018). Sin embargo, la composición de las colonias bacterianas y de hongos no muestran correlación en

su diversidad alfa. Esto es, la forma en que está constituida una comunidad no necesariamente afecta a la otra (Nash *et al.* 2017)

Es interesante mencionar que, en el LMC, de las 31 muestras que se analizaron para 16S e ITS1, sólo 5 (16.13%) dieron positivo a ambos marcadores, los cuales presentaban un grado de transformación epitelial, aunque no se observó que la transformación epitelial tuviera relación con que la muestra fuera positiva a 16S e ITS1. El caso con los soplos de BA, se analizaron 22 muestras para ambos marcadores, y 8 (36.36%) fueron positivas a ambos marcadores, sin relación alguna respecto al sexo o su condición corporal. Es decir, en menos de la mitad de las muestras analizadas fue posible obtener ADN de bacterias y de hongos, lo que por sí solo indica baja co-ocurrencia.

Investigar la co-ocurrencia y asociación entre hongos y bacterias permite inferir de qué manera pueden interactuar diferentes dominios en un nicho (Zhang *et al.* 2018, Pawlowska 2024). Las redes entre dominios muestran por lo general una mayor conectividad y comunidades más robustas que las redes de un solo dominio, lo que significa que los hongos y las bacterias cumplen roles importantes en la estabilización del microbioma (Lee *et al.* 2022). Además, las comunidades entre bacterias y hongos suelen sufrir modificaciones cuando su entorno está perturbado o en estrés que solo son visibles al observar la comunidad en su conjunto y no por separado (Gao *et al.* 2022).

Si bien en esta tesis no se evaluaron cambios en la red entre cambios epiteliales o condición corporal, observar los patrones de asociación nos permite identificar posibles grupos funcionales para estudiar su impacto en diferentes condiciones del hospedero.

En las redes de co-ocurrencia de hongos y bacterias del LMC y BA se observó que la mediana del *degree* aumentó en los dos casos, es decir, los nodos co-ocurren con más nodos en promedio. También se observa cómo el diámetro de la red se reduce, esto refleja cómo las distancias entre dos nodos disminuyen haciendo la red más compacta. El índice de clusterización solamente aumentó en la red de bacterioma-fungoma del LMC, puesto que en la de la BA disminuyó.

Las comunidades estimadas a partir de las redes de coocurrencia de hongos y bacterias tanto en LMC y BA estaban constituidas total o parcialmente por microorganismos de un solo reino, sin haber agrupaciones donde la coocurrencia fuese equitativa. Esto refleja nuevamente baja coocurrencia entre hongos y bacterias.

En el LMC, la familia Malasseziaceae tuvo índices de asociación más altos con las bacterias Leptotrichiaceae, Rhodobacteriaceae y Lachnospiraceae. *Malassezia* se ha reportado como un *hub* importante para la co-ocurrencia de hongos y bacterias, especialmente en procesos oncogénicos en humanos (Narunsky-Haziza *et al.* 2022). Aspergillaceae también tuvo correlación positiva con Ruminococcaceae. Este tipo de relación también se ha reportado en el tracto gastrointestinal en humanos sanos (Maas *et al.* 2023). Por su parte, en la BA, la familia Cladosporiaceae fue la que tuvo más correlaciones positivas con familias bacterianas como Moraxellaceae, Lachnospiraceae y Prevotellaceae, entre otras. Esto es interesante dado que estos grupos de bacterias fueron determinados como componentes del bacterioma central en la ballena azul por Domínguez-Sánchez (2020) y *Cladosporium* sp. fue dominante entre hongos, lo que podría indicar mutualismo en el tracto respiratorio, pues en ocasiones la actividad bacteriana puede favorecer el crecimiento de hongos, como se ha reportado en plantas (Kobayashi y Crouch, 2009), aunque en el contexto del microbioma respiratorio este tipo de interacciones debe ser explorado con más detalle aún.

8. CONCLUSIONES

Esta tesis es la primera, a nivel mundial, en estudiar el fungoma epitelial de mamíferos marinos, con énfasis en dos especies, que son centinelas de su ecosistema. El estudio amplio del microbioma nos permite entender cómo interactúa un hospedero con los microorganismos de su entorno y de qué formas modulan varios aspectos importantes de su vida como la reproducción, el crecimiento, el comportamiento y salud. Los hongos son microorganismos que se estudian más frecuentemente asociados a plantas o como patógenos en animales, pero su papel en el microbioma cada vez va siendo más reconocido.

El estudio del fungoma enfrenta retos inherentes al propio microorganismo, así como limitaciones técnicas: desde la colecta de la muestra, el tipo de identificación a usar, la ausencia de un marcador molecular universal, la base de datos de referencia y la variabilidad de su abundancia.

En este trabajo se observó que la detección de ADN de hongos por PCR requiere al menos 0.003 ng/ μ L de ADN de hongos, y que el marcador ITS1 es más informativo para describir las comunidades de hongos de mamíferos marinos.

Se evaluaron en conjunto muestras biológicas de diferentes mamíferos marinos, pero sólo se pudieron secuenciar las correspondientes a ballena azul, ballena gris, elefante marino del norte, cachalote y lobo marino de California. De entre todos, se compartieron 72 ASVs, que representaron el 11% del total.

Para el caso del epitelio genital del lobo marino de California, su fungoma central, determinado por un mínimo de 75% de ocurrencia y 2% de abundancia, está constituido por 11 ASVs de los géneros *Malassezia*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Chateomium*, *Symmetrospora* y *Albifimbria*, y al observar la red de co-ocurrencia especies menos abundantes como *Colletotrichum* sp. y *Candida albicans* pueden ser clave para mantener la integridad de la comunidad. Sus índices de alfa diversidad indican que está dominado por unas cuantas especies, mientras que su beta diversidad nos muestra que el fungoma responde a una regionalización por colonias reproductivas. Además, se observó que los hongos de la clase

Tremellomycetes son más abundantes en lobos marinos de California con transformación epitelial posiblemente por favorecerse de un entorno proinflamatorio, y los Dothideomycetes son más abundantes en hembras que en crías quizá porque éstas aún no terminan de moldear su microbioma.

Con la ballena azul, usando los mismos criterios, el fungoma central del tracto respiratorio estuvo dominado por 13 ASVs de los géneros *Malassezia*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Lectera*, *Aspergillus*, Pleosporaceae y Debaryomyces, y la red de co-ocurrencia permitió inferir un papel regulador de la comunidad de *Candida zeylanoides*, *Penicillium* y Coniothyriaceae. Además, se observó una subcomunidad con alta interconectividad de ASVs (lo que implicaría alta coocurrencia) de 155 ASVs de los *phyla* Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Mucoromycota. Los índices de diversidad alfa nos indicaron, al igual que en el caso del LMC, que la comunidad está dominada por unos cuantos taxones. Las diferencias observadas en su diversidad beta, con la distancia UniFrac ponderada entre sexos, nos indicó que hay grupos filogenéticos con diferentes abundancias. Además, se observó que los Saccharomycetes tienen mayor abundancia en machos que en hembras quizá por diferencias conductuales.

Finalmente, se analizó la relación del bacterioma con el fungoma en el lobo marino de California y ballena azul. En ambos casos ocurrió una baja co-ocurrencia, sin embargo, tras el análisis de redes de co-ocurrencia es posible inferir un papel mediador de los hongos y bacterias entre sí pues la red aumenta su interconectividad y la comunidad se vuelve más robusta. Los hongos con mayor co-ocurrencia en ambas redes fueron Aspergillaceae, Malasseziaceae, Cryptococcaceae y Cladosporiaceae, con bacterias de las familias Ruminococcaceae, Moraxellaceae, Christiansenellaceae, Lachnospiraceae y Prevotellaceae lo que podría indicar actividad sinérgica o mutualista entre estos hongos y bacterias específicamente.

En esta tesis se desafió la hipótesis central propuesta que indica que “el fungoma epitelial es diferente dependiendo de características fisiológicas del hospedero”.

Esta hipótesis fue comprobada. Las hipótesis secundarias también se comprobaron. Específicamente, se determinó lo siguiente para cada hipótesis de trabajo:

- Hipótesis: El fungoma del tracto genital de *Zalophus californianus* varía de acuerdo con el estado de transformación epitelial. Los hongos de la clase Tremellomycetes tienen mayor abundancia en LMC con cambios epiteliales. Es importante mencionar que la edad también es un factor importante para el fungoma, pero sobre todo la región ecológica.
- Hipótesis: El fungoma del epitelio respiratorio de *Balaenoptera musculus* difiere dependiendo de la condición corporal. Existen familias de hongos que sólo están presentes en ballenas con condición corporal mala, así como familias de hongos que sólo están ausentes en estas ballenas. Esto podría indicar una tendencia de taxones que están presentes en una condición u otra, pero es necesario un estudio con mayor tamaño de muestra para confirmarlo. No obstante, las mayores diferencias en el fungoma se observan entre sexos.
- Hipótesis: Los elementos que conforman al fungoma de *Z. californianus* y *B. musculus* están asociados a elementos específicos del bacterioma epitelial de cada especie. La co-ocurrencia de hongos y bacterias es más bien baja, pero fue posible identificar familias de hongos que se asocian a ciertas familias de bacterias, como Aspergillaceae con Ruminococcaceae en *Z. californianus*, o Cladosporiaceae y Prevotallaceae en *B. musculus*.

9. REFERENCIAS

- Abdo W, Kawachi T, Sakai H, Fukushi H, Kano R, Shibahara T, Shirouzu H, Kakizoe Y, Tuji H y Yanai T. 2012. Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(1):211-218. doi: 10.1177/1040638711416969.
- Acevedo-Gutiérrez A, Croll DA y Tershy BR. 2002. High feeding costs limit dive time in the largest whales. *Journals of experimental biology*, 12:1747-1753. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.12.1747>
- Acevedo-Whitehouse K y Duffus ALJ. 2009. Effects of environmental change on wildlife health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3429–3438. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0128>.
- Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D y Amos W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature*, 422(35). <https://doi.org/10.1038/422035a>.
- Acevedo-Whitehouse K, Rocha-Gosselin A y Gendron D. 2010. A novel non-invasive tool for disease surveillance of free-ranging whales and its relevance to conservation programs. *Animal Conservation*, 13(2), 217–225. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00326.x>.
- Acevedo-Whitehouse K. 2009. The importance of disease management programmes for wildlife conservation. *Animal Conservation*, 12(3), 185–186. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00266.x>.
- Aguirre AA y Tabor G. 2004. Introduction: Marine Vertebrates as Sentinels of Marine Ecosystem Health. *EcoHealth*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0091-9>.
- Ali N, Aogáin MM, Morales RF, Tiew PY y Chotirmall SH. 2019. Optimisation and benchmarking of targeted amplicon sequencing for mycobiome analysis of Respiratory Specimens. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20204991>.
- Alvarez-Borrego S y Lara-Lara JR. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. En: Dauphin, J.P. Simonelt, B.R. (Eds.),

The Gulf of California and peninsular province of the Californias, Memoir (pp. 47: 555-567). American Association of Petroleum Geologists, Tulsa, Oklahoma.

Alvarez-Perez S, Mateos A, Dominguez L, Martinez-Nevaldo E, Blanco JL y Garcia ME. 2010. Isolation of *Rhodotorula mucilaginosa* from skin lesions in a Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Veterinarni Medicina*, 55(6):297-301

Andermann T, Antonelli A, Barrett RL y Silvestro D. 2022. Estimating Alpha, Beta, and Gamma diversity through deep learning. *Front Plant Sci*, 13:839407 <https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2022.839407>

Apprill A, Miller CA, Moore MJ, Durban JW, Faernbach H, Barrett-Lennard LG. 2017. Extensive core microbiome in drone-captured whale blow supports a framework for health monitoring. *mSystems*, 2: <https://doi.org/10.1128/msystems.00119-17>

Apprill A, Robbins J, Murat-Eren A, Reveillaud J, Mattila D, Moore M, Niemeyer M, Moore KMT, Mincer TJ. 2014. Humpback whale populations share a core skin bacterial community: toward a health index for marine mammals? *PLoS ONE* 9(3): e90785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090785>.

Arenas GR. 2008. *Micología Médica Ilustrada*. Tercera Edición. McGraw Hill. México.

Arfi Y, Marchand C, Wartel M y Record E. 2012. Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil. *Fungal Ecology*, 5:282-285 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.09.004>

Assress HA, Selvarajan R y Nyoni R. 2019. Co-occurrence and implications of fungal communities in wastewater treatment plants. *Sci Rep* 9(14056). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50624-z>

Atkinson S, Gendron D, Branch TA, Mashburn KL, Melica V, Enriquez-Paredes LE y Brownell Jr RL. 2019. Pregnancy rate and biomarker validations from the

- blubber of eastern North Pacific blue whales. *Marine Mammal Science*, 36:6-28. <https://doi.org/10.1111/mms.12616>.
- Baharav TZ, Kamath GM, Tse DN y Shomorony I. 2020. Spectral Jaccard Similarity: a new approach to estimating pairwise Sequence Alignments. *Patterns (NY)*, 1(6):100081 <https://doi.org/10.1016%2Fj.patter.2020.100081>
- Bahram M y Netherway T. 2022. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2) <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>
- Bailey H. Mate BR, Palacios DM, Irvine L, Bograd SJ y Costa DP. 2009. Behavioural estimation of blue whale movements in the Northeast Pacific from state-space model analysis of satellite tracks. *Endangered Species Research*, preprint. <https://doi.org/10.3354/esr00239>.
- Bambi M, Galla G, Donati C, Rovero F, Hauffe H y Barelli C. 2024. Gut microbiota variation in wild yellow baboons (*Papio cynocephalus*) are associated with sex and habitat disturbance. *Scientific Reports*, 14(869) <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50126-z>.
- Barelli C, Albanese D, Stumpf RM, Asangba A, Donati C, Rovero F y Hauffe HC. 2020. The gut microbiota communities of wild arboreal and ground-feeding tropical primates are affected differently by habitat disturbance. *mSystems*, 5:e00061-20 <https://doi.org/10.1128/mSystems.00061-20>
- Barragán-Vargas C, Montano-Frías J, Ávila RG, Godínez-Reyes CR y Acevedo-Whitehouse K. 2016. Transformation of the genital epithelial tract occurs early in California sea lion development. *R. Soc. Open sci*, 3:150419. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150419>
- Baselga A y Gómez-Rodríguez C. 2019. Diversidad alfa, beta y gamma: 'cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 26:39-45. Recuperado de: <https://revistas.usc.gal/index.php/nacc/article/view/6413>

- Bastow WJ. 1991. Methods for fitting dominance/diversity curves. *Journal of Vegetation Science*, 2:35-46. <https://doi.org/10.2307/3235896>
- Belvonicova P, Splichalova P, Videnska P y Gardlik R. 2022. The human mycobiome: colonization, composition and the role in the health and disease. *J Fungi (Basel)*, 8(10). <https://doi.org/10.3390%2Fjof8101046>
- Berta A, Sumich JL y Kovacs KM. 2006. Marine Mammals. *Evolutionary Biology*. 2nd Edition. Academic Press. United States of America.
- Bierlich KC, Kane A, Hildebrand L, Bird CN, Fernández Ajo A, Stewart JD, Hewitt J, Hildebrand I, Sumish J, Torres LG. 2023. Downsized: gray whales using an alternative foraging ground have smaller morphology. *Biology letters*, 19:20230043. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2023.0043>.
- Blaalid R, Kumar S, Nilsson R, Abarenkov K, Kirk P y Kausrud H. 2013. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour*, 13(2): <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>.
- Blevins C, Busquets-Vass G, Pardo MA, Gendron D, Jacobsen JK, Gómez-Díaz F, Pérez-Puig H, Ortega-Ortiz CD, Heckel G, Urbán RJ, Vitoria-Gómora L y Newsome SD. 2022. Sex- and age-specific migratory strategies of blue whales in the northeast Pacific Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 9:944918. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.944918>.
- Boekhout T, Fonseca A, Sampaio JP, Bandoni R, Fell J y Kwon-Chung KJ. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. En *The Yeasts* (5a edición), 1339-1372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2>.
- Bossart GD. 2011. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology*, 48(3), 676–690. <https://doi.org/10.1177/0300985810388525>.
- Bowen L, Aldridge BM, DeLong R, Melin S, Buckles EL, Gulland F, Lowenstine LJ, Stott JL, Johnson ML. 2005. An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions

(*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*. 56(11):846-8.
<https://doi.org/10.1007/s00251-004-0757-z>.

Bradford LL y Ravel J. 2017. The vaginal mycobiome: a contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*, 8(3):342-351
<https://doi.org/10.1080%2F21505594.2016.1237332>.

Brock PM, Hall AJ, Goodman SJ, Cruz M y Acevedo-Whitehouse K. 2013. Immune Activity, Body Condition and Human-Associated Environmental Impacts in a Wild Marine Mammal. *PLoS ONE*, 8(6), 4–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067132>.

Brouwer N, Connuck H, Dubniczki H, Gownaris N, Howard A, Olmsted C, Wetzel D, Whittinghill K, Wilson A y Zallek T. 2023. Ecology for All! LibreTexts TM
<https://LibreTexts.org>.

Browning HM, Gulland FMD, Hammond JA, Colegrove KM y Hall AJ. 2015. Common cancer in a wild animal: The California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0228>.

Buckles EL, Lowenstine LJ, Funke C, Vittore RK, Wong HN, St Leger JA, Greig DJ, Duerr RS, Gulland FMD y Stott JL. 2006. Otarine Herpesvirus-1, not Papillomavirus, is Associated with Endemic Tumours in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Comparative Pathology*, 135(4), 183–189.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.06.007>.

Burek-Huntington KA, Gill V y Bradway DS. 2014. Locally acquired disseminated histoplasmosis in a Northern Sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*) In Alaska, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(2). <https://doi.org/10.7589/2013-11-288>.

Burnett JD, Lemos L, Barlow D, Wing MG, Chandler T y Torres LG. 2018. Estimating morphometric attributes of baleen whales with photogrammetry from small UASs: A case study with blue and gray whales. *Marine Mammal Science*, 35(1):108-139. <https://doi.org/10.1111/mms.12527>.

- Busquets-Vass G, Newsome SD, Calambokidis J, Serra-Valente G, Jacobsen JK, Aguíñaga-García S y Gendron D. 2017. Estimating blue whale skin isotopic incorporation rates and baleen growth rates : implications for assessing diet and movement patterns in mysticetes. *PLoS ONE*, 12(5) :e0177880.
- Busquets-Vass G, Newsome SD, Pardo MA, Calambokidis J, Aguíñaga-García S, Páez-Rosas D, Gómez-Gutiérrez J, Enríquez-Paredes LM y Gendron D. 2021. Isotope-based inferences of the seasonal foraging and migratory strategies of blue whales in the eastern Pacific Ocean. *Marine Environmental Research*, 163(105201). <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105201>.
- Calambokidis J y Barlow J. 2004. Abundance of blue and humpback whale in the eastern north pacific estimated by capture-recapture and line-transect methods. *Marine Mammal Science*, 20(1):63-85
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ y Holmes SP. 2016. DADA2: high resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 13(7):581-583 <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan BJ, Wong J, Heiner C, Oh S, Theriot CM, Gulati AS, McGill SK y Dougherty MK. 2019. High-throughput amplicon of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res*. 47(18):e103 <https://doi.org/10.1093/nar/nfz569>
- Carter JB y Saunders V. 2007. Virology: Principles and applications. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, Inglaterra. Pp:121-135
- Casillas-López C. 2016. Condición corporal de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) con base en un índice visual a partir de fotografías. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.
- Chiarello M, Villéger S, Bouvier C, Auguet JC y Bouvier T. 2017. Captive bottlenose dolphins and killer whales harbor a species-specific skin microbiota that varies among individuals. *Scientific reports*, 7(15269). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15220-z>.

- Christiansen F, Sironi M, Moore MJ, Di Martino M, Ricciardi M, Warick HA, Irschick DJ, Gutierrez R y Uhart MM. 2019. Estimating body mass of free-living whales using aerial photogrammetry and 3D volumetrics. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:2023-2044. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13298>.
- Christiansen F, Vikingsson GA, Rasmussen MH y Lusseau D. 2013. Female body condition affects foetal growth in a capital breeding mysticete. *Functional Ecology*, 28(3):579-588. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12200>.
- Chun JL, Ji SY, Lee SD, Lee YK, Kim B y Kim KH. 2020. Difference of gut microbiota composition based on the body condition scores in dogs. *J Anim Sci Technol*, 62(2):239-246. <https://doi.org/10.5187%2Fjast.2020.62.2.239>.
- Chun SJ. 2022. Microbiome dataset of eukaryotic and fungal communities in the bulk soil and root of wild *Brassica napus* in South Korea. *Data in Brief*, 43:108457 <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108457>.
- Cisneros-Montemayor AM, Townsel A, González CM, Haas AR, Navarro-Holm EE, Salorio-Zuñiga T y Johnson AF. 2020. Nature-based marine tourism in the Gulf of California and Baja California Peninsula: Economic benefits and key species. *Natural Resources Forum*, 44(2). <https://doi.org/10.1111/1477-8947.12193>.
- Colegrove K, Gulland FMD, Naydan DK y Lowenstine LJ. 2009-a. The normal genital tract of the female California sea lion (*Zalophus californianus*): cyclic changes in histomorphology and hormone receptor distribution. *The Anatomical Record*, 292:1801-1817 <https://doi.org/10.1002/ar.21009>.
- Colegrove KM, Gulland FMD, Naydan DK y Lowenstine LJ. 2009-b. Tumor morphology and immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptor, p53, and Ki67 in Urogenital carcinomas of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Pathology*, 46(4), 642–655. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0214-C-FL>.
- Cooke JG. 2018. *Balaenoptera musculus* (errata version published in 2019). *The IUCN Red List of Threatened Species*:

e.T2477A156923585. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T2477A156923585>.

Costa-Urrutia P, Sanvito S, Victoria-Cota N, Enríquez-Paredes L, Gendron D. 2013. Fine-scale population structure of blue whale wintering aggregations in the Gulf of California. *PLoS ONE*, 8(3):e58315.

Coyte KZ y Rakoff-Nahoum S. 2019. Understanding competition and cooperation within the mammalian gut microbiome. *Curr Biol*, 29(11):R538-R544 doi:10.1016/j.cub.2019.04.017.

Csardi G y Nepusz T. 2006. The igraph software package for complex research. *InterJournal, Complex Systems*, 1695. <https://igraph.org/>

Davis RW, Jaquet N, Gendron D, Markaida U, Bazzino G y Gilly W. 2007. Diving behavior of sperm whales in relation to behavior of a major prey species, the jumbo squid, in the Gulf of California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 333:291-302.

De Candia AL, Dobson AP y vonHoldt BM. 2018. Toward an integrative molecular approach to wildlife disease. *Conservation Biology*, 32(4):798-807 <https://doi.org/10.1111/cobi.13083>.

De Hoog, GS, Ahmed SA, Danesi P, Guillot J y Gräser Y. 2018. Distribution of Pathogens and outbreak fungi in the fungal kingdom. In emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals, 3-17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7_1

Del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S y Ferrer-Martínez M. 2018. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(4):241-245. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>.

Delgado-Rodríguez V. 2022. Variabilidad en la dieta de la ballena azul mediante la escatología molecular. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional.

- Desoubeaux G y Cray C. 2018. Animal models of aspergillosis. *Comparative Medicine*, 68(2), 109–123.
- Dierauf LA y Gulland FMD. 2001. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. 2° edición CRC Press, New York.
- Domínguez-Sánchez CA, Acevedo-Whitehouse K y Gendron D. 2018. Effect of drone-based blow sampling on blue whale (*Balaenoptera musculus*) behavior. *Marine Mammal Science*, 34(3):841–850. <https://doi.org/10.1111/mms.12482>
- Domínguez-Sánchez CA. 2020. Microbioma bacteriano del tracto respiratorio de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspollu A, Väin E, Saarma I, Salumets A, Donders GGG y Metsis M. 2013. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS ONE* 8(1):e54379 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054379>.
- Drumond SLM, Lirio JM, Coria SH, Cardoso LFA, Convey P, Carvalho-Silva M, Soares OF, Rosa CA, Saraiva CPEA y Rosa LH. 2022. Diversity, distribution and ecology of fungal communities present in Antarctic lake sediments uncovered by DNA metabarcoding. *Scientific Reports*, 12,8407. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12290-6>
- Duignan PJ, Stephens NS y Robb K. 2020. Fresh water skin disease in dolphins: a case definition based on pathology and environmental factors in Australia. *Scientific Reports*, 10(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78858-2>
- Dunn JL, Buck JD y Spotte S. 1984. Candidiasis in captive pinnipeds. *Journal of the American Veterinary Medical association*, 185(11):1328-1330
- Dunn JL, Buck JD, Spotte S. 1989. Candidiasis in captive cetaceans. *Journal of the American Veterinary Medical association*, 181(11):1316-1321
- Dunn R, Dudbridge F y Sanderson CM. 2005. The use of edge-betweenness clustering to investigate biological function in protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 1:6-39. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-39>.

- Edwards JE, Forster R, Callaghan TM, Dollhofer V, Dagar SS, Cheng Y, Chang J, Kittelmann S, Fliegerova K, Puniya AK, Henske JK, Gilmore SP, O'Malley MA, Griffith GW y Smidt H. 2017. PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities. *Front. Microbiol*, 8:1657 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01657>
- Elkhateeb WA y Daba GM. 2021. *Stemphylium* and *Ulocladium* between benefit and harmful. *J Biomed Res Environ Sci*, 20;2(11):1117-1120 <https://doi.org/10.37871/jbres1356>
- Elorriaga-Verplancken F, Ferretto G y Angel OC. 2015. Current status of the California sea lion (*Zalophus californianus*) and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) at the San Benito Archipelago, Mexico. *Ciencias Marinas*, 41(4), 269–281. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2545>
- Emami-Khoyi A, Benmazouz I, Rodd JG, Boren LJ, Murphy EC, van Vuuren BJ, Teske PR y Paterson AM. 2019. A survey of the oral cavity microbiome of New Zealand fur seal pups (*Arctocephalus forsteri*). *Marine Mammal Science*, 36(1):334-343 <https://doi.org/10.1111/mms.12639>
- Emmons S, Kobourov S, Gallant M y Börner K. 2016. Analysis of network clustering algorithms and cluster quality metrics at scale. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159161>.
- Eo K-Y y Kwon O-D. 2014. Dermatitis caused by *Candida albicans* in a captive spotted seal (*Phoca largha*). *Journal of Veterinary Clinics*, 31(4):322-324
- Escalante F, Valdez-Holguin JE, Alvarez-Borrego S y Lara-Lara. 2013. Temporal and spatial variation of sea surface temperature, chlorophyll a, and primary productivity in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 39(2):203-215. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v39i2.2233>
- Espinosa de AW, Olvera-Ramírez A, Arellano-Carbajal F, Lanz-Mendoza H, Villagrán-Herrera E y Acevedo-Whitehouse K. 2017. Protein and RNA extraction from mucosal swabs: a minimally invasive source of ecological data

- for studies of natural populations. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(3), 370–378. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12680>
- Farell EM y Alexandre G. 2012. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, 5:257. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>
- Favorit A, Hood WR, Kavazis AN, Villamediana P, Nian Yap K, Parry HA y Skibieli A. 2021. Mitochondrial bioenergetics of extramammary tissues in lactating dairy cattle. *Animals (Basel)*, 11(9): 2647 <https://doi.org/10.3390%2Fani11092647>
- Fiorito F, Cerracchio C, Salvatore MM, Serra F, Pucciarelli A, Amoroso MG, Nicoletti R y Andolfi A. 2022. Antiviral property of the fungal metabolite 3-O-Methylfunicone in bovine herpesvirus 1 infection. *Microorganisms*, 10(1):188. <https://doi.org/10.3390%2Fmicroorganisms10010188>
- Flores-Cascante L, Gómez-Gutiérrez J, Gómez del Prado-Rosas MC y Gendron D. 2019. Helminth load in faeces of free-ranging blue and fin whales from the Gulf of California. *Acta parasitologica*, 64(3):625-637. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00069-1>
- Frau A, Kenny JG, Lenzi L, Campbell BJ, Ijaz U, Duckworth CA, Burkitt MD, Hall N, Anson J, Darby AC y Probert CSJ. 2019. DNA extraction and amplicon production strategies deeply influence the outcome of gut mycobiome studies. *Scientific Reports*. 9:9328. doi.org/10.1038/s41598-019-44974-x
- French SS, González-Suárez M, Young JK, Durham S y Gerber LR. 2011. Human Disturbance Influences Reproductive Success and Growth Rate in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *PLoS One*, 6(3):e17686 <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0017686>
- Gams W, Diederich P y Poldmaa K. 2004. Fungicolous fungi. *Biodiversity of fungi*, 343-392. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50020-9>

- Gao C, Xu L, Montoya L, Madera M, Hollingsworth, Chen L, Purdom E, Singan V, Vogel J, Hutmacher RB, Dahlberg JA, Coleman-Derr D, Lemaux PG y Taylor JW. 2022. Co-occurrence networks reveal more complexity than community composition in resistance and resilience of microbial communities. *Nature communications*, 13(3867) <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31343-y>.
- Gao CH, Yu G y Chai P. 2021. ggVennDiagram: an intuitive, easy-to-use, and highly customizable R package to generate Venn Diagram. *Frontiers in genetics* 12, 1598. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.706907/full>
- García-Hermoso D, Hamane S, Fekkar A, Jabet A, Denis B, Siguier M, Galeazzi G, Haddad E, Brun S, Vidal V, Nevez G, Le Berre R, Gits-Muselli M, Lantermier F y Bretagne S. 2020. Invasive Infections with *Nannizziopsis obscura* species complex in 9 patients from West Africa, France, 2004-2020. *Emerg Infect Dis*, 26(9):2022-2030 <https://doi.org/10.3201%2Faid2609.200276>
- Gelippi M, Caraveo-Patiño J, Gauger MFW, Popp BN, Panigada S y Marcín-Medina R. 2022. Isotopic composition of the eastern gray whale epidermis indicates contribution of prey outside Arctic feeding grounds. *Scientific Reports*, 12:7055. <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-022-10780-1>.
- Gendron D y Ugalde de la Cruz A. 2012. A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. *J. Cetacean Res. Manage*, 12(1):79-83. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v12i1.594>.
- Gendron D. 1992. Population structure of daytime surface swarms of *Nyctiphanes simplex* (Crustacea: Euphasiacea) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 87:1-6.
- Gendron D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul, *Balaenoptera musculus*, de la península de Baja California. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 15–38
- Gilot-Fromont E, Jégo M, Bonenfant C, Gibert P, Rannou B, Klein F y Gaillard JM. 2012. Immune Phenotype and body condition in Roe Deer: individuals with high

body condition have different, not stronger immunity. *PLoS ONE*, 7(9):e45576, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045576>

Glaeser SP, Silva LMR, Prieto R, Silva MA, Franco A, Kämpfer P, Hermosilla C, Taubert A, Eisenberg T. 2022. A preliminar comparison on faecal microbiomes of free-ranging large baleen (*Balaenoptera musculus*, *B. physalus*, *B. borealis*) and toothed (*Physeter macrocephalus*) whales. *Microb Ecol*, 83(1):18-33. <https://doi.org/10.1007%2Fs00248-021-01729-4>.

Gleason FH, Chambouvet A, Sullivan BK, Lilje O y Rowley JLL. 2014. Multiple zoosporic parasites pose a significant threat to amphibian populations. *Fungal ecology*, 11:181-192. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.04.001>

Gleason FH, Jephcott TG, Küpper FC, Gerphagnon M, Sime-Ngango T, Karpov S, Guillou L y van Ogtrop FF. 2015. Potential roles for recently discovered chytrid parasites in the dynamics of harmful algal blooms. *Fungal Biology Reviews*, 29(1):20-33 <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.03.002>.

Godoy-Vitorino F, Rodríguez-Hilario A, Alves AL, Goncalves F, Cabrera-Colon B, Mesquita CS, Soares-Castro P, Ferreira M, Marcalo A, Vingada J, Eira C y Santos PM. 2017. The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in Microbiology*, 168(1):85-93. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.08.004>

Godoy-Vitorino F, Romaguera J, Zhao C, Vargas-Robles D, Ortiz-Morales G, Vázquez-Sánchez F, Sánchez-Vázquez M, Garza-Casillas M, Martínez-Ferrer M, White J, Bittinger K, Dominguez-Bello MG y Blaser MJ. 2018. Cervicovaginal fungi and bacteria associated with cervical intraepithelial neoplasia and high risk human papillomavirus infections in a Hispanic population. *Front Microbiol*, 9:2533. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2018.02533>

Gómez-deMariscal E, Guerrero V, Sneider A, Jayatilaka H, Philip JM, Wirtz D y Muñoz-Barrutia. 2021. Use of the *p-values* as a size-dependent function to address practical differences when analyzing large datasets. *Scientific Reports*, 11:20942. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00199-5>.

- Grattarola C, Giorda F, Iulini B, Pautasso A, Ballardini M, Zoppi S, Marsili L, Peletto S, Masoero L, Varello K, Garibaldi F, Scaglione FE, Di Guardo G, Dondo A, Goria M, Serracca L, Mignone W y Caralone C. 2018. Occlusive mycotic tracheobronchitis and systemic Alphaherpesvirus coinfection in a free-living striped dolphin *Stenella coeruleoalba* in Italy. *Diseases of aquatic organisms*. 127:137-144 <https://doi.org/10.3354/dao03190>
- Green SR y Moehle CM. 2001. Media and culture of yeast. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 1:Unit 1.6. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0106s04>
- Griffith GW, Easton GL, Detheridge A, Roderick K, Edwards A, Worgan HJ, Nicholson J y Perkins W. 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters* 276(2):165-171 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x>
- Groch KR, Díaz-Delgado J, Sacristán C, Oliveira DE, Souza G, Sánchez-Sarmiento AM, Costa-Silva S, Marigo J, Castilho PV, Cremer MJ, Hoffmann AR, Esperón F y Catão-Dias JL. 2018. Pulmonary and systemic fungal infections in an Atlantic spotted dolphin and a Bryde's whale, Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(1), 73–79. <https://doi.org/10.3354/dao03207>
- Guan X, Guo H, Guo Y, Han Q, Li Z y Zhang C. 2024. Perforin 1 in cancer: mechanisms, therapy, and outlook. *Biomolecules*, 14(8):910 <https://doi.org/10.3390%2Fbiom14080910>
- Guerrero de la Rosa F. 2014. Efecto de la estructura social en la dieta de los cachalotes del Golfo de California. CICIMAR-IPN. Tesis de Doctorado. 94 pp.
- Guevara-Suarez M, García D, Cano-Lira JF y Gené J. 2020. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in *Aspergillaceae*. *Fungal Systematics and Evolution*, 5:39-75. <https://doi.org/10.3114/fuse.20220.05.03>
- Guillot J, Petit T, Degorce-Rubiales F, Guého E y Chermette R. 1998. Dermatitis caused by *Malassezia pachydermatis* in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Veterinary record*, 142:311-312.

- Gulland FMD, Hall AJ, Ylitalo GM, Colegrove KM, Norris T, Duignan PJ, Halaska B, Acevedo-Whitehouse K, Lowenstine LJ, Deming AC y Rowles TK. 2020. Persistent Contaminants and Herpesvirus OtHV1 Are Positively Associated With Cancer in Wild California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Frontiers in Marine Science*, 7:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.602565>
- Guo B, Zhang L, Sun H, Gao M, Yu N, Zhang Q, Mou A y Liu Y. 2022. Microbial co-occurrence network topological properties link with reactor parameters and reveal importance of low-abundance genera. *npj Biofilms and Microbiomes*, 8(3). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00263-y>
- Hađina S, Boras J, Bata I, Škrilin B, Starešina V, Barbić L, Perko VM, Štritof Z, Stevanović V, Habuš J, Perharić M, Milas Z, Turk N y Pinter L. 2019. Isolation and molecular characterization of *Malassezia pachydermatis* from a cutaneous lesion in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Veterinarski Arhiv*, 89(2), 211–222. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0173>
- Haelewaters D, Urbina H, Brown S, Newerth-Henson S y Aime MC. 2021. Isolation and molecular characterization of the romain lettuce Phylloplane mycobiome. *J Fungi*. 7(4), 277 <https://doi.org/10.3390/jof7040277>
- Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Högenauer C, Thallinger GG y Gorkiewicz G. 2017. Critical issues in mycobiota analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00180>.
- Hamm PS, Taylor JW, Cook JA y Natvig DO. 2020. Decades-old studies of fungi associated with mammalian lungs and modern DNA sequencing approaches help define the nature of the lung mycobiome. *PLoS Pathog*, 16(7):e1008684. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008684>.
- Häussermann V, Gutstein CS, Bedington M, Cassis D, Olavarria C, Dale AC, Valenzuela-Toro AM, Perez-Alvarez MJ, Sepúlveda HH, McConnell KM, Horwitz FE y Försterra G. 2017. Largest baleen whale mass mortality during strong El Niño event is likely related to harmful toxic algal bloom. *PeerJ*, 5:e3123 <https://doi.org/10.7717/peerj.3123>

- Hazen EL, Friedlaender AS y Goldbogen JA. 2015. Blue whales (*Balaenoptera musculus*) optimize foraging efficiency by balancing oxygen use and energy gain as a function of prey density. *Science Advances*, 1(9):e1500469. <https://doi.org/10.1126%2Fsciadv.1500469>.
- Heckel G, Ruiz Mar MG, Schramm Y y Gorter U. 2020. Atlas of Marine Mammal Distribution and Abundance in Mexican Waters. Universidad Autónoma de Campeche. <https://doi.org/10.26359/epomex.cemie022020>
- Henk WG, y Haldiman JT. 1990. Microanatomy of the Lung of the Bowhead Whale *Balaena mysticetus*. *The anatomical record*, 226:187-197.
- Henry T, Iwen PC y Hinrichs SH. 2000. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1510–1515. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.4.1510-1515.2000>
- Higgins R. 2000. Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Canadian Veterinary Journal*, 41:105-116.
- Höft M, Duvenage L y Hoving CJ. 2022. Key thermally dimorphic fungal pathogens: shaping host immunity. *Open Biol*, 12(3), DOI 10.1098/rsob.210219
- Holst BS y Gustavsson MH. 2016. Animal obesity: causes, consequences and comparative aspects. *Acta Vet Scand*, 58(1):56. <https://doi.org/10.1186%2Fs13028-016-0237-0>
- Hong SK, Choi HW, Lee YK, Shim HS y Lee SY. 2012. Leaf spot and stem rot on wilford swallowwort caused by *Stemphylium*: *Lycopersici* in Korea. *Mycobiology*, 40(4):268–271. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.4.268>
- How CW, Ong YS, Low SS, Pandey A, Show PL y Foo JB. 2021. How far have we explored fungi to fight cancer? *Seminars in Cancer Biology*, In Press, corrected Proof. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.009>
- Huckabone SE, Gulland FMD, Johnson SM, Colegrove KM, Dodd EM, Pappagianis D, Dunkin C, Carlson EL, Sykes JE, Meyer W y Miller MA. 2015. Coccidioidomycosis and other systemic mycoses of marine mammals

- stranding along the central California, USA coast: 1998-2012. *J of Wildlife Diseases*, 51(2):295-308. <https://doi.org/10.7589/2014-06-143>
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH y Bohannan BJM. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 67(10):4399-4406. <https://doi.org/10.1128%2FAEM.67.10.4399-4406.2001>
- Iliev ID y Leonardi I. 2017. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nat Rev Immunol*, 17(10):635-646. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.55>
- Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, Cardinali G, Arthur I, Normand AC, Giraldo A, Da Cunha KC, Sandoval-Denis M, ... Meyer W. 2015. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database -the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 53(4):313-337 <https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>
- James SA, Parker A, Purse C, Telatin A, Baker D, Holmes S, Durham J, Funnell SGP y Carding SR. 2022. The *Cynomolgus* macaque Intestinal mycobiome is dominated by the *Kazachstania* Genus and *K. pintolopesii* Species. *J. Fungi*, 8(10), 1054. <https://doi.org/10.3390/jof8101054>
- Jensen ED, Lipscomb T, van Bonn B, Miller G, Fradkin JM y Ridgway SH. 1998. Disseminated histoplasmosis in an atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(4):456-460
- Jiang TT, Shao TY, Ang WXG, Kinder JM, Turner LH, Pham G, Whitt J, Alenghat T y Way SS. 2017. Commensal fungi recapitulate the protective benefits of intestinal bacteria. *Cell Host Microbe*, 22(6):809-816.e4 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.013>
- Jiménez-Pinedo NC. 2010. Hábitos alimenticios y relación interespecífica entre la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) y la ballena de aleta (*B. physalus*) en el

suroeste del Golfo de California. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional.

Joos L, Beirinckx S, Haegeman A, Debode J, Vandecasteele B, Baeyen S, Goormachtig S, Clement L y De Tender C. 2020. Daring to be differential: metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units. *Genomics* 21:733. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07124-4>

Joseph BE, Cornell LH, Simpson JG, Migaki G y Griner L. 1986. Pulmonary Aspergillosis in three species of dolphin. *Zoo Biology*, 5:301-308

Jost L. 2006. Entropy and diversity. *Oikos*, 113(2): 363-375. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>.

Kantarci B y Labatut V. 2013. Classification of Complex Networks Based on Topological Properties. 3rd Conference on Social Computing and its Applications, Sep 2013, Karlsruhe, Alemania:297-304, 10.1109/CGC.2013.54. hal-00940688

Kapitan M, Niemec MJ, Steimle A, Frick JS y Jacobsen ID. 2018. Fungi as part of the microbiota and Interactions with intestinal bacteria. *Current topics in microbiology and Immunology*. 10.1007/82_2018_117

Kaplan MH. 2013. STAT signaling in inflammation. *JAKSTAT*, 2(1): e24198. <https://doi.org/10.4161%2Fjkst.24198>

Kers JG, Saccenti E. 2022. The power of microbiome studies:some considerations on which alpha and beta metrics to use and how to report results. *Front Microbiol*, 12:796025. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2021.796025>

Khehra N, Padda IS y Swift CJ. 2023. Polymerase Chain Reaction (PCR) (Updated 2023 Mar 6). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Acceso desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>

King DP, Hure MC, Goldstein T, Aldridge BM, Gulland FMD, Saliki JT, Buckles EL, Lowenstine LJ y Stott JL. 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel

- gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*, 86, 131–137.
- Kobayashi DY y Crouch JA. 2009. Bacterial/Fungal Interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1):63-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081729>
- Kolde R. 2018. Pheatmap: pretty heatmaps. R package version 1.0.12, <https://github.com/raivokolde/pheatmap>.
- Kurtz ZD, Müller CL, Miraldi ER, Littman DR, Blaser MJ y Bonneau RA. 2015. Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLOS Computational Biology*, 11(5):e1004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>.
- Kuzmina TA, Spraker TR, Kudlai O, Lisitsyna OI, Zabludovskaja SO, Karbowski G, Fontaine C y Kuchta R. 2018. Metazoan parasites of California sea lions (*Zalophus californianus*): A new data and review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3):326–334. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.09.001>
- Lai GC, Tan TG y Pavelka N. 2018. The mammalian mycobiome: A complex system in a dynamic relationship with the host. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*:1–22. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1438>
- Lai S, Yan Y, Pu Y, Lin S, Qiu J-G, Jiang B-H, Keller MI, Wang M, Bork P, Chen WH, Zheng Y, Zhao XM. 2023. Enterotypes of the human gut mycobiome. *Microbiome*, 11(179). <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01586-y>
- Lavaniegos BE, Jiménez-Herrera M y Ambriz-Arreola I. 2019. Unusually low euphasiid biomass during the warm years of 2014-2016 in the transition zone of the California Current. *Deep-Sea Research Part II*, (169-170):104638. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2019.104638>.
- Lavrinenko A, Scholier T, Bates S, Miller AN y Watts PC. 2021. Defining gut mycobiota for wild animals: a need for caution in assigning authentic resident

- fungal taxa. *Animal microbiome*, 3:75. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00134-z>
- Layeghifard M, Hwang D, Guttman DS, 2017. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. *Trends Microbiol*, 25(3):217-228 <https://doi.org/10.1016%2Fj.tim.2016.11.008>
- Lázaro-Vidal V y Álvarez-Martínez R. *in press*. Network Analysis: a key technique in microbial community research.
- Lee KK, Kim H y Lee YH. 2022. Cross-kingdom co-occurrence networks in the plant microbiome: importance and ecological interpretations. *Frontiers in Microbiology*, 13:953300 doi:10.3389/fmicb.2022.953300
- Lee W, Kim JS, Seo CW, Lee JW, Kim SH, Cho Y y Lim YW. 2023. Diversity of *Cladosporium* (Cladosporiales, Cladosporiaceae) species in marine environments and report on five new species. *MycKeys*, 98:87–111. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.98.101918>
- Li F, Gao Y, Cheng W, Su X y Yang R. 2023. Gut fungal mycobiome: a significant factor of tumor occurrence and development. *Cancer Letters*, 569:216302. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216302>.
- Li J, Li L, Jiang H, Yuan L, Zhang L, Ma J, Zhang X, Cheng M y Chen J. 2018. Fecal bacteriome and mycobiome in bats with diverse diets in South China. *Current Microbiology*, 75:1352-1361, <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1530-0>.
- Limon J, Skalski JH y Underhill DM. 2017. Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe*, 22(2):156–165. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.002>
- Lionakis MS, Drummond RA y Hohl TM. 2023. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. *Nature Reviews Immunology*, 23:433-452. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00826-w>
- Liu W, Li Z, Li X, Cao H, Jiang H, Niu Q y Hu B. 2023. Influence of tumor mycobiome on cancer pathogenesis (Review). *Oncol Lett*, 26(6):541 <https://doi.org/10.3892%2Fol.2023.14128>.

- Lluch-Cota SE, Aragón-Noriega EA, Arreguín-Sánchez F, Aurióles-Gamboa D, Bautista-Romero JJ, Brusca RC, Cervantes-Duarte R, Cortés-Altamirano R, Del-Monte-Luna P, Esquivel-Herrera A. [...], y Sierra Beltrán AP. 2007. The Gulf of California: review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in oceanography*, 73(1):1-26. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.01.013>.
- López AS, López GG y Fagilde EMC. 2017. Propuesta de un índice de diversidad funcional. Aplicación a un bosque semideciduo micrófilo de Cuba Oriental. *Bosque*, 38(3):457-466. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000300003>.
- López-Martínez J, Farach EB, Cervantes HH y García-Morales R. 2023. Long-term variability in sea Surface temperatura and chlorophyll a concentration in the Gulf of California. *Remote Sens*, 15(16). <https://doi.org/10.3390/rs15164088>.
- Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawkworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Öpik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov AM, Zhang N y Schoch CL. 2020. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus* 11:14 <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Ma X, Liu Z, Yue C, Wang S, Li X, Wang C, Ling S, Wang Y, Liu S y Gu Y. 2024. High-throughput sequencing and characterization of potentially pathogenic fungi from the vaginal mycobiome of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in estrus and non-estrus. *Front. Microbiol*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1265829>
- Maas E, Penders J y Venema K. 2023. Fungal-Bacterial interactions in the human gut of healthy individuals. *J Fungi (Basel)*, 9(2):139. <https://doi.org/10.3390%2Fjof9020139>.
- MacLachlan NJ y Dubovi EJ. 2011. Fenner's Veterinary Virology. 4th Edition. Elsevier. China.

- Marques TC, Bourke BP, Laporta GZ y Sallum MAM. 2012. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. *Parasites & Vectors*, 5:41. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-41>.
- Matchado MS, Lauber M, Reitmeier S, Kacprowski T, Baumbach J, Haller D y List M. 2021. Network analysis methods for studying microbial communities: a mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19:2687-2698. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>.
- Mauldin EA y Peters-Kennedy J. 2016. Integumentary System. In Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1. 509-736 <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-7020-5317-7.00006-0>.
- Mbareche H, Veillette M, Bilodeau G y Duchaine C. 2020. Comparison of the performance of ITS1 and ITS2 as barcodes in amplicon-based sequencing of bioaerosols. *PeerJ*. 8:e8523 <https://doi.org/10.7717/peerj.8523>.
- McCabe RM, Hickey BM, Kudela RM, Lefebvre KA, Adams NG, Bill BD, Gulland FMD, Thomson RE, Cochlan WP y Trainer VL. 2016. An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions. *Geophys Res Lett*, 43(19):10366-10376 <https://doi.org/10.1002%2F2016GL070023>.
- McGinnis MR y Tyring SK. 1996. Introduction to Mycology. En: Medical Microbiology, 4° Ed. Galveston (Tx): University of Texas Medical Branch. Accedido desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8125/>.
- McGuire TL, Stephens AD, McClung JR, Garner C, Burek-Huntington KA, Goertz CEC, Shelden KEW, O'Corry-Crowe G, Himes Boor GK y Wright B. 2020. Anthropogenic scarring in long-term photo-identification records of cook inlet Beluga Whales, *Delphinapterus leucas*. *Marine Fisheries Review*, 82(3), 20–40. <https://doi.org/10.7755/MFR.82.3-4.3>.
- McLeland S, Duncan C, Spraker T, Wheeler E, Lockhart SR y Gulland F. 2012. *Cryptococcus albidus* infection in a California sea lion (*Zalophus californianus*).

Journal of Wildlife Diseases, 48(4), 1030–1034. <https://doi.org/10.7589/2011-08-226>.

McMurdie P y Holmes S. 2013. Phyloseq: a Bioconductor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. *PLoS ONE*, 8(4):e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

Mehta SD, Nandi D, Agingu W, Green SJ, Bhaumik DK, Bailey RC y Otieno F. 2022. Vaginal and penile microbiome associations with herpes simplex virus type 2 in women and their male sex partners. *J Infect Dis*, 226(4):644-654. <https://doi.org/10.1093%2Finfdis%2Fjiaa529>.

Miller WG, Padhye AA, van Bonn W, Jensen E, Brandt ME y Ridgway SH. 2002. Cryptococcosis in a Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii*. *J Clin Microbiol*, 40(2):721-724 <https://doi.org/10.1128%2FJCM.40.2.721-724.2002>.

Moeller AH, Foerster S, Wilson ML, Pusey AE, Hahn B y Ochman H. 2016. Social behavior shapes the chimpanzee pan-microbiome. *Sci Adv*, 2(1):e1500997 <https://doi.org/10.1126%2Fsciadv.1500997>.

Monard C, Gantner S y Stenlid J. 2013. Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(1), 165–175. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12046>.

Montoya AM y González GM. 2014. *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen. *Medicina Universitaria*, 16(62):37-43.

Morales DNR. 2018. Respuestas del elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) a desafíos inmunes en un contexto de historia de vida. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Tesis de Maestría.

Moreno CE, Barragán F, Pineda E y Pavón NP. 2011. Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4):1249-1261.

- Mortia T, Kishimoto M, Shimada A, Matsumoto Y, Shindo. 2001. Disseminated histoplasmosis in a sea otter (*Enhydra lutris*). *J Comp Pathol*, 125(2-3):219-223. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0490>.
- Mouton M y Botha A. 2012. Cutaneous lesions in cetaceans: an indicator of ecosystem status? *New Approaches to the study of Marine Mammals*. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/chapters/40769>
- Mouton M, Reeb D, Botha A y Best P. 2009. Yeast infection in beached southern right whale (*Eubalaena australis*) neonate. *J Wildl Dis*, 45(3):692-699
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H. 1986. Specific enzymatic chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Narunsky-Haziza L, Sepich-Poore GD, Livyatan I, Asraf O, Martino C, Nejman D, Gavert N, Stajich JE, Amit G, González A, Wandro S, Perry G, Ariel R, Meltser A, Shaffer JP, Zhu Q, Balint-Lahat N, Barshack I, Dadiani M, Gal-Yam EN, Patel SP, Bashan A, Swafford AD, Pilpel Y, Knight R y Straussman R. 2022. Pan-cancer analyses reveal cancer-type-specific fungal ecologies and bacteriome interactions. *Cell*. 185:3789-3806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.005>
- Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, Stewart CJ, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, Ajami NJ y Petrosino JF. 2017. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5:153. Doi 10.1186/s40168-017-0373-4
- Nayar R y Wilbur D. 2015. *The Bethesda System for reporting cervical cytology*. Springer. 3rd edition. Doi:10.1007/978-3-319-11074-5
- Neu AT, Allen EE y Kaustuv R. 2021. Defining and quantifying the core microbiome: challenges and prospects. *PNAS*, 118(51), <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>

- Newbold CJ y Ramos-Morales E. 2020. Review: ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*, 14(1):s78-s86 <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>.
- Nieves-Martínez P. 2022. Expresión genética relacionada con la transformación epitelial genital del lobo marino de California. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P y Tedersoo L. 2019. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Niño-Torres CA, Urbán-Ramírez J y Vidal O. 2011. Mamíferos Marinos del Golfo de California: Guía ilustrada. Publicación Especial No. 2, Alianza WWF México-Telcel. 192 pp.
- Nishijima S, Nagata N, Kiguchi Y, Kojima Y, Miyoshi-Akiyama T, Kimura M, Ohsugi M, Ueki K, oka S, Mizokami M, Itoi T, Kawai T, Uemura N y Hattori M. 2022. Extensive gut virome variation and its associations with host and environmental factor in a population-level cohort. *Nature Communications*, 13(5252): <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32832-w>
- O'Rawe JA, Ferson S y Lyon GJ. 2015. Accounting for uncertainty in DNA sequencing data. *Trends in Genetics*, 31(2). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.12.002>
- Oftedal OT. 1997. Lactation in whales and dolphins: evidence of divergence between baleen- and toothed species. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2(3). <https://doi.org/10.1023/A:1026328203526>
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlenn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J (2024).

vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4,
<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Olaya-Ponzzone L, Espada R, Martín Moreno E, Cárdenas Marcial I y García-Gómez JC. 2020. Injuries, healing and management of common dolphins (*Delphinus delphis*) in human-impacted waters in the south Iberian Peninsula. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 100(2), 315–325. <https://doi.org/10.1017/S0025315420000090>

Ortega-Ortiz C, Gómez-Muñoz VM y Gendron D. 2018. Allometry and morphometry of blue whales photographed in the Gulf of California: insights into subspecies taxonomy in the Eastern North Pacific. *Endangered Species Research*, 37:183-194. <https://doi.org/10.3354/esr00910>.

Páez-Osuna F, Sanchez-Cabeza JA, Ruiz-Fernández AC, Alonso-Rodríguez ACR, Piñón Gimete JG, Cardoso-Mohedano JG, Flores-Verdugo FJ, Caballo-Cenizo JL, Cisneros-Mata MA y Álvarez-Borrego S. 2016. Environmental status of the Gulf of California: a review of responses to climate change and climate variability. *Earth Science Reviews*, 162:253-268. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.09.015>.

Pang KL, Hassett BT, Shaumi A, Guo SY, Sakayaroj J, Chiang MWL, Yang CH y Jones EBG. 2021. Pathogenic fungi of marine animals: A taxonomic perspective. *Fungal Biology Reviews*, 38:92–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.008>.

Pannoni SB, Proffitt KM y Holben WE. 2022. Non-invasive monitoring of multiple wildlife health factors by fecal microbiome analysis. *Ecology and Evolution*, 12(22):e8564 <https://doi.org/10.1002/ece3.8564>.

Papastavrou V y Ryan C. 2023. Ethical standards for research on marine mammals. *Research Ethics*, 19(4):390-408. <https://doi.org/10.1177/17470161231182066>.

Pardo MA, Gerrodette T, Beier E, Gendron D, Forney KA, Chivers SJ, Barlow J, Palacios DM. 2015. Inferring cetacean population densities from the absolute

- dynamic topography of the ocean in a hierarchical Bayesian framework. *PLoS ONE*, 10(3):e0120727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120727>.
- Park MS, Oh SY, Fong JJ, Houbraken J y Lim YW. 2019. The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>.
- Pawlowska TE. 2024. Symbioses between fungi and bacteria: from mechanisms to impacts on biodiversity. *Current Opinion in Microbiology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102496>.
- Peñín I, Figueroa-Cabañas ME, De la Rosa FG, Soto-García LA, Álvarez-Martínez R, Flores-Morán A y 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. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019>
- Pereida-Aguilar JC, Barragán-Vargas C, Domínguez-Sánchez C, Álvarez-Martínez RC y Acevedo-Whitehouse K. 2023. Bacterial dysbiosis and epithelial transformation of the California Sea Lion (*Zalophus californianus*). SSRN, preprint.
- Pereida-Aguilar JC. 2020. Microbioma cervical y su relación con la transformación epitelial cervical en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Peterson RS y Bartholomew GA. 1967. The natural history and behavior of the California sea lion. *The American Society of Mammologists*. Harvard University.
- Porrás-Peters H, Aurióles-Gamboa D, Cruz-Escalona VH y Koch PL. 2008. Trophic level and overlap of sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Mammal Science*, 24(3):554-576. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00197.x>.

- Posit team. 2024. RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. <http://www.posit.co/>.
- Powell MJ, 2015. Chytridiomycota. In: Archibald, J., *et al.* Handbook of the protists, Springer, Cham 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_18-1.
- Prokopenko D, Hecker J, Silverman EK, Pagano M, Nöthen MN, Dina C, Lange C y Fier HL. 2016. Utilizing the Jaccard index to reveal population stratification in sequencing data: a simulation study and application to the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics*, 32(9): 1366-1372. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv752>.
- Puig RM, García-Ulloa M, Espunyes J y Cabezón O. 2023. Improving the assessment of ecosystem and wildlife health: microbiome as an early indicator. *Current Opinion in Biotechnology*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102923>.
- R Core Team. 2023. *_R: A language and environment for statistical computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <Http://www.R-project.org>.
- Reyes-Montes M, Pérez-Huitrón MA, Ocaña-Monroy JL, Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E, Arenas R y Duarte-Escalante E. 2016. The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1902-7>.
- Ridgway S. 1979. Reported causes of death of captive killer whales (*Orcinus orca*). *Journal of Wildlife Diseases*, 15:99-104.
- Riet SFG. 2019. Lactation Strategies and Milk Composition in Pinnipeds. *IntechOpen*. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/chapters/68765>.
- Risely A. 2020. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, 89(7):1549-1558 <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>

- Robles-Malagambra MJ, Walsh MT, Ahasan MS, Thompson P, Wells RS, Jobin C, Fodor AA, Winglee K y Waltzek TB. 2020. Characterization of the bacterial microbiome among free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Heliyon*, 6(6):e03944. <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2020.e03944>
- Roche JR, Meier S, Heiser A, Mitchell MD, Walker CG, Crookenden MA, Riboni MV, Loor JJ y Kay JK. 2014. Effects of precalving body condition score and prepartum feeding level on production, reproduction, and health parameters in pasture-based transition dairy cows. *J Dairy Sci*, 98:7164-7182 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9269>
- Rojas CA, Ramírez-Barahona S, Holekamp KE, Theis K 2021. Host phylogeny and host ecology structure the mammalian gut microbiota at different taxonomic scales. *Animal Microbiome*, 3:33. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00094-4>
- Romano LA, Klosterhoff MC, Medeiros AFF y Pedrosa V. 2020. Pulmonary *Asperillus* in the dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Braz J Vet Pathol*, 13(2):524-526 doi: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i2p524-526
- Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z, Zolnik C, Jones HE, Waldron L, Dowd JB, Thorpe LE y Burk RD. 2019. Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. *Scientific Reports*, 9:1531 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38049-6>
- Ross JGB, Newman C, Buesching CD, Connolly E, Nakagawa S Macdonald DW. 2021. A fat chance of survival: body condition provides life-history dependent buffering of environmental change in a wild mammal population. *Climate Change Ecology*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.ecochg.2021.100022>
- Ross MH y Pawlina W. 2012. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 6° Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Sam QH, Chng MW y Chai LYA. 2017. The fungal mycobiome and its interaction with gut bacteria in the host. *Int J Mol Sci*, 18(2):220 <https://doi.org/10.3390%2Fijms18020330>

- Sarkar G, Kapelner S y Sommer SS. 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*, 18(24):7465
- Savoca MS, Czapanskiy MF, Kahane-Rapport SR, Gough WT, Fahlbusch JA, Blerlich KC, Segre PS, Di Clemente J, Penry GS, Wiley DN, Calambokidis J, Nowacek DP, Johnston DW, Pyenson ND, Friedlaender AS, Hazen EL y Goldbogen JA. 2021. Baleen whale prey consumption based on high-resolution foraging measurements. *Nature*, 599:85-90. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03991-5>.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, Miller AN, Wingfield MJ, Aime MC, An KD, Bai FY, Barreto RW, Begerow D, Bergeron MJ, Blackwell M, ... Schindel D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16):6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Scholin CA, Gulland F, Doucette GJ, Benson S, Busman M, Chavez FP, Cordaro J, DeLong R, De Vogelaere A, Harvey J, Haulena M, Lefebvre K, Lipscomb T, Loscutoff S, Lowestine LJ, Marin III R, Miller PE, McLellan WA, Moeller PDR, Powell CL, Rowles T, Silvagni P, Silver M, Spraker T, Trainer V y Van Dolah FM. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403(6765):80–84. doi:10.1038/47481.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L y Johne R. 2012. PCR inhibitor – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5):1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Schramm Y, Mesnick SL, de la Rosa J, Palacios DM, Lowry MS, Auriolles-Gamboa D, Snell HM y Escorza-Treviño S. 2009. Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Mar Bio*, 156:1375-1387. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-009-1178-1>
- Schwartz I. 2017. Blastomycosis in mammals. In *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*, 159–176. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7>

- Seyedmousavi S, Bosco SMG, de Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, Jacobsen ID, Jensen HE, Martel A, Mignon B, Pasmans F, Piecková E, Messias Rodrigues A, Singh K, Vicente VA, Wibbelt G, Wiederhold NP y Guillot J. 2018-a. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations, *Medical Mycology*, 56(1):S165 S187. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>
- Seyedmousavi S, de Hoog GS, Guillot J y Verweij PE. 2018-b. Emerging and epizootic fungal infections in animals. Springer, https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7_1
- Seyedmousavi S, Guillot J, Amé P, de Hoog S, Mouton JW, Melchers WJG y Verweij PE. 2015. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical mycology*, 53:765-797. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv067>
- Shin JH. 2012. Nucleic Acid Extraction Techniques. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. 5:209–25. https://doi.org/10.1007%2F978-1-4614-3970-7_11
- Shirakata C, Sugawara S, Kano R. 2022. Isolation of antifungal-resistant *Candida* from the blowholes of captive dolphins. *J Vet Med Sci*, 84(7):942-945. <https://doi.org/10.1292%2Fjvms.22-0007>
- Sidrim JJC, Carvalho VL, Castelo-Branco DSC, Brilhante RSN, Bandeira TJP, Cordeiro RA, Guedes GMM, Riello GB, Lazzarini SM, Oliveira DCR, Meirelles ACO, Attademo FLN, Freire ACB, Moreira JLB, Monteiro AJ y Rocha MFG. 2015. Yeast microbiota of natural cavities of manatees (*Trichechus inunguis* and *T. manatus*) in Brazil and its relevance for animal health and management in captivity. *Can J microbiol*, 61(10):763-769. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0341>
- Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S y Eiler A. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA Gene amplicons: evaluating the Illumina Platform. *PLoS ONE*, 10(2):e0116955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116955>.

- Skalski JH, Limon JJ, Sharma P, Gargus MD, Nguyen C, Tang J, Coelho AL, Hogaboam CM, Crother TR y Underhill DM. 2018. Expansion of commensal fungus *Wallemia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS Pathog*, 14(9):e1007260 <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.ppat.1007260>.
- Smith KF, Acevedo-Whitehouse K y Pedersen AB. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x>.
- Soares-Castro P, Araújo-Rodrigues H, Godoy-Vitorino F, Ferreira M, Covelo P, López A, Vingada J, Eira C, Santos PM. 2019. Microbiota fingerprints within the oral cavity of cetaceans as indicators for population biomonitoring. *Scientific Reports*, 9(13679): <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50139-7>.
- Sowjanya AP, Rao M, Vedantha H, Kalpana B, Poli UR, Marks M y Sujatha M. 2015. Correlation of plasma nitrite/nitrate levels and inducible nitric oxide gene expression among women with cervical abnormalities and cancer, *Nitric Oxide*, doi:10.1016/j.niox.2015.09.005.
- Stal LJ y Cretoiu MS. 2022. *The Marine Microbiome*. 2nd Edition. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-90383-1>.
- Starke R, Capek P, Morais D, Callister SJ y Jehmlich N. 2020. The total microbiome functions in bacteria and fungi. *Journal of Proteomics*, 213, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103623>.
- Stoffel MA, Acevedo-Whitehouse K, Morales-Durán N, Grosser S, Chakarov N, Krüger O, Nichols HJ, Elorriaga-Verplancken FR y Hoffman JI. 2019. Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals. *Molecular ecology*, 29(11):2109-2122. <https://doi.org/10.1111/mec.15385>.
- Strati F, Di Paola M, Stefanini I, Albanese D, Rizzetto L, Lionetti P, Calabrò A, Jousson O, Donati C, Cavalieri D y De Filippo C. 2016. Age and gender affect

- the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Frontiers in microbiology*, 7:1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227>
- Suzuki A, Akuzawa K, Kogi K, Ueda K y Suzuki M. 2020. Captive environment influences the composition and diversity of fecal microbiota in Indo-Pacific bottlenose, *Tursiops aduncus*. *Marine Mammal Science*, 37(1):207-219. <https://doi.org/10.1111/mms.12736>
- Szóstak N, Handschuh L, Samelak-Czajka A, Tomela K, Schmidt M, Pruss L, Milanowska-Zabel K, Kozłowski P y Philips A. 2023. Host factors associated with gut mycobiome structure. *mSystems*, 8(2) :e00986-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00986-22>
- Szteren A y Aurióles-Gamboa D. 2011. Ecological regionalization of *Calophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 37(3):349-368 <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v37i3.1818>
- Takahashi H, Ueda K, Itano EN, Yanagisawa M, Murata Y, Murata M, Yaguchi T, Murakami M, Kamei K, Inomata T, Miyahara H, Sano A y Uchida S. 2010. *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Vet Med Int*:349364. <https://doi.org/10.4061%2F2010%2F349364>
- Taylor TN, Krings M y Taylor EL. 2015. Ascomycota. In *Fossil Fungi*, pp:129-171. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387731-4.00008-6>
- Tedersoo L y Lindahl B. 2016. Fungal identification biases in microbiome projects. *Environmental microbiology reports*, 8(5):774-779. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12438>
- Tellería MT, Melo I, Dueñas M, Salcedo I, Beltrán-Tejera B, Rodríguez-Armas JL, Martín MP. 2013. *Sistotremastrum guttuliferum*: a new species from the Macaronesian islands. *Mycol Progress*, 12:687-692 <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-012-0876-0>
- Thermo Scientific. 2016. Espectrofotómetro micro-UV/Vis NanoDrop. Guía del usuario.

- Tian J, Du J, Han J, Song X y Lu Z. 2020. Age-related differences in gut microbial community composition of captive spotted seals (*Phoca largha*). *Marine Mammal Science*, 36(4):1231-1240 <https://doi.org/10.1111/mms.12728>
- Tian Y, Gou W, Ma Y, Shuai M, Liang X, Fu Y y Zheng J-S. 2023. The short-term variation of human gut mycobiome in response to dietary intervention of different macronutrient distributions. *Nutrients*, 15(9):2152. <https://doi.org/10.3390%2Fnu15092152>.
- Tiew PY, Aogain MM, Ali NABM, Thng KX, Goh K, Lau KJX y Chotirmall SH. 2020. The Mycobiome in health and disease: emerging concepts methodologies and challenges. *Mycopathologia*, 185(2):207-231 <https://doi.org/10.1007%2Fs11046-019-00413-z>.
- Tipton L, Zahn G, Darcy JL, Amend AS y Hyson NA. 2021. Hawaiian fungal amplicon sequence variants reveal otherwise hidden biogeography. *Microbial Ecology*. 83(1):48-57 <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01730-x>.
- Tizard I. 1995. Inmunología veterinaria. 4° Edición. Interamericana – McGraw Hill. Ciudad de México.
- Trigo TFJ y Elizondo GV. 2004. Patología General Veterinaria. 4° Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad de México.
- Turko AJ, Firth BL, Craig PM, Eliason EJ, Raby GD y Borowiec BG. 2023. Physiological differences between wild and captive animals: a century-old dilemma. *Journal of Experimental Biology*, 226(23) <https://doi.org/10.1242/jeb.246037>
- Underhill DM y Iliev ID. 2014. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(6):405-16. <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K y Bennett M. 2006. Orthopoxvirus Neutralising Antibodies in small cetaceans from the Southeast Pacific. *LAJAM*, 5(1):49–54.

- Van Dijk JGB, Fouchier RAM, Klaassen M y Matson KD. 2014. Minor differences in body condition and immune status between avian influenza virus-infected and noninfected mallards: a sign of coevolution? *Ecology and Evolution*, 5(2):436-449. <https://doi.org/10.1002/ece3.1359>.
- Vendl C, Slavich E, Nelson T, Acevedo-Whitehouse K, Montgomery K, Ferrari B, Thomas T y Rogers T. 2020. Does sociality drive diversity and composition of airway microbiota in cetaceans? *Environmental Microbiology Reports*, 12(3), 324–333. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12835>.
- Vilela R, Bossart GD, St. Leger JA, Dalton LM, Reif JS, Schaefer AM, McCarthy PJ, Fair PA y Mendoza L. 2016. Cutaneous granulomas in dolphins caused by Novel uncultivated paracoccidioides brasiliensis. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2063–2069. <https://doi.org/10.3201/eid2212.160860>
- Voigt K y Kirk PM. 2014. FUNGI | Classification of Zygomycetes. *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp:54-67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00136-1>
- Vorontsov IE, Kulakovskiy IV, Makeev VJ. 2013. Jaccard index based similarity measure to compare transcription factor binding site models. *Algorithms Mol Biol*. 8:23. <https://doi.org/10.1186%2F1748-7188-8-23>
- Wachtendonk R, Calambokidis J y Flynn K. 2022. Blue whale body condition assessed over a 14-year period in the NE Pacific: annual variation and connection to measures of Ocean Productivity. *Frontiers in Marine Sciences*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.847032>
- Wages Jr JM 2005. Polymerase Chain Reaction. *Encyclopedia of Analytical Science*, (28):243-250. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>.
- Wang H, Capula M, Krom BP, Yee D, Giovannetti E y Deng D. 2020. Of fungi and men: role of fungi in pancreatic cancer carcinogenesis. *Annals of Translational Medicine*, 8(19):1257 <http://dx.doi.org/10.21037/atm-20-2723>

- Wang L, Zhang K, Zeng Y, Luo Y, Peng J, Zhang J, Kuang T y Fan G. 2023. Gut mycobiome and metabolic diseases: the known, the unknown, and the future. *Pharmacological research*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106807>
- Wang Y, Li X, Chen X, Fakhre-Alam-Kulyar M, Duan K, Li H, Bhutta ZA, Wu Y y Li K. 2022. Gut Fungal microbiome responses to natural *Cryptosporidium* infection in horses. *Front Microbiol.* 13:877280 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.877280>
- Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, Leal CA, Gargus M, Tang J, Brown J, Funari VA, Wang HL, Crother TR, Arditi M, Underhill DM e Iliev ID. 2016. Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. *Cell Host and Microbe*, 19(6), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.003>
- Wickham H. 2016. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. 2° Ed. Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wilkinson T, Wiken E, Bezaury-Creel J, Hourigan T, Agardy T, Herrmann H, Janishevski L, Madden C, Morgan L y Padilla M. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte. *Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/region/ecorregiones1.html>
- Williams R, Vikingsson GA, Gislason A, Lockyer C, New L, Thomas L, Hammond S. 2013. Evidence for density-dependent changes in body condition and pregnancy rate of North Atlantic fin whales over four decades of varying environmental conditions. *ICES Journal of Marine Science*, 70(6):1273-1280. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fst059>
- Willis A. 2019. Rarefaction, Alpha diversity, and Statistics. *Front. Microbiol*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Worsley S, Davies C, Mannarelli ME, Hutchings MI, Komdeur J, Burke T, Dugdale HL y Richardson DS. 2021. Gut microbiome composition, not alpha diversity, is associated with survival in a natural vertebrate population. *Animal Microbiome*, 3:84. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00149-6>

- Würsig B. y Orbach DN. 2023. Sex in Cetaceans. Morphology, Behavior, and the Evolution of Sexual Strategies. Springer.
- Xia Y, Xu X, Chen H, Yue R, Xia D, Wang X, Li J y Sun B. 2022. Effects of captive and primate-focused tourism on the gut microbiome of Tibetan macaques. *Front. Microbiol*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023898>
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC y Samson RA. 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78(1):175-341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>
- Ylitalo GM, Stein JE, Hom T, Johnson LL, Tilbury KL, Hall AJ, Rowles T, Greig D, Lowenstine LJ y Gulland FMD. 2005. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Pollution Bulletin*, 50(1):30–39. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.08.005>
- Yoshikata R, Yamaguchi M, Mase Y, Tatuzuki A, Myint K y Ohta H. 2021. Age-related changes, influencing factor and crosstalk between vaginal and gut microbiota: a cross-sectional comparative study of pre- and postmenopausal women. *Journal of Women's Health*, 31(12): <https://doi.org/10.1089/jwh.2022.0114>
- Young SJF, Huff DG y Stephen C. 1999. A risk-management approach to a mycotic disease potential in captive beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Zoo Biology*, 18:5-16 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:1%3C5::AID-ZOO3%3E3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:1%3C5::AID-ZOO3%3E3.0.CO;2-W)
- Zhang F, Aschenbrenner D, Yoo JY y Zuo T. 2022. The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. En *The Lancet Microbe*, 3(12):e969–e983. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00203-8)
- Zhang Y, Kastman EK, Guasto JS y Wolfe BE. 2018. Fungal networks shape dynamics of bacterial dispersal and community assembly in cheese rind

microbiomes. *Nature Communications*, 9(336).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02522-z>

Zhao S, Li J, Liu J, Xiao S, Yang S, Mei J, Ren M, Wu S, Zhang H y Yang X. 2022. Secondary metabolites of *Alternaria*: a comprehensive review of Chemical diversity and pharmacological properties. *Front Microbiol* 10.3389/fmicb.2022.1085666

Zhu B, Edwards DJ, Spaine KM, Edupuganti L, Matveyev A, Serrano MG y Buck GA. 2024. The association of maternal factors with the neonatal microbiota and health. *Nature Communications*, 15(5260). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49160-w>

Zhu F, Willette-Brown J, Song NY, Lomada D, Song Y, Xue L, Gray Z, Zhao Z, Davis SR, Sun Z, Zhang P, Wu X, Zhan Q, Richie ER y Hu Y. 2017. Autoreactive T cells and chronic fungal infection drive esophageal carcinogenesis. *Cell Host & Microbe*, 21:478-493 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.006>

Zou Y, Zhao P y Axmacher JC. 2023. Estimating total species richness: Fitting rarefaction by asymptotic approximation. *Ecosphere*, 14(1):e4363. <https://doi.org/10.1002/ecs2.4363>

Zwick L, Briggs MB, Tunev SS, Lichtensteiger CA y Murnane RD. 2000. Disseminated blastomycosis in two california sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(2):211-214.

10. ANEXOS

Anexo 1. Reportes de hongos que infectan a diversas especies de mamíferos marinos.

Género de hongo	Especie afectada	Condición del animal	Órganos afectados u origen de la muestra	Fuente
<i>Aspergillus</i>	<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	Llevado a cautiverio. Muere después de 10 días	Pulmonar	Joseph <i>et al.</i> 1986
	<i>Delphinapterus leucas</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Young <i>et al.</i> 1999
	<i>Lissodelphis borealis</i>	Llevado a cautiverio. Muere después de 12 días	Pulmonar	Joseph <i>et al.</i> 1986
	<i>Orcinus orca</i>	Cautiverio	Sistémico	Abdo <i>et al.</i> 2009
	<i>Phocoena phocoena</i>	Varado, <i>post mortem</i>	Oído medio	Seyedmousavi <i>et al.</i> 2015
	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Varado, <i>post mortem</i>	Pulmonar	Romano <i>et al.</i> 2020
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Varado vivo, muerto después	Respiratorio	Grattarola <i>et al.</i> 2018
<i>Blastomyces</i>	<i>Tursiops truncatus</i>	Cautiverio	Pulmón, bazo, hígado y riñón	Higgins 2000
	<i>Zalophus californianus</i>	Cautiverio	Sin información	Higgins 2000
	<i>Zalophus californianus</i>	Cautiverio	Sistémico	Zwick <i>et al.</i> 2000
<i>Candida</i>	<i>Callorhinus ursinus</i>	Cautiverio	Uniones mucocutáneas	Dunn <i>et al.</i> 1984
	<i>Delphinapterus leucas</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Higgins 2000
	<i>Eubalaena australis</i>	Varado, <i>post mortem</i>	Piel dorsal y ventral	Mouton <i>et al.</i> 2009
	<i>Globicephala melaena</i>	Cautiverio	Sistémico	Dunn <i>et al.</i> 1982
	<i>Grampus griseus</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Shirakata <i>et al.</i> 2022
	<i>Halichoerus grypus</i>	Cautiverio	Uniones mucocutáneas	Dunn <i>et al.</i> 1984
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Shirakata <i>et al.</i> 2022
	<i>Mirounga angustirostris</i>	Cautiverio	Uniones mucocutáneas	Dunn <i>et al.</i> 1984
	<i>Orcinus orca</i>	Cautiverio	Sistémico	Ridgway 1979
	<i>Phoca largha</i>	Cautiverio	Piel, rostro	Eo y Kwon, 2014
	<i>Phoca vitulina</i>	Cautiverio	Uniones mucocutáneas	Dunn <i>et al.</i> 1984
	<i>Phocoena phocoena</i>	Cautiverio	Sistémico	Dunn <i>et al.</i> 1989
	<i>Pseudorca crassidens</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Takahashi <i>et al.</i> 2010
	<i>Steno Bredanensis</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Takahashi <i>et al.</i> 2010
	<i>Trichechus inunguis</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
	<i>Trichechus manatus</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
<i>Tursiops truncatus</i>	Cautiverio	Exhalado respiratorio	Shirakata <i>et al.</i> 2022	
<i>Zalophus californianus</i>	Cautiverio	Uniones mucocutáneas	Dunn <i>et al.</i> 1984	

(continúa en siguiente página)

Género de hongo	Especie afectada	Condición del animal	Órganos afectados u origen de la muestra	Fuente
Coccidioides	<i>Enhydra lutris</i>	Post mortem	Pulmonar, Sistémico	Huckabone <i>et al.</i> 2015
	<i>Phoca vitulina</i>	Varado, post mortem	Sistémico	Huckabone <i>et al.</i> 2015
	<i>Tursiops truncatus</i>	Varado, post mortem	Pulmonar	Higgins 2000
	<i>Zalophus californianus</i>	Varado, post mortem	Pulmonar, peritoneal y sistémico	Huckabone <i>et al.</i> 2015
Cryptococcus		Cautiverio	Sin datos	Seyedmousavi <i>et al.</i> 2018
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Cautiverio	Pulmonar	Higgins 2000
	<i>Phoca vitulina</i>	Varado, post mortem	Pulmonar	Seyedmousavi <i>et al.</i> 2018-b
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Cautiverio	Sistémico	Seyedmousavi <i>et al.</i> 2018-b
	<i>Trichechus inunguis</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Zalophus californianus</i>	Cautiverio Varado	Pulmonar Sistémico	Miller <i>et al.</i> 2002 McLeland <i>et al.</i> 2012
Fusarium	<i>Kogia breviceps</i>	Cautiverio	Piel cabeza, rostro y región caudal	Mouton y Botha 2012
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	Cautiverio	Piel cabeza, rostro y región caudal	Mouton y Botha 2012
	<i>Zalophus californianus</i>	No especificado	Piel	Dierauf y Gulland 2001
	<i>Halichoerus grypus</i>	No especificado	Piel	Dierauf y Gulland 2001
Histoplasma		Cautiverio	Sistémico	Morita <i>et al.</i> 2001
	<i>Enhydra lutris</i>	Post mortem	Sistémico	Burek-Huntington <i>et al.</i> 2014
	<i>Tursiops truncatus</i>	Cautiverio	Pulmonar	Jensen <i>et al.</i> 1998
Lacazia (Paracoccidioides)	<i>Tursiops truncatus</i>	Vida libre	Piel	Vilela <i>et al.</i> 2016, Duignan <i>et al.</i> 2020
Malassezia	<i>Zalophus californianus</i>	Cautiverio	Piel dorsal y flancos	Guillot <i>et al.</i> 1998, Hadina <i>et al.</i> 2019
Mucor	<i>Orcinus orca</i>	Cautiverio	Sistémico	Abdo <i>et al.</i> 2012
Nannizziopsis	<i>Balaenoptera edeni</i>	Varado, post mortem	Sistémico	Groch <i>et al.</i> 2018
Rhodotorula	<i>Trichechus manatus</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
	<i>Trichechus inunguis</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
	<i>Otaria flavescens</i>	Cautiverio	Piel de rostro y aletas	Alvarez-Perez <i>et al.</i> 2010
Stagonosporopsis	<i>Balaenoptera edeni</i>	Varado, post mortem	Sistémico	Groch <i>et al.</i> 2018
Trichosporon	<i>Trichechus manatus</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015
	<i>Trichechus inunguis</i>	Cautiverio	Oral, fosas nasales y genital	Sidrim <i>et al.</i> 2015

