



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

**IMPORTANCIA DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA, EL ESTADO NUTRICIONAL  
Y LA DIETA EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR EPITELIAL GENITAL DEL  
LOBO MARINO DE CALIFORNIA**

Tesis  
Que como parte de los requisitos para  
obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta  
Ana Itzel Montesinos Laffont

Dirigida por:  
Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Querétaro, Qro. a Julio, 2025

**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 licenciatario 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 licenciatario.

 **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  
Doctorado en Ciencias Biológicas

IMPORTANCIA DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA, EL ESTADO NUTRICIONAL  
Y LA DIETA EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR EPITELIAL GENITAL DEL  
LOBO MARINO DE CALIFORNIA

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Ana Itzel Montesinos Laffont

Dirigida por:

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse \_\_\_\_\_  
Presidente  
Dra. Olga Patricia García Obregón \_\_\_\_\_  
Secretaria  
Dra. Etzel Garrido Espinosa \_\_\_\_\_  
Vocal  
Dr. Fernando R. Elorriaga Verplancken \_\_\_\_\_  
Suplente  
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval \_\_\_\_\_  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Julio, 2025

México

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, mi roca hoy y siempre*

## AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento siempre permite recordar todos los momentos vividos para la culminación de un proyecto, y en este no es la excepción. La persona que siempre me ha respaldado y apoyado en todas mis locuras es mi madre, a ella le agradezco infinitamente su paciencia, consejos y cuidado que me ayudaron a nunca sentirme sola ni claudicar en el camino.

Gracias Karina por abrirme las puertas de tu laboratorio de investigación desde el primer momento, por presentarme este proyecto y permitirme conocer campos inexplorados para mí, además de mostrarme la pasión y compromiso que tienes para la investigación no solo en tu campo sino en muchos otros sin miedo a la crítica. Te agradezco la confianza y el apoyo para que este trabajo saliera lo mejor posible. No solo eres una extraordinaria investigadora, también un gran ser humano que está dispuesta a ayudar y a conocer más allá del trabajo de laboratorio a tus estudiantes.

Por supuesto que el trabajo de una gran investigadora está respaldado por sus estudiantes, lo que me da paso a agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Ecoinmunología y Fisiología de la Conservación. Desde el día uno hasta el último encontré en este lugar personas maravillosas con muchos sueños por cumplir y con muchas risas por compartir. Gracias Nami, Paulina, Ariadna, Carla, Yara, Vero, Mario, Fer, Ana, Mara, Zoé, Fabi, Norma, Ceci y Aldo; ya sea como colegas de laboratorio, amig@s e incluso como técnic@s de laboratorio siempre estuvieron ahí dispuestos a ayudar con las muestras, los materiales de trabajo, intercambiando ideas o simplemente al compartir nuestras frustaciones y actos desesperados en el laboratorio. Siempre recordaré todas las aventuras vividas con ustedes.

Este tipo de proyectos se fortalece con el conocimiento de otros grandes investigadores, muchas gracias Dra. Olga García por todo su conocimiento y apoyo en el tema de nutrición, por siempre tener las puertas abiertas para cualquier duda acerca de este tema y por estar dispuesta a explorar otras especies animales; sin su apoyo y orientación no habría sido posible la culminación de esta investigación. Agradezco también al Dr. Fernando Elorriaga, quien siempre estuvo al pendiente de cualquier necesidad o duda durante este estudio, gracias por introducirme en el mundo de los isótopos estables. Su conocimiento y apoyo fueron parte importante para mi formación y culminación del proyecto. Por otra parte, gracias a la Dra. Etzel Garrido quien me ayudó a direccionar y responder preguntas que a veces se dan por sentado durante el curso del proyecto, además de darme consejos para el análisis de los datos. Por último agradezco al Dr. Luis Hernández por sus aportaciones y consejos, puntuales y acertivos, que me ayudaron a tener otra perspectiva de mis preguntas de investigación.

La Universidad Autónoma de Querétaro y la Facultad de Ciencias Naturales son sitios que permiten conocer y desarrollar investigaciones sorprendentes,

así como el programa del Doctorado en Ciencias Biológicas que permite conocer proyectos de compañeros totalmente diferentes al mío y así desarrollar una visión multidisciplinaria. Agradezco los apoyos, foros y congresos a los que se nos facilita asistir y participar para poder tener una experiencia más enriquecedoras como estudiante de posgrado.

Asimismo, instituciones como el CONACyT (ahora CONAHCyT) que me permitieron contar con una beca de doctorado con N° 766648, la cual me ayudó para estar comprometida a tiempo completo para este proyecto. Además con el financiamiento al proyecto CB-2017-2018-A1-S-16417, también otorgado por esta institución, se pudo realizar toda la parte de laboratorio y divulgación del conocimiento obtenido durante esta investigación.

A toda mi familia, especialmente la de Querétaro, por estar siempre al pendiente de mí, mis avances, mi salud y bienestar. Gracias por el apoyo a la distancia y a la cercana, los amo mucho. Gracias Liz y Alex por abrirme las puertas de su hogar en el primer instante, no saben lo que significa eso cuando uno anda cambiando de aires.

A mis amigos de toda la vida por echarme porras, por preguntarme de todo lo que hago y tratar de ayudarme aunque no sea su campo de experiencia. Esos pequeños detalles alientan el alma e impulsan para no tirar la toalla, los amo infinitamente.

Algunas etapas son fáciles, otras son más complicadas pero de todas se aprende algo y se llevan experiencias valiosas. Mi camino como profesionista y apasionada de la naturaleza y del mar apenas empieza, ahora buscaré el mejor camino para mí... Gracias hoy y siempre.

## **DECLARATORIA DE AUTORIA**

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.

Confirmo 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

|  |      |
|--|------|
| <b>DEDICATORIA .....</b>   | I    |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>   | II   |
| <b>DECLARATORIA DE AUTORIA .....</b>   | IV   |
| <b>TABLA DE CONTENIDOS .....</b>   | V    |
| <b>LISTADO DE CUADROS .....</b>  | VIII |
| <b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>  | X    |
| <b>RESUMEN .....</b>   | XII  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1    |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 5    |
| 2.1. El cáncer, su clasificación y su desarrollo .....   | 5    |
| 2.2. Generalidades del cáncer en la fauna silvestre.....   | 9    |
| 2.3. Generalidades de <i>Zalophus californianus</i> .....  | 14   |
| 2.4. Conocimiento actual del cáncer urogenital del lobo marino de California .....   | 17   |
| 3. METODOLOGÍA .....   | 23   |
| 3.1. Metodología general.....  | 23   |
| 3.1.1. Área de estudio.....  | 23   |
| 3.1.2. Las ecorregiones en el Golfo de California y las loberas del lobo marino de California .....  | 26   |
| 3.1.3. Captura de animales y toma de muestras .....  | 30   |
| 3.1.4. Caracterización celular del epitelio cervical del lobo marino de California .....   | 33   |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....   | 36   |
| 5. DETERMINACIÓN DE LA POSICIÓN TRÓFICA Y ZONA DE ALIMENTACIÓN POR ECORREGIÓN Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE TRANSFORMACIÓN EPITELIAL GENITAL..... | 38   |
| 5.1. Introducción .....  | 38   |
| 5.2. Métodos .....   | 41   |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.1. Determinación de la posición trófica y zona de alimentación .....  | 41         |
| 5.2.2. Agrupación de colonias reproductivas en zonas con mayor disturbio antrópico y menor disturbio antrópico.....                     | 44         |
| 5.2.3. Análisis estadísticos .....  | 45         |
| 5.3. Resultados.....  | 46         |
| 5.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital.....   | 46         |
| 5.3.2. Posición trófica y zona de alimentación por ecorregión y por zona de disturbio .....   | 48         |
| 5.3.3. OtHV-1, estado del epitelio, coilocitos y células binucleadas asociadas a ecorregiones y zonas de disturbio .....                | 54         |
| 5.4. Discusión .....  | 58         |
| <b>6. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA DEL ESTADO NUTRICIONAL Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE TRANSFORMACIÓN EPITELIAL GENITAL.....</b>           | <b>65</b>  |
| 6.1. Introducción .....   | 65         |
| 6.2. Métodos .....  | 70         |
| 6.2.1. Procesamiento y resguardo de las muestras en campo .....   | 70         |
| 6.2.2. Análisis de las muestras .....   | 70         |
| 6.2.2.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital .....  | 70         |
| 6.2.2.2. Evaluación del estado nutricional.....   | 71         |
| 6.2.3. Análisis estadísticos .....  | 72         |
| 6.3. Resultados.....  | 73         |
| 6.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital.....   | 74         |
| 6.3.2. Evaluación hematológica del estado nutricional.....  | 74         |
| 6.4. Discusión .....  | 84         |
| <b>7. VALORACIÓN DEL ESTADO DE INFLAMACIÓN CON ASOCIACIÓN AL ESTADO DEL EPITELIO Y A LAS ECORREGIONES DEL GOLFO DE CALIFORNIA .....</b> | <b>94</b>  |
| 7.1. Introducción .....   | 94         |
| 7.2. Métodos .....  | 102        |
| 7.2.1. Obtención y análisis de las muestras de epitelio genital .....   | 102        |
| 7.2.2. Evaluación del estado de inflamación crónica.....  | 102        |
| 7.2.3. Análisis estadísticos .....  | 103        |
| <b>7.3. Resultados .....</b>  | <b>104</b> |
| 7.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital.....   | 104        |
| 7.3.2. Evaluación del estado de inflamación crónica.....  | 104        |
| 7.4. Discusión .....  | 105        |

|   |     |
|---|-----|
| 8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES ..... | 109 |
| 9. REFERENCIAS .....                        | 115 |

## LISTADO DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Tipos y ejemplos de carcinomas comunes en el humano .....  | 6  |
| Cuadro 2. Reportes de prevalencia de cáncer en diferentes grupos del mundo animal (Madsen <i>et al.</i> , 2017; Hamede <i>et al.</i> , 2020) .....   | 12 |
| Cuadro 3. Relación de las loberas del Golfo de California, México y número de muestras de hembras de lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) para el año 2016 .....  | 32 |
| Cuadro 4. Asociación de las colonias del lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) del Golfo de California, México, con las muestras de zooplancton utilizadas para obtener el nivel trófico en cada sitio .....           | 44 |
| Cuadro 5. Promedio e intervalo de confianza de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) por región muestreada en el Golfo de California .....         | 48 |
| Cuadro 6. Valor promedio e intervalo de confianza del nivel trófico calculado para las cuatro regiones del Golfo de California con colonias reproductoras del lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) .....              | 49 |
| Cuadro 7. Análisis de varianza en relación al estado epitelial genital con el nivel trófico y con la región de la lobera. En sombreado se muestra la relación estadísticamente significativa, P (<0.05) .....                                | 50 |
| Cuadro 8. Análisis de varianza en relación al estado epitelial genital con el $\delta^{13}\text{C}$ y con la región de la lobera .....   | 52 |
| Cuadro 9. Relación de las colonias reproductivas del Golfo de California, México, incluidas en el estudio, y número de muestras de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> capturadas en 2016 .....                                 | 74 |
| Cuadro 10. Distribución final por región de las muestras con información de marcadores sanguíneos y de diagnóstico epitelial exitoso .....   | 75 |
| Cuadro 11. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con el diagnóstico del epitelio genital. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro ..... | 77 |
| Cuadro 12. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con la región ecológica de  |    |

|   |       |
|---|-------|
| procedencia. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro .....   | 78    |
| Cuadro 13. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con la zona de disturbio. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro ..                          | 79    |
| Cuadro 14. Variación en los niveles de colesterol, creatinina y triglicéridos en relación con la presencia de virus OthHV-1 en el epitelio de hembras adultas de lobo marino de California .....  | 82    |
| Cuadro 15. Principales citocinas involucradas en el proceso inflamatorio tanto agudo como crónico. Información tomada de: Feghali y Wright (1997), INC (2016) Clínica Universitaria de Navarra (2020), Navarrete Prida (2000), Saldana (2020) ..... | 96,97 |

## LISTADO DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Proceso de modificación del tejido celular. Tomado de Instituto Nacional del Cáncer EE UU. Figura realizada por Terese Winslow, 2014 .....   | 8  |
| Figura 2. Mapa de la zona de estudio. El mapa muestra la regionalización ecológica (números y línea en negrita; 1) Golfo Norte, 2) Grandes Islas, 3) Golfo Central y 4) Golfo Sur) y las zonas de perturbación (oeste o este; línea de puntos) del Golfo de California. Los puntos negros indican las colonias en el Golfo de California .....                         | 27 |
| Figura 3. Distribución a lo largo del Golfo de California del diagnóstico del estado del epitelio cervical de los lobos marinos de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) según el método Bethesda. Se especifica el grado de transformación epitelial y el número de muestras (entre paréntesis) recolectadas en cada ecorregión .....                          | 47 |
| Figura 4. Asociación del estado de transición epitelial (LSIL= Displasia celular, ASC= Atipia celular, N= Negativo a células atípicas) con relación al nivel trófico del lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) .....   | 50 |
| Figura 5. Agrupación del estado epitelial genital (LSIL= Lesión epitelial de bajo grado, ASC= Presencia de células atípicas y N= Negativo a células atípicas) con relación al nivel trófico y a la región de muestreo (RN= Región Norte, GI= Grandes Islas, RCT= Región Central, RS= Región Sur) del lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) ..... | 51 |
| Figura 6. Asociación del estado de transición epitelial (LSIL= Displasia celular, ASC= Atipia celular, N= Negativo a células atípicas) con relación a la señal isotópica del $\delta^{13}\text{C}$ en el lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) .....   | 53 |
| Figura 7. Agrupación del estado epitelial genital (LSIL= Lesión epitelial de bajo grado, ASC= Presencia de células atípicas y N= Negativo a células atípicas) con relación a la señal de $\delta^{13}\text{C}$ y a la región de muestreo (RN= Región Norte, GI= Grandes Islas, RCT= Región Central, RS= Región Sur) .....  | 54 |
| Figura 8. Diferencias espaciales en la prevalencia de OtHV-1 y los diagnósticos epiteliales cervicales de lobos marinos de California hembras adultas. A) OtHV-1 entre regiones ecológicas. B) OtHV-1 según la ubicación de  |    |

|   |     |
|---|-----|
| las colonias en la zona perturbada o en la zona menos perturbada. C) ASC, LSIL y N entre regiones ecológicas. D) ASC, LSIL y N según la ubicación de sus colonias .....   | 56  |
| Figura 9. Diferencias espaciales en la prevalencia de tipos celulares anormales en el epitelio cervical de lobos marinos de California hembras adultas. A) Coilocitosis entre regiones ecológicas. B) La coilocitosis según la ubicación de sus colonias en la zona perturbada o en la menos perturbada. C) Prevalencia de células binucleadas entre regiones ecológicas. D) La prevalencia de células binucleadas según la ubicación de las colonias ..... | 57  |
| Figura 10. Variación de la concentración de marcadores nutricios entre regiones ecológicas dentro del Golfo de California. A. Colesterol (mg/dl), B. Creatinina (mg/dl), C. Ferritina (ng/ml) y D. Triglicéridos (mg/dl) .....  | 80  |
| Figura 11. Gráfica de dispersión de la relación entre la concentración de marcadores nutricios (A. Colesterol (mg/dl), B. Triglicéridos (mg/dl) y C. Ferritina (ng/ml)) con respecto a la posición trófica (A,B) o a la zona de alimentación explotada ( $\delta^{13}\text{C}$ ; C) dentro del Golfo de California .....  | 81  |
| Figura 12. Valores de las concentraciones de ferritina con respecto a la presencia o no de lesión epitelial cervical .....  | 82  |
| Figura 13. Variación de marcadores nutricios en función de la infección del epitelio genital con el virus OtHV-1. A. Colesterol, B. Triglicéridos y C. Creatinina .....   | 83  |
| Figura 14. Variación en el colesterol (A) y glucosa (B) en relación con la presencia de células binucleadas en el epitelio genital de las hembras adultas de lobo marino de California .....  | 84  |
| Figura 15. Boxplot de la relación entre la concentración (ng/ml) del antiinflamatorio interleucina 10 (IL-10) y el estado de transformación del epitelio cervical (LSIL: Lesión Epitelial Escamosa de Bajo Grado, ASC: Células Escamosas Atípicas, N: Epitelio normal) .....  | 105 |

## RESUMEN

El cáncer en vida silvestre cobra relevancia al poder comprender esto en especies no tradicionales. El lobo marino de California es susceptible a un carcinoma urogenital, observado en las costas de California, no así en el Golfo de California. Identificado factores claves, como la genética, la concentración de contaminantes persistentes y los virus oncogénicos. Sin embargo, factores, como la nutrición, no han sido investigados. La nutrición impacta el funcionamiento del sistema inmune influyendo sobre el inicio y progreso del cáncer. El objetivo de esta tesis fue evaluar si el cambio de dieta, los nutrientes y la inflamación crónica se relacionan en la transformación del epitelio genital en hembras adultas de lobo marino de California en el Golfo de California. Se obtuvieron 40 muestras de pelo, sangre y epitelio genital de individuos capturados en doce colonias reproductivas. Por análisis de isótopos estables se determinó el nivel trófico y  $\delta^{13}\text{C}$ , identificando en algunas regiones que a mayor nivel trófico mayor era la transformación. Esta relación no se observó con  $\delta^{13}\text{C}$ . En sangre, se midieron marcadores nutricios encontrando diferencias en las concentraciones de ferritina y triglicéridos entre regiones, siendo más altas en la Sur y más bajas en Norte y Grandes Islas. Además, en esta última se encontraron concentraciones altas de creatinina, mientras que en la Central fue el colesterol quien mostró alta concentración. Situación contraria en la región Norte. Esto permite inferir que el cambio de dieta, asociado a variaciones en la temperatura marina o ciclos biológicos, impacta sobre procesos fisiológicos, como el uso de lípidos o la oncovigilancia inmunitaria. Se realizó un último análisis para evaluar la inflamación crónica, clave para algunos tipos de cáncer. Aquí, se efectuaron pruebas de ELISA para medir la concentración de citoquinas anti y pro-inflamatorias. Solo se encontraron valores cuantificables de IL-10, mayor en animales con una transformación epitelial más avanzada. Con base en este resultado se sugiere que IL-10 podría participar en procesos de oncovigilancia. Los resultados son relevantes, ya que en las últimas décadas se han presentado variaciones climáticas y de las presas frecuentes de este organismo que han impactado en la demografía de la especie.

**Palabras clave:** *Zalophus californianus*, carcinoma urogenital, nutrición, isótopos estables, inflamación crónica

## ABSTRACT

Cancer in wildlife becomes relevant when we can understand this in non-traditional species. The California sea lion is susceptible to urogenital carcinoma, observed on the coasts of California, but not in the Gulf of California. Key factors have been identified, such as genetics, the concentration of persistent pollutants and oncogenic viruses. However, factors such as nutrition have not been investigated. Nutrition impacts the functioning of the immune system, influencing the start and progression of cancer. The objective of this thesis was to evaluate whether diet change, nutrients and chronic inflammation are related to the transformation of the genital epithelium in adult female California sea lions in the Gulf of California. Forty samples of fur, blood and genital epithelium were obtained from individuals captured in twelve rookeries. Stable isotope analysis determined the trophic level and  $\delta^{13}\text{C}$ , identifying in some regions that the higher the trophic level, the greater the transformation. This relationship was not observed with  $\delta^{13}\text{C}$ . In blood, nutritional markers were measured, finding differences in ferritin and triglyceride concentrations between regions, being higher in the South and lower in the North and the Midriff. In addition, high concentrations of creatinine were found in the latter, while in the Central region it was cholesterol that showed a high concentration. The situation was contrary in the North region. This allows us to infer that the change in diet, associated with variations in sea temperature or biological cycles, impacts physiological processes, such as the use of lipids or immune oncovigilance. A final analysis was carried out to evaluate chronic inflammation, key for some types of cancer. Here, ELISA tests were carried out to measure the concentration of anti- and pro-inflammatory cytokines. Only quantifiable values of IL-10 were found, higher in animals with a more advanced epithelial transformation. Based on this result, it is suggested that IL-10 could participate in oncovigilance processes. The results are relevant, since in recent decades there have been climatic variations and changes in the frequent prey of this organism that have impacted the demography of the species.

**Key words:** *Zalophus californianus*, urogenital carcinoma, nutrition, stable isotopes, chronic inflammation

*“Deberíamos adquirir el coraje de no ser como todo el mundo”*

*Jean Paul Sartre*

## 1. INTRODUCCIÓN

Existe un interés creciente por entender las causas que favorecen la presencia del cáncer en la vida silvestre, dado el incremento de casos en algunas especies (McAloose y Newton, 2009). Este tipo de patologías, caracterizadas por una desdiferenciación y proliferación descontrolada de células con fenotipo y genotipo perturbado puede alterar la dinámica poblacional e incidir en el decline de la misma (Cooper, 2000; Instituto Nacional de Cáncer, 2015; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018). A pesar de que el cáncer en la vida silvestre ha pasado relativamente inadvertido por largo tiempo, es importante reconocer los factores de riesgo, incidencia e impacto que tienen estas patologías para la conservación de las especies. En las últimas décadas se ha buscado entender las causas, la biología de los tumores y los efectos de la enfermedad a nivel individual y poblacional, con el fin de reconocer el impacto que podría tener en la dinámica poblacional así como para buscar disminuir o erradicar los factores que la favorecen (McAloose y Newton, 2009; Ujvari *et al.*, 2018).

Dentro de los casos de cáncer que han cobrado relevancia en la comunidad científica se encuentra el del demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), en quien se ha identificado una enfermedad de tumor facial contagioso, asociado a un sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I monomórfico, lo que no permite que el sistema inmune del hospedero reconozca a las células cancerígenas transmitidas como si fueran aloantígenos (Hawkins *et al.*, 2006; Siddle *et al.*, 2007). Otros tipos de cáncer reportados en fauna silvestre son los tumores asociados a virus. Este tipo de cáncer, de origen epitelial (p.ej. carcinoma), se da por la ocurrencia de mutaciones de proto-oncogenes que regulan el ciclo celular, señales de transducción y supresión de tumores, o por la presencia de oncogenes virales. Se han identificado tumores de este tipo en algunas aves, peces, reptiles y mamíferos marinos (Ratcliffe, 1933; Canfield *et al.*, 1990; Reece, 1992; Mader, 1996; Hernández-Divers y Garner, 2003; Masahito *et al.*, 2003; Groff, 2004; Porter *et al.*, 2004; Heatley *et al.*, 2005; Newman y Smith, 2006; Ladds, 2009; Wiley *et al.*,

*al.*, 2009; Martínez Silvestre *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; LePage *et al.*, 2012; Coffee *et al.*, 2013; Robins *et al.*, 2014; Dietz *et al.*, 2016). Al menos en los organismos acuáticos, se ha identificado que altos niveles de contaminantes ambientales son un factor de riesgo para que las infecciones por virus oncogénicos promuevan la transformación cancerígena (Erren *et al.*, 2009; McAloose y Newton, 2009; Gulland *et al.*, 2020).

La relación entre los contaminantes ambientales y el desarrollo de tumores se ha observado en particular para especies con historia de vida bentónica, las cuales se encuentran expuestas en mayor medida a los sedimentos contaminados y al consumo de invertebrados contaminados (McAloose y Newton, 2009). Algunas especies afectadas han sido peces marinos, de agua dulce y de estuarios, así como una población de belugas (*Delphinapterus leucas*) del estero de San Lorenzo, en Canadá. Otro de los mamíferos marinos con una prevalencia importante de cáncer es el lobo marino de California (*Zalophus californianus*), en el que se reportó un 18% de prevalencia entre los animales varados muertos entre 1979-1994, en la costa central de California EEUUAA, a los que se les practicaba una necropsia (Gulland *et al.*, 1996). Entre 1998 y 2012 la prevalencia subió a 26% en la misma región (Browning *et al.*, 2015). Este aumento ha despertado el interés por encontrar las probables causas de la enfermedad, así como el impacto en las poblaciones de esta especie para comprender si el padecimiento puede ser un factor importante dentro de su dinámica poblacional.

Hasta ahora se ha identificado que este carcinoma urogenital se presenta en lobos marinos de California adultos (con mayor proporción en los machos de algunas zonas como California; Buckles *et al.*, 2007; Deming *et al.*, 2018), y que se asocia a la infección con un gama herpesvirus (OtHV-1, por sus siglas en inglés; Lipscomb *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002). Aunque se pensaba que podría comportarse como una enfermedad sexual, se ha detectado la presencia de OtHV-1 en crías y juveniles de esta especie (Barragán-Vargas *et al.*, 2016) y hay evidencia de que puede haber transformación epitelial del tracto genital de crías en vida libre (Barragán-

Vargas *et al.*, 2016) lo cual podría indicar que esta especie tiene una tendencia a la transformación espontánea; sin embargo, también la contaminación (especialmente por organoclorados) podrían ser un factor determinante para la ocurrencia del cáncer (Buckles *et al.*, 2007; Deming *et al.*, 2018; Gulland *et al.*, 2020), independientemente de la presencia del virus.

Como se mencionó anteriormente en el caso de las belugas del estuario de San Lorenzo, la presencia de contaminantes puede ser determinante para que una población tenga problemas de salud importantes (McAloose y Newton, 2009). Es por eso que en el caso de *Zalophus californianus*, no se descarta este punto sobre todo porque los reportes de presencia de la enfermedad son de California, lugar donde los organismos presentan niveles de contaminación de hasta por dos órdenes de magnitud más altas que en otras zonas con nulo reporte de la misma, como el Golfo de California (Gulland *et al.*, 1996; Peñín *et al.*, 2019).

Otro de los factores que se han relacionado con esta enfermedad y en esta especie es la diversidad genética (Ujvari *et al.*, 2018). Los individuos con un mayor grado de endogamia son más susceptibles a desarrollar carcinoma urogenital (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Asimismo, se ha encontrado que organismos con homocigosis en el microsatélite Pv11 presentan un mayor riesgo de carcinoma urogenital (Browning *et al.*, 2014). Como puede verse, el desarrollo del carcinoma urogenital es multifactorial (Browning *et al.*, 2015), lo que es semejante a lo que ocurre con un número alto de tipos de cáncer en humanos. Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado la relevancia de otros factores, como la nutrición y el estado inflamatorio crónico de los individuos.

En los últimos años se ha puesto especial atención en el estilo de vida y su relación con el desarrollo de enfermedades en los humanos. Solo el 10% de los cánceres se relacionan a la genética y el resto son por factores externos, entre ellos la dieta (Anand *et al.*, 2008; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018). En este sentido, la dieta también se relaciona con estados inflamatorios crónicos. Por ejemplo, en los humanos, el ejemplo perfecto es la relación entre la obesidad y la diabetes (Khandekar *et al.*, 2011). Por su parte, los estados inflamatorios crónicos son factor de riesgo

para el cáncer (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016; Galdiero *et al.*, 2017). Es por estas razones que la dieta y los nutrientes derivados de la misma juegan una pieza importante en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. El hecho de tener una nutrición deficiente provoca la ineficaz actuación del sistema inmune en contra de patógenos (Nova *et al.*, 2002; Villegas Valverde y Faxas García, 2014; Segurola Gurrutxaga *et al.*, 2016). La presencia constante de estos organismos puede facilitar la transformación celular, ante la excesiva secreción de mediadores de la inflamación como las citocinas, modificando el epitelio y favoreciendo la aparición de lesiones precancerosas (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009). La presencia de estos mediadores inflamatorios provoca un microambiente inflamatorio, el cual es un punto precedente al desarrollo de cáncer (Grivennikov *et al.*, 2010; Candido y Hagemann, 2013).

Debido a la relevancia de estos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer en el humano, es posible que también pudieran serlo para el desarrollo del carcinoma del lobo marino de California. En esta tesis se aborda precisamente esa pregunta, con la finalidad de conocer el impacto de la nutrición y la inflamación sobre la transformación celular en este otárido.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El cáncer, su clasificación y su desarrollo**

Desde el inicio de la vida de un organismo es necesaria la división celular constante y estrictamente regulada. Al principio la división del cigoto permite, al cabo de una serie de miles de ellas, la formación de sistemas especializados para el mantenimiento del ser vivo. Aunque en la mayoría de los organismos hay mecanismos altamente eficaces para el mantenimiento de estos sistemas a nivel celular, en algunos casos los organismos pueden presentar fallas y como consecuencia una vulnerabilidad a ciertas enfermedades como el cáncer (World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018).

Cualquier proliferación anormal de células tiene el nombre de tumor; sin embargo, lo importante es diferenciar entre una proliferación maligna y un benigna. Mientras un tumor benigno permanece en el lugar donde se desarrolló y no tiene ciertas características fenotípicas, uno maligno puede expandirse a tejidos vecinos y viajar a partes más lejanas del cuerpo, mediante el sistema circulatorio o linfático, proceso conocido como metástasis. Es esta característica de invasión, junto con la de células anormales y de crecimiento sin control, las que preocupan por las consecuencias que puede provocar en el organismo y por eso solo a este tipo de tumores se les llama cáncer (Cooper, 2000; SEER Training Modules, 2020). De manera general, el cáncer es un proceso en el cual la regulación celular falla, lo que provoca la proliferación clonal de una célula que compartirá estas anomalías y que, de no ser detenido a tiempo, inducirá desequilibrios en el organismo y que puede llevar a la muerte (Cooper, 2000; Instituto Nacional de Cáncer, 2015; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018).

Hay varios tipos de cáncer; fundamentalmente, estos se dividen de acuerdo con el tipo de tejido que lo origina en cuatro principales tipos, que son carcinomas (tejido epitelial), sarcomas (tejido conjuntivo), leucemias (componentes de la sangre) y linfomas (células linfoides). Los carcinomas son

más comunes, constituyendo aproximadamente el 90% de todos los cánceres (Cooper, 2000; Instituto Nacional de Cáncer, 2015; SEER Training Modules, 2020). Los carcinomas, a su vez, se dividen en adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición (Cuadro 1; Cooper, 2000). Los sarcomas son cánceres localizados en tejidos conectivos como hueso, músculo, grasa o cartílago; el más común es el cáncer de hueso llamado osteosarcoma. Finalmente, las leucemias y linfomas tienen su origen en las células formadoras de sangre o en aquellas relacionadas con el sistema inmune. Las leucemias son un tipo de cáncer que no forma tumores como tal, pero las células sanguíneas anormales desplazan a las sanas y se diseminan por todo el cuerpo, limitando el flujo de oxígeno, la coagulación o disminuyendo la eficiencia del sistema inmune. Los linfomas son específicos de los linfocitos (T y B), pueden desarrollar tumores sólidos en los linfonodos y afectan el funcionamiento del sistema inmune adaptativo (Cooper, 2000; Instituto Nacional de Cáncer, 2015; SEER Training Modules, 2020).

Cuadro 1. Tipos y ejemplos de carcinomas comunes en el humano

| Tipo de carcinoma               | Características  | Ejemplos   |
|---------------------------------|--|--|
| Adenocarcinoma                  | Células epiteliales que producen mucusidad o fluidos en tejidos, también llamados glandulares.   | Cáncer de seno, próstata y colon.                      |
| Cáncer de células basales       | De la zona más baja o basal de la epidermis, capa exterior de la piel.   | Melanoma.  |
| Cáncer de células escamosas     | Células epiteliales debajo de la parte exterior de la piel, muchas veces revisten a los órganos internos. También llamado carcinoma epidermoide. | Cáncer de ano, cuello uterino, cabeza y vagina.        |
| Cáncer de células de transición | Formado en las células del tejido epitelial de transición o urotelio.  | Algunos tipos de cáncer de vejiga, uréteres y riñones. |

En los últimos años se ha estudiado la ruta de la progresión del cáncer, encontrando puntos clave que podrían ser fundamentales para entender la enfermedad. Dentro de estos factores resaltan la reparación y daño en el ADN, genes supresores de tumores y oncogenes y las “marcas” del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018). El primer factor clave tiene que ver con el hecho de que las células continuamente son expuestas a productos metabólicos (especies reactivas de oxígeno, radicales hidroxilo y peróxidos de hidrógeno) al igual que factores externos (radiación UV o humo de cigarrillo). Estos factores pueden afectar la estructura e integridad del ADN provocando una inestabilidad celular (Nair *et al.*, 2007; Pourahmad *et al.*, 2016; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018). Si a esto se suman alteraciones en proteínas clave del ciclo celular, como p53, encontramos un panorama donde las células evitan la apoptosis y acumulan mutaciones promoviendo la formación y proliferación de tumores cancerígenos (World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018).

Otro factor clave mencionado son los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros son versiones anormales de genes que normalmente se involucran en el crecimiento, replicación y supervivencia que al ser modificados permitirán la libre proliferación celular (Hagino-Yamagishi y Toyoshima, 2019). Por otra parte, los genes supresores son importantes en el ciclo celular al detener errores y repararlos, pero estos pueden ser inactivados, por epigenética o por mutaciones, permitiendo la presencia de células dañadas (World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018).

El último punto clave, conocido como las “marcas” del cáncer, se refiere a un conjunto de seis características celulares importantes para poder comprender el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). Además, agrega dos condicionantes importantes que permitirán dar paso a este padecimiento: la inflamación y la inestabilidad del genoma y mutaciones. Los seis puntos antes mencionados son: sostener la señal de proliferación, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la replicación inmortal, inducir la

angiogénesis y activar la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018).

Así como las células de forma individual modifican sus procesos regulares, también el tejido lo evidencia (Fig.1). El proceso mediante el cual un tejido sano puede cambiar a uno con cáncer involucra pasos intermedios dentro de los cuales existen algunos en donde todavía no hay características de células cancerígenas (lo arriba descrito como “marcas” del cáncer) pero que de continuar así podrían llegar a la formación de un carcinoma (Instituto Nacional de Cáncer, 2015). Como primer paso se menciona a la hiperplasia. En este punto, las células aumentan en cantidad ya que aumentan la proliferación celular pero no hay anormalidades en el tejido teniendo las células el mismo tamaño y forma. El segundo paso es la displasia, la cual ya presenta anormalidades en el tejido; en este paso las células presentan cambios a nivel estructural (cambio en el tamaño y forma del núcleo, modificación del radio nuclear contra el citoplasma, incremento de la actividad mitótica, entre otras) y la diversidad se ve disminuida, todos estos cambios provocan una arquitectura diferente en el tejido. Este paso se considera la transición entre un crecimiento benigno y los precancerosos (Weinberg, 2014; Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

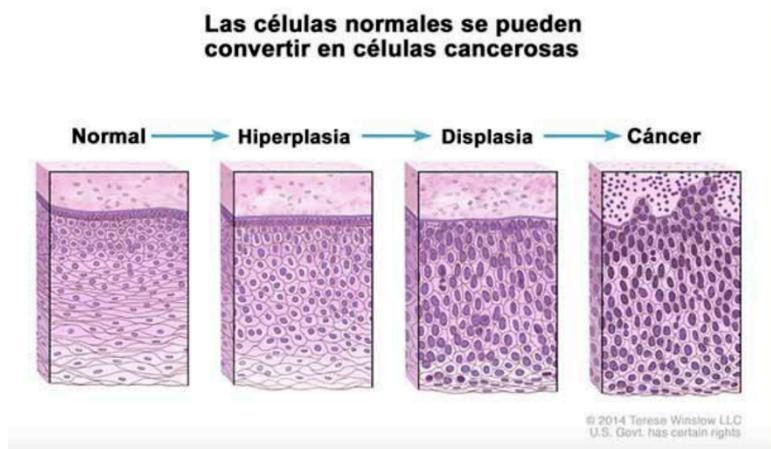


Figura 1. Proceso de modificación del tejido celular. Tomado de Instituto Nacional del Cáncer EE UU. Figura realizada por Terese Winslow, 2014.

Cuando las células pierden su aspecto normal e incluso modifican sus funciones sin que su proliferación haya traspasado la membrana basal; es decir, que no han invadido tejidos vecinos, se le llama carcinoma *in situ* (Weinberg, 2014). Cuando las células cancerígenas han invadido tejidos aledaños, proceso conocido como metástasis, hay una alta probabilidad de muerte si no se da un tratamiento oportuno (Weinberg, 2014; Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

## **2.2. Generalidades del cáncer en la fauna silvestre**

Prácticamente cualquier tipo de célula diferenciada puede malignizarse, por lo cual se podría esperar que los metazoarios tengan la tendencia a padecer cáncer (Vittecoq *et al.*, 2013; Ujvari *et al.*, 2018). Sin embargo, no parece que sea un fenómeno que ocurra de forma tan común en animales silvestres, ya que a diferencia de lo que se observa para el humano y animales domésticos, su incidencia en fauna silvestre es marcadamente menor (McAloose y Newton, 2009; Hamede *et al.*, 2020). En algunos organismos, como los tiburones, el ratón rasurado o los elefantes, la frecuencia de ocurrencia del cáncer es de baja a nula (Pesavento *et al.*, 2018).

Debido a su estilo de vida y a limitaciones en su investigación, no se tienen datos precisos sobre la incidencia de cáncer en fauna silvestre en vida libre (Vittecoq *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2017; Ujvari *et al.*, 2018). Por lo general, los reportes son escasos y fue hasta hace poco tiempo que se ha puesto interés en estudiar el cáncer en especies silvestres de forma más detallada, sobre todo, al comprender que puede ser un factor importante para la conservación de especies (Erren *et al.*, 2009; McAloose y Newton, 2009; Vittecoq *et al.*, 2013; Pesavento *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020). La mayoría de los reportes de cáncer publicados a la fecha son el resultado de hallazgos fortuitos ya sea durante el monitoreo de especies que viven de forma aislada, al atender a especies varadas o al analizar cadáveres. Estas circunstancias hacen difícil el poder tener un contexto claro de las causas que llevaron a su inicio, a las características del desarrollo de la patología y si esta fue la causa

de muerte del animal (Madsen *et al.*, 2017; Pesavento *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020)

A pesar de la escasa información que se tiene, algunos estudios y casos puntuales han permitido identificar posibles factores asociados a la ocurrencia del cáncer, como la presencia de virus con potencial de transformación celular (conocidos como oncovirus), estados de inmunosupresión, condiciones ambientales particulares asociadas a épocas del año o a condiciones geográficas y contaminación, entre otras (Bossart, 2006; McAloose y Newton, 2009; Vittecoq *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2017; Pesavento *et al.*, 2018; Ujvari *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020). Un ejemplo interesante es del del carcinoma facial del demonio de Tasmania, *Sarcophilus harrisii*, que tuvo una aparición repentina y una diseminación poblacional marcada debido a su origen genético (asociado a un monomorfismo genético en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I; Pyecroft *et al.*, 2007). Luego de provocar una epidemia que incluso llevó a la especie a ser considerada como en peligro de extinción (Hawkins *et al.*, 2006), se observó una disminución, tanto en incidencia como en mortalidad y hasta en el tamaño de los tumores faciales (Hamede *et al.*, 2020), semejante a lo que se ha observado en el carcinoma venéreo transmisible en perros. Este fenómeno es evidencia de que las respuestas inmunes adecuadas pueden evitar o contrarrestar el cáncer (Hamede *et al.*, 2020). Ante estas claves puede postularse que la relación hospedero-tumor podría ser una muy similar a la que se da con los parásitos, permitiendo relaciones de tolerancia o resistencia (Hamede *et al.*, 2020). Si fuera así, explicaría por qué es menos común observar casos de cáncer en fauna silvestre, dado que en la mayoría de los casos, su sistema inmune funciona de manera óptima y los casos de cáncer que sí se han reportado suelen ser en animales que se encuentran en condiciones no óptimas para su sistema inmune, como es el caso de los tumores malignos en las belugas del Estero de San Lorenzo, en Canadá, considerado el cuerpo de agua más contaminado del hemisferio norte durante varias décadas (Martineau *et al.*, 2002).

Aún hay muchas interrogantes sobre el desarrollo de cáncer en especies silvestres. Por ejemplo, ¿Por qué se desarrolla el cáncer en algunos individuos y en otros no, inclusive bajo circunstancias similares como la presencia de microorganismos con potencial oncogénico o exposición a un mismo ambiente contaminado (Vittecoq *et al.*, 2013; Pesavento *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020)? De este modo, se han identificado algunas de las condiciones bajo las que es más factible el desarrollo del cáncer, como en el caso de organismos de hábitos bentónicos que viven en lugares contaminados, los cuales por su modo de vida y de obtener alimento se exponen a padecer carcinomas gástricos o del hígado (Bossart, 2006; McAloose y Newton, 2009; Hamede *et al.*, 2020). Pero aún con este riesgo, actualmente algunos peces ya han desarrollado formas efectivas para vivir en estos ambientes sin que se desarrolle el carcinoma, por lo cual al prestar atención en estos mecanismos podría ayudarnos a comprender como incluso exponiéndose a una concentración alta de contaminantes, es posible ralentizar o evitar el desarrollo del cáncer (Vittecoq *et al.*, 2013).

Hasta ahora se han reportado casos de cáncer en diferentes animales, desde invertebrados, principalmente marinos, hasta mamíferos (Bossart, 2006; McAloose y Newton, 2009; Vittecoq *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2017; Pesavento *et al.*, 2018; Ujvari *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020). En los vertebrados ha habido más reportes (Cuadro 2) siendo los más estudiados casos en aves y en mamíferos (Madsen *et al.*, 2017). Es importante resaltar que la mayoría de las especies de peces en las que se ha reportado cáncer son de interés comercial, lo cual tiene al menos dos implicaciones importantes: 1) si los peces están desarrollando el cáncer como consecuencia de la exposición a contaminantes, existe la posibilidad de bioacumulación y biomagnificación de esos contaminantes al ser comidos como alimento humano o animal (Ahmed *et al.*, 2019) y 2) si el cáncer llega a impactar el tamaño poblacional y gran cantidad de individuos murieran por este padecimiento o si afecta su éxito reproductivo, podría haber un impacto económico. Estos aspectos de las consecuencias del cáncer aún no se han evaluado (McAloose

y Newton, 2009; Madsen *et al.*, 2017; Pesavento *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020).

Cuadro 2. Reportes de prevalencia de cáncer en diferentes grupos del mundo animal (Madsen *et al.*, 2017; Hamede *et al.*, 2020)

| Grupo taxonómico     | Número de especies con reporte de algún proceso cancerígeno | Referencias   |
|----------------------|---|---|
| <b>Invertebrados</b> |   |   |
| Hydrozoa             | 1   | Domazet-Lošo <i>et al.</i> (2014)   |
| Mollusca             | 19  | Peters <i>et al.</i> (1994); Barber (2004); Ciocan y Sunila (2005); Carballal <i>et al.</i> (2015)  |
| Crustacea            | 3   | Morado <i>et al.</i> (2014)   |
| Insecta              | 1   | Salomon y Jackson (2008)  |
| <b>Vertebrados</b>   |   |   |
| Peces                | 61  | Groff (2004); LePage <i>et al.</i> (2012); Coffee <i>et al.</i> (2013); Robins <i>et al.</i> (2014)   |
| Anfibios             | 9   | Masahito <i>et al.</i> (2003); Ladds (2009); Martínez Silvestre <i>et al.</i> (2011); Chu <i>et al.</i> (2012)  |
| Reptiles             | 97  | Mader (1996); Hernández-Divers y Garner (2003); Ladds (2009); Chu <i>et al.</i> (2012); Dietz <i>et al.</i> (2016)  |
| Aves                 | 125   | Ratcliffe (1933); Reece (1992); Ladds (2009); Wiley et al. (2009); Chu <i>et al.</i> (2012)   |
| Mamíferos            | 223   | Ratcliffe (1933); Canfield <i>et al.</i> (1990); Porter <i>et al.</i> (2004); Heatley <i>et al.</i> (2005); Newman y Smith (2006); Ladds (2009); Chu <i>et al.</i> (2012) |

En el caso de las poblaciones de anfibios, aunque aparentemente son naturalmente resistentes al cáncer (Chen *et al.*, 2023), actualmente no han presentado una afectación relevante, pero otros factores, como el hongo quitridio, virus patógenos, su susceptibilidad a las variaciones climáticas y a la luz UV (Madsen *et al.*, 2017) podrían llegar a romper esa resistencia innata al cáncer e incrementar el riesgo de que ocurriera transformación maligna celular.

En reptiles, el caso más relevante es de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) que se distribuye en aguas tropicales (Madsen *et al.*, 2017). Los juveniles comúnmente se ven afectados por fibropapilomatosis, una tumoración no maligna que, dependiendo del tamaño y ubicación, puede impedir el desarrollo y actividad óptima de los individuos que la padecen. Este padecimiento se ha reportado en organismos de Brasil, Hawaii y, en fechas recientes, en México (Santos *et al.*, 2010). Aunque la prevalencia varía de un sitio a otro, su presencia se asocia a una mayor carga parasitaria e inmunosupresión, lo que facilita la presencia de otras enfermedades que podrían ser mortales (Work *et al.*, 2005).

En el caso de las aves los estudios de cáncer son pocos, observando una baja prevalencia en aves de vida silvestre (Madsen *et al.*, 2017). Los escasos reportes incluyen gansos canadienses (*Branta canadiensis*; Gates *et al.*, 1992), pero contrario a lo reportado hay dos estudios donde se encontraron alta prevalencia. El primer caso es el estudio de *Bonasa umbellus* (Howerth *et al.*, 1986) donde había organismos de cautiverio y en vida libre, por lo que los resultados deben ser tomados con cautela. McAloose y Newton (2009) reportaron también un caso interesante con el pollo de las praderas de Attwater, el cual está al borde de la extinción por un linfoma asociado a un virus, resultando una alta mortalidad sobre todo en pollos en cautiverio.

En contraste, en mamíferos silvestres se han detectado diversos tipos de cáncer. Algunos de los estudios presentan evidencia de que el cáncer puede tener un impacto importante en las poblaciones, pero otros han encontrado lo contrario, incluso tratándose de la misma especie (Gulland *et al.*, 1996; Barragán-Vargas *et al.*, 2016; Deming *et al.*, 2018; Peñín *et al.*, 2019). Esto, de nuevo, deja entrever que existen factores que determinan las diferencias en la susceptibilidad, el desarrollo y el impacto del cáncer en una población.

Sin importar a que clase pertenezca la especie, como ya se mencionó, cualquier organismo multicelular está expuesto a que se desarrolle cáncer si existen las condiciones ideales para que progresen esas células transformadas (Vittecoq *et al.*, 2013). A pesar de que existen factores de susceptibilidad intrínsecos, las variaciones ambientales podrían ser un factor importante de

susceptibilidad al cáncer, y al sufrir modificaciones rápidas, abruptas e impredecibles (Trisos *et al.*, 2020) podría haber un mayor riesgo, y por lo tanto, una mayor incidencia de cáncer (McAloose y Newton, 2009; Hamede *et al.*, 2020). El impacto antrópico en los ecosistemas también debe ser considerado como un factor de riesgo para el cáncer en poblaciones silvestres, tanto de forma directa como indirecta. Por un lado, la modificación del hábitat somete a los organismos a mayores niveles de estrés que podrían provocar inmunosupresión (Shini *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2023), dando condiciones favorables para el desarrollo del cáncer. Por otro lado, la antropización de un ecosistema suele acompañarse de la acumulación de contaminantes persistentes que pueden ocasionar inmunosupresión (Peñín *et al.*, 2018) o directamente inducir transformación celular (Berwald y Sachs, 1965).

### **2.3. Generalidades de *Zalophus californianus***

El lobo marino de California, *Zalophus californianus*, se encuentra dentro de la clase Mammalia, orden Carnivora, familia Otariidae. Como todos en la familia Otariidae, presentan orejas visibles y habilidad para trasladarse en tierra, debido a que sus aletas frontales son largas en comparación con las posteriores además de poseer músculos pectorales que les permiten el impulso y la rotación (Heath y Perrin, 2008; Jefferson *et al.*, 2015). El género *Zalophus* se compone de tres especies distribuidas en el océano Pacífico, de las cuales una, *Z. japonicus*, está extinta (Lowry 2017). El lobo marino de California está distribuido en el Pacífico oriental, desde la costa de la Columbia Británica en Canadá hasta la península de Baja California, México y en las islas dentro del Golfo de California (Heath y Perrin, 2008).

La distribución de la especie está determinada por la disponibilidad de hábitat, principalmente en lugares rocosos costeros, temperatura templada del mar (con un máximo de 21°C en su distribución más sureña) y una productividad primaria alta en sus zonas de alimentación y en las zonas aledañas a las loberas (Yonezawa *et al.*, 2009; Ortega-Ortiz *et al.*, 2013). Las hembras, crías y juveniles se encuentran principalmente en la Islas del Canal, al sur de California, en las islas fuera de la costa de Baja California, así como

en las islas del Golfo de California (Jefferson *et al.*, 2015), mientras que los machos, con características migratorias, llegan a estos sitios al inicio de la época de apareamiento en verano (Heath y Perrin, 2008).

Existen diferencias en el ADN mitocondrial (ADNmt) entre las poblaciones del Golfo de California y las del Pacífico, permitiendo conformar cinco regiones genéticas para la especie (Schramm *et al.*, 2009), siendo estas: 1) Pacífico norte (poblaciones de California y parte norte de Baja California), 2) Pacífico subtropical (poblaciones del sur de Baja California), 3) zona sur del Golfo de California (colonias de las islas de Espíritu Santo y Farallón de San Ignacio), 4) zona central del Golfo (colonias de las islas de San Pedro Martir, San Pedro Nolasco, San Esteban, Archipiélago de San Lorenzo, Ángel de la Guarda y Lobos) y 5) zona norte del Golfo (colonias de islas San Jorge y Rocas Consag).

Los censos más recientes indican que la población de EEUUA se encuentra estable ( $N= 257\,631$  individuos [95% IC, límite inferior: 233 515, límite superior: 273 211]; Laake *et al.*, 2017) e incluso marca una tendencia de crecimiento (NOAA, 2019), mientras que la población del Golfo de California presenta distintos patrones ya que en algunos sitios está estable, otras en crecimiento y otras en declive (Lowry y Maravilla-Chávez, 2005; Szteren *et al.*, 2006; Adame *et al.*, 2020). Queda claro que las tendencias poblacionales pueden cambiar rápidamente. Por ejemplo, la población de lobos marinos del Golfo de California ( $N_{2019}= 15\,291$  [rango 11 861- 20 316]; Adame *et al.*, 2020) presentó un declive del 65.2% en tan solo 28 años (1991-2019), y solamente la colonia de la isla de Espíritu Santo (la lobera de Los Islotes) presenta crecimiento (Adame *et al.*, 2020). Esta colonia al encontrarse en el extremo sur del Golfo de California presenta gran variabilidad de presas y disponibilidad de estas a lo largo del año por su conexión con el océano Pacífico, además de que se ha encontrado una ampliación del área de búsqueda de alimento en situaciones adversas; todo esto podría favorecer el incremento de esta colonia (Adame *et al.*, 2020; Cruz-Vallejo *et al.*, 2024). A pesar de las variaciones de abundancia en los distintos sitios de su distribución, la lista roja de UICN aún la cataloga como una especie de baja preocupación (Aurioles-Gamboa y Hernández-Camacho, 2015).

La especie presenta un dimorfismo sexual marcado en la edad adulta, ya que el macho puede medir hasta 2.4 m y pesar 350 kg mientras que las hembras no suelen rebasar los 1.8 m de longitud, con un peso de 100 kg. Además, los machos adultos presentan una cresta sagital protuberante y un cuello grueso (Jefferson *et al.*, 2015). El pelaje de las crías es de coloración café oscuro a negro hasta que mudan a un pelaje de tono café claro o cenizo alrededor de los seis meses. Las hembras permanecen con este color, pero los machos obscurecen conforme envejecen (Heath y Perrin, 2008).

La madurez sexual se alcanza alrededor de los 4 o 5 años para las hembras y a los 5 a 7 años para los machos (Morales, 1990). Su longevidad en vida libre oscila entre los 20 y 22 años para hembras y 17 para los machos (Inclán Magaña, 1999). La temporada de apareamiento y nacimiento de crías abarca desde finales de mayo hasta julio, luego de un periodo de gestación de un año y la lactancia puede durar de uno a dos años. Las hembras presentan una alta fidelidad a los sitios de crianza, de los cuales solamente se alejan para alimentarse a una distancia de 50 a 100 km (Kuhn y Costa, 2014; Rosas-Hernández *et al.*, 2019). El lobo marino de California es una especie gregaria, lo que queda en evidencia durante la temporada reproductiva. Los machos establecen un territorio en donde buscarán aumentar sus opciones de apareamiento, tanto como sea posible con la mayor cantidad de hembras disponibles. Las disputas por territorio son frecuentes, e incluyen vocalizaciones cortas y de sonido grave hasta peleas físicas (Jefferson *et al.* 2015).

Su alimentación, a pesar de ser considerada como plástica, se encuentra determinada por la productividad primaria del sitio e incluso por los ciclos de vida de las especies consumidas. Dentro de las principales presas podemos mencionar a la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax*), la anchoveta (*Engraulis mordax*), la merluza del Pacífico (*Merluccius productus*), el jurel del Pacífico (*Trachurus symmetricus*), el calamar de mercado (*Loligo opalescens*) y también otros cefalópodos como diversas especies de pulpo (Melin *et al.*, 2017). En colonias como la asentada en el Archipiélago San Benito, el lobo marino de California se alimenta especialmente de pez aguja (*Strongylura*

*exilis*), merluza (*Merluccius productus*), calamar rojo volador (*Ommastrephes bartramii*) y sardina (*Sardinops sagax*) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2024).

Las principales amenazas para la especie son las enfermedades (Greig *et al.*, 2005; Van Bonn, 2015), cambios en la disponibilidad de alimento por factores climáticos y oceanográficos como “El Niño” que alteran negativamente su abundancia o condición corporal/mortalidad de crías (Jefferson *et al.*, 2015; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016), contaminación ambiental (Ylitalo *et al.*, 2005), interacciones con pesquerías y pérdida del hábitat (Zavala *et al.*, 2004; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2022). Cada una de ellas se presenta en menor o mayor grado dependiendo de la localización de las poblaciones o colonias, por lo cual es importante identificar en cada sitio el factor y grado de amenaza para considerarlo y mantener a esta especie en una estabilidad poblacional.

#### **2.4. Conocimiento actual del cáncer urogenital del lobo marino de California**

Uno de los casos más interesantes y más estudiados de cáncer en vida silvestre es el que afecta al lobo marino de California, *Zalophus californianus*. Hasta los primeros años de la década de los ochenta los reportes de cáncer – específicamente un carcinoma urogenital – en esta especie eran escasos (Gulland *et al.*, 1996; Browning *et al.*, 2015). Sin embargo, a partir de esta época incrementó el número de reportes en animales adultos varados en la costa de California, EEUUA (Deming *et al.*, 2018). El aumento en la incidencia despertó el interés en investigar las causas asociadas al desarrollo del carcinoma urogenital. Actualmente se han identificado diversos factores de riesgo, como factores genéticos (Acevedo-Whitehouse *et al.* 2003; Bowen *et al.* 2004; Browning *et al.*, 2014; Browning *et al.*, 2015), presencia de contaminantes ambientales persistentes como los organoclorados (Ylitalo *et al.*, 2005; Erren *et al.*, 2009; Randhawa *et al.*, 2015; Browning *et al.*, 2015) y patógenos oncogénicos (King *et al.*, 2002; Buckles *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006). Estos hallazgos son intrigantes, sobre todo si consideramos que, aunque la especie se encuentra distribuida desde California, EEUUA hasta

Baja California Sur, México y zonas insulares del Golfo de California, hasta ahora solamente se ha reportado la presencia de la enfermedad en California (Godínez-Reyes *et al.*, 2006; Peñín *et al.*, 2019), y solamente se han detectado evidencias de transformación preoncogénica en individuos del Golfo de California (Barragán-Vargas *et al.*, 2015).

A pesar de que el carcinoma urogenital no ha mermado el tamaño de la población, que se mantiene estable en California (Laake *et al.*, 2017), es importante tener un monitoreo de la patología en la dinámica poblacional para entender su efecto a largo plazo, descubrir cuales otros factores influyen en su inicio y desarrollo, así como establecer los ambientes donde esta enfermedad podría aumentar más rápidamente. Esto es particularmente importante dado que la especie es considerada centinela del ambiente marino costero (Godínez Reyes *et al.*, 2006; Bossart 2010).

Al ser el cáncer una enfermedad multifactorial, es imprescindible conocer cada aspecto que pueda contribuir en su desarrollo. Sabemos que la diversidad genética es uno de los aspectos fundamentales para el éxito y la permanencia de una especie, por lo que la disminución de este carácter puede contribuir al desarrollo de algunas enfermedades (Ujvari *et al.*, 2018). A nivel genético se ha identificado que la homocigocidad en el microsatélite Pv11 aumenta al doble la probabilidad de presentar un carcinoma (Browning *et al.*, 2014). También se ha encontrado que la presencia de un gen específico del MHC clase II (Zaca-DRB.A) podría estar asociado a un incremento en el riesgo del cáncer urogenital (Bowen *et al.*, 2005). Por esto, se especula que la vulnerabilidad al carcinoma urogenital y a otras enfermedades podría estar relacionado con la endogamia y que no sería enteramente al azar (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Todo esto se asocia a una disminución de variabilidad genética, producto de la endogamia lo cual impacta, de forma directa (p.ej. por la acumulación de mutaciones deletéreas) o indirectamente (p.ej. vulnerabilidad a patógenos oncogénicos), la eficiencia del sistema inmune para detectar células malignas (Ujvari *et al.*, 2018).

Otro factor identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma urogenital es la infección por un gammaherpesvirus (OtHV-1, por

sus siglas en inglés; Lipscomb *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002). Otros virus del mismo género se han asociado a otros tipos de cáncer en humanos y animales domésticos (Fujiwara *et al.*, 2020). A pesar de que un estudio realizado en animales de EEUU mostró que la prevalencia de OtvH-1 se encuentra en mayor prevalencia en adultos sexualmente maduros que en subadultos, juveniles y crías, lo que sugeriría una transmisión sexual (Buckles *et al.*, 2007) se ha detectado en crías del Golfo de California y Pacífico Norte Mexicano (Barragán-Vargas *et al.*, 2016; Peñín *et al.*, 2019; Pereida *et al.*, 2023), lo cual permite especular que una exposición vía perinatal puede ser posible.

La mayor prevalencia de carcinoma urogenital la presentan los machos adultos, los cuales son los que presentan la mayor concentración de organoclorados (Ylitalo *et al.*, 2005), planteando que este factor podría jugar un papel importante para el desarrollo del carcinoma urogenital (Gulland *et al.*, 1996; Buckles *et al.*, 2007; Deming *et al.*, 2018). La relevancia de los contaminantes como factor de riesgo para el carcinoma urogenital queda evidenciada, ya que los individuos con carcinoma urogenital suelen tener concentraciones más altas de organoclorados en su tejido adiposo que aquellos animales de la misma edad y sexo que no presentan la patología (Ylitalo *et al.*, 2005). Además, en áreas de la distribución de la especie en la que las concentraciones de estos contaminantes son dos a tres órdenes de magnitud menores que en California, como el Golfo de California (Niño-Torres *et al.*, 2008), no se observan problemas de carcinoma urogenital (Barragán-Vargas *et al.*, 2016). Los organoclorados no solamente impactan por su presencia (altos o bajos niveles de concentración) sino también lo hacen como moduladores endocrinos, por lo cual se espera que jueguen un papel importante en la regulación de las células inmunes. Esto ha sido demostrado experimentalmente, al exponer a linfocitos de lobo marino de California a concentraciones ambientalmente relevantes de diferentes congéneres de pesticidas y observar un efecto supresor de muchos de ellos (Peñín *et al.*, 2018). Congruente con esta premisa, se han encontrado diferencias en la expresión de genes moduladores de la inflamación y en la respuesta de tipo Th1 de hembras adultas de lobo marino de California en el Golfo de California, además de diferencias en la transcripción dependiendo de

si estaban o no infectadas por el virus oncogénico (Peñín *et al.*, 2019). Por otra parte, también se identificó una regionalización en los patrones de transcripción inmune de los lobos marinos adultos en el Golfo de California y una parte de Baja California, lo que sugiere diferencias ecológicas que impactan la respuesta inmune de los organismos y que pudieran, a la larga, explicar la ocurrencia de carcinoma urogenital (Peñín *et al.*, 2019).

La participación de los contaminantes ambientales como disruptores endocrinos puede ser demostrado por medio de los cambios en la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona, encontrando una disminución significativa en los tejidos con lesiones a diferencia de aquellos tejidos sanos (Colegrove *et al.*, 2009). Estos cambios junto con la alteración en la expresión de Ki67 y p53 podrían tener un papel importante en el desarrollo del cáncer (Colegrove *et al.*, 2009). Esto es importante, ya que en diferentes zonas de su distribución geográfica hay variación en los contaminantes, tanto en el tipo de químico presente como en su cantidad (Niño-Torres *et al.*, 2008). Por ejemplo, en el Golfo de California, existen diferencias, en el norte y zona media del Golfo, en la proporción de neutrófilos a linfocitos, un biomarcador de inflamación crónica, asimismo en el norte hay señal de anergia o agotamiento linfocitario (Peñín *et al.*, 2019). Tanto la anergia como la inflamación crónica pueden asociarse con el desarrollo de cáncer (Martyshkina *et al.*, 2023; Cifuentes *et al.*, 2024).

Un factor de riesgo adicional a considerar es la asociación entre bacterias oportunistas y el carcinoma urogenital del lobo marino de California. Un primer estudio mostró que la presencia de *Streptococcus* beta-hemolítico se asociaba con un mayor riesgo de carcinoma urogenital en hembras adultas (Johnson *et al.*, 2006). Más recientemente, se encontró que había diferencias en la abundancia de ciertas bacterias del tracto respiratorio en relación con el estado epitelial del cérvix (Pereida-Aguilar *et al.*, 2023). Hasta ahora no se ha determinado si las bacterias inducen el ambiente inflamatorio propicio para el desarrollo de la enfermedad o si la presencia del carcinoma es el que favorece la presencia de bacterias específicas (Johnson *et al.*, 2006), pero la observación de que puede haber disbiosis asociada con la transformación del

epitelio genital existe (Pereida-Aguilar *et al.*, 2023). Por otra parte, se ha reportado transformación celular pre cancerígena en el tracto genital de crías de lobo marino de California en el Golfo de California, lo que hace pensar que la especie podría tener alguna propensión para la transformación celular espontánea, incluso a temprana edad (Barragán-Vargas *et al.*, 2016). Esa propuesta es relevante a considerar, ya que implicaría que la presencia de altas concentraciones de contaminantes ambientales y virus oncogénicos podrían ser factores que contribuyen al desarrollo del carcinoma, pero que no son la causa en sí misma. Dado que en el Golfo de California se ha encontrado que la presencia de OtHV-1 en epitelio genital del lobo marino de California es igual o mayor que la reportada para animales en California pero que a la fecha no se han detectado casos de carcinoma urogenital, es posible que el virus OtHV-1 tenga un papel menos importante del que se ha postulado (Buckles *et al.*, 2006) para el desarrollo del carcinoma urogenital (Barragán-Vargas *et al.*, 2016), y que lo más relevante sea el óptimo funcionamiento del sistema inmune, que a su vez, es influenciado por factores como los contaminantes (Peñín *et al.*, 2018). Es probable que existan otros factores de riesgo para esta patología que aún no han sido identificados, para el lobo marino de California, y que son conocidos en otros procesos cancerígenos del humano y animales domésticos.

El lobo marino de California ofrece una oportunidad invaluable de estudiar e identificar la etiología multifactorial del cáncer, no solo el carcinoma urogenital de una especie silvestre, sino para cualquier otro tipo de cáncer, e incluso, para el desarrollo de esta enfermedad en los seres humanos. Con este modelo no tradicional se puede entender como factores tales como la dieta, el ambiente y la genética pueden interactuar para el desarrollo de este padecimiento. Hasta ahora se pueden identificar algunos paralelismos en la presencia de la enfermedad entre seres humanos y el lobo marino como la edad de ocurrencia, histomorfología, asociación con oncovirus y alelos del MHC clase II; además de la exposición de ambos a contaminantes ambientales, estos aspectos pueden ser fundamentales para comprender la presencia y desarrollo de la enfermedad (Browning *et al.*, 2015).

Dados los estudios arriba indicados, existen aún interrogantes sobre los factores causales y de riesgo para el carcinoma urogenital en el lobo marino de California en vida libre. Considerando que se conoce, a partir de estudios en humanos, una asociación del estado nutricional con las respuestas del sistema inmune y un mayor riesgo de transformación celular por inflamación sistémica crónica, a su vez relacionada con la nutrición; es relevante conocer si estos factores, además de las diferencias en las zonas de alimentación y nivel trófico de la dieta, podrían contribuir en la transformación epitelial y subsecuente desarrollo del carcinoma urogenital en esta especie.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Metodología general**

Esta tesis se separa en tres capítulos de resultados, y cada uno describe a detalle la metodología utilizada. Sin embargo, todas las muestras se colectaron en el mismo lugar y de los mismos animales. Por lo tanto, en esta sección se describe la metodología general que es relevante para todos los capítulos de resultados.

##### **3.1.1. Área de estudio**

El Golfo de California es un mar parcialmente cerrado limitado por los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit al este, la península de Baja California al oeste y el delta del Río Colorado (Sonora y Baja California) al norte (Lara-Lara *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2009). Con 1,200 km de largo y entre 90 a 222 km de ancho, contiene 40 lagunas costeras y 922 islas e isletas (Lara-Lara *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2009; Páez-Osuna *et al.*, 2016,2019). Es una zona con gran variabilidad tanto topográfica como ambiental, la cual está dividida en una serie de cuencas y trincheras que se van haciendo más profundas hacia el sur (Santamaría del Angel *et al.*, 1994; Lluch-Cota, 2004; Wilkinson *et al.*, 2009).

Este mar se caracteriza por un sistema subtropical, que presenta un clima determinado por las zonas terrestres más que las costeras, determinando el régimen anual y diurno de temperaturas (Álvarez-Borrego, 1983). Presenta actividad tectónica y posee ventanas hidrotermales con fauna, bacterias y arqueas especializadas en el uso de sulfuro de hidrógeno. Además, la zona se caracteriza por una gran diversidad de flora y fauna debido a su alta productividad primaria y condiciones oceanográficas; específicamente, sostiene grandes poblaciones de peces, las cuales a su vez funcionan como alimento de especies piscívoras de alto nivel trófico (Lara-Lara *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2009). Además, habitan varias especies endémicas y se han delimitado cinco

áreas marinas de conservación para la zona (Lara-Lara *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2009).

La productividad primaria que presenta este mar ha sido equiparable a la de la corriente de California o la zona de surgencias en Perú (Lara-Lara *et al.*, 2008; Álvarez-Borrego 2010). Sin embargo, el aporte de nutrientes por los afluentes de ríos no tiene un papel importante en esta cuenca, la cual es considerada como de alta evaporación (Wilkinson *et al.*, 2009; Álvarez-Borrego 2010). En cambio, este mar tiene tres principales mecanismos de fertilización: la fuerza de las mareas, el régimen de vientos y el intercambio de agua con el Océano Pacífico, principalmente en la entrada la cual se ha delimitado en una línea recta desde Cabo San Lucas, BCS hasta Cabo Corrientes, Jalisco (Lluch-Cota 1999, 2004; Álvarez-Borrego 2010).

Las surgencias ocurren en la parte este o continental por vientos de noroeste, los cuales se presentan durante el invierno (diciembre a mayo), mientras que, en el oeste, es decir, la región cercana a la península de Baja California, los vientos del sureste ocurren durante la temporada de verano (julio a octubre; Lluch-Cota 1999; Álvarez-Borrego 2010). Durante el verano, debido a las altas temperaturas superficiales, existe una importante estratificación en el agua por lo cual el nivel de productividad por los vientos no es tan marcado en la zona de Baja California como lo es para la zona continental durante el invierno (concentración de clorofila +10 mg m<sup>-3</sup> vs. 0.5 mg m<sup>-3</sup>). Los remolinos (*eddies*, en inglés) formados permiten incrementar la abundancia de fitoplancton en todo el Golfo (Lluch-Cota 1999; Brusca *et al.*, 2017).

Uno de los eventos que presenta un importante papel en la variación interanual es el fenómeno de la oscilación del Sur asociada a “El Niño” (ENSO, por sus siglas en inglés) y su contraparte “La Niña”, sobre todo en cuanto a la distribución y abundancia de especies, así como de la productividad en la zona, también es el mayor recurso de variabilidad de la temperatura superficial (Lluch-Cota 2004; Herrera-Cervantes *et al.*, 2007). Uno de los eventos más significativos es la interrupción de los patrones de vientos, la cual es más evidente durante el invierno, y se observa como la interrupción de la surgencia en la zona este (Lluch-Cota 2004; Herrera-Cervantes *et al.*, 2007, 2020). Aún

con estos datos el impacto más significativo, sobre todo en eventos fuertes de “El Niño” se ha encontrado en la entrada del Golfo. En ellos se ha observado una reducción de clorofila de hasta el 20% tanto en esta zona, como en centro y Grandes Islas, pero sin una afectación en la productividad primaria, la cual se observa solo en la entrada del Golfo (Lluch-Cota 2004; Álvarez-Borrego 2010). El fenómeno de “La Niña” también ha manifestado su presencia con altos picos de clorofila tanto al centro como al sur y una fuerte fuerza del viento. Estas ventajas ayudan a disminuir el impacto de “El Niño” débil y moderado (Lluch-Cota 2004; Herrera-Cervantes *et al.*, 2020). Se especula que la zona de las Grandes Islas funcionaría como una especie de barrera para el impacto más norteño de este fenómeno por lo cual esta zona se considera como refugio para la vida silvestre (Lluch-Cota 2004).

Otros fenómenos que se han observado, sobre todo a nivel de productividad primaria, que impactan en la variabilidad interanual, es la oscilación decadal del Pacífico (PDO). Aunque hay pocos reportes, se ha encontrado una coincidencia de aumento de la producción primaria durante la fase fría y de decremento durante la fase cálida; lo cual ha incrementado de forma exponencial con la presencia de un evento de “El Niño” fuerte (decremento) o un evento de “La Niña” fuerte (aumento) (Lluch-Cota *et al.*, 2010; Pelayo-González, 2018).

Dentro de las amenazas más importantes al ecosistema del Golfo de California se encuentra la explotación pesquera sin control, ya que, al ser muy productivo, provee cerca del 40% de la pesquería del país de pequeños pelágicos y de camarón (SePesca, 1990; Lluch-Cota *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2009). Gran parte de esta actividad es realizada de forma ilegal (Calderón-Aguilera, 2019; Aceves-Bueno *et al.*, 2016), y parte de la pesca legal utiliza artes de pesca que no son sustentables e impactan la disponibilidad de alimento para especies residentes, como el lobo marino de California y algunas especies de aves (Lluch-Cota 2004; Wilkinson *et al.*, 2009). Otra de las amenazas importantes son los contaminantes que provienen de actividades económicas y de la presencia humana, y que provocan una degradación de los ecosistemas costeros. Entre los principales están pesticidas agrícolas

provenientes del margen continental, esta actividad también desecha productos ricos en nitrógeno provocando florecimiento de fitoplancton, algunos de ellos nocivos. También se ha comenzado a registrar un incremento en los niveles de metales y metaloides como resultado de la minería, todos ellos asociados a la parte continental actualmente (Páez-Osuna *et al.*, 2016, 2019).

### 3.1.2. Las ecorregiones en el Golfo de California y las laderas del lobo marino de California

El Golfo de California se divide en dos grandes zonas oceanográficas: la región norte, al norte de las grandes islas (Isla Tiburón y Ángel de la Guarda), y la región sur, desde estas islas hasta la boca (Lara-Lara *et al.*, 2008). Sin embargo, se han observado características distintas (p.ej. de biodiversidad, oceanográficas, topográficas, entre otras) en muchas zonas, llegándolas a dividir hasta en 14 regiones (Santamaría del Ángel *et al.*, 1994; Lara-Lara *et al.*, 2008). La división se basa en la productividad primaria, requisito importante en la distribución del lobo marino de California, e incluye otros aspectos relevantes para la especie, como censos poblacionales, contenido de metales traza en hueso, diversidad de dieta, presencia de serovariaciones de la bacteria *Leptospira*, isótopos estables, incidencia de osteoartritis, temperatura superficial del mar y concentración de clorofila. Con base en esto, se han delimitado cuatro zonas ecológicas (ecorregiones). Estas son Zona Sur (línea entre La Paz, BCS y Topolobampo, Sin. hacia el sur o boca del Golfo –línea entre Cabo San Lucas, BCS y Cabo Corrientes, Jal.-); zona Central (línea entre La Paz, BCS y Topolobampo, Sin. hacia el norte hasta la Isla Tiburón); zona de Grandes Islas (entre la Isla Tiburón y la Isla Ángel de la Guarda) y zona Norte (de Isla Ángel de la Guarda al norte) (Lluch-Cota, 2004; Lara-Lara *et al.*, 2008; Szteren y Aurioles-Gamboa, 2011).

Dentro del Golfo hay 13 loberas reproductivas conocidas (Fig. 2), distribuidas tres en la zona norte, cuatro en la región de las Grandes Islas, cuatro en la zona central y dos en la zona sur (Szteren y Aurióles-Gamboa, 2011).

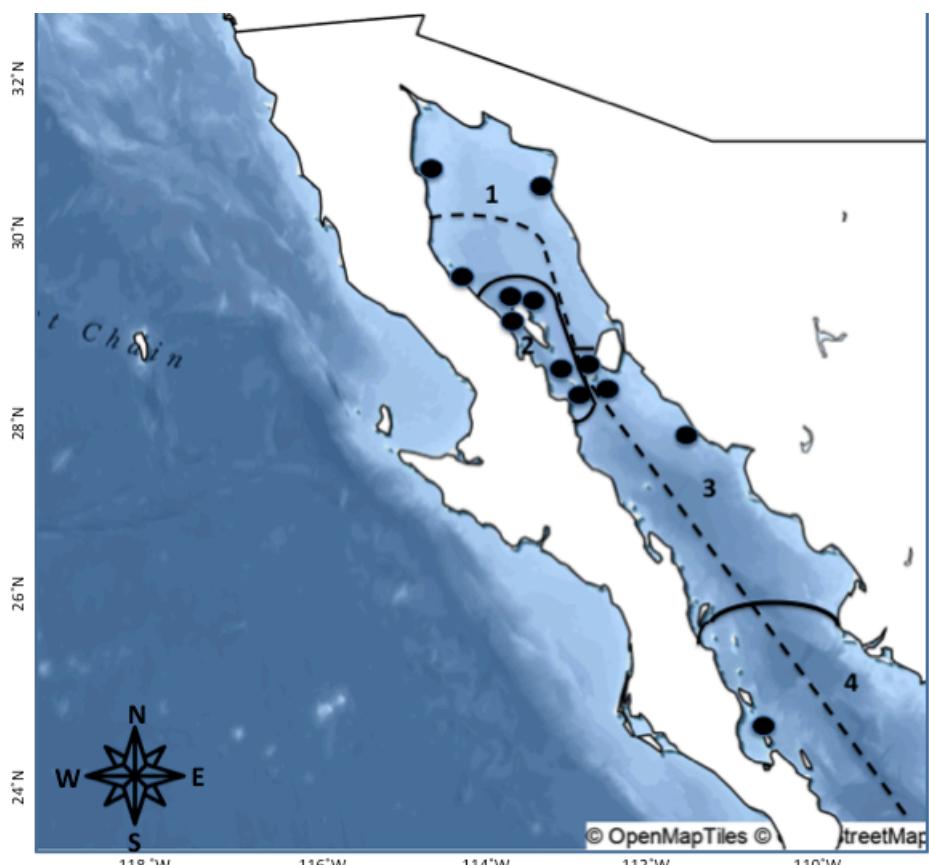


Figura 2. Mapa de la zona de estudio. El mapa muestra la regionalización ecológica (números y línea en negrita; 1) Golfo Norte, 2) Grandes Islas, 3) Golfo Central y 4) Golfo Sur) y las zonas de perturbación (oeste o este; línea de puntos) del Golfo de California. Los puntos negros indican las colonias en el Golfo de California.

A continuación, se describirán las cuatro ecorregiones:

Zona sur. En la boca del Golfo, las surgencias costeras son un importante recurso para obtener nutrientes y aumentar la clorofila y productividad primaria, la variabilidad de la biomasa del fitoplancton está dada por los eventos de surgencia, la intrusión de aguas cálidas y la presencia de “El Niño” (Lara-Lara y

Álvarez-Borrego, 2014). Esta zona es una transición entre las aguas cálidas del Pacífico Sur y las más templadas del Golfo de California. Se han reportado altos valores de fitoplancton de enero a mayo, mientras que un frente recurrente se observa cerca de Cabo San Lucas con una alta concentración de nutrientes durante primavera y principios de verano (en años no “El Niño”) (Lara-Lara y Álvarez-Borrego, 2014). El promedio de clorofila en la época fría (final de noviembre- final de junio) es de 0.36 a 0.92 mg m<sup>-3</sup>, mientras que en la cálida (inicio de julio- inicio de noviembre) es de 0.24 a 0.55 mg m<sup>-3</sup>. Esta parte sur presenta profundidades mayores a los 3000 m (Lara-Lara *et al.*, 2008; Lluch-Cota *et al.*, 2010).

Las dos loberas reproductivas que se encuentran en la zona sur son Los Islotes y Farallón de San Ignacio. La primera presenta un aumento poblacional mientras que para la segunda se habla de estabilidad, pero también de una disminución (Szteren *et al.*, 2006; Masper *et al.*, 2019; Adame *et al.*, 2020).

Zona central. Es una zona profunda y con influencia de las aguas del Océano Pacífico. Termoclina bien desarrollada de abril a octubre con un máximo en agosto, llegando hasta los 150m de profundidad (Álvarez-Borrego 1983).

Las loberas reproductivas de esta zona son San Esteban, San Pedro Mártir, El Rasito y San Pedro Nolasco. Aquí la cantidad de organismos ha variado, con algunas tendencias de crecimiento (Szteren *et al.*, 2006), de establecimiento (Masper *et al.*, 2019) o de reducción (Adame *et al.*, 2020); como San Esteban y El Rasito, que en menos de 15 años, han mostrado un marcado declive (Szteren *et al.*, 2006; Masper *et al.*, 2019; Adame *et al.*, 2020).

Región de las grandes islas. Durante el verano, la productividad del Golfo de California es baja, pero esto no ocurre alrededor de las grandes islas, ya que al igual que en la zona norte, la mezcla de mareas tiene un impacto importante manteniendo una alta productividad aquí (Álvarez-Borrego, 2010; Álvarez-Molina *et al.*, 2013). Se ha reportado que la productividad durante el “invierno” ( $1.96 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) no es significativamente diferente a la del “verano” ( $1.62 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Incluso en esta zona se presentan las temperaturas más bajas del Golfo (independientemente de la época del año) y es la zona con mayor

concentración de nutrientes en superficie lo que le permite atraer a gran cantidad de organismos para alimentarse (Álvarez-Borrego, 2010; Escalante *et al.*, 2013).

El flujo de agua superficial aquí es intenso, ya que los flujos de marea deben atravesar zonas estrechas e intercambiar agua de las zonas norte y sur. La parte occidental presenta surgencias frecuentes en comparación a su contraparte, aquí remolinos ciclónicos acarrean aguas frías y ricas en nutrientes en la zona del umbral de San Lorenzo permitiendo valores altos de clorofila (hasta 3.5 mg m<sup>-3</sup>) (Álvarez-Molina *et al.*, 2013; Brusca *et al.*, 2017). En la profundidad, una bifurcación fría proveniente del norte se separa en el Canal de Ballenas hasta el umbral de San Lorenzo y otra llega directamente del norte hasta el umbral, rodeando la isla Ángel de la Guarda y llegando a unirse con la proveniente del Canal; esto produce surgencias permanentes aquí (Álvarez-Molina *et al.*, 2013; Brusca *et al.*, 2017).

En el Canal de Ballenas las concentraciones de oxígeno son altas, incluso a grandes profundidades, aquí no hay zona de mínimo oxígeno, esto asociado a la constante mezcla de mareas (Álvarez-Borrego 1983).

Las loberas distribuidas en esta zona son Granito, Cantiles, Los Machos y el Partido. Se ha observado un decremento poblacional en todas las colonias para las distintas estimaciones (Szteren *et al.*, 2006; Masper *et al.*, 2019; Adame *et al.*, 2020), excepto el Partido, que tiene una condición demográfica estable (Masper *et al.*, 2019).

Zona norte. Es una de las regiones más ricas y productivas en términos biológicos como resultado de distintos fenómenos que interactúan para proveer a los organismos de condiciones óptimas (Brusca *et al.*, 2017). Las condiciones que presenta actualmente permiten definirlo como un estuario inverso, con nulo aporte de agua dulce y alta evaporación (Brusca *et al.*, 2017). En esta región es donde mejor se muestra el impacto de las mareas. La mezcla de mareas puede tener un impacto a una profundidad de hasta 500 m, permitiendo la llegada a la superficie de agua frías y con ello muchos nutrientes, simulando surgencias constantes (Álvarez-Borrego, 2010). El Alto Golfo presenta un rango de marea de aproximadamente 10 m (Lara-Lara *et al.*, 2008; Brusca *et al.*, 2017).

Los vientos de invierno, que impactan la región este, también producen importantes surgencias asimismo los *westerlies* del norte llevan viento frío a la zona del Alto Golfo (Santamaría del Ángel *et al.*, 1994; Brusca *et al.*, 2017). La circulación superficial consiste en giros ciclónicos en el verano y un débil giro anticiclónico de noviembre a marzo (Brusca *et al.*, 2017).

La zona norte es somera con profundidades menores a los 200 m y alta salinidad (promedio de 38 unidades prácticas de salinidad -ups-). Por este motivo, los organismos que aquí habitan, particularmente en los esteros poco profundos, están adaptados a niveles de salinidad altos (Lara-Lara *et al.*, 2008; Brusca *et al.*, 2017).

El Alto Golfo de California proporciona un hábitat para las especies endémicas, así como un refugio para la crianza de muchas especies de interés comercial (Wilkinson *et al.*, 2009). Es aquí donde se encuentra un impacto profundo de la sobreexplotación pesquera, se especula sobre si la disminución del flujo del Río Colorado ha sido el factor fundamental para la degradación de esta zona o solo es una coincidencia y el verdadero culpable es el aumento indiscriminado de la pesca (Wilkinson *et al.*, 2009; Brusca *et al.*, 2017).

En esta zona se encuentran tres loberas que son Rocas Consag, Isla San Jorge e Isla Lobos. Datos anteriores a 2016, indican que Isla San Jorge era una población en crecimiento (Szteren *et al.*, 2006) o con estabilidad (Masper *et al.*, 2019), Rocas Consag era una población en crecimiento (Szteren *et al.*, 2006; Masper *et al.*, 2019), con lo inverso observado para Isla Lobos, donde se ha reportado una disminución (Szteren *et al.*, 2006) o al menos, estabilidad poblacional (Masper *et al.*, 2019). Sin embargo, estas estimaciones difieren con la más reciente de Adame y colaboradores (2020), con datos de hasta 2019, donde se colocan a las tres colonias en disminución poblacional, lo que pone de manifiesto la rapidez con la que pueden darse variaciones demográficas sustanciales de esta especie en la región de estudio.

### 3.1.3. Captura de animales y toma de muestras

En un crucero científico realizado durante 2016, se visitaron las loberas dentro del Golfo de California, México. Esto ocurrió durante el periodo reproductivo

(junio-julio), y se obtuvieron muestras biológicas (sangre, epitelio cervical y pelo) de 47 hembras de lobo marino de California en vida libre (este número de muestras puede variar dependiendo el análisis a realizar, ya que no en todo los casos se obtuvieron muestras iguales). Para este estudio, de las trece loberas solo se pudo obtener muestra en doce de ellas, faltando la de Farallón de San Ignacio. La distribución de muestras en cada lobera se encuentra detallada en el cuadro 3.

Cuadro 3. Relación de las loberas del Golfo de California, México y número de muestras de hembras de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) para el año 2016.

| Sitio de muestreo | N° de muestras |
|-------------------|----------------|
| Rocas Consag      | 4              |
| San Jorge         | 7              |
| Isla Lobos        | 4              |
| Isla Granito      | 3              |
| Los Cantiles      | 4              |
| Los Machos        | 5              |
| El Partido        | 2              |
| El Rasito         | 3              |
| San Esteban       | 3              |
| San Pedro Mártir  | 3              |
| San Pedro Nolasco | 2              |
| Los islotes       | 7              |

Los individuos, todos aparentemente sanos, fueron capturados usando redes de aro y fueron anestesiados con isofluorano o manipulación manual, dependiendo del nivel de estrés que mostrara el organismo en turno. A continuación, cada lobo marino fue revisado por un veterinario capacitado para determinar su estado general de salud y stado reproductivo, y para monitorear sus signos vitales durante la extracción de muestras, lo cual se realizó en un periodo de 10-12 minutos. De cada individuo se obtuvieron muestras de pelo, sangre y mucosa del cérvix. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (México) y se llevaron a cabo bajo permisos (SGPA/DGVS/09004/15 y SGPA/DGVS/11794/19) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales a través de la Dirección General de Vida Silvestre en México.

Especificamente, a los animales se les colectó una muestra de pelo de la parte dorsal, en un área de alrededor de 5 cm x 5 cm. Las muestras de pelo fueron limpiadas con agua destilada y resguardadas para su procesamiento en el laboratorio. Las muestras de sangre se obtuvieron por medio de punción de la vena glútea caudal, extrayendo dos tubos de 7ml por individuo con equipo Vacutainer estéril. Uno de los tubos tenía heparina sódica como anticoagulante para obtener plasma y el otro tubo carecía de anticoagulante y se utilizó para la obtención de suero. Además, se obtuvieron muestras del epitelio genital para la evaluación del estado del mismo. Para este procedimiento, un espéculo estéril fue introducido para visualizar el cérvix y la mucosa cervical fue raspada con un cepillo citológico estéril conforme a lo descrito por Barragán y colaboradores (2016). Las muestras se fijaron con citofix y fueron protegidas de la luz del sol hasta su análisis en el laboratorio.

### 3.1.4. Caracterización celular del epitelio cervical del lobo marino de California

Las muestras obtenidas en el campo y resguardadas fueron teñidas para determinar el estado de transformación del epitelio de cada individuo. El protocolo utilizado fue Papanicolau modificado, y fue realizado de acuerdo con la descripción de Barragán-Vargas (2015). Cada muestra se sumergió en cuatro distintas sustancias: etanol al 80%, etanol al 70%, etanol al 50% y agua destilada cada uno durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante 4 minutos y medio, continuando con un enjuague con agua destilada por 30 segundos. Consecutivamente cada muestra se sumergió en HCl 0.25% seis ciclos para después lavar con agua corriente durante seis minutos, esto con la finalidad de eliminar el exceso de colorante.

A continuación, se repitió el procedimiento inicial de baño en las cuatro sustancias, agregando etanol al 95% y finalizando con tinción por medio del colorante OG6 por 90 segundos. Las muestras se volvieron a sumergir en etanol al 95% por 30 segundos, realizando este procedimiento dos veces. La última tinción fue con colorante EA-50, colocándolo por 90 segundos y

finalizando con un baño por 30 segundo de cada uno de los siguientes reactivos: etanol al 95%, etanol al 100%, xilol-alcohol 1:1 y xilol al 100%. Cada laminilla se dejó secando para colocarle un cubreobjetos y fijando con resina sintética a base de xilol 60%.

Los análisis de estas laminillas fueron realizados por la M. en C. Cecilia Barragán Vargas, la M. en Salud y Producción Animal Sustentable Paulina Martínez Nieves junto con el patólogo Germán Ávila Rosales, como parte de los proyectos de investigación realizados en el Laboratorio de Ecoinmunología y Fisiología de la Conservación, UAQ, y de donde también emana la presente tesis. Estos datos estuvieron disponibles para la presente tesis. Cada diagnóstico fue basado en la clasificación del sistema Bethesda 2001 (Bergeron, 2003), el cual es usado para informar los resultados de citología cervical humana, pero cuya similitud celular con el lobo marino permite el uso para esta especie.

El sistema de clasificación Bethesda ha sido usado desde 1988 y se han realizado a lo largo del tiempo adecuaciones para un diagnóstico más certero. La última actualización fue en el 2001, haciendo cuatro grandes grupos: negativo para lesión intraepitelial, células escamosas atípicas (ASC, por sus siglas en inglés), lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés). El primer grupo, negativo a lesiones, no solo agrupa la ausencia de alteraciones malignas sino también aquellas anomalías benignas o normales. Aquí también se encuentran alteraciones por la presencia de microorganismos y aquellas resultantes por la presencia de dispositivos intrauterinos (Bergeron, 2003; Valer *et al.*, 2005; Cuba, 2019).

El segundo grupo, ASC, se subdivide en dos ASC-US y ASC-H. El primero se dirige a células escamosas atípicas de significado indeterminado, donde se encuentran anormalidades que podrían sugerir lesiones de bajo grado pero cuyo origen no puede esclarecerse con la muestra. El tipo ASC-H son células escamosas atípicas en las cuales no se debe descartar una lesión de grado alto, es decir, una de tipo HSIL. Los últimos dos grupos, LSIL y HSIL, son para clasificar lesiones intraepiteliales escamosas de bajo o alto grado;

este tipo de lesiones se encuentran confinadas a la mucosa cervical sin llegar a la membrana basal (Bergeron, 2003; Valer *et al.*, 2005; Cuba, 2019). Las lesiones de bajo grado presentan una displasia leve, en este grupo también se encuentran las lesiones por VPH (virus de papiloma humano), por otra parte las de alto grado se caracterizan por displasia moderada o severa y carcinoma *in situ* (Valer *et al.*, 2005; Cuba, 2019). Las lesiones de alto grado se suelen asociar a infecciones virales persistentes, las cuales en conjunto pueden influenciar el desarrollo de carcinomas agresivos e invasivos (Bergeron, 2003).

#### **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL**

La hipótesis general de la presente tesis es que la transformación epitelial del cérvix del lobo marino de California es influida por la alimentación, estado nutricio e inflamación.

La predicción es que, dado que existen diferencias en las especies que conforman la dieta de las hembras del lobo marino de California (García-Rodríguez y Auñoles-Gamboa, 2004; Rosas-Hernández *et al.*, 2018; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2024), se espera que estas se vean reflejadas en el estado nutricional de los individuos provocando respuestas diversas del sistema inmune. Estas respuestas desiguales estarán influyendo en el estado inflamatorio y como consecuencia en el grado de transformación epitelial genital.

Dada la hipótesis, el objetivo general de este trabajo fue entender la relación de la inflamación crónica, el estado nutricional y los distintos tipos de dieta en el grado de transformación epitelial del lobo marino de California.

Las hipótesis de trabajo que fueron desafiadas fueron las siguientes:

- 1) La transformación epitelial del cérvix del lobo marino de California adulto se asocia a la posición de la cadena trófica en la cual se están alimentando y la ecorregión en la que se encuentran sus colonias.
- 2) El estado nutricional del lobo marino de California adulto varía de acuerdo con la posición de la cadena trófica en la que se alimentan.
- 3) El estado inmune del lobo marino de California adulto varía de acuerdo con la posición de la cadena trófica en la que se alimentan.
- 4) La transformación epitelial del cérvix del lobo marino de California adulto es influida por la bioquímica de parámetros involucrados con el estado nutricional y el funcionamiento del sistema inmune.

- 5) Los marcadores bioquímicos de la inflamación varían de acuerdo con el estado de transformación epitelial genital.

## **5. DETERMINACIÓN DE LA POSICIÓN TRÓFICA Y ZONA DE ALIMENTACIÓN POR ECORREGIÓN Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE TRANSFORMACIÓN EPITELIAL GENITAL**

### **5.1. Introducción**

Hasta ahora, entre los métodos más utilizados para conocer la dieta del lobo marino de California (*Zalophus californianus*), se utiliza el análisis de estructuras duras en las excretas (Aurioles-Gamboa *et al.*, 1984; García-Rodríguez y Aurioles-Gamboa, 2004; Mellink y Romero-Saavedra, 2005; Espinosa de los Reyes Ayala, 2007; Szteren y Aurioles-Gamboa, 2011). Sin embargo, existen otras herramientas, como los isótopos estables, que permiten determinar el nivel trófico en el cual se alimentan, lo cual también nos puede dar información valiosa de la ecología de las especies en las redes alimenticias (Post, 2002; Kupfer *et al.*, 2006; Newsome *et al.*, 2007; Hyodo, 2015). Varios estudios han encontrado, utilizando esta técnica, información sobre la alimentación de los individuos en un plazo más largo que lo que se puede inferir utilizando excretas. Esto es porque de acuerdo con el tejido analizado, es posible obtener información de días, meses o años. El pelo y el plasma sanguíneo dan información temporal distintas desde días hasta un par de meses aproximadamente, mientras que el pelaje evidencia un plazo mayor, al ser este elemento una característica de formación, desarrollo y eliminación con mayor longevidad indicando un mayor número de meses (Newsome *et al.*, 2007).

El análisis de isótopos estables muestra que el lobo marino de California es un consumidor generalista. Sin embargo, ha permitido identificar algunos hábitos de alimentación especialistas, encontrando zonas de fidelidad para la alimentación por parte de las hembras ( $\delta^{13}\text{C}$ ), en el Golfo de California, además de diferencias temporales (i.e. etapa de embarazo o lactancia) y etarias (Porras-Peters *et al.*, 2008; Rosas-Hernández *et al.*, 2019). Análisis realizados

con plasma de lobo marino de California han mostrado que los individuos de un año o menos de edad presentan valores enriquecidos de  $\delta^{15}\text{N}$  en comparación con los que muestra el resto de las edades, lo que permite inferir la alimentación complementaria con leche materna durante su etapa juvenil temprana; esto también se observa en el pelaje donde los valores menores de  $\delta^{13}\text{C}$  reflejan la combinación de leche y dieta sólida (Orr *et al.*, 2011). Incluso utilizando métodos complementarios, como la espectroscopía de absorción atómica para identificar metales, los cuales asociados con los hábitos de alimentación (obtenidos por isótopos estables), permitieron encontrar patrones de mayor o menor concentración de metales en ciertas zonas explicando esto a través del tipo de alimentación consumida o de procesos fisiológicos asociados a estos organismos (Elorriaga-Verplancken y Auriolles-Gamboa, 2008).

Se tienen datos sobre la dieta de las poblaciones de lobo marino de California en sus distintas ubicaciones, principalmente en el Golfo de California y en la costa Sur de California. Estudios realizados en el Golfo de California han confirmado, tanto por métodos de excretas como por isótopos estables, cambios en la posición trófica y en las zonas de alimentación (pelágica o costera; García-Rodríguez y Auriolles-Gamboa, 2004; Porras-Peters *et al.*, 2008). Szteren y Auriolles-Gamboa (2011), presentaron una regionalización del Golfo con base en aspectos como concentraciones de clorofila, presencia de contaminantes, características de las poblaciones y diferencias en la alimentación; encontrando cuatro zonas: Norte con diversidad de dieta,  $\delta^{15}\text{N}$  alto y  $\delta^{13}\text{C}$  medio a alto, Ángel de la Guarda con diversidad de dieta baja a media y  $\delta^{13}\text{C}$  bajo, Golfo Central diversidad de dieta alta,  $\delta^{15}\text{N}$  bajo y  $\delta^{13}\text{C}$  alto y Golfo Sur con diversidad alta en dieta,  $\delta^{15}\text{N}$  alto y  $\delta^{13}\text{C}$  de medio a bajo. A pesar de las diferencias entre las zonas, se puede decir que, en general, la dieta del lobo marino dentro del Golfo de California se basa principalmente en peces pelágicos, seguido por los cefalópodos, y finalmente por crustáceos (García-Rodríguez y Auriolles-Gamboa, 2004; Espinosa de los Reyes Ayala, 2007). Entre las especies más consumidas se encuentran *Porichthys* sp., *Pomadasys panamensis*, el calamar *Loligoopsis diomedaeae*, *Trichiurus lepturus*,

*Sardinops caeruleus*, *Engraulis mordax*, *Scomber japonicus*, *Cetengraulis mysticetus* y *Trachurus symmetricus* (García-Rodríguez y Auriolés-Gamboa, 2004; Mellink y Romero-Saavedra, 2005).

En cuanto a la zona de California, los sitios más estudiados han sido las Islas del Canal, la Bahía de Monterey y las islas del Sureste de Los Farallones, zona donde se encuentran las loberas reproductoras más activas. Aquí se ha encontrado que las presas que se juntan en cardúmenes (sardinas, anchoas y calamares) son las preferidas ya que normalmente se encuentran a poca distancia de las loberas (Antonelis y Fiscus, 1980; Lowry y Carretta, 1999). También hay una importante participación (entre las primeras diez especies) en la dieta por parte de los salmonidos, los cuales varían en importancia dependiendo la temporada (alta en verano y otoño y baja en primavera e invierno; Weise, 2000; Weise y Harvey, 2008). En la zona de Monterey se encuentra una dieta dominada por las sardinas del Pacífico *Sardinops sagax* y por el calamar de mercado *Loligo opalescens*. Seguidas, en importancia, varios miembros del género *Sebastodes* sp., las anchoas *Engraulis mordax*, la merluza del Norte *Merluccius productus*, el arenque del Pacífico *Trachurus symmetricus* y el salmón *Oncorhynchus* sp. (Antonelis y Fiscus, 1980; Lowry y Carretta, 1999; Weise, 2000; Weise y Harvey, 2008). Se ha encontrado que en zonas donde hay preferencia de calamares existe una baja disponibilidad de sardinas y anchoas, mientras que cuando hay una alta disponibilidad de estas, los animales no consumen tanto calamar. Este fenómeno se ha asociado a la calidad del alimento, sardinas y anchoas tienen mayor contenido calórico y alto contenido en grasa en comparación con el calamar o la merluza (McClatchie *et al.*, 2016). Como se ha mencionado anteriormente el lobo marino está altamente ligado a las variaciones del ambiente, lo que impacta la disponibilidad de las presas encontrando cambios en su alimentación dependiendo la época del año o incluso ante la presencia de fenómenos como “El Niño” (Weise, 2000; Weise y Harvey, 2008; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016).

Si se considera esta variabilidad en calidad y cantidad de presas de las distintas zonas que habita el lobo marino de California, y se toma el ejemplo del ser humano donde este cambio en el estilo de vida favorece el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Se plantea como el objetivo de este capítulo establecer si existe una diferencia del estado de transformación epitelial con respecto a la posición trófica y las diferentes zonas de alimentación (pelágica o costera) en las regiones ecológicas establecidas para el Golfo de California.

## 5.2. Métodos

En el Capítulo 3 pueden leerse detalles sobre la zona de muestreo, las técnicas de captura y la colecta y procesamiento de las muestras.

### 5.2.1. Determinación de la posición trófica y zona de alimentación.

Después de resguardar las muestras de pelo en el campo, el análisis fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Química del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) de La Paz, BCS. En el laboratorio las muestras fueron limpiadas con agua desionizada y colocadas en microtubos tipo Eppendorf de 2 ml (estos tubos fueron preparados con jabón libre de fosfato y agua destilada, así como mezcla crómica). Nuevamente se lavaron con cloroformo-metanol (1:1) para eliminar impurezas de lípidos dejadas por la piel. Posteriormente se pusieron a secar para evaporar residuos del solvente. Doce horas después, las muestras se cortaron y se homogeneizaron en un mortero ágata; todo esto se realizó en una campana de flujo laminar para evitar contaminación. Posteriormente se pesaron, en una microbalanza de precisión, entre 0.8 y 1.2 mg de cada muestra, que fue colocada en una microcápsula de estaño de 8 x 5 mm.

Las microcápsulas fueron enviadas para su análisis por medio de un espectrómetro de masas de razones isotópicas en el Laboratorio de Isótopos Estables de la Universidad de Nuevo México en EEUUAA. Por otra parte, durante el crucero, se tomaron muestras de zooplancton alrededor de las colonias de Rocas Consag, Isla Lobos, Los Cantiles, Los Machos y el Partido;

para las colonias sureñas se utilizaron los datos reportados por Whitehead *et al.* (2018) con la finalidad de obtener el nivel trófico de los organismos muestreados. El procesamiento de las muestras fue similar a las del pelo (desecación, homogenización y colocación en microcápsulas).

Los análisis resultantes fueron expresados con el valor de delta en la proporción de  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , de acuerdo a la siguiente fórmula de DeNiro y Epstein (1978):

$$\delta X = [(R \text{ muestra} / R \text{ estándar}) - 1] \times 10^3$$

donde  $\delta X$  corresponde al valor de  $\delta^{15}\text{N}$  y de  $\delta^{13}\text{C}$ , en cada análisis, el cual se refiere a la diferencia expresada en partes por mil (‰) entre la muestra estándar y la evaluada de  $^{15}\text{N}$  y de  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. A su vez  $R$  muestra y  $R$  estándar representan la diferencia del isótopo pesado respecto al ligero ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ).

Los estándares utilizados son reconocidos internacionalmente para evitar variaciones en la medición en diferentes lugares. Estos valores son, para el caso del carbono, el Belemnita de la formación PeeDee (PDB) con un valor de 0.011‰ y para el nitrógeno, el estándar es el nitrógeno atmosférico con un valor de 0.004‰ (DeNiro y Epstein, 1978). Adicionalmente el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  fue utilizado para que, junto con los valores de zooplancton de cada sitio y aplicando el algoritmo de Post (2002), fuera calculado el nivel trófico por colonia (Sandoval, 2018). Dicho algoritmo se explica a continuación;

$$NT = \frac{(\delta^{15}\text{N consumidor} - \delta^{15}\text{N organismo base})}{3.4} + 2.0$$

donde  $\delta^{15}\text{N consumidor}$  se refiere al valor obtenido del análisis de isótopos de la muestra de pelo de las hembras adultas de lobo marino,  $\delta^{15}\text{N organismo base}$  hace referencia al valor de análisis de isótopos de las muestras de zooplancton como consumidor primario del sitio de muestreo (como ya se explicó para algunos sitios fueron asociadas muestras de lugares cercanos) y el valor de 3.4 se refiere al fraccionamiento isotópico promedio, que se ha calculado, ocurre a lo largo de la cadena trófica desde los organismos base

hasta los depredadores tope (Minagawa y Wada, 1984). Las muestras de zooplancton para el año 2016 se especifican en el cuadro 4, donde se indica de donde se obtuvo la muestra y para aquellas sin muestra se le asoció a la lobera más cercana geográficamente.

Cuadro 4. Asociación de las colonias del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) del Golfo de California, México, con las muestras de zooplancton utilizadas para obtener el nivel trófico en cada sitio.

| <b>Sitio de muestreo</b> | <b>Muestra de zooplancton</b> |
|--------------------------|-------------------------------|
| Rocas Consag             | Rocas Consag                  |
| San Jorge                | Rocas Consag                  |
| Isla Lobos               | Isla Lobos                    |
| Isla Granito             | Los Cantiles                  |
| Los Cantiles             | Los Cantiles                  |
| Los Machos               | Los Cantiles                  |
| El Partido               | El Partido                    |
| El Rasito                | El Partido                    |
| San Esteban              | El Partido                    |
| San Pedro Mártir         | El Partido                    |
| San Pedro Nolasco        | Los Islotes                   |
| Los Islotes              | Los Islotes                   |

#### 5.2.2. Agrupación de colonias reproductivas en zonas con mayor disturbio antrópico y menor disturbio antrópico

Con la finalidad de explorar si dentro del Golfo, además de las ecorregiones ya descritas, podría haber agrupaciones por nivel de disturbio antrópico, se realizó una separación longitudinal. De esta forma las loberas localizadas en zonas cercanas a áreas con impacto antrópico que pudiera tener un efecto en la ecología alimentaria de la especie, como zonas de desarrollo agrícola, ganadera y asentamientos humanos grandes, se agrupaban en la parte norte y este del litoral del Golfo de California, mientras que las loberas en zonas sin disturbio (p.ej. asentamientos humanos con pocos habitantes, poca actividad

agrícola y ganadera y turismo de bajo impacto), se agrupaban en la costa oeste del Golfo.

La ubicación de las ecorregiones descritas con anterioridad (sección 3.1.2.) como las de esta nueva distribución se pueden ver en la Fig. 2 (sección 3.1.2.). Específicamente para esta nueva distribución quedaron las loberas de la siguiente forma; zona de no disturbio: Lobos, Granitos, Cantiles, Machos, Partido, Rasito y Los Islotes y zona de disturbio: San Jorge, Rocas Consag, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco y San Esteban.

### 5.2.3. Análisis estadísticos

En este capítulo se desafió la siguiente hipótesis de trabajo: *La transformación epitelial del cérvix del lobo marino adulto se asocia a la posición de la cadena trófica en la cual se están alimentando y a la ecorregión en la que se encuentran sus colonias*. Para desafiarla, primero se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las variables respuesta. Posteriormente, se comparó el nivel trófico y el  $\delta^{13}\text{C}$  de las hembras adultas de lobo marino de California entre regiones utilizando ANOVA unidireccional y entre zonas de disturbio (mayor disturbio antrópico vs. menor disturbio antrópico) utilizando pruebas t de dos colas. Se comparó la prevalencia de OtHV-1, la categoría de diagnóstico citológico, la abundancia de coilocitos y de células binucleadas entre regiones ecológicas y entre zonas de disturbio mediante tablas de contingencia y se calculó la probabilidad exacta (mediante Fisher exacta) para cada tabla. También se calculó la razón de monios (OR, por sus siglas en inglés) y los intervalos de confianza al 95% cuando las diferencias en la prevalencia fueron significativas.

Se construyeron modelos lineales generalizados independientes para desafiar las siguientes hipótesis de trabajo: el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (como proxy de zona de alimentación; variable numérica discreta) y nivel trófico (variable numérica discreta) explica i) la presencia o ausencia de OtHV-1 en el epitelio cervical, ii) la presencia o ausencia de coilocitos y iii) la presencia o ausencia de células binucleadas en el epitelio cervical de las hembras adultas de lobo marino de California. Los modelos se construyeron teniendo en cuenta la

región ecológica (variable categórica nominal) y la zona de disturbio (variable dicotómica categórica) a la que pertenece cada colonia, así como interacciones bidireccionales.

Se realizaron 1,000 permutaciones con el fin de asignar al azar las loberas en dos grupos: A ó B. Esto se hizo para determinar la probabilidad de que la asignación longitudinal por grado de impacto antrópico no reflejara una asignación azarosa. Posteriormente se repitieron los análisis para las variables respuestas ( $\delta^{13}\text{C}$ , nivel trófico, OtHV-1, coilocitos, células binucleadas, estado epitelial cervical) utilizando los grupos seleccionados como variable explicativa. Se creó una distribución de valores p bajo la hipótesis nula de que no existe relación entre los nuevos grupos de ubicación y cada variable respuesta. En cada permutación, se ajustó un modelo de regresión logística a los datos con la variable de agrupación (A ó B) como predictor para la variable respuesta. El valor p para cada modelo se calculó mediante una prueba de razón de verosimilitud. La distribución resultante de los valores p se comparó con los valores p obtenidos de los modelos originales para determinar si la asociación entre las agrupaciones aleatorias y la variable respuesta era significativa o no.

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital**

De las 47 muestras de epitelio obtenidas y por medio del método Bethesda 2001, solo se pudieron diagnosticar 40 ya que el resto de las muestras se encontraban degradadas, lo que impedía un análisis certero. De las 40, 19 fueron diagnosticadas como negativas a lesiones epiteliales (N), 14 con presencia de células escamosas atípicas (ASC) y 7 con lesiones epiteliales de bajo grado (LSIL) (Cuadro 5).

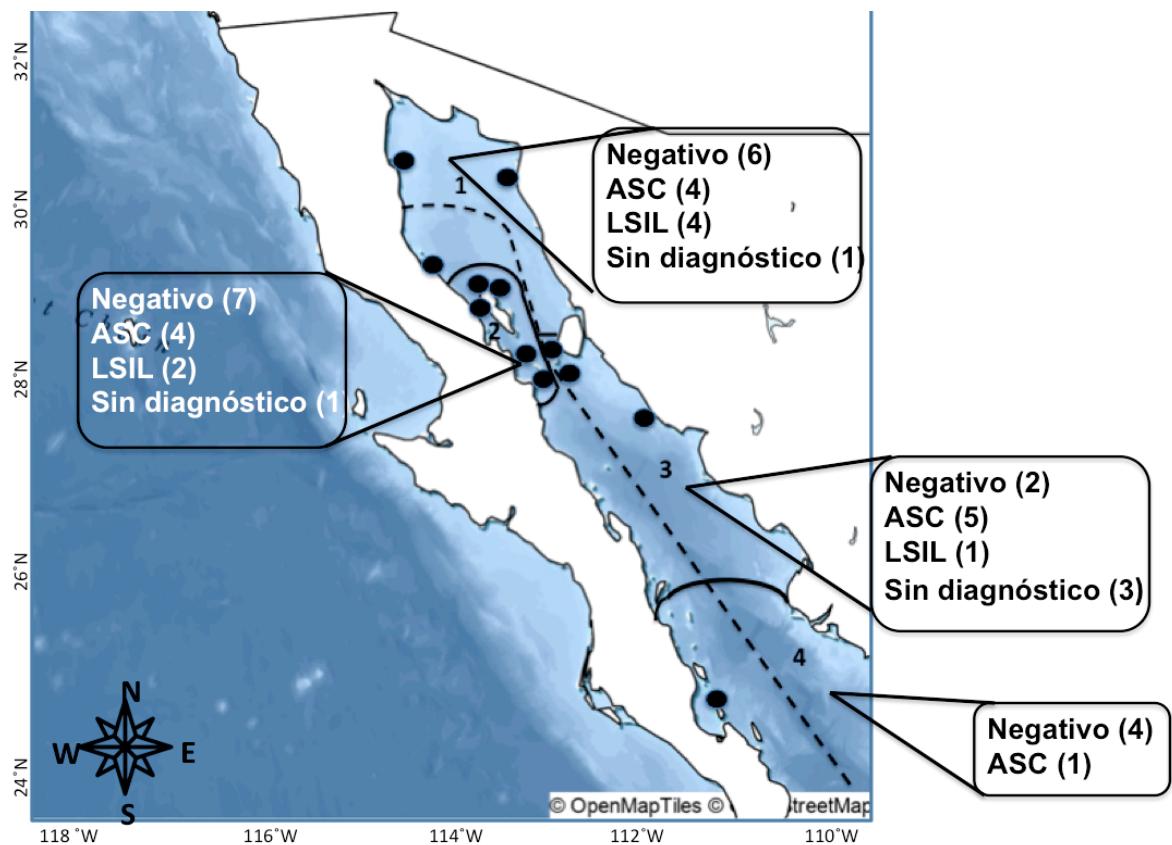


Figura 3. Distribución a lo largo del Golfo de California del diagnóstico del estado del epitelio cervical de los lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) según el método Bethesda. Se especifica el grado de transformación epitelial y el número de muestras (entre paréntesis) recolectadas en cada ecorregión.

En la figura anterior, se puede observar que mientras en la región sur no hay LSIL, en la región norte se encuentra el mayor número de diagnósticos. Por otra parte, ASC tiene mayor presencia en la región central y la menor en la región sur. Finalmente, el mayor número de epitelios negativos (sin cambios aparentes) están en la región de grandes islas y su contraparte se presenta en la región central.

### 5.3.2. Posición trófica y zona de alimentación por ecorregión y por zona de disturbio

Tras realizar los análisis de isótopos correspondientes, los valores mínimos y máximos de  $\delta^{13}\text{C}$  fueron  $-15.99\text{\textperthousand}$  y  $-13.65\text{\textperthousand}$ , respectivamente, con un promedio de  $-14.09\text{\textperthousand}$ . Por otra parte, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  se distribuyeron de  $19.42\text{\textperthousand}$  hasta  $21.9\text{\textperthousand}$  promediando  $20.9\text{\textperthousand}$ . En el cuadro 5 se puede observar que, para ambas mediciones de isótopos,  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , las regiones más extremas son las del norte y del sur. En el caso de  $\delta^{15}\text{N}$ , los niveles más altos están en la región norte mientras que los más bajos son en la región sur; en cuanto al valor de  $\delta^{13}\text{C}$  los valores son al revés, es decir, el valor más alto es en la región sur y el más bajo se presenta en el norte.

Cuadro 5. Promedio e intervalo de confianza de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\text{\textperthousand}$ ) de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) por región muestreada en el Golfo de California.

| Región               | $\delta^{13}\text{C}$ Promedio<br>con I.C. ( $\text{\textperthousand}$ ) | $\delta^{15}\text{N}$ Promedio<br>con I.C. ( $\text{\textperthousand}$ ) |
|----------------------|--|--|
| Región Norte         | -13.88 (-14.11 a -13.65)   | 21.65 (21.4-21.9)  |
| Región Grandes Islas | -14.10 (-14.27 a -13.92)   | 20.58 (20.17-20.9)   |
| Región Central       | -13.99 (-14.19 a -13.79)   | 20.73 (20.45-21.01)  |
| Región Sur           | -14.85 (-15.99 a -13.71)   | 19.82 (19.42-20.22)  |

Como ya se había mencionado, el valor promedio de  $\delta^{15}\text{N}$  de las hembras junto con el del zooplancton, utilizando el algoritmo de Post (2002) permitió el cálculo del nivel trófico por región (Sandoval, 2018). Estos datos se presentan en el cuadro 6, donde se puede observar que el nivel más alto se encuentra en la región sur (4.3) mientras que el nivel más bajo calculado es para la región central (3.9) del Golfo de California.

Cuadro 6. Valor promedio e intervalo de confianza del nivel trófico calculado para las cuatro regiones del Golfo de California con colonias reproductoras del lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

| Región               | Nivel trófico promedio con I.C. |
|----------------------|---------------------------------|
| Región Norte         | 4.06 (3.93-4.19)                |
| Región Grandes Islas | 4.2 (3.83-4.56)                 |
| Región Central       | 3.9 (3.49-4.3)                  |
| Región Sur           | 4.3*                            |

\*Este valor es el obtenido del algoritmo ya que solo se tuvo datos de Los Islotes

Los ANOVA realizados para investigar si el estado epitelial cervical variaba de acuerdo con el nivel trófico mostraron una relación significativa entre el estado de transición del epitelio, el nivel trófico y la región de muestreo (Cuadro 7 y Fig. 4 y 5). En la figura 4 se observa la asociación de transformación contra el nivel trófico donde no hay un patrón de asociación, aunque se puede ver que la mediana de LSIL y de ASC es similar mientras que la de N tiene valores ligeramente más bajos, sin llegar a ser estadísticamente significativo. Esto cambia al involucrar la región de muestreo (Fig. 5). Aquí podemos ver que en algunas regiones, como la norte y la de las grandes islas, a mayor nivel trófico hay presencia de transformación del tipo LSIL; por otra parte en niveles más bajos se presentan transformaciones negativas o ASC. Para las otras dos regiones esta relación no es tan clara, como en la región sur, donde no hay presencia de tipo LSIL impidiendo comparar su valor con respecto al tipo negativo. Caso similar el de la región central, donde se tienen los tres tipos de transformación, pero sin una relación precisa del impacto del nivel trófico.

Cuadro 7. Análisis de varianza en relación al estado epitelial genital con el nivel trófico y con la región de la lobera. En sombreado se muestra la relación estadísticamente significativa, P (<0.05).

| Variable             | GL | Sum Cuad | Media Cuad | Valor F | P (<0.05) |
|----------------------|----|----------|------------|---------|-----------|
| Nivel Trófico        | 1  | 0.116    | 0.116      | 0.248   | 0.621     |
| Región               | 3  | 3.043    | 1.014      | 2.163   | 0.111     |
| Nivel Trófico:Región | 2  | 3.761    | 1.880      | 4.010   | 0.027     |
| Residuales           | 33 | 15.478   | 0.469      |         |           |

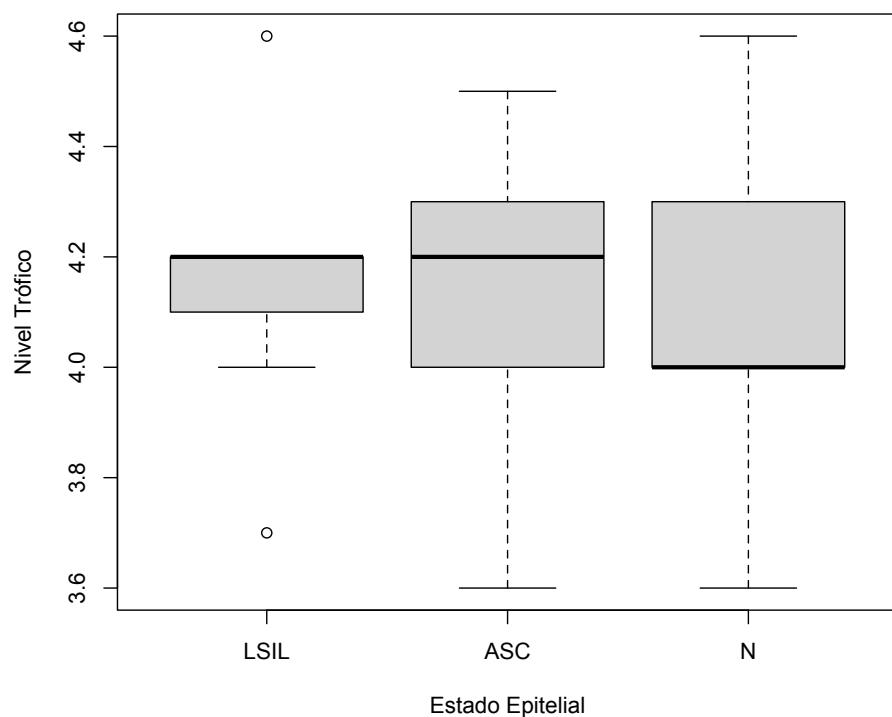


Figura 4. Asociación del estado de transición epitelial (LSIL= Displasia celular, ASC= Atipia celular, N= Negativo a células atípicas) con relación al nivel trófico del lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

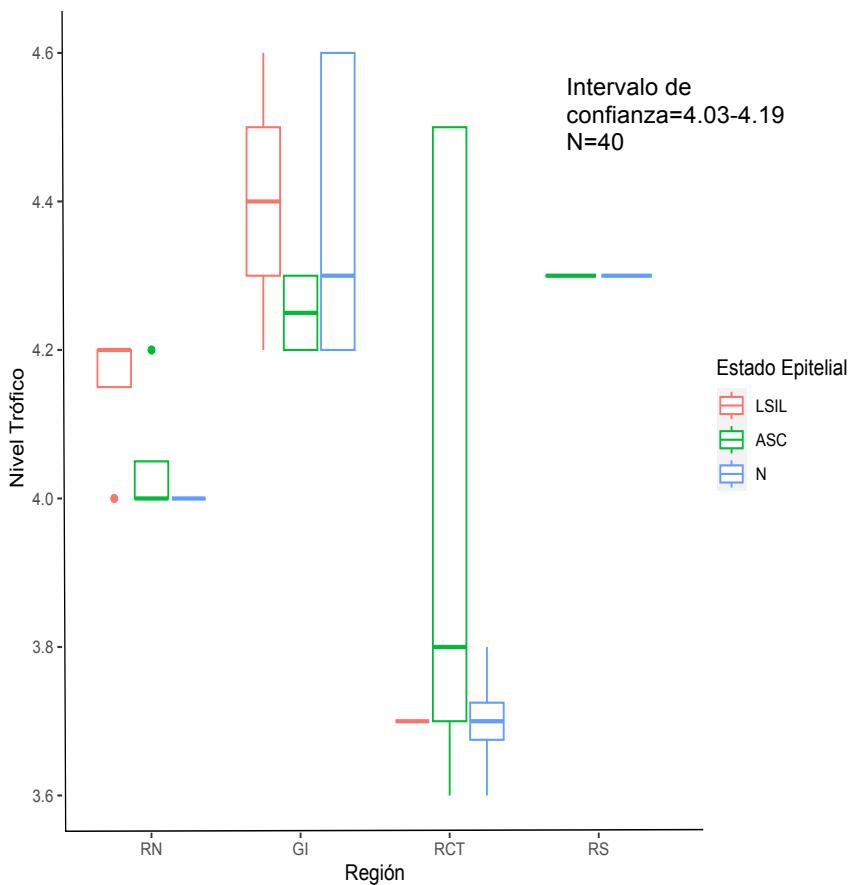


Figura 5. Agrupación del estado epitelial genital (LSIL= Lesión epitelial de bajo grado, ASC= Presencia de células atípicas y N= Negativo a células atípicas) con relación al nivel trófico y a la región de muestreo (RN= Región Norte, GI= Grandes Islas, RCT= Región Central, RS= Región Sur) del lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

Con relación al estado del epitelio genital y el  $\delta^{13}\text{C}$  (uso de zona pelágica o costera) no se encontró asociación significativa. Esto tampoco se observó al incluir la región de muestreo (Cuadro 8). La figura 6 y 7 muestran niveles similares de  $\delta^{13}\text{C}$  tanto en los tres estados de transición epitelial (Fig. 6) como en las regiones (Fig. 7). Aún así esta última figura muestra en la región sur niveles de  $\delta^{13}\text{C}$  con valores más negativos (sin llegar a ser significativos). En cuanto a la asociación de  $\delta^{13}\text{C}$  y nivel trófico con la cercanía o no a zonas de disturbio no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las dos variables ( $\delta^{13}\text{C}$  T-test;  $t=0.98$ ,  $gl=37.69$ ,  $p=0.33$ / nivel trófico T-Test;  $t=-1.29$ ,  $gl=35.79$ ,  $p=0.21$ ).

Cuadro 8. Análisis de varianza en relación al estado epitelial genital con el  $\delta^{13}\text{C}$  y con la región de la lobera.

| Variable                             | GL | Sum Cuad | Media Cuad | Valor F | P (<0.05) |
|--------------------------------------|----|----------|------------|---------|-----------|
| $\delta^{13}\text{C}$                | 1  | 0.233    | 0.233      | 0.373   | 0.545     |
| Región                               | 3  | 1.736    | 0.578      | 0.925   | 0.439     |
| $\delta^{13}\text{C}: \text{Región}$ | 3  | 0.417    | 0.138      | 0.222   | 0.880     |
| Residuales                           | 32 | 20.013   | 0.625      |         |           |

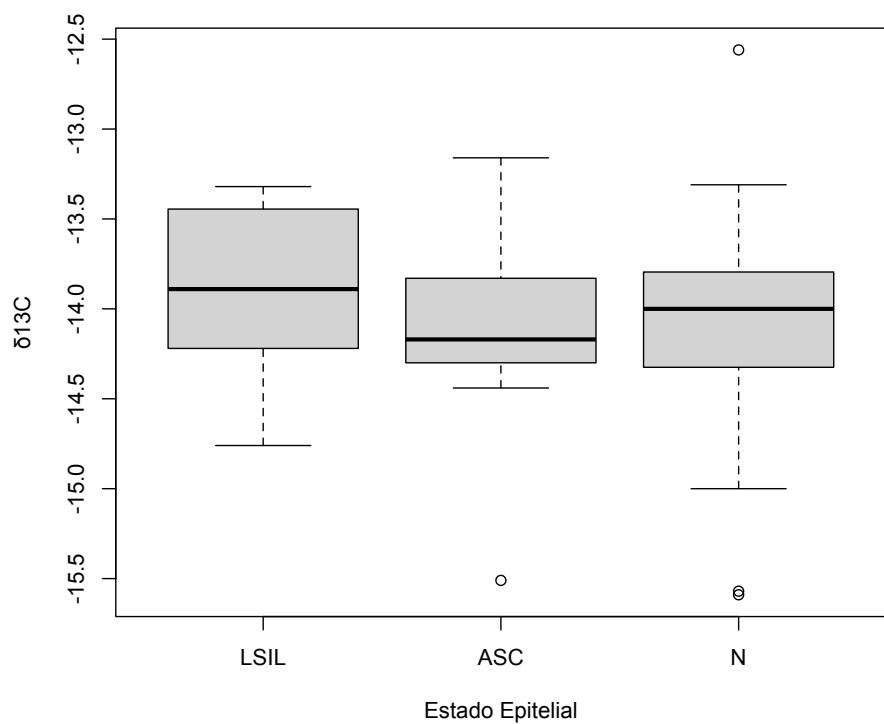


Figura 6. Asociación del estado de transición epitelial (LSIL= Displasia celular, ASC= Atipia celular, N= Negativo a células atípicas) con relación a la señal isotópica del  $\delta^{13}\text{C}$  en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

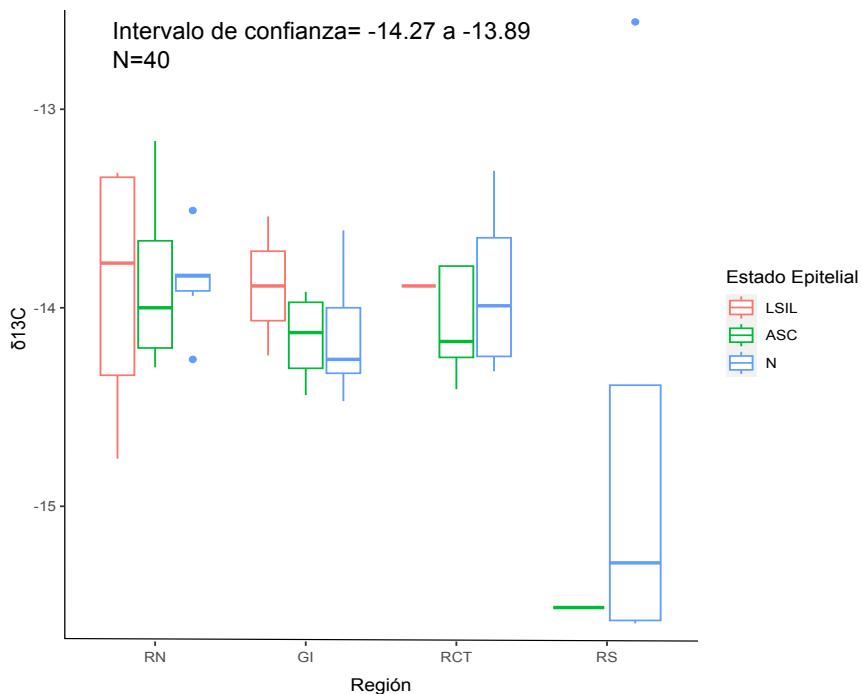


Figura 7. Agrupación del estado epitelial genital (LSIL= Lesión epitelial de bajo grado, ASC= Presencia de células atípicas y N= Negativo a células atípicas) con relación a la señal de  $\delta^{13}\text{C}$  y a la región de muestreo (RN= Región Norte, GI= Grandes Islas, RCT= Región Central, RS= Región Sur).

### 5.3.3. OtHV-1, estado del epitelio, coilocitos y células binucleadas asociadas a ecorregiones y zonas de disturbio

Al ser esta tesis parte de un trabajo mayor se contaba con datos adicionales como la presencia o ausencia de ADN de OtHV-1 en el tejido, así como el análisis de tipos celulares cuya presencia indica una transformación celular; específicamente la presencia de células binucleadas, y de células asociadas a la presencia del virus de la familia Papillomaviridae, es decir, de coilocitos. Se encontró que la prevalencia de OtHV-1 varió significativamente entre regiones ecológicas (Chi-sq = 8.52, gl = 3, p=0.036; Fig. 8A), y también si las colonias estaban en la zona perturbada o no (Chi-sq = 3.81, gl = 1, p = 0.03; Fig. 8B).

Por lo cual, los lobos marinos de la zona perturbada tienen 13 veces más riesgo de infectarse en comparación con las no perturbadas (OR = 13.63; IC 95% = 0.72–257.8).

La prevalencia de ASC, LSIL y N no varió entre regiones ecológicas (Chi-sq = 8.44; gl = 6, p=0.167), aunque hubo una tendencia aparente en la que los casos de LSIL aumentaron latitudinalmente, estando ausente en la región Sur y más alto en la región Norte (Fig. 8C). En cuanto a la prevalencia de cada clase de diagnóstico epitelial, esta varió si las colonias estaban dentro de la zona perturbada o no (Chi-sq = 6.31; df = 4; p = 0.04; Fig. 8D), teniendo los lobos marinos de esas colonias más de ocho veces el riesgo de LSIL en comparación con tener un epitelio normal (OR = 8.13; IC 95% = 1.21–83.03).

La prevalencia de coilocitosis no varió significativamente entre regiones (Chi-sq = 6.74; df = 3; p=0.08; Fig. 9A), pero si lo hizo según la ubicación de las colonias dentro de la zona perturbada o no (Chi-sq = 6.81, gl = 1, p = 0.009; Fig. 9B). Es así que los lobos marinos de esas colonias tenían casi 10 veces más riesgo de tener coilocitos (OR = 9.82; IC 95 % = 1.92 – 83.49). La prevalencia de células binucleadas varió entre las regiones ecológicas (Chi-sq = 10.03; df = 3; p = 0.02; Fig. 9C), siendo más baja en las regiones Sur (22.22%) y Grandes Islas (18.18%), y más alta en la región norte (80%). De manera similar, hubo diferencias en la prevalencia de células binucleadas según la posición de las colonias dentro de la zona perturbada o no (Chi-sq = 11.29, gl = 1, p=7.8 x 10<sup>-4</sup>; Fig. 9D), con lobos marinos de aquellas colonias teniendo más de 13 veces el riesgo de tener células binucleadas (OR = 13.34; IC 95% = 3.04 – 75.39).

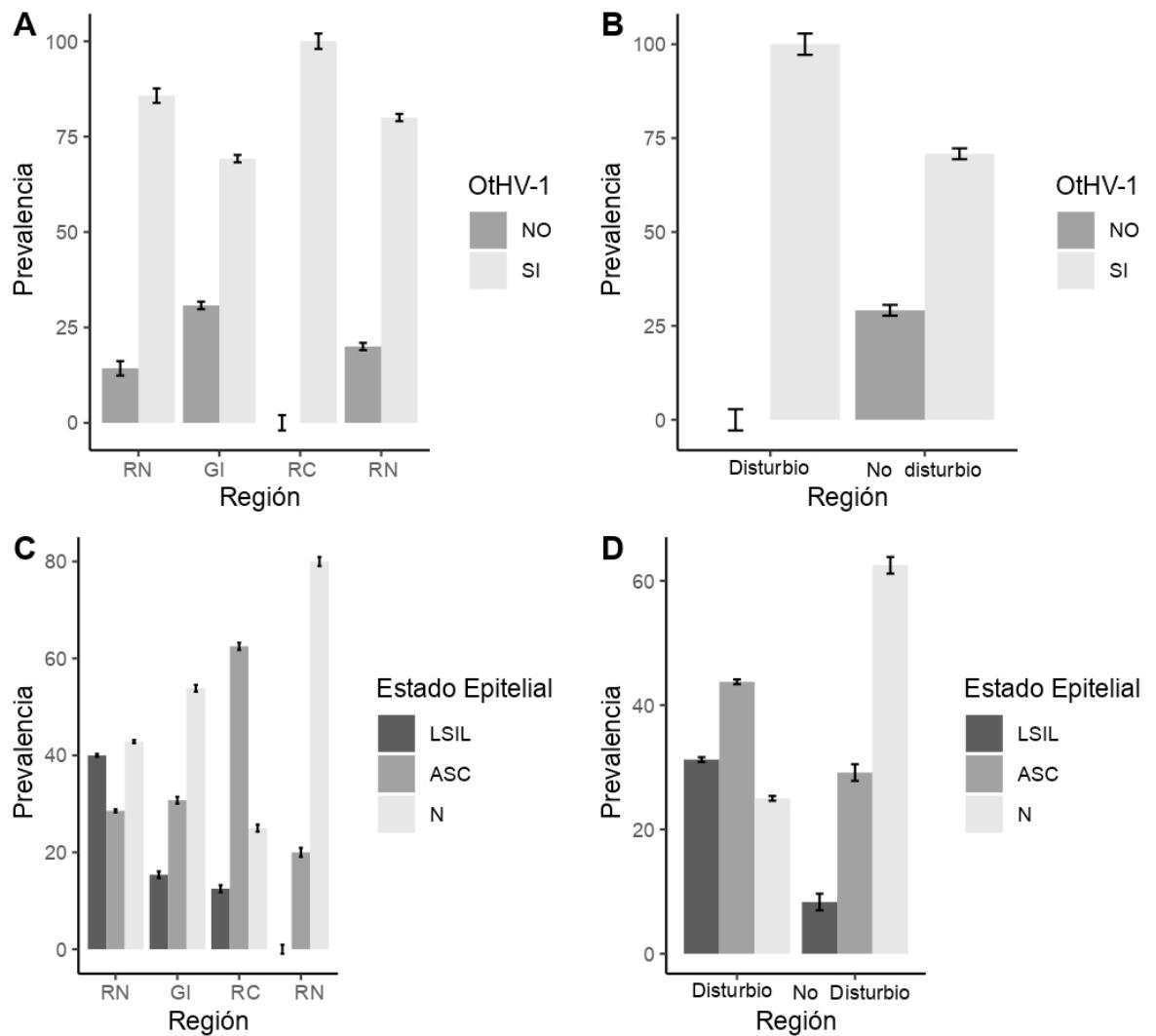


Figura 8. Diferencias espaciales en la prevalencia de OtHV-1 y los diagnósticos epiteliales cervicales de lobos marinos de California hembras adultas. A) OtHV-1 entre regiones ecológicas. B) OtHV-1 según la ubicación de las colonias en la zona perturbada o en la zona menos perturbada. C) ASC, LSIL y N entre regiones ecológicas. D) ASC, LSIL y N según la ubicación de sus colonias.

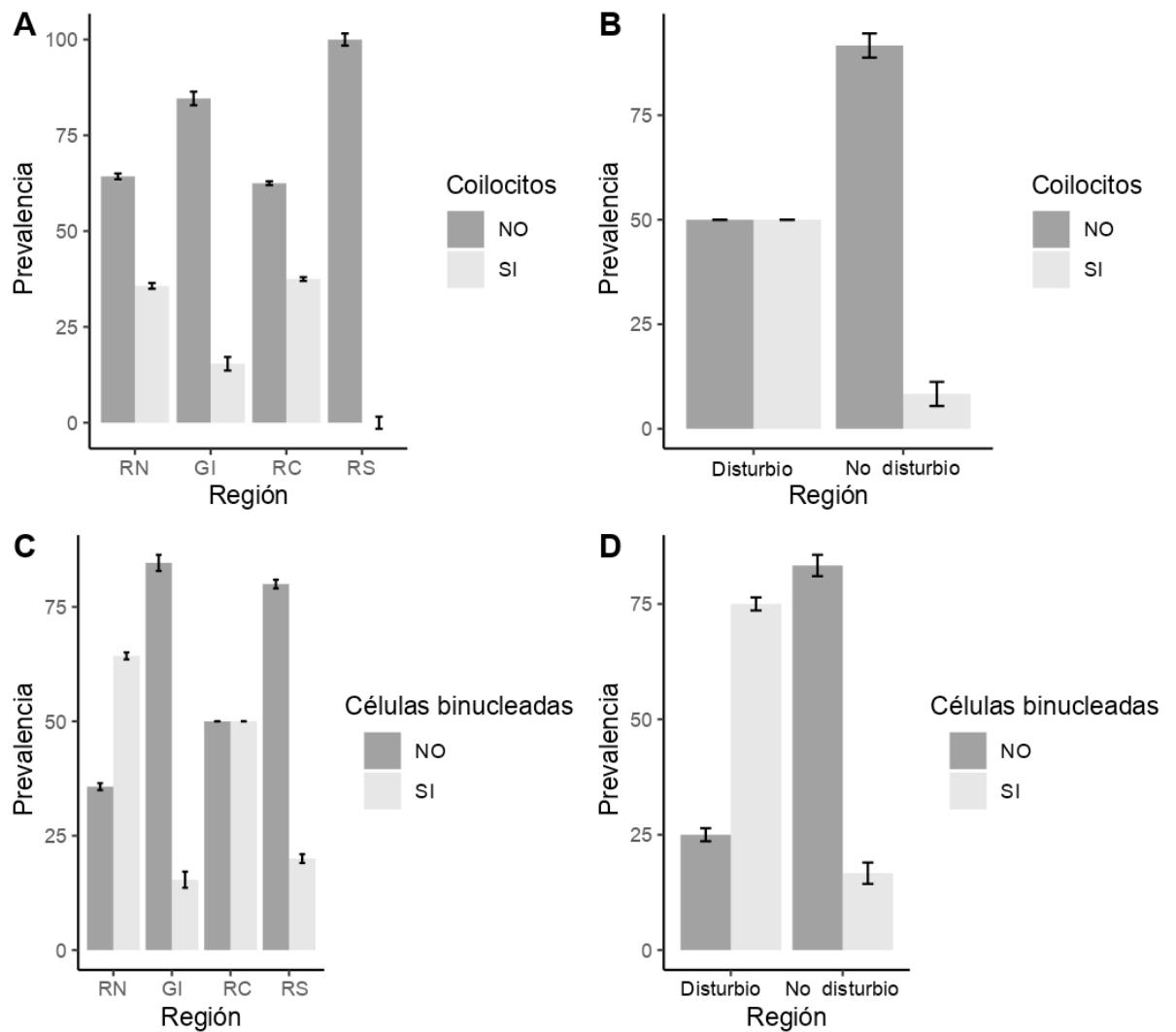


Figura 9. Diferencias espaciales en la prevalencia de tipos celulares anormales en el epitelio cervical de lobos marinos de California hembras adultas. A) Coilocitosis entre regiones ecológicas. B) La coilocitosis según la ubicación de sus colonias en la zona perturbada o en la menos perturbada. C) Prevalencia de células binucleadas entre regiones ecológicas. D) La prevalencia de células binucleadas según la ubicación de las colonias.

La infección por OtHV-1 fue predicha por la región ecológica ( $p=0.024$ ),  $\delta^{13}\text{C}$  y el nivel trófico no tuvieron valor predictivo para la infección por sí solos ( $p>0.05$  para cada término), pero muestran una interacción significativa ( $p=0.017$ ). La ubicación de la colonia predijo la infección por OtHV-1 ( $p =$

0.004), una vez más sin efecto de  $\delta^{13}\text{C}$  ni del nivel trófico ( $p>0.05$  para cada término) y sin interacción bidireccional significativa entre los términos.

La presencia de células binucleadas se predijo por región ecológica ( $p=0.002$ ) y ubicación de la colonia ( $p=3.07\times 10^{-5}$ ), sin efecto de  $\delta^{13}\text{C}$  ni del nivel trófico ( $p>0.05$  para cada término) y sin interacciones significativas. La presencia de coilocitos fue predicha por la región ecológica de las colonias de lobos marinos ( $p=0.021$ ) sin efecto de  $\delta^{13}\text{C}$  ni del nivel trófico por sí solos ( $p>0.05$  para cada término) pero sí una interacción significativa entre nivel trófico y región ( $p = 0.002$ ). Respecto a la ubicación de la colonia, esta predijo la presencia de coilocitos ( $p = 0.002$ ) sin efecto individual ni de interacción entre el nivel trófico y el  $\delta^{13}\text{C}$ .

#### **5.4. Discusión**

El uso de diversas herramientas para determinar las redes tróficas en un ecosistema nos permite tener una perspectiva más amplia de la dinámica que ocurre entre los organismos. En este capítulo se determinó como, por medio del análisis de isótopos estables del pelaje de hembras de lobo marino de California, se pueden obtener resultados que dan claves acerca del impacto del alimento para el potencial desarrollo de una patología determinada. Aunque este tipo de análisis no permite determinar las presas a nivel de especie, se generaron interrogantes que justifican evaluar si esa es la clave para el desarrollo del carcinoma que padecen estos organismos.

La ausencia de diferencias significativas para el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  indica que la transformación epitelial no está asociada a la zona (costera-pelágica) donde se encuentren alimentando las hembras de lobo marino de California entre las distintas regiones y zonas alrededor de las loberas. Aún así, fue posible observar una tendencia en la zona sur, donde los animales buscan salir hacia zonas más pelágicas (alejadas de la costa) para buscar alimento. Esto coincide con lo observado por Cruz-Vallejo (2024) en un estudio de señales isotópicas en lobos marinos de Los Islotes a lo largo de varios años. Por otra parte, al analizar el nivel trófico se encontraron diferencias estadísticas, específicamente al asociar la región de muestreo y el grado de transformación del epitelio cervical. En el ecosistema del Golfo de California los valores bajos de nivel

trófico se relacionan al consumo de peces pelágicos menores, tales como sardina del Pacífico (*Sardinops sagax*) o anchoveta norteña (*Engraulis mordax*) (García-Rodríguez y Auriolos Gamboa, 2004), los cuales contienen niveles de grasa y nutrientes más altos en comparación con otras presas de niveles tróficos superiores (McClatchie *et al.*, 2016). Con los resultados obtenidos en este capítulo se podría evidenciar que el consumo de alimentos con alta calidad de nutrientes favorece un nulo proceso de transformación celular. Esto se manifiesta, principalmente, en las regiones norte y la región de las grandes islas donde la presencia de estas especies es mayor a diferencia de la zona sur (García-Rodríguez y Auriolos Gamboa, 2004; Szteren *et al.*, 2006). Con base en esto, se esperaría que estas zonas, donde se ha reportado la presencia de especies de alto valor nutricional, presentaran LSIL muy bajos o nulos pero esta situación no se observó. Esto apunta a que existen otros factores involucrados en la transformación celular premaligna. Cabe mencionar que, si bien estas presas con alto valor nutricional han sido mencionadas para esas regiones, también se maneja una reducción en la disponibilidad de este recurso, explicando tentativamente las tendencias poblacionales negativas de esas colonias (Szteren *et al.*, 2006; Adame *et al.*, 2020).

Es importante resaltar que el Golfo de California ha presentado un aumento en la temperatura superficial en los últimos 20 años (1991-2019; Adame *et al.*, 2020), situación que altera la presencia y desarrollo de todas las especies. El impacto, aunque desigual entre las distintas zonas, afecta desde las bases tróficas, como la concentración de clorofila (Escalante *et al.*, 2013), hasta los grandes depredadores, no siendo excepción el lobo marino, mostrando una reducción en la mayoría de sus loberas (Adame *et al.*, 2020). Hay que destacar que el último estudio de las presas de *Zalophus californianus* en esta zona tiene más de diez años, tiempo en el que hay reporte de disminución de presas como la sardina (Nevárez-Martínez *et al.*, 2001; Giron-Nava *et al.*, 2021) presionando a los organismos a modificar su dieta (Szteren *et al.*, 2006). Para este estudio sería un factor primordial conocer como han cambiado las presas en las diferentes regiones del Golfo, ya que como se

mencionó, con los datos arrojados se puede elucidar que cambios a nivel de especie podrían tener algún impacto en el desarrollo de algunas enfermedades.

Los niveles tróficos a los que se alimentaban las hembras de este estudio coinciden con los reportados previamente (García-Rodríguez y Auriolos Gamboa, 2004; Rosas-Hernández *et al.*, 2018), mostrando que los individuos siguen alimentándose de especies similares, pero no implicando la misma calidad de nutrientes. Como ya se mencionó anteriormente, en los últimos años la mayoría de los estudios se han enfocado en el estado demográfico de las colonias, las cuales solo muestran crecimiento en Los Islotes (colonia de la cual se analizaron los datos en este estudio) de la zona sur. Se puede especular que un punto clave es la alta diversificación de la dieta (Szteren y Auriolos-Gamboa 2011), lo cual podría ser cierto si se compara con una diversidad baja o media en la dieta de las demás zonas y el consiguiente decrecimiento poblacional de las loberas. Un ejemplo de esto se presentó en la investigación de Merrick *et al.* (1997) donde el lobo marino de Steller presentó decline poblacional en las zonas con una diversidad de dieta baja. Con esto se podría hipotetizar que las loberas del sur, al estar en la boca del Golfo y en una ambiente de constante cambio, se han adaptado y han sido capaces de buscar el alimento que satisfaga sus necesidades en comparación con otras zonas, donde al comenzar a experimentar estos cambios (disponibilidad de presa y de ambiente), no han sido todavía eficaces en su respuesta.

Otro punto importante en la transformación celular, y donde también se ve involucrado el nivel trófico, es la bioacumulación de contaminantes. Estudios realizados en diferentes zonas y especies marinas han mostrado que conforme se pasa de un nivel trófico bajo a uno más alto hay una mayor acumulación de contaminantes (Hoekstra *et al.*, 2003; Borgå *et al.*, 2004; Choy *et al.*, 2010; Alava y Gobas, 2012). Especies como el lobo marino de las Galápagos, *Zalophus wollebaecki*, o la foca común, *Phoca vitulina*, han mostrado bioacumulación de contaminantes orgánicos persistentes e intorgánicos en los ecosistemas donde han sido evaluados (Ruus *et al.*, 2002; Alava y Gobas, 2012), mostrando no solo que la acumulación y el daño depende de la fisiología del organismo sino que también se puede observar a través de las crías de

estos organismos, donde la transferencia aumenta al ser estas alimentadas por sus madres. Este fenómeno también se observó previamente en crías de lobo marino de California, donde a mayor edad de la cría mayor capa de grasa y mayor concentración de contaminantes, derivado del consumo de leche materna (Greig *et al.*, 2007). Esta concentración de contaminantes acumulada en organismos tope, como el lobo marino de California, sería clave para favorecer la transformación celular pudiendo llegar hasta el nivel de una displasia celular (Peñín *et al.*, 2019). Esta situación es ampliamente conocida sobretodo en las poblaciones de California donde los organismos presentan hasta dos ordenes de magnitud mayor en la acumulación de contaminantes que en el Golfo de California (Del Toro *et al.*, 2006); y que altas concentraciones de estos contaminantes suelen asociarse, a su vez, a mayores índices de mortalidad y desarrollo de carcinoma urogenital (Ylitalo *et al.*, 2005). Altas concentraciones de contaminantes tipo PCB's y DDT's aumentan la probabilidad de infección con virus con potencial oncogénico y comprometen la función de células inmunes oncovigilantes, como las T y las asesinas naturales (natural killer) (Peñín *et al.*, 2019). Por otra parte, este fenómeno podría ayudar a entender porque al analizar las zonas de disturbio con las que no lo tienen hay mayor probabilidad de transformación celular premaligna en las primeras. Incluso se ha observado que existe una relación significativa de la presencia de virus oncogénicos con niveles de contaminación altos derivando en el desarrollo del cáncer (Peñín *et al.*, 2019; Gulland *et al.*, 2020).

Retomando el análisis del estado epitelial de transformación de acuerdo con la región ecológica de los animales, se encontró un patrón de sur a norte con el mayor registro de LSIL en esta última. Hay que señalar que esta región del Golfo (Norte) presenta una perturbación muy fuerte sobretodo en cuanto a la sobreexplotación de la pesca y el cambio en la cantidad de aporte de agua, lo que modifica las características físicas y químicas de la zona con impacto amplio, desde la base de la cadena trófica y por consiguiente el resto de los niveles (Lluch-Cota 2004; Wilkinson *et al.*, 2009; Brusca *et al.*, 2017). Ya se ha mencionado que estos cambios repentinos podrían modificar la calidad de vida de los lobos marinos de California (Adame *et al.*, 2020). Por otra parte, al

analizar los resultados con base en la distribución de las loberas en zona con o sin disturbio, lo observado puede deberse a que las zonas con disturbio están asociados a la parte oriental del Golfo (estados de Sonora y Sinaloa) que presenta actividad ganadera, agrícola y ciudades densamente pobladas así como altos niveles de turismo (Páez-Osuna *et al.*, 2016, 2019; Vargas-González *et al.*, 2017), incluso se podría hablar de características naturales de la zona, como ventilas hidrotermales, que aumentan el riesgo de algunos contaminantes (Páez-Osuna *et al.*, 2016). Todos los desechos asociados a estas actividades indudablemente terminan en el mar, lo que impacta la salud de los organismos ya sea por medio de los alimentos o solo al interactuar en este medio ambiente, tal como se muestra en organismos topo de la cadena o en aquellos de hábitos bentónicos volviéndose propensos a ciertas enfermedades (Hoekstra *et al.*, 2003; Borgå *et al.*, 2004; McAloose y Newton, 2009; Choy *et al.*, 2010; Alava y Gobas, 2012; Pancaldi, 2020). Esta situación sería similar a la que padecen los organismos en California registrando un número importante de animales con el cáncer urogenital (Del Toro *et al.*, 2006; Buckles *et al.*, 2007; Niño-Torres *et al.*, 2008; Deming *et al.*, 2018).

Hay que recordar que se consideran, hasta ahora, tres factores fundamentales para el desarrollo de este tipo de cáncer: el genético, los contaminantes y la presencia del virus OtHV-1 (Browning *et al.*, 2015). Es importante aclarar que la presencia de este virus no implica el desarrollo de cáncer, ya que son comunes las infecciones del tracto genital con OtHV-1 en crías, y también se han reportado crías con epitelios genitales con pretransformación (Barragán-Vargas *et al.*, 2016). Este virus sería una pieza más en el rompecabezas para tratar de comprender la patología, y en el caso del Golfo de California al encontrar diferencias significativas tanto para las regiones como para las zonas con y sin disturbio, quedó claro que la presencia de OtHV-1 no pareció jugar un papel en la transformación celular. En el caso de las zonas con disturbio todos los organismos tienen el virus, pero no todos presentan transformación celular genital. Con base en lo encontrado se podría especular que, como ya se ha mencionado en otros trabajos (Mori *et al.*, 2006; Browning *et al.*, 2015; Peñín *et al.*, 2019), la interacción con contaminantes

impacta el sistema inmune facilitando la presencia de estos virus los cuales, bajo la presencia de otros factores, podrían favorecer la transformación celular al “confundir” al sistema inmune con su presencia. Hay que considerar que la infección por región estuvo influenciada por el nivel trófico, donde se puede mencionar la bioacumulación como un factor preponderante, y el valor de  $\delta^{13}\text{C}$ , aquí la acumulación de contaminantes podría ser mayor en zonas costeras que en zonas mar adentro o viceversa.

Los coilocitos son células que se encuentran frecuentemente en las muestras infectadas por el virus del papiloma humano (Salvia *et al.*, 2004), y pareciera asociarse a la presencia de lesiones pre-malignas o malignas (Ríos-Yuil, 2012). Sin embargo, su presencia no siempre es prueba confirmatoria de que este o no el virus de papiloma humano (Salvia *et al.*, 2004; Capdeville-García *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio se detectó la presencia de papilomavirus del lobo marino, y conociendo la naturaleza del virus, se esperaría que al menos en algunos animales infectados, los coilocitos fueran un indicador efectivo de su presencia. Además, de acuerdo con lo que se conoce de OTHV-1 (Lipscomb *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002), se podría suponer que se opera bajo el mismo principio para los lobos marinos, es decir, que algunos organismos presentan alteraciones celulares a pesar de no haber sido detectado material genético del virus, como en la zona con disturbio, mientras que en otras, como la de no disturbio, la mayoría no presenta alteraciones celulares siendo que hay una prevalencia alta de estos virus en el epitelio genital de los animales. Con base en los resultados obtenidos, surge la pregunta de cómo se genera este tipo de células sin la presencia del virus e incluso como algunos individuos con bajo conteo de coilocitos presentan una alta transformación celular. Podría ser que otros factores, como el nivel trófico (que explicaría diferencias en la bioacumulación de contaminantes y en la calidad de nutrientes) y el  $\delta^{13}\text{C}$  (que explicaría diferencias en los patrones de alimentación cercanos o lejanos a la costa) este jugando un papel que no ha sido explorado y que podrían dar una pista más sobre el desarrollo de la enfermedad.

También se ha asociado la presencia del virus de papiloma humano a las células binucleadas (Salvia *et al.*, 2004). Al igual que los coilocitos, su presencia o ausencia no es signo exacto de una infección o no (Salvia *et al.*, 2004). Estas células se han encontrado frecuentemente en varios tipos de cáncer por lo que se pueden considerar como indicador de procesos neoplásicos (Kovacs *et al.*, 1988; Papaparaskeva *et al.*, 2000; Shi y King, 2005; Harrison Pitner y Saavedra, 2013). Las causas a nivel celular son varias (Shi y King, 2005) pero lo que favorezca estos procesos a nivel organismo todavía no está claro. Lo encontrado en este capítulo muestra que las áreas con perturbación como el oriente del Golfo de California o la región norte facilitan el desarrollo de este tipo de anormalidades celulares que, a su vez, pueden influir en el estado del epitelio cervical de las hembras adultas de lobo marino de California.

## **6. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA DEL ESTADO NUTRICIONAL Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE TRANSFORMACIÓN EPITELIAL GENITAL**

### **6.1. Introducción**

El estado nutricional de un organismo es un factor determinante para comprender su estado general de salud (Gimeno, 2003; Suverza, 2010). Este concepto se puede definir como la proporción adecuada entre los nutrientes ingeridos, procesados y absorbidos contra el gasto energético necesario para realizar todos los procesos fisiológicos y biológicos importantes de un organismo. Cualquier alteración en esta proporción derivará en un consumo excesivo de nutrientes, exceso de tejido adiposo o sobrepeso, o en la falta de nutrientes fundamentales para la buena salud, desnutrición (Gimeno, 2003; Farré, 2005; FAO, 2007; Suverza, 2010). El proceso de determinación del estado nutricional consiste en una serie de análisis del estado físico del individuo (talla, peso e índice de masa corporal), de la alimentación y pruebas bioquímicas; todos estos elementos ayudarán a determinar el estado nutricional de un organismo (Farré, 2005; Suverza, 2010). Desafortunadamente, en el caso de algunos animales silvestres es difícil realizar análisis tan exhaustivos y, sobre todo, tener un seguimiento. En la mayoría de los casos solo se cuenta con una oportunidad de muestreo lo que lleva a buscar métodos más eficientes donde se obtengan la mayor cantidad de información con una sola muestra.

Los indicadores bioquímicos pueden ser claves, ya que permiten detectar deficiencias nutricias incluso antes de que haya signos físicos de algún padecimiento (Guerra Montemayor, 2010). A la fecha, se han realizado pocos intentos de determinar el estado nutricional del lobo marino de California en vida libre. Estudios realizados en organismos de vida libre, varados y en cautiverio midieron indicadores bioquímicos de forma simultánea (Roletto, 1993; Williams, 2013), pero no se ha investigado la relación de estos parámetros con aspectos de salud, como la transformación epitelial genital. Es

relevante estudiar esta relación, ya que el cáncer es un padecimiento multifactorial (Cooper, 2000; Instituto Nacional de Cáncer, 2015; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018), que puede estar influenciado por el estado nutricional de los individuos, que impacta a su vez en el funcionamiento de efectores inmunes claves para la oncovigilancia, como los linfocitos NK y los linfocitos citotóxicos (Nova *et al.*, 2002; Segurola Gurrutxaga *et al.*, 2016; Zitvogel *et al.*, 2017). Por otro lado, los indicadores nutricios sanguíneos pueden reflejar diferencias en las dietas e, indirectamente, diferencias en la exposición a contaminantes debido a la cercanía de las zonas de alimentación con zonas de disturbio antrópico (ver Capítulo 4).

Uno de los indicadores bioquímicos más importantes para evaluar aspectos de salud son las proteínas en el organismo. La estimación de proteínas totales, que se divide en somáticas y viscerales, siendo las primeras conocidas como masa muscular (Guerra Montemayor, 2010). Estas están relacionadas metabólicamente con el consumo de aminoácidos, energía y nitrógeno y su evaluación se puede realizar mediante la medición de creatinina en orina o la excreción urinaria de 3-metil histidina (Farré, 2005; Gibson, 2005; Keller, 2019). En el caso de las proteínas viscerales, las cuales son aquellas que se encuentran en órganos como hígado, riñones, páncreas y corazón, así como en los eritrocitos, linfocitos, granulocitos y proteínas del suero sanguíneo, su evaluación se realiza con muestras sanguíneas donde una menor concentración se relaciona con una menor capacidad de síntesis en el hígado, ya sea por disminución del consumo de aminoácidos o por incapacidad del órgano. Estos marcadores permiten estimar el estado nutricio a corto, mediano y largo plazo (Farré, 2005; Gibson, 2005; Lee y Nieman, 2007; Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019).

Dentro de los indicadores bioquímicos de las proteínas viscerales se encuentran la albúmina, la transferrina, la prealbúmina y la proteína transportadora de retinol (Farré, 2005; Gibson, 2005; Lee y Nieman, 2007; Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019). La albúmina ha sido utilizada, para los seres humanos, como un índice de aumento en la mortalidad, alimentación deficiente y respuesta inflamatoria crónica (Don y Kaysen, 2004; Farré, 2005;

Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019). Se trata de una proteína transportadora y reguladora que impide la salida de líquido en los vasos sanguíneos (Farré, 2005; Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019). Estos indicadores se relacionan de manera inversamente proporcional con marcadores relacionados a la inflamación como citocinas y la proteína reactiva-C, ya que el proceso inflamatorio impacta en la síntesis de estas proteínas (Mahan y Escott-stump, 2004).

Los lípidos también son de gran importancia para la salud al ser moléculas fundamentales para la vida y componentes de diferentes sistemas biológicos (Maldonado Saavedra *et al.*, 2012; McKee y McKee, 2014). Funcionan como almacén de energía, estabilizador en las membranas celulares e incluso como hormonas, factores de crecimiento, pigmentos; también como precursores de la vitamina D y ácidos biliares (Maldonado Saavedra *et al.*, 2012; McKee y McKee, 2014; Ibarretxe y Masana, 2021).

Otros parámetros, como la concentración de vitaminas y minerales inorgánicos, también se ven alterados al tener una alimentación deficiente (Guerra Montemayor, 2010). Por eso son importantes evaluadores del estado nutricional, además de impactar en el funcionamiento óptimo de sistemas biológicos como el inmune (Gibson, 2005; Lee y Nieman, 2007).

Hasta ahora la importancia de una nutrición deficiente y el consiguiente mal funcionamiento del sistema inmune ha estado poco valorada (Nova *et al.*, 2002). Dicho sistema necesita de varios elementos para poder funcionar de forma exitosa. Uno de estos es el suministro de nutrientes, tanto en cantidad como en calidad. Actualmente se habla de una nutrición que no solo provea al cuerpo de alimentos para cumplir sus funciones metabólicas, sino que además influya en el sistema inmune, adoptando el término *inmunonutrición* (Segurola Gurrutxaga *et al.*, 2016). De esto depende que no exista un desequilibrio en el sistema y que los mecanismos para mantener libre de patógenos al organismo se encuentren funcionando de forma eficiente. Es por esto que se ha considerado la importancia de la inmunovigilancia en enfermedades como el cáncer (Nova *et al.*, 2002; Segurola Gurrutxaga *et al.*, 2016; Zitvogel *et al.*, 2017).

Tanto en seres humanos como en animales de laboratorio, las deficiencias de vitaminas como la A, E, C, D y el complejo B; así como algunos minerales (hierro, zinc, cobre y selenio) y ácidos grasos (equilibrio omega 6/omega 3) disminuyen la respuesta del sistema inmune, contribuyendo a la vulnerabilidad de enfrentar infecciones virales o bacterianas con potencial oncogénico, y directamente afectando a las células de vigilancia oncogénica (Nova *et al.*, 2002; Villegas Valverde y Faxas García, 2014). Algunos minerales, como el zinc, el selenio y el cobre, tienen un papel importante en la proliferación de células tipo B y junto con las vitaminas ayudan a un funcionamiento óptimo del sistema inmune (Failla y Hopkins 1998; Powell, 2000; Calder y Kew, 2002; Arthur *et al.*, 2003; Segurola Gurrutxaga *et al.*, 2016).

Un mineral de gran importancia es el hierro, que está involucrado varias funciones biológicas (Boccio *et al.*, 2003; Sermini *et al.*, 2017). Este mineral es obtenido por medio de los alimentos ya sean de tipo hemínico o no hemínico, y su déficit disminuye la secreción de citocinas y al aumento en los radicales libres, lo que inciden en el estrés oxidativo; por otra parte, su hipersuplementación se ha asociado a la disminución de algunos componentes del sistema inmune (Boccio *et al.*, 2003). Una de las proteínas ligadas a este mineral es la ferritina, la cual guarda hierro dentro de la célula siendo el gran almacén el hígado (Boccio *et al.*, 2003; Sermini *et al.*, 2017). Tanto el hierro como la ferritina han sido identificadas como marcadores de inflamación, aunque se ha asociado más a inflamación aguda (Sermini *et al.*, 2017).

Productos finales del metabolismo, como la bilirrubina también nos dan claves del estado general de salud del organismo. La bilirrubina se produce en el sistema reticuloendotelial como producto de la hemólisis, siendo el punto final del catabolismo de los eritrocitos y es expulsada por el hígado a través de la bilis (Carvajal, 2019; Guerra-Ruiz *et al.*, 2021). Este producto de desecho puede funcionar como indicador de algunos padecimientos. Dentro de los más importantes está la salud hepática, ya que aunque debe de haber cierta cantidad de bilirrubina en sangre (considerada hasta con función protectora;

Nascimento *et al.*, 2015), su aumento podría indicar problemas de salud importantes.

La obtención y almacenamiento de energía es un parámetro fundamental para un estado de salud óptimo. Uno de los carbohidratos por excelencia, que es la principal fuente de combustible para la vida, es la glucosa (Fischbach y Dunning III, 2009). Este carbohidrato simple se obtiene a través de la digestión o de la conversión de glucógeno por medio de la glucólisis en el hígado (Fischbach y Dunning III, 2009).

Para que la glucosa sea procesada se requiere de una serie de reacciones químicas llamadas glucólisis donde a través de cada reacción se obtendrá energía para el funcionamiento celular, produciendo también metabolitos como el piruvato, siendo este el final de la reacción (Fischbach y Dunning III, 2009; Bender y Mayes, 2018). El piruvato cobra importancia en otros mecanismos como la respiración de tipo anaerobia donde se obtendrá como metabolito final el lactato, siendo necesaria la participación de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH) (Bender y Mayes, 2018; Farhana y Lappin, 2023).

La LDH se encuentra en todos los tejidos de plantas y animales, ya que se ha conservado a lo largo de la evolución, y presenta cinco isoformas, producidas en diferentes cantidades dependiendo del órgano donde se ubiquen (Matus-Ortega *et al.*, 2020; Farhana y Lappin, 2023). Considerada como una enzima intracelular, se ha encontrado que los niveles más altos de LDH están en órganos como el riñón, el músculo esquelético, el corazón, los pulmones, el cerebro y el hígado (Fischbach y Dunning III, 2009; Farhana y Lappin, 2023). Hasta ahora se considera un marcador de daño celular, a pesar de que su incremento no permite indicar la localización exacta de este daño (Matus-Ortega *et al.*, 2020; Farhana y Lappin, 2023). Cabe resaltar, como ya se mencionó, este se consideraba un mecanismo solo para reacciones anaerobias, pero en últimos años se ha descubierto que hay otras funciones fisiológicas donde podría estar interactuando esta reacción energética (Matus-Ortega *et al.*, 2020).

En el caso del cáncer se le ha vinculado por la demanda de lactato que requieren las células cancerosas favoreciendo la angiogénesis y vascularización del tumor inicial, desarrollando posteriormente la mestástasis (Matus-Ortega *et al.*, 2020). Incluso algunos tumores modifican su actividad metabólica de fosforilación oxidativa a una de tipo glucolítica anaerobia (Shaw, 2006).

Con lo establecido anteriormente se puede afirmar que el estado nutricional de un organismo es fundamental para la supervivencia óptima de un organismo. Por lo cual, el desarrollo o no de una enfermedad se relaciona íntimamente con los recursos nutricios de un individuo. Es así que en este capítulo se investigó, a través del uso de indicadores bioquímicos clave, la relación entre estos y el grado de transformación epitelial genital de las hembras adultas de lobo marino de California.

## **6.2. Métodos**

En la sección 2.5 pueden leerse detalles sobre la zona de muestreo, las técnicas de captura y la colecta y procesamiento de las muestras.

### **6.2.1. Procesamiento y resguardo de las muestras en campo**

Las muestras de sangre fueron centrifugadas en una centrífuga clínica (Clay Adams compact II, Daigger Scientific, USA), por 10 min. a una velocidad fija de 3200 rpm dentro de las tres primeras horas de haber sido colectadas. Por medio de una pipeta Pasteur estéril se obtuvo el plasma y el suero de cada tubo, y las muestras fueron resguardadas inmediatamente después de su separación en tubos criogénicos y conservadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en el laboratorio.

### **6.2.2. Análisis de las muestras**

#### **6.2.2.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital**

El diagnóstico del estado epitelial de las muestras se realizó como se indica en la sección 2.5.4. del Capítulo 2.

#### 6.2.2.2. Evaluación del estado nutricional

Se cuantificaron once indicadores nutricionales sanguíneos. Específicamente, para conocer la concentración de proteínas viscerales, se cuantificó la albúmina (Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019), la cual está relacionada con estados inflamatorios crónicos (Don y Kaysen, 2004; Nakajima *et al.*, 2014).

Para conocer el estado general de salud y el funcionamiento renal y hepático, se cuantificó colesterol, triglicéridos, glucosa, creatinina, LDH, ferritina, proteínas totales y bilirrubina total (Guerra Montemayor, 2010). También se determinó la concentración de hierro y zinc como minerales relacionados con el óptimo funcionamiento del sistema inmune (Guerra Montemayor, 2010; Keller, 2019).

Se utilizaron 450 µl de suero de cada individuo para cuantificar zinc y ferritina, y 400 µl de plasma para cuantificar los nueve marcadores restantes. Los análisis fueron realizados por la M. en C. Mariela Camacho Barrón, técnica del Laboratorio de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Se aplicó el protocolo desarrollado para muestras humanas, ya que al revisar algunos reportes anteriores los valores de estos elementos en el lobo marino de California estaban dentro del rango para el ser humano (Roletto, 1993; Burns *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2009).

Se utilizaron kits comerciales de la marca SPINREACT, realizando el análisis de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las cuantificaciones se realizaron mediante espectrofotometría en el equipo Spin 120 (SPINREACT):

- Glucosa, kit 41013
- Albúmina, kit 1001020
- Hierro Ferrozine, kit 1001247
- LDH, kit 41222
- Proteínas Séricas Totales, kit 1001291
- Colesterol, kit 41021

- Triglicéridos, kit 41033
- Bilirrubina Total, kit 1001046
- Creatinina, kit 1001113

Se utilizaron reactivos tanto para el control de calidad como para la calibración. Estos reactivos fueron: Spintrol H Calibrador 1002012, Spintrol H Normal 1002120 y Spintrol H Patológico 1002210.

Para los últimos dos análisis se utilizaron distintas técnicas. Para la ferritina se realizó un ELISA marca Abcam (kit ab108837), siguiendo las instrucciones de la casa comercial y utilizando el equipo Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation) para las lecturas correspondientes. Finalmente, la cuantificación de zinc se realizó mediante Espectrometría de Absorción Atómica en el equipo Analyst 700, Atomica Absorption Spectrometer (Perkin Elmer). Se usó como calibrador 1000 mg/l de N9300178 marca Perkin Elmer, suero de control de calidad marca Randox, suero control nivel 2 HN1530 y suero control nivel 3 HE1532.

#### 6.2.3. Análisis estadísticos

Se obtuvieron los promedios e intervalos de confianza de los marcadores evaluados de acuerdo con el estado epitelial de transformación, la región ecológica y por estar o no en una zona de disturbio. Posteriormente, se identificaron los tipos de distribución que tenían los datos (normal, logarítmica o beta), eligiendo el método de Shapiro y el paquete fitdistrplus en R para comparar las distribuciones propuestas.

Cuando los datos eran normales no hubo necesidad de realizar ninguna modificación, mientras que cuando eran de tipo logarítmico se transformaron con su logaritmo y así fueron incluidos en los modelos, y cuando tuvieron una distribución tipo beta, fueron divididos entre el valor más alto para tener datos que estuvieran entre 0 y 1 y así utilizar una familia quasibinomial para los modelos. Se construyeron modelos lineales generalizados para desafiar las siguientes hipótesis:

i) Los marcadores nutricionales varían de acuerdo con el estado de transformación del epitelio y la región ecológica de las hembras adultas de lobo marino de California,

- ii) El valor de los marcadores varía entre nivel trófico y valor de  $\delta^{13}\text{C}$  como indicador de uso de hábitat,
- iii) Los marcadores nutricios varían de acuerdo con el nivel de disturbio en el que se encuentran las colonias.

Por otra parte, se evaluó si las concentraciones de los indicadores nutricios eran influenciadas por la presencia de cambios epiteliales. Para esto, se utilizó una prueba T de student. También se aplicó este método para evaluar el impacto de la presencia de Papillomavirus y de OtHV-1. Finalmente se evaluó el impacto de la presencia de células binucleadas o coilocitos en las concentraciones de indicadores nutricios por medio de una prueba de Fisher exacta.

### **6.3. Resultados**

La distribución de muestras colectadas en cada colonia reproductiva se encuentra en el Cuadro 9, obteniéndose un total de 43 muestras. Este número de muestras varió, ya que no se pudieron obtener muestras de sangre y de epitelio de todas las hembras capturadas.

Cuadro 9. Relación de las colonias reproductivas del Golfo de California, México, incluidas en el estudio, y número de muestras de hembras adultas de *Zalophus californianus* capturadas en 2016.

| Sitio de muestreo | N° de muestras |
|-------------------|----------------|
| Rocas Consag      | 4              |
| San Jorge         | 8              |
| Isla Lobos        | 4              |
| Isla Granito      | 3              |
| Los Cantiles      | 3              |
| Los Machos        | 5              |
| El Partido        | 3              |
| El Rasito         | 3              |
| San Esteban       | 3              |
| San Pedro Mártir  | 3              |
| San Pedro         | 1              |
| Nolasco           |                |
| Los islotes       | 3              |

#### 6.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital

El estado epitelial de las hembras se puede observar en la sección 4.3.1. del Capítulo 4.

#### 6.3.2. Evaluación hematológica del estado nutricional

De las 43 muestras iniciales, fue posible diagnosticar el epitelio genital correctamente en 40 muestras, pero al relacionarlas con las muestras sanguíneas quedaron un total de 37 muestras. Estas se distribuyen por región ecológica (Cuadro 10).

Cuadro 10. Distribución final por región de las muestras con información de marcadores sanguíneos y de diagnóstico epitelial exitoso.

| Región               | N° de muestras |
|----------------------|----------------|
| Región Norte         | 14             |
| Región Grandes Islas | 11             |
| Región Central       | 9              |
| Región Sur           | 3              |

No se encontró evidencia de que los marcadores nutricios variaran de acuerdo con el estado epitelial (para cada parámetro,  $p>0.05$ ; Cuadro 11). En cuanto a las variaciones entre regiones ecológicas (ver Cuadro 12), el colesterol (GLM;  $F_{3,33}=3.66, p=0.026$ ), la creatinina (GLM;  $F_{3,33}=2.08, p=0.035$ ) y los triglicéridos (GLM;  $F_{3,32}=4.69, p=0.026$ ) variaron significativamente (ver Cuadro 12). Específicamente, el colesterol (Fig. 10A), presentó los valores más altos en la región sur y en la central, mientras que en la región de Grandes Islas el intervalo fue el más amplio y la región norte tuvo los valores más bajos. Todas las regiones presentaron valores más bajos de colesterol que los reportados en otros trabajos del Pacífico estadounidense. La creatinina tuvo valores más altos a los reportados (Fig. 10B), y fueron mayores en las regiones central y de las Grandes Islas, disminuyendo en la norte y siendo la más baja en la sur. Los triglicéridos (Fig. 10D) presentaron los valores más bajos en la región de Grandes Islas, seguido por la norte, después la central y por último en la sur, mientras que los valores reportados estuvieron dentro del mismo rango de los encontrados en este estudio. Finalmente, se observó una relación marginalmente significativa con la ferritina (GLM;  $Chisq_{3,30}=6.92, p=0.074$ ), donde los valores más altos se encontraron en la región sur (Fig. 10C). Para este parámetro no se contó con valores de referencia para la especie.

Finalmente, al analizar los parámetros de acuerdo con del disturbio (colonias en zonas con disturbio vs. colonias en zonas sin disturbio), no se encontró evidencia de que ningún marcador nutricio variara entre los animales

cuyas colonias se encuentran en una zona con disturbio o en una sin disturbio ( $p>0.05$  en todos los modelos; Cuadro 12).

Cuadro 11. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con el diagnóstico del epitelio genital. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro.

| <b>Estado epitelial</b>             | <b>LSIL</b>             | <b>ASC</b>              | <b>N</b>                |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Ferritina (ng/ml)</b>            | 9.87<br>(3.6-16.2)      | 16.84<br>(5.3-28.4)     | 28.51<br>(12.1-45)      |
| <b>Albúmina (g/dl)</b>              | 3.4<br>(3.2-3.6)        | 3.31<br>(3.1-3.6)       | 3.37<br>(3.3-3.5)       |
| <b>Bilirrubina (mg/dl)</b>          | 0.58<br>(0.4-0.7)       | 0.53<br>(0.4-0.7)       | 0.64<br>(0.5-0.8)       |
| <b>Creatinina (mg/dl)</b>           | 1.58<br>(1.4-1.8)       | 1.51<br>(1.3-1.8)       | 1.5<br>(1.4-1.6)        |
| <b>Proteína Total (g/dl)</b>        | 8.05<br>(7.3-8.8)       | 7.81<br>(6.9-8.7)       | 8.16<br>(7.8-8.5)       |
| <b>Colesterol (mg/dl)</b>           | 128.57<br>(159.5-97.6)  | 141.57<br>(117.9-165.2) | 140.43<br>(128.5-152.4) |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>        | 44.38<br>(33-55.8)      | 60.99<br>(42.3-79.7)    | 41.06<br>(29.3-52.9)    |
| <b>Glucosa (mg/dl)</b>              | 125.64<br>(95.2-156.1)  | 142.63<br>(125.7-159.5) | 149.6<br>(130.4-168.8)  |
| <b>Hierro (ug/dl)</b>               | 170.85<br>(143.3-198.5) | 189.72<br>(143.8-235.7) | 193.83<br>(160.6-227.1) |
| <b>Zinc (mg/L)</b>                  | 0.46<br>(0.3-0.6)       | 0.39<br>(0.3-0.5)       | 0.51<br>(0.5-0.6)       |
| <b>Deshidrogenasa láctica (U/L)</b> | 233.85<br>(172-295.7)   | 299.54<br>(411-188)     | 269.16<br>(219.4-319)   |

Cuadro 12. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con la región ecológica de procedencia. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro.

| Región                                      | Norte                       | Grandes<br>Islas            | Central                     | Sur                     |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Isla  |                             |                             |                             |                         |
| <b>Ferritina (ng/ml)</b>                    | 19.28<br>(4.3-34.3)         | 17.14<br>(4.8-29.4)         | 14.99<br>(4.4-25.5)         | 61.48<br>(0.8-122.1)    |
| <b>Albúmina (g/dl)</b>                      | 3.31<br>(3.1-3.5)           | 3.46<br>(3.4-3.6)           | 3.31<br>(3.2-3.4)           | 3.33<br>(3.0-3.7)       |
| <b>Bilirrubina<br/>(mg/dl)</b>              | 0.6<br>(0.5-0.7)            | 0.5<br>(0.4-0.6)            | 0.73<br>(0.5-1.0)           | 0.51<br>(0.2-0.8)       |
| <b>Creatinina<br/>(mg/dl)</b>               | 1.46<br>(1.3-1.6)           | 1.71<br>(1.6-1.9)           | 1.45<br>(1.3-1.6)           | 1.16<br>(0.9-1.4)       |
| <b>Proteína Total<br/>(g/dl)</b>            | 7.98<br>(7.3-8.7)           | 8.06<br>(7.6-8.5)           | 7.74<br>(7.0-8.5)           | 8.96<br>(8.4-9.5)       |
| <b>Colesterol<br/>(mg/dl)</b>               | 119.51<br>(101.1-<br>137.9) | 136.7<br>(120.1-<br>153.3)  | 169.8<br>(156-183.6)        | 140.5<br>(123-158)      |
| <b>Triglicéridos<br/>(mg/dl)</b>            | 40.05<br>(30.7-49.4)        | 41.21<br>(31.2-51.3)        | 64.7<br>(40.4-89.0)         | 72.1<br>(9.1-135.1)     |
| <b>Glucosa (mg/dl)</b>                      | 142.32<br>(122.4-<br>162.3) | 147.92<br>(120.3-<br>175.6) | 152.47<br>(137.8-<br>167.2) | 97.3<br>(89.6-105)      |
| <b>Hierro<br/>(ug/dl)</b>                   | 176.3<br>(137.6-215)        | 192.09<br>(147.9-<br>236.3) | 206.22<br>(164.6-<br>247.8) | 170.33<br>(131.2-209.4) |
| <b>Zinc<br/>(mg/L)</b>                      | 0.46<br>(0.4-0.6)           | 0.43<br>(0.3-0.6)           | 0.48<br>(0.4-0.6)           | 0.59<br>(0.4-0.8)       |
| <b>Deshidrogenasa<br/>láctica<br/>(U/L)</b> | 292.61<br>(206.4-<br>378.9) | 290.36<br>(222.8-<br>357.9) | 224.33<br>(160.7-<br>287.9) | 253.33<br>(10-496.7)    |

Cuadro 13. Parámetros nutricios analizados en la sangre de hembras adultas de lobo marino de California de acuerdo con la zona de disturbio. Se muestra el promedio e intervalos de confianza (95%) para cada parámetro.

| <b>Zona</b>                         | <b>Sin disturbio</b>   | <b>Con disturbio</b>   |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Ferritina (ng/ml)</b>            | 25.2<br>(13.6-36.7)    | 22.4<br>(5.5-39.3)     |
| <b>Albúmina (g/dl)</b>              | 3.4<br>(3.4-3.5)       | 3.3<br>(3.1-3.4)       |
| <b>Bilirrubina (mg/dl)</b>          | 0.6<br>(0.5-0.7)       | 0.6<br>(0.5-0.7)       |
| <b>Creatinina (mg/dl)</b>           | 1.6<br>(1.4-1.7)       | 1.5<br>(1.3-1.6)       |
| <b>Proteína Total (g/dl)</b>        | 8.3<br>(8.0-8.6)       | 7.9<br>(7.2-8.5)       |
| <b>Colesterol (mg/dl)</b>           | 146.6<br>(135.1-158.2) | 135.2<br>(114.8-155.7) |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>        | 50.2<br>(38.9-61.6)    | 50.4<br>(35.8-65.1)    |
| <b>Glucosa (mg/dl)</b>              | 143.3<br>(127.3-159.3) | 143.3<br>(127.8 158.9) |
| <b>Hierro (ug/dl)</b>               | 204.3<br>(177.6-230.9) | 169.4<br>(143.6-195.2) |
| <b>Zinc (mg/L)</b>                  | 0.5<br>(0.4-0.6)       | 0.5<br>(0.4-0.5)       |
| <b>Deshidrogenasa láctica (U/L)</b> | 285.5<br>(226.6-344.5) | 243.7<br>(196.5-290.9) |

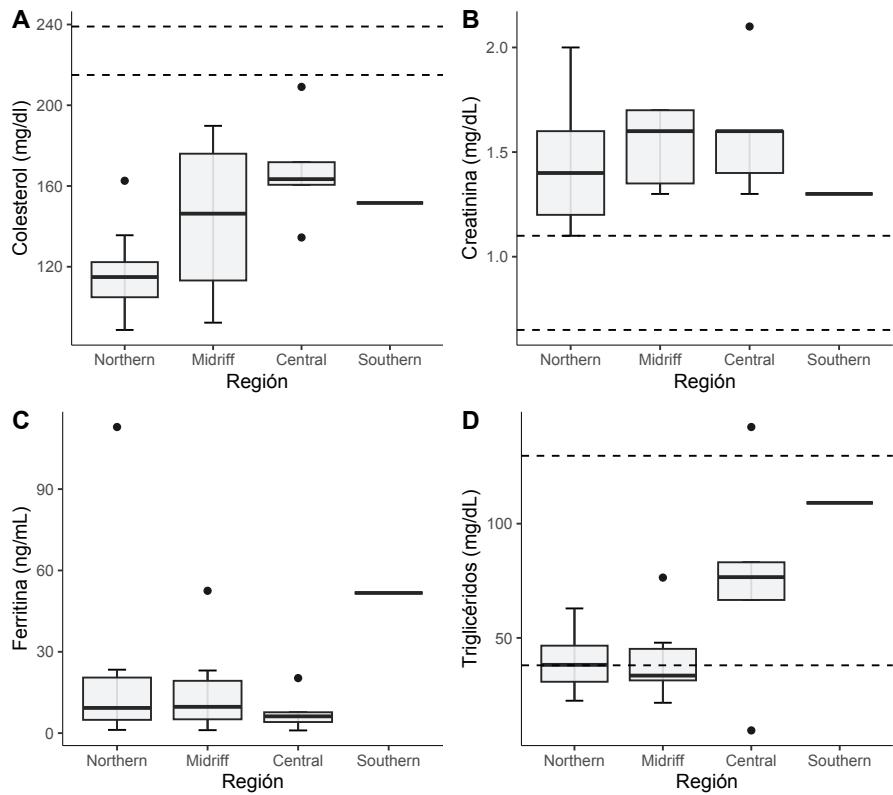


Figura 10. Variación de la concentración de marcadores nutricios entre regiones ecológicas dentro del Golfo de California. A. Colesterol (mg/dl), B. Creatinina (mg/dL), C. Ferritina (ng/ml) y D. Triglicéridos (mg/dL).

La relación de los marcadores y el nivel trófico y  $\delta^{13}\text{C}$  de las hembras adultas (ver Capítulo 4) mostró que tanto el colesterol (GLM;  $F_{1,40}=7.31$ ,  $p=0.010$ ) como los triglicéridos (GLM;  $\text{Chisq}_{1,39}=7.17$ ,  $p=0.041$ ) tienen una relación inversamente proporcional con respecto al nivel trófico. A mayor nivel trófico, menor fue el valor del marcador y viceversa (Fig. 11); esto se observa más claramente en el marcador del colesterol (Fig. 11A) que en los triglicéridos (Fig. 11B). En cuanto a los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , se encontró una relación marginalmente significativa, también inversa, con la ferritina (GLM;  $\text{Chisq}_{1,38}=12.20$ ,  $p=0.071$ ; Fig. 11C) donde los animales con valores de  $\delta^{13}\text{C}$  indicativos de alimentarse más alejadas de la costa tenían mayores niveles de ferritina y las que se alimentaban más cercano a la costa presentaron un valor menor. La mayoría de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que mostraron los individuos son de alimentación cercana a la costa.

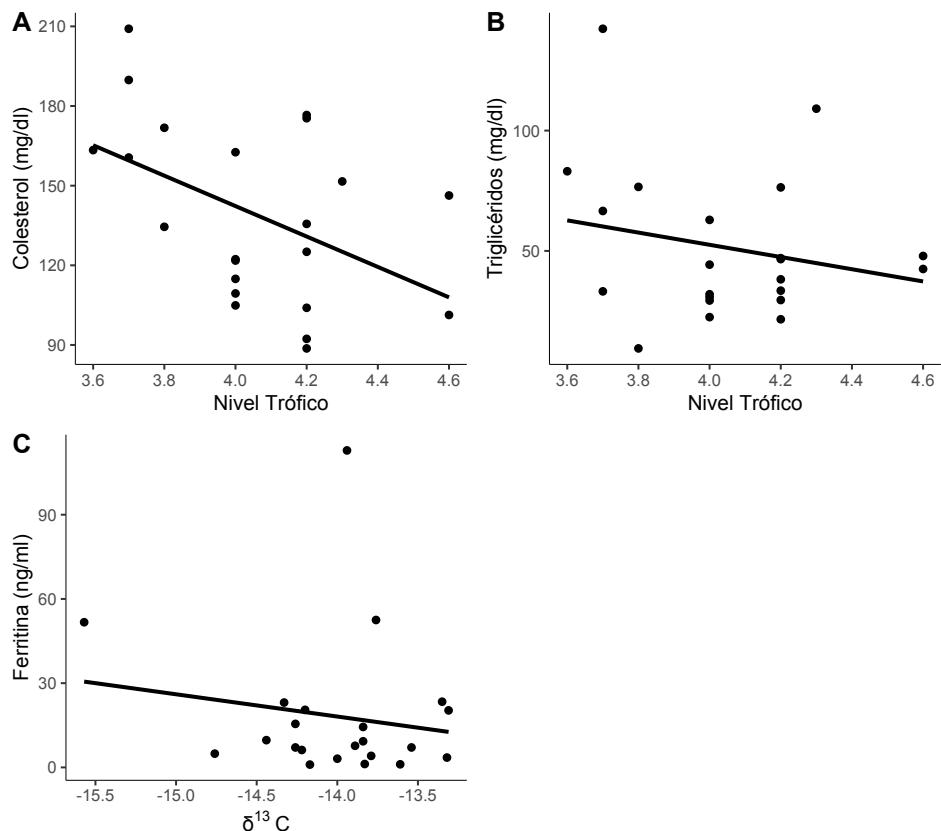


Figura 11. Gráfica de dispersión de la relación entre la concentración de marcadores nutricios (A. Colesterol (mg/dl), B. Triglicéridos (mg/dl) y C. Ferritina (ng/ml)) con respecto a la posición trófica (A,B) o a la zona de alimentación explotada ( $\delta^{13}\text{C}$ ; C) dentro del Golfo de California.

Al analizar si la concentración de los marcadores nutricios se asociaban con la presencia o ausencia de lesiones celulares en el epitelio genital, la ferritina resultó ser un marcador potencial ( $T= 2.09$ ,  $gl=31.77$ ,  $p=0.045$ ; Fig. 12). Específicamente, los individuos sin lesiones tenían niveles significativamente más altos que aquellos con alguna lesión. Igualmente, al analizar los marcadores nutricios en función de la presencia o ausencia de Papillomavirus y de OtHV-1, se observó que el colesterol, creatinina y triglicéridos se relacionaban con el OtHV-1 (Cuadro 14), siendo mayores los niveles de

triglicéridos (Fig. 13A) y colesterol (Fig. 13B) en animales que tenían el virus OthHV-1 en el epitelio genital. Esta situación fue inversa para la creatinina, donde los animales sin el virus presentaban los niveles mayores (Fig. 13C).

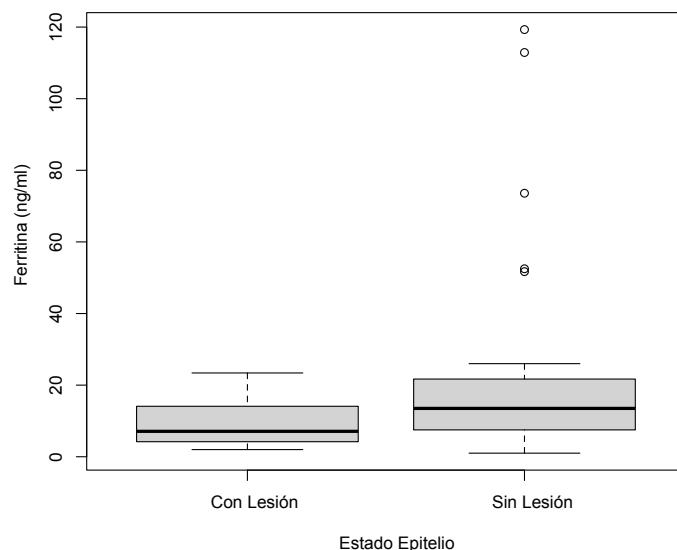


Figura 12. Valores de las concentraciones de ferritina con respecto a la presencia o no de lesión epitelial cervical.

Cuadro 14. Variación en los niveles de colesterol, creatinina y triglicéridos en relación con la presencia de virus OthHV-1 en el epitelio de hembras adultas de lobo marino de California.

| Marcador      | Valor T | gl    | p (<0.05) |
|---------------|---------|-------|-----------|
| Colesterol    | 2.284   | 11.29 | 0.042     |
| Creatinina    | - 4.107 | 14.81 | 0.0009    |
| Triglicéridos | 2.498   | 16.41 | 0.023     |

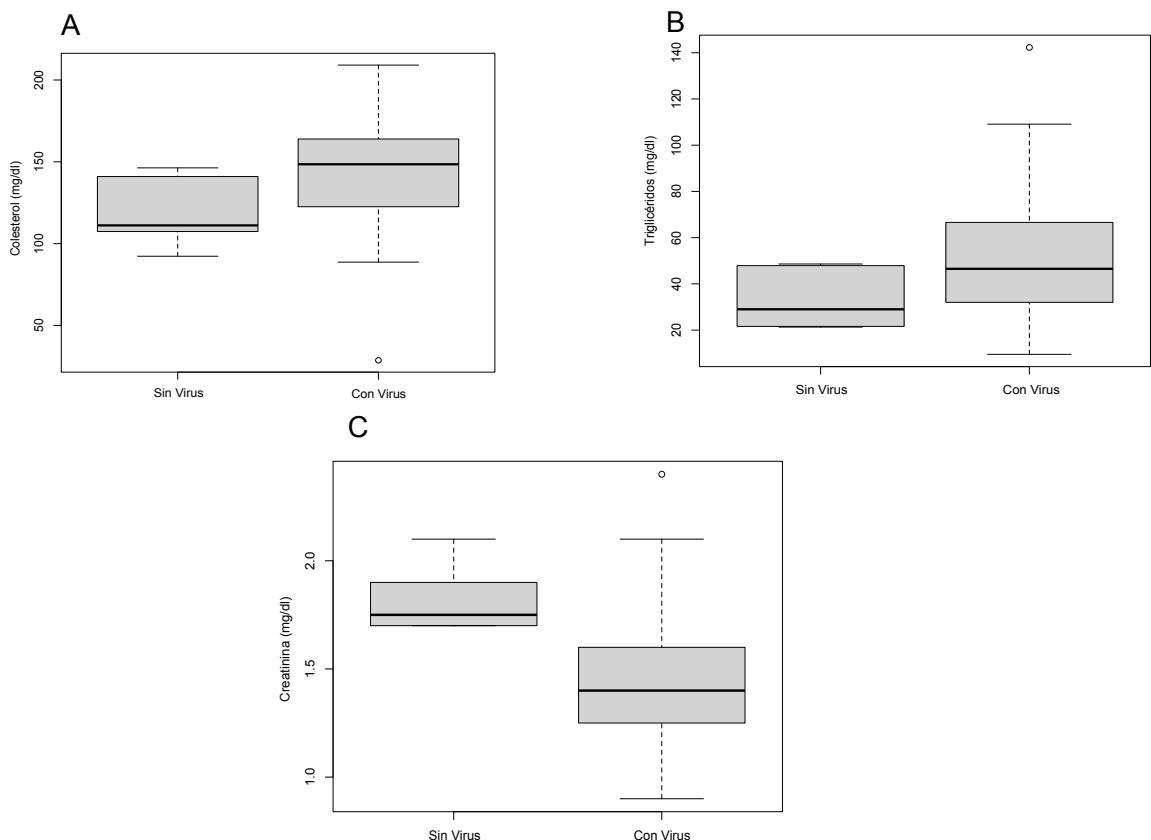


Figura 13. Variación de marcadores nutricios en función de la infección del epitelio genital con el virus OtvH-1. A. Colesterol, B. Triglicéridos y C. Creatinina.

Al investigar la variación de los marcadores nutricionales en relación a la presencia de fenotipos celulares típicos de transformación (células binucleadas y coilocitos), se encontró que los niveles de colesterol ( $p=0.045$ ; Fig. 14A) y de glucosa ( $p=0.045$ ; Fig. 14B) fueron menores en animales que tenían células binucleadas en el epitelio. La presencia de coilocitos no se asoció con diferencias en ninguno de los parámetros nutricios aquí analizados.

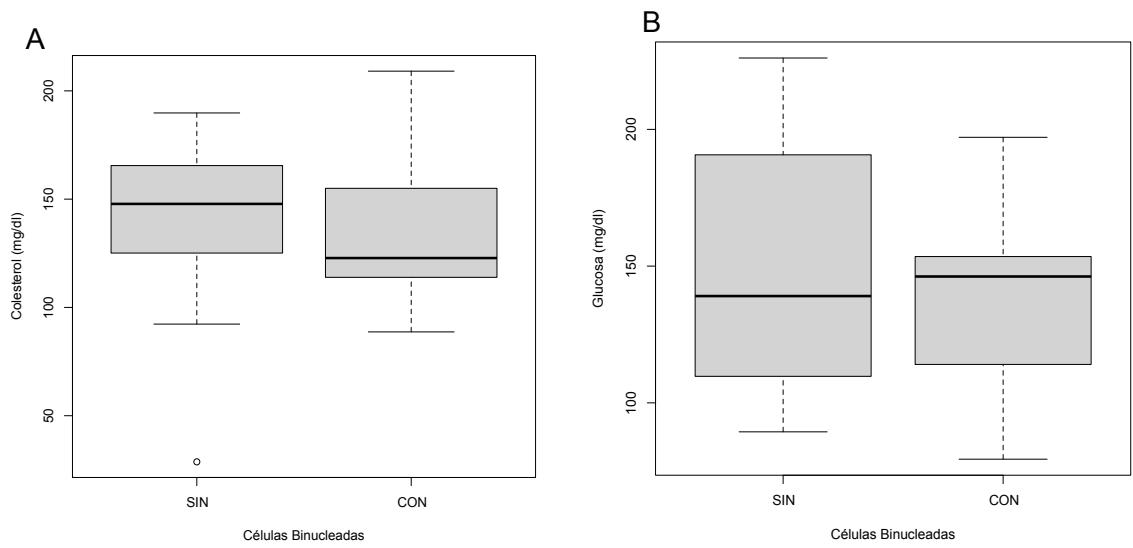


Figura 14. Variación en el colesterol (A) y glucosa (B) en relación con la presencia de células binucleadas en el epitelio genital de las hembras adultas de lobo marino de California.

#### 6.4. Discusión

El estado nutricional de un organismo constituye un parámetro fundamental para una buena salud. En el caso de los lobos marinos de California las condiciones ambientales cambiantes a las que se encuentran expuestas, representan un importante factor de modificación importante de las especies que componen su dieta. Es por esto por lo que conocer si el cambio de una especie a otra favorece, junto con otros factores, fenómenos como la transformación epitelial genital, es relevante de ser investigado. Para este capítulo se eligieron marcadores sanguíneos que nos pueden dar un panorama general del estado de salud del organismo. Algunos de estos marcadores como el colesterol, los triglicéridos, la ferritina y la creatinina mostraron variaciones importantes asociadas a la zona de toma de muestra y del estado del epitelio. Incluso hubo información sobre la infección de OtHV-1 y los procesos celulares asociados a un carcinoma. A continuación, se discutirán los resultados, con

base en la información encontrada de la especie, pero también de organismos filogenéticamente cercanos a ella.

Los lípidos son un componente principal en las funciones de un organismo. Una de las más importantes es proveer de energía, ya sea de forma inmediata o como almacén. Si se considera que los pinnípedos necesitan grandes cantidades de grasa almacenada para sobrevivir en el ambiente marino, estos cobran mayor importancia como marcadores nutricionales (Liwanag *et al.*, 2012; Carvalho y Caramujo, 2018).

Una molécula lipídica imprescindible para el correcto funcionamiento de un organismo es el colesterol, el cual permite el adecuado funcionamiento celular y también participa en funciones hormonales o como precursor de algunas vitaminas (Maldonado Saavedra *et al.*, 2012; McKee y McKee, 2014). El colesterol se sintetiza de forma endógena o se adquiere por medio de la dieta (Maldonado Saavedra *et al.*, 2012). Los pinnípedos suelen tener mayores niveles de colesterol de alta densidad que de baja densidad (Davis *et al.*, 1991; Fayolle *et al.*, 2000), y se ha encontrado que los eritrocitos de estas especies presentan niveles de ácidos grasos omega-3 más altos que los del ser humano (Chapman, 1980; Fayolle *et al.*, 2000). Esto podría estar asociado a su dieta, que suele incluir presas ricas en omega-3 (p.ej. sardina, arenque, boquerón, entre otras presas) de niveles bajos en la cadena trófica, que suelen tener niveles de colesterol mayores que las presas con nivel trófico mayor (Linder *et al.*, 2010).

Las variaciones observadas en la concentración de colesterol entre regiones ecológicas, lesiones celulares en el epitelio genital, e infección con OTHV-1 podrían relacionarse con una fluctuación de especies más frecuentes de la dieta debido a las variaciones de temperatura superficial del mar (Adame *et al.*, 2020). Estas variaciones climáticas forzarían un cambio en las presas del lobo marino de California (McClatchie *et al.*, 2016), lo que podría impactar en varios aspectos de la fisiología de los animales, además de influir en la calidad de leche o el cuidado materno que las hembras adultas ofrezcan a las crías (Boyd, 1998; Kovacs y Lavinge, 1992; Oftedal, 2008). Esto, a su vez, podría impactar la supervivencia de la colonia. Las hembras adultas de la región norte

tenían bajos niveles de colesterol y alto nivel trófico, lo que es sugerente de un cambio de hábitos alimentarios (Szteren y Auriolés-Gamboa 2011) y son estas colonias las que tienen una tendencia poblacional de decline marcada (Szteren *et al.*, 2006; Adame *et al.*, 2020); situación contraria a la region del Sur (en particular, la colonia Los Islotes) donde, por su ubicación en la boca del Golfo, hay un constante cambio y variabilidad de especies, y es plausible que los lobos marinos de esta región tengan mayor habilidad de desafiar o plasticidad alimentaria frente a cambios ambientales (Adame *et al.*, 2020; Cruz-Vallejo *et al.*, 2024).

Resulta interesante que los valores de colesterol difirieron en relación con lo reportado en otros estudios (Roletto, 1993; Williams, 2013) lo cual puede ser asociado a los cambios en las especies de la dieta entre una zona y otra (California con respecto al Golfo de California) ya que se trata de estudios realizados hace tres décadas y una década, respectivamente, tiempo en el que se han dado muchos fenómenos de variabilidad climática (Adame *et al.*, 2020). Por otro lado, esos estudios se enfocaron en animales del Pacífico Estadounidense, mientras que el presente estudio se enfocó en animales del Golfo de California, para los que no había mucha información sobre los valores normales de colesterol, solo un reporte de valores en crías (Castro-González *et al.*, 2001). También puede ser que las diferencias se deban a que en el presente estudio solo analizaron muestras de hembras adultas, mientras que en los otros dos estudios se incluyeron individuos de ambos sexos, y que los machos de lobo marino de California en el Pacífico Estadounidense consumen otras presas, como salmón (Weise, 2000; Weise y Harvey, 2008), con diferente proporción de colesterol (Linder *et al.*, 2010) y en general presentan un nivel trófico mayor que las hembras adultas (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013). Ninguna de estas posibilidades es mutuamente excluyente.

Los triglicéridos también tienen funciones bioquímicas y fisiológicas semejantes al colesterol. Sus funciones primordiales son el almacenamiento de energía, mantener la homeostasis lipídica, regulación en membrana y metabolismo de lípidos (Ibarretxe y Masana, 2021), y sus valores alterados se relacionan con algunas enfermedades en el ser humano y animales de

compañía (como diabetes, obesidad, arteroesclerosis, infartos cardíacos y enfermedades metabólicas hepáticas). Sin embargo, a diferencia del colesterol, los triglicéridos se obtienen únicamente de la energía no utilizada proveniente de la dieta, por lo que si no hay un suministro suficiente de triglicéridos, son afectadas negativamente las funciones celulares donde participan. Se podría especular que si las hembras adultas de lobo marino de California optan por presas con bajos niveles de grasa, que es lo que se ha reportado recientemente durante los eventos de anomalías cálidas de temperatura superficial del mar en la zona estudiada (Adame *et al.*, 2020), se podría ver comprometida su salud a corto plazo dada la limitación en los niveles de triglicéridos, pero al igual que lo discutido anteriormente para el colesterol, el impacto no se detiene a nivel de la salud de las hembras, sino que las crías se podrían ver limitadas en cuanto a la capacidad de la madre de proveerlas de alimento de calidad para su desarrollo exitoso (Boyd, 1998; Kovacs y Lavinge, 1992; Oftedal, 2008), afectando así de forma transgeneracional.

El género *Zalophus* utiliza como aislamiento térmico y como almacenamiento su capa de grasa, a diferencia del género *Arctocephalus* (lobos finos), quienes usan su pelaje como aislamiento primario (Liwanag *et al.*, 2012). Por lo tanto, es sensato suponer que ante la falta de almacenaje se podría comprometer su supervivencia y éxito en la búsqueda de alimento. Además, dado que los pinnípedos, junto con los cetáceos, son presas de algunas especies de tiburones y orcas, y fuente primordial para la obtención de grasas (Davidson y Cliff, 2014), queda claro que la ausencia de una presa y las modificaciones en la dieta pueden impactar la cadena trófica, ocasionando alteraciones a varios niveles del ecosistema. Esto es, precisamente, el enfoque amplio de la fisiología de la conservación.

El uso y almacenamiento de lípidos no es un asunto menor para los pinnípedos, ya que la mayoría de estas especies experimentan períodos de ayuno prolongados donde el uso de estos recursos es diferente al de los seres humanos o incluso al de otros animales terrestres. La distribución de recusos a reproducción, cuidado de progenie y crecimiento debe ser combinada con estos periodos de privación alimentaria, por lo que el conocimiento de las

estrategias fisiológicas adquiere gran importancia (Boyd, 1998; Kovacs y Lavinge, 1992; Oftedal, 2008; Gittleman y Thompson, 2018). Se ha encontrado un ahorro de proteínas altamente eficiente, además de poca oxidación de carbohidratos con altas tasas de lipólisis y diversos ajustes en mecanismos como la gluconeogénesis (Champagne *et al.*, 2012). Las focas grises (*Halichoerus grypus*) incluso presentan excesiva producción de glucosa por lo que se sugiere que hay altos índices de reciclaje de este carbohidrato y que la fuente principal de obtención de energía, sobretodo durante los ayunos prolongados, son las reservas de grasa en forma de cuerpos cetónicos (Nordøy y Blix, 1991).

Para concluir la discusión sobre los resultados encontrados para los parámetros nutricios lipídicos, se puede destacar el papel importante que tienen en la supervivencia y replicación de los virus (Lange *et al.*, 2016). Es relevante, ya que una especie viral, el gammaherpesvirus otárgico OtHV-1, es un simbionte del lobo marino de California, y se cree que está involucrado en la patogenia del carcinoma urogenital (Buckles *et al.*, 2007). La presencia de herpesvirus modifica el metabolismo lipídico del hospedero, sobretodo durante las fases iniciales de la infección, promoviendo acumulación aórtica de colesterol, fosfolípidos y triacilglicerol. Esto fue observado en experimentos realizados en pollos infectados por herpesvirus causantes de la enfermedad de Marek (Hajjar *et al.*, 1986).

Tiempo después se han observado procesos similares en ratones, en los que la infección con gammaherpesvirus-68 murino promueve la formación de ácidos grasos, acumulación de lípidos e, incluso, resistencia a la insulina, además de un incremento de citocinas pro-inflamatorias (Zhao *et al.*, 2011). Además, los macrófagos primarios pueden ser clave para evitar la replicación viral, debido a la ausencia de la expresión de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL-R; Aurubin *et al.*, 2021) o por la represión de los receptores X hepáticos (Lange *et al.*, 2018); los cuales están involucrados en la producción de colesterol endógeno y en la activación de intermediarios que sintetizan ácidos grasos, respectivamente (Lange *et al.*, 2018; Aurubin *et al.*, 2021). De acuerdo con lo encontrado en este estudio, se podría especular que al igual

que lo reportado para el ratón, cuando el lobo marino de California se encuentra infectado con OtHV-1, se dan alteraciones en el metabolismo lipídico, observable por el aumento en los niveles de colesterol y triglicéridos. Sería interesante poder evaluar esto para otras poblaciones e incluso poder indagar, en modelos *in vitro* o a partir de cadáveres, cómo es que ocurre la acumulación, es decir, si se presenta como en otros organismos a nivel aórtico provocando enfermedades cardíacas (Lange *et al.*, 2016) o si se metaboliza como almacenaje de energía (Maldonado Saavedra *et al.*, 2012), permitiendo algún tipo de “ventaja” en los lobos marinos infectados.

La obtención, almacenaje y uso de la energía metabólica es fundamental para la supervivencia y desarrollo de los seres vivos, y los pinnípedos no son excepción. La glucosa es el principal azúcar en la sangre, y es un parámetro muy fluctuante (Fischbach y Dunning III, 2009; Hantzidiamantis *et al.*, 2022) pero fundamental para las funciones biológicas de los organismos vivos. Los niveles de glucosa reflejan diversos estados, como el consumo de presas con mayor cantidad de calorías que otras (McClatchie *et al.*, 2016), hasta el gasto del recurso al buscar alimento. Por ejemplo, si se tiene que viajar a mayor distancia de la lobera, el gasto energético será mayor. También resulta importante para la fisiología celular, donde procesos metabólicos como la glucólisis pueden verse alterados en ritmo y frecuencia ante la presencia de células anormales o en proceso de transformación (Shaw, 2006; Matus-Ortega *et al.*, 2020).

La alteración de procesos biológicos impacta a todos los intermediarios como lo es la LDH. Esta enzima está involucrada en la glucólisis y puede indicarnos desgaste muscular, infecciones, daño en el tejido y procesos neoplásicos (Fischbach y Dunning III, 2009; Farhana y Lappin, 2023). Esta enzima como parte del panel bioquímico sanguíneo, para la medicina humana, es considerada importante para informar sobre la presencia de procesos celulares anormales (Klein *et al.*, 2020).

Esta enzima podría resultar útil para estudios de poblaciones silvestres de pinnípedos como el lobo marino de California, ya que al ser considerada como un marcador de desgaste muscular, podría ayudar a ubicar zonas que

impliquen un mayor desgaste al recorrer una distancia mayor de la lobera, lo que provocaría un incremento en LDH. Sin embargo, aunque se observó un aparente incremento en animales de la región de Grandes Islas, caracterizada por corrientes marinas fuertes (Lavin *et al.*, 2014) el incremento no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, en apoyo a esta hipótesis, observamos un patrón interesante al analizar la creatinina sanguínea. Este compuesto orgánico es generado por la degradación de la creatina, y refleja el metabolismo normal de los músculos al ser producido de manera constante dentro de niveles normales (Díaz Portillo *et al.*, 1997). Al ser filtrada y desechada por los riñones funciona como un marcador de salud de estos órganos pero también ayuda a detectar otras cuestiones como una deshidratación intensa o un esfuerzo físico excesivo (Díaz Portillo *et al.*, 1997). Al no presentarse alteración en otros marcadores, como la albúmina, que ayudarían a pensar en deshidratación o daño renal, es correcto interpretar el incremento en creatinina debido a un excesivo esfuerzo físico, más que a un proceso de catabolismo proteico asociado a enfermedad (Guerra Montemayor, 2010).

Precisamente, fue en la región de las Grandes Islas donde las hembras de lobo marino de California tuvieron una concentración elevada y, en comparación, las hembras de la región sur tuvieron el nivel más bajo. Además, todas las regiones ecológicas del Golfo de California mostraron valores de creatinina más altos que los reportados para la especie en California (Roletto, 1993; Williams, 2013).

Es importante considerar la oceanografía del Golfo de California, pero de manera individual de la región de Grandes Islas ya que es una de las zonas donde históricamente se han reportado surgencias y gran abundancia de presas para el lobo marino (Lluch-Cota, 2004; López Mariscal y Candela Pérez, 2015). A lo largo del Golfo de California y en diferentes épocas del año se encuentran giros oceánicos y corrientes que ayudan a darle movimientos a los sedimentos, permitiendo que en algunas regiones como la norte y las Grandes Islas existan afloramientos de nutrientes que permitan sostener cadenas tróficas complejas en estas zonas marinas (López Mariscal y Candela Pérez,

2015). Incluso se ha mencionado que el Canal de Ballenas es la parte que provee de nutrientes a la región norte, por medio de las mareas y corrientes que se generan como resultado de la profundidad y la estrechez del canal y por la presencia de islas en esta zona del Golfo (particularmente Isla Tiburón, San Esteban y San Lorenzo) que favorecen un aumento de la velocidad del flujo del agua y arrastre de sedimento (López Mariscal y Candela Pérez, 2015; Velázquez-Muñoz y Filinov, 2021).

Lavín y colaboradores (2014) encontraron que en esta zona durante fines de primavera y verano la velocidad promedio es de 0.6 m/s y en el resto del año se encuentra un 0.35 m/s. Considerando estas características oceanológicas y teniendo en cuenta que aunque era una zona rica en presas, sobretodo sardina (Lluch-Cota, 2004; Adame *et al.*, 2020), pero que en los últimos años se ha experimentado una disminución; podríamos especular que los altos valores de creatinina detectados en los animales de esta región se deben a que las hembras adultas se verían forzadas a una mayor actividad física. Al buscar presas de mayor calidad y enfrentarse a las características de la zona donde viven, tendrían un desgaste muscular mayor que el realizado por las hembras adultas de la región sur, donde no hay corrientes marinas tan rápidas (hay pocos giros oceánicos y mayor amplitud de la zona, con un máximo de 0.5 m/s; Figueroa *et al.*, 2003) y donde hay una gran variabilidad de presas (González-Acosta *et al.*, 2018).

Un importante punto importante es que las hembras adultas de la región de las Grandes Islas presentaron valores más altos que las de la costa sur de California, por lo que se puede pensar que los animales de la región de las Grandes Islas se enfrentan a mayores demandas de ejercicio físico. Siendo el Golfo de California un lugar dominado por corrientes de entrada y salida del Océano Pacífico, además de muchos giros oceánicos internos, topografía y batimetría variada, no es descabellado proponer que podría ser un mayor desafío físico para las hembras adultas de lobo marino de California. Incluso, puede plantearse que se han dado fenómenos de selección natural que han favorecido a aquellos individuos con habilidades para resistir esas condiciones “extremas” y estas han llevado a la formación de poblaciones genéticamente

separadas de las del pacífico Norte Mexicano y estadounidense (Schramm *et al.*, 2009).

Continuando con indicadores relevantes, uno de los minerales más importante para la vida en la tierra es el hierro. Este se involucra en gran cantidad de funciones biológicas pero en su estado libre puede llegar a ser dañino para células y órganos por la formación de radicales libres (Gutiérrez, 2015; Moreira *et al.*, 2020). Es por esto que su proceso de almacenamiento debe ser altamente efectivo, lo cual es realizado por la proteína llamada ferritina (Arosio *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2015; Moreira *et al.*, 2020). Esta proteína, imprescindible desde organismos como las diatomeas hasta los mamíferos, es altamente conservada y con mecanismos reguladores para su expresión y almacenamiento muy eficientes (Arosio *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2020). Aunque se podría asumir que la cantidad de hierro en el cuerpo y de ferritina están directamente relacionadas, en muchas situaciones no es así (Gutiérrez, 2015). Se deben considerar factores como la inflamación, estrechamente ligada con la ferritina e incluso utilizada como un marcador proinflamatorio, dentro de este proceso podemos identificar presencia de algún trauma, algún proceso infeccioso o el inicio de alguna patología como el cáncer (Moreira *et al.*, 2020). Analizando esto en relación con las condiciones de vida del lobo marino en el Golfo de California, y considerando que la concentración de hierro varía por su consumo en dieta, se debe evaluar como primer punto la diversidad en la dieta. Aunque el estudio más completo es de hace más de diez años (Szteren y Aurioles-Gamboa, 2011), se sabe que a lo largo de las regiones hay una baja diversidad en la dieta para la zona norte hasta llegar a una diversidad mayor en la región sur, permitiendo especular que esta variabilidad permite a los individuos explorar gran variedad de presas con diferentes niveles de hierro, y en consecuencia presentando reservas más altas de ferritina. Por otro lado, si se considera que los niveles de ferritina están influenciados por procesos inflamatorios nuestra hipótesis se vuelve más compleja teniendo que considerar si los organismos de esta zona presentaban alguna infección o algún proceso celular.

Sabemos que los lobos marinos de California analizados en la zona sur presentan una nula transformación celular del epitelio cervical y también que los organismos sin lesión, de todas las regiones, presentaron niveles de ferritina más altos que sus contrapartes. Esto muestra escenarios diferentes a lo planteado anteriormente en humanos donde, en general, procesos celulares avanzados presentan niveles anormalmente elevados de ferritina (Moreira *et al.*, 2020). Incluso se considera a esta proteína como un modulador de angiogénesis, la proliferación celular y de la inmunosupresión (Alkhateeb *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2020); también se ha visto involucrada en la resistencia a terapias por reprimir la actividad de las especies reactivas de oxígeno. Tal vez un mecanismo clave en este escenario sería el hierro, el cual se ha observado aumentado durante la proliferación celular, siendo que en este estudio al ser encontrado en bajos niveles en etapas de transformación avanzadas (LSIL) se consideraría la activación de otros mecanismos como la ferroptosis (Proneth y Conrad, 2019) evitando la proliferación y contrarrestando el avance de la patología.

En conclusión, lo encontrado en este capítulo nos permite asegurar que los cambios en la alimentación hasta ahora no han tenido un impacto en la salud general de la hembras de lobo marino de California que habitan en el Golfo de California. A pesar de esto hubo marcadores que nos permitieron encontrar fenómenos interesantes asociados a la dinámica de las poblaciones. Por ejemplo los lípidos analizados nos mostraron como la presencia de OtHV-1 modifica su concentración, así como también lo hace el estar habitando en alguna de las diferentes ecorregiones, y a su vez esto impacta en la transformación del epitelio. También la creatinina mostró el cambio del esfuerzo físico que deben realizar los organismos para conseguir su alimento, además de las condiciones oceanográficas de la zona cercan a sus loberas. Finalmente la ferritina, así como los lípidos, permitieron ver más allá de esta especie y relacionarla con algunas de sus presas frecuentes através de los nutrientes proporcionados. Este capítulo presenta un acercamiento más profundo del análisis hematológico de una especie de vida libre, profundizando en su estado de salud y la ecología del ecosistema donde habita.

## **7. VALORACIÓN DEL ESTADO DE INFLAMACIÓN CON ASOCIACIÓN AL ESTADO DEL EPITELIO Y A LAS ECORREGIONES DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

### **7.1. Introducción**

A partir de trabajos realizados con humanos y animales de laboratorio, algunos de los factores que se han encontrados asociados al inicio y desarrollo el cáncer son el estado nutricional, competitividad del sistema inmune y la inflamación crónica (Nova *et al.*, 2002; Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010). Es hasta hace poco tiempo que se ha reconocido la importancia de la inflamación crónica como un promotor de algunos tipos de cáncer en el humano (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010). A pesar de que la inflamación es el factor desencadenante de un mecanismo eficiente de vigilancia del sistema inmune innato que permite identificar y eliminar patógenos oncogénicos y antígenos tumorales; las infecciones o daños tisulares persistentes pueden generar un estado de inflamación crónica que, a su vez, puede ser la clave para el inicio del desarrollo del tumor (Solinas *et al.*, 2009). Un ejemplo de esto es la presencia persistente de *Helicobacter pylori* y su asociación con el cáncer gástrico del humano (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009), o la infección persistente con virus de Hepatitis C, que se asocia con el carcinoma hepatocelular debido a inflamación recurrente (Florino *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2015).

La inflamación crónica, a diferencia de la inflamación aguda, puede ser asintomática y presentarse durante un tiempo prolongado. Su consecuencia es el daño tisular persistente que, incluso, puede ocasionar necrosis. En los tejidos con inflamación crónica hay un reclutamiento masivo y constante de macrófagos. Estos, a su vez, reclutan a los fibroblastos mediante la liberación de citoquinas. Los fibroblastos juegan un papel importante en los tejidos dañados, ya que gracias a ellos y a la producción de sustancias como el interferón beta y el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), se revierte

y detiene la muerte celular de los macrófagos y también de los linfocitos reclutados (García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000; Ward, 2010).

Al llegar al sitio donde son requeridos debido a señalización molecular asociada a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), los macrófagos destruyen al patógeno e inician la reparación del daño tisular consecuencia de la patogenia del microorganismo infectivo. Sin embargo, si permanecen en el tejido comienzan a destruirlo debido a la acción de mediadores de la inflamación (citocinas, quimiocinas, eicosanoides y factores de crecimiento) que reclutan a otras células inflamatorias (Thompson *et al.*, 2015; González-Costa y Padrón González, 2018; Qu *et al.*, 2018). Los macrófagos también participan en el inicio de la formación del tejido conectivo de reparación. Durante todo este proceso, las citocinas son los mediadores con mayor participación, destacando la interleucina 1- $\beta$  (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) como proinflamatorias, y la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 10 (IL-10) como antiinflamatorias (García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000; Ward, 2010; Cuadro 15).

El hígado es un órgano clave para la inflamación, ya que aquí se sintetizan las proteínas de fase aguda, las cuales, al cambiar su concentración en plasma reflejan la etapa de inflamación. La proteína de fase aguda más utilizada para la medicina clínica de humanos y animales son la proteína reactiva C (PRC) (Caspi *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1991; Burton *et al.*, 1994; Clybe y Olshaker, 1999; Hyashi *et al.*, 2001; Pepys y Hirschfield, 2003). También puede ser utilizada la velocidad de sedimentación globular como indicador de la inflamación (García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000; González Naranjo y Molina Restrepo 2010; Luan y Yao, 2018; Urquiza Ayala *et al.* 2019).

Cuadro 15. Principales citocinas involucradas en el proceso inflamatorio tanto agudo como crónico. Información tomada de: Feghali y Wright (1997), INC (2016) Clínica Universitaria de Navarra (2020), Navarrete Prida (2000), Saldana (2020).

| Citocinas                       | Funciones primordiales  |
|---------------------------------|---|
| Interleucina 1-β                | Citocina proinflamatoria.<br>Induce fiebre y la síntesis de proteínas de fase aguda.<br>Producida por diferentes células, principalmente por macrófagos, monocitos y células endoteliales.<br><u>Inhibida por corticoides y prostaglandinas.</u>  |
| Interleucina 6                  | Citocina proinflamatoria.<br>Producida por diversos tipos celulares, entre ellos las células mononucleares fagocíticas y las endoteliales.<br>Las citocinas IL-1 y TNF promueven su síntesis por lo que su función esta muy relacionada con ellas.<br>Diferenciador tardío de linfocitos B.<br>Actúa en el hígado para la producción de proteínas de la fase aguda. |
| Interleucina 8                  | Citocina proinflamatoria con función quimiotáctica.<br>Se produce en monocitos, linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos y neutrófilos.<br>Su principal función es atraer neutrófilos, induciendo la formación de integrinas y provocando la fijación al endotelio por parte de los neutrófilos.  |
| Factor de necrosis tumoral alfa | Citocina proinflamatoria.<br>Producida por los monocitos y macrófagos ante la presencia de un antígeno o alguna infección.<br>Participa en el proceso de inflamación, reclutamiento leucocitario, angiogénesis y producción de fibroblastos.<br>Presenta cierta actividad citotóxica contra algunas células tumorales.  |

Cuadro 15 (continuación). Principales citocinas involucradas en el proceso inflamatorio tanto agudo como crónico. Información tomada de: Feghali y Wright (1997), INC (2016) Clínica Universitaria de Navarra (2020), Navarrete Prida (2000), Saldana (2020).

|                 |  |
|-----------------|--|
| Interleucina 10 | Citocina inmunosupresora.<br>Producida por diversos tipos celulares (células T helper y reguladoras, monocitos, algunos macrófagos activados, algunas células dendríticas, ciertas células tumorales y epiteliales).<br>Reduce la inflamación al limitar a los macrófagos en la producción de citocinas limitando también a las células T.<br>Aumenta la producción de células B y también de las natural killer (NK).<br>Es secretada en grandes cantidades en tejidos con mucosa como el pulmón donde una respuesta inflamatoria puede poner en riesgo al organismo. |
| Interleucina 4  | Citocina antiinflamatoria.<br>Secretada por linfocitos T cd4+ y por mastocitos activados.<br>Permite que los linfocitos B aumenten y produzcan más anticuerpos.<br>Inhibe que los linfocitos T cd4+ se conviertan en helper.<br>Participación activa en las reacciones alérgicas.  |

La inflamación crónica puede acelerar la tasa de mutación e incrementar la proliferación de las células transformadas (Ferguson, 2010); además, en algunos tipos de cáncer las substancias secretadas en los epitelios en respuesta a la inflamación crónica inducen daño en el ADN, promoviendo la formación de carcinomas (Meira *et al.*, 2008). Dentro de los mediadores moleculares identificados, hasta ahora, entre la inflamación y la oncogénesis se pueden mencionar al factor nuclear kappa B (NF-κB), las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citocinas y microRNA's específicos, los cuales van tomando distintos papeles durante las rutas de inicio, supervivencia y proliferación de las células malignas. En la relación inflamación-cáncer se han

encontrado dos rutas; la primera, que incluye alteraciones genéticas que guían a la inflamación y posteriormente a la carcinogénesis; y la segunda, caracterizada por la presencia de patógenos o enfermedades autoinmunes que dirigen la inflamación crónica y la formación de tumores (Grivennikov *et al.*, 2010).

Para algunos tipos de cáncer se ha vuelto evidente que un microambiente inflamatorio es fundamental para la formación, proliferación y sobrevivencia del tumor (Grivennikov *et al.*, 2010; Candido y Hagemann, 2013). Las células inmunes innatas y adaptativas presentes en el microambiente del tumor expresan mediadores y moduladores inmunes que promueven la abundancia y activación de ciertos tipos celulares. Hasta ahora, las células inmunes más encontradas en el microambiente tumoral son los macrófagos y los linfocitos T (Botella Estrada *et al.*, 2002; Coussens y Werb, 2002; Sica *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010).

La presencia de estos leucocitos dentro de un tumor indica una respuesta inmunológica, donde ambos tipos celulares juegan un papel importante en el inicio y progresión del carcinoma (Sica *et al.*, 2008). Estudios en melanomas y cáncer cervicouterino han encontrado que las citocinas asociadas a Th2 (IL-4 e IL-10) aumentan su producción a medida que el tumor crece, mientras que la respuesta Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) disminuye (Alcocer Gonzalez, 1997; Botella Estrada *et al.*, 2002). Es por esto por lo que se menciona que la IL-10 inhibe las funciones de inmunovigilancia de los linfocitos T cercanos al tumor como también lo hace con las CD8 $^{+}$ , funcionando como un protector de las células tumorales, y estas funciones se potencian con la presencia de IL-4 (Alcocer Gonzalez, 1997). El cambio de Th1 a Th2 sería un paso fundamental para pasar de una infección simple que pudo haber sido controlada oportunamente, a una neoplasia, y queda en evidencia la importancia de una respuesta inmune óptima para la oncovigilancia y oncoprotección (Briukhovetska *et al.*, 2021). Algunos virus, como los papillomavirus, regulan la expresión de genes y proteínas de los linfocitos T locales, limitando su función para eliminarlos y así pasar inadvertidos (Alcocer Gonzalez, 1997).

Con la evidencia encontrada hasta ahora se piensa que el perfil de expresión de citocinas y quimiocinas en el microambiente es más relevante que los tipos celulares, ya que son estas sustancias las que podrían estar dirigiendo el rumbo celular (Smyth *et al.*, 2006; Grivenkov *et al.*, 2010). Es por esto, que se considera que si en el huésped la inmunidad antitumoral es débil, entonces la inmunidad derivada de las células tumorales ganará por lo que el tumor crecerá y se dispersará, pero si la situación es contraria, con una inmunidad tumoral fuerte, la inmunidad del huésped eliminará al tumor eficientemente (Lin y Karin, 2007). Para algunos tipos de cáncer se ha propuesto el mecanismo probable por el cual la inflamación crónica altera el entorno celular para promover el inicio de un tumor, siendo uno de los principales participantes el NF-κB, el cual al ser activado inapropiadamente por citocinas de otras células (macrófagos y/o células T) se involucra en la modificación de procesos celulares críticos como la supervivencia, la proliferación y la evasión a la apoptosis. Además, este factor contribuye con la permanencia de un ambiente inflamatorio al ser un regulador de este proceso (Aggarwal, 2004; Lin y Karin, 2007).

Los macrófagos involucrados con el desarrollo cáncer, denominados como TAM's (tumores asociados a macrófagos), son unos de los principales participantes en la relación inflamación-cáncer ya que funcionan como un recurso fundamental de citocinas promoviendo el crecimiento del tumor, la metástasis y la subregulación de la inmunidad adaptativa (Coussens y Werb, 2002; Grivenkov *et al.*, 2010). Además, exhiben una alta plasticidad fenotípica, diferenciándose según la señal ambiental expuesta, lo que les permite producir distintas señales en el microambiente inflamatorio (Galdiero *et al.*, 2017). Una de las más reconocidas es el ligando a quimiocina 2 (CCL2), el cual participa como una sustancia fundamental para el reclutamiento de TAM's en los tumores (Sica *et al.*, 2008). Además, si se considera que por sí mismos los TAM's producen CCL2, el aumento de la concentración en este sitio resulta en una amplificación de la señal. Por otra parte, algunos otros monocitos atraen fibronectina, fibrinógeno y otras sustancias relacionadas con las proteínas de anclaje de la matriz extracelular (Solinas *et al.*, 2009).

Otro paso importante en la supervivencia del tumor es la neoangiogénesis, es decir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los TAM's han sido encontrados en zonas hipóxicas del tumor que se encuentran regularmente al centro del mismo. Al sobrepasar los límites de sangre de las primeras células tumorales, se produce la hipoxia lo que provoca el lanzamiento de sustancias proinflamatorias y promotoras de la neoangiogénesis, dándole nuevo suministro de factores de crecimiento al tumor y promoviendo su supervivencia (Grivennikov *et al.*, 2010). De nuevo, el factor de crecimiento NF-κB es uno de los reguladores primordiales en la relación inflamación-cáncer. Incluso este factor ha sido identificado en las modificaciones relacionadas con un tumor más o menos agresivo (Aggarwal *et al.*, 2006; Karin, 2006; Mantovani *et al.*, 2008). Este complejo parece ser otro participante importante en la relación inflamación-cáncer ya que se ha observado hiperactivado en algunos carcinomas, lo que contribuiría al crecimiento y dispersión del tumor (Aggarwal, 2004; Hardman, 2014).

En los últimos años se ha comenzado a discutir acerca de la importancia de los neutrófilos en la formación y desarrollo de los carcinomas. Debido a que algunos experimentos han mostrado un papel importante de estas células en el microambiente tumoral, han sido llamados neutrófilos asociados a tumores (TAN's). Los TAN's, al igual que los TAM's, exhiben una plasticidad fenotípica dependiendo de las señales en el medio donde se diferencien (Galdiero *et al.*, 2017). Ellos pueden actuar como supresores de tumores o como promotores de estos; lo que se ha observado en experimentos con ratones donde el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) provoca que los TAN's tomen un papel de supresor, en ausencia de dicha proteína, o de promotores con la presencia de ella (Fridlender *et al.*, 2011). Por otra parte, también se les ha relacionado con la inestabilidad genética y la mutación del ADN, asociadas con el inicio de la formación de un tumor, esto al funcionar como liberadores de especies reactivas de oxígeno (Galdiero *et al.*, 2017).

El proceso inflamatorio también tiene un impacto en los mecanismos epigenéticos, los cuales, al ser modificados, pueden ser promotores críticos del inicio de la carcinogénesis. Las modificaciones epigenéticas que se incluyen

son alteración en la expresión de microRNA y la metilación del ADN (Grivennikov *et al.*, 2010). El funcionamiento de los microRNA asociados a distintas enfermedades metabólicas ha sido bien descrito. Estos RNA no codificantes de cadena sencilla que actúan a nivel post-transcripcional contienen información importante que de ser clarificada completamente podría ayudar, no solo para usarlos como biomarcadores de distintas enfermedades sino para posibles blancos terapeúticos en humanos (Martínez-Jiménez *et al.*, 2018).

Otros mediadores moleculares antes mencionados son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales son importantes para los procesos del sistema inmune innato pero que en altas concentraciones pueden ser promotores de carcinomas (Federico *et al.*, 2007). Estas son segregadas de forma normal por el estímulo de citocinas proinflamatorias mediante la activación, por señalización, de proteína cinasa de células fagocíticas y no fagocíticas (Schetter *et al.*, 2010). En algunos tipos de cáncer se ha encontrado que altas concentraciones de las especies reactivas provocan estrés oxidativo y nitrosativo lo que interfiere con la estabilidad del ADN, la mutación, la generación de moléculas que modifican la actividad tumoral a nivel del ADN e incluso pueden afectar la expresión en proteínas y activar proto-oncogenes. Un jugador importante es p53, el cual puede favorecer o reprimir a las especies reactivas (Schetter *et al.*, 2010).

Existen otros procesos en los cuales la inflamación crónica causa un desequilibrio en el organismo haciéndolo más propenso al desarrollo de cáncer. Uno de ellos es el impacto que tiene en las células T reguladoras (células CD4 que expresan CD25) las cuales, en condiciones sanas, son capaces de detener los procesos de transformación celular mientras que en organismos con enfermedades relacionadas a inflamación crónica no son capaces e incluso cambian su papel, funcionando como amplificadores de la señal de proinflamación (Erdman y Poutahidis, 2010). Incluso, como parte del proceso de envejecimiento celular, o senescencia, también puede ser más fácil que ocurra una inflamación crónica, y aunque se puede considerar de bajo grado, si a esta le agregamos otras patologías asociadas a la edad como obesidad,

cambio en la microbiota del intestino, inmunosenescencia, malnutrición y microRNA's; el estado de baja inflamación crónica comienza a reclutar células inmunes productoras de sustancias pro-inflamatorias, derivando en un proceso de inflamación crónica muy alto. Es por esto que la edad es un factor de riesgo importante cuando se trata de cáncer (Leonardo *et al.*, 2018).

El conocimiento sobre la inflamación crónica es prácticamente inexistente en organismos de vida silvestre. Eso es desafortunado si consideramos que el cáncer es un fenómeno que ha sido reportado para varias especies silvestres en vida libre (McAloose y Newton, 2009), entre las que destaca el lobo marino de California (Browning *et al.*, 2015). En este capítulo, se explora la relación entre los indicadores de inflamación crónica en hembras adultas de lobo marino de California y la transformación epitelial preoncogénica del epitelio genital en un contexto ecológico

## 7.2. Métodos

### 7.2.1. Obtención y análisis de las muestras de epitelio genital

El diagnóstico del estado epitelial de las muestras se realizó como se indica en la sección 2.5.4. del Capítulo 2.

### 7.2.2. Evaluación del estado de inflamación crónica

El plasma utilizado en estos análisis es el mismo que se obtuvo en la expedición de campo y cuya obtención se describe a detalle en la sección 2.5.3. del capítulo 2. Por lo cual el procesamiento de estas muestras es el mismo del ejecutado en la sección 5.2.1. del capítulo 5.

Con estas muestras, se realizaron inmunoensayos tipo ELISA en sandwich para cuantificar a las citocinas que fueron seleccionadas por su papel en la inflamación. Se incluyeron citocinas pro-inflamatorias IL-1 e IL-6 y la citocina anti-inflamatoria IL-10. Los ensayos se realizaron con inmunoensayos comerciales desarrollados para caninos, los cuales han demostrado eficiencia para evaluar estos parámetros en distintas especies de pinnipedos (Levin *et al.*, 2014).

Los kits utilizados fueron:

- Canine IL-1 beta ELISA kit (ECIL1B), Invitrogen (ThermoFisher Scientific)
- Canine IL-10 ELISA Kit (ECIL10), Invitrogen (ThermoFisher Scientific)
- Canine IL-6 ELISA Kit (ECIL6), Invitrogen (ThermoFisher Scientific)

Para cada uno de ellos se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, eso incluyó: 1) Colocación de la muestra diluida en cada pocillo, dejando el tiempo y en la temperatura indicada; 2) Se realizan 4 lavados con buffer a la concentración indicada; 3) Se coloca el conjugado, en cada pocillo, ya preparado y se deja en incubación el tiempo y en la temperatura indicada; 4) Se repite el paso 2 y se coloca el siguiente conjugado para dejarlo el tiempo y en las condiciones especificadas; 5) Se vuelve a realizar el paso 2 y se coloca el sustrato en el tiempo y en las condiciones indicadas; 6) Finalmente se agrega la solución que detiene la reacción y se realiza la lectura en un lector de placas a 450nm.

Se realizaron las curvas estándar con el promedio de tres ensayos, y las muestras fueron diluidas al 1:100  $\mu$ l para obtener resultados óptimos.

#### 7.2.3. Análisis estadísticos

Al igual que en el Capítulo 5, se identificaron los tipos de distribución que tenían los datos (normal, logarítmica o beta) eligiendo el método de Shapiro y el paquete fitdistrplus en R para comparar las distribuciones propuestas.

Para los datos de distribución Gaussiana no se realizó ninguna transformación, y se modelaron con una distribución normal. Los datos con distribución logarítmica se transformaron y modelaron con esa estructura de error y los datos de distribución beta fueron divididos entre el valor más alto para que estuvieran entre 0 y 1, y que pudieran ser modelados como si tuvieran una distribución quasipoisson. Se construyeron modelos lineales generalizados para desafiar las primeras tres hipótesis, una prueba de T para la cuarta hipótesis, y una prueba de Fisher exacta para la quinta hipótesis:

- i) Los marcadores asociados a procesos de la inflamación varían de acuerdo con el estado de transformación del epitelio y la región ecológica de las hembras adultas de lobo marino de California.
- ii) El valor de los marcadores de la inflamación es influenciado por el nivel trófico y el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  como indicador de uso de hábitat.

- iii) Los marcadores inflamatorios varían de acuerdo con las zonas de disturbio.
- iv) Los marcadores inflamatorios son influenciados por la presencia de papillomavirus y de OtHV-1.
- v) Los marcadores inflamatorios se relacionan con la presencia de células binucleadas o coilocitos.

### **7.3. Resultados**

#### **7.3.1. Diagnóstico del estado del epitelio genital.**

Los resultados obtenidos para el estado del epitelio genital se encuentran detallados en la sección 2.5.4. del capítulo 2.

#### **7.3.2. Evaluación del estado de inflamación crónica**

Se analizaron muestras de sangre de 40 hembras adultas de lobo marino de California capturadas en las cuatro regiones ecológicas descritas en el Capítulo 2. Los marcadores proinflamatorios, IL-1 e IL-6, estaban ausentes, o debajo del nivel detectable por la prueba en el suero de muchos animales (IL-1 fue detectable en 8 muestras; media: 25; intervalo: 7.1-278.6; e IL-6 fue detectable en solo una muestra), mientras que la mayoría de las muestras tenían niveles medibles de IL-10 (media: 497.2; intervalo: 15-3648.3). Por lo anterior, solo fue posible analizar la variación en IL-1 e IL-10.

El marcador IL-1 no varió entre estados epiteliales, presencia de células binucleadas o coilocitos, regiones ecológicas, estatus de infección viral ni zona de disturbio ( $p>0.05$  en todos los análisis). Sin embargo, IL-10 varió de acuerdo con el estadio epitelial de los animales (GLM; Chisq<sub>5,28</sub>=5.45, p=0.0000814; Fig. 15). Específicamente, las hembras adultas de lobo marino de California que tenían un epitelio genital con mayor grado de transformación (LSIL), los niveles de IL-10 fueron más altos que para las categorías de ASC y N.

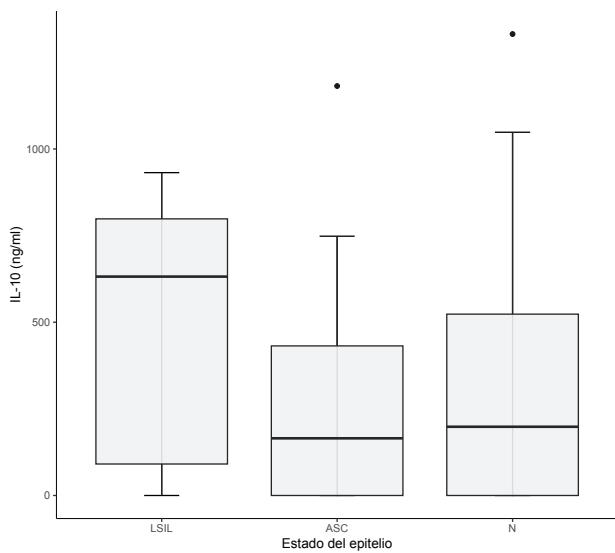


Figura 15. Boxplot de la relación entre la concentración (ng/ml) del antiinflamatorio interleucina 10 (IL-10) y el estado de transformación del epitelio cervical (LSIL: Lesión Epitelial Escamosa de Bajo Grado, ASC: Células Escamosas Atípicas, N: Epitelio normal)

#### 7.4. Discusión

Los resultados encontrados en este capítulo son un primer paso para explorar la inflamación en un organismo silvestre de vida libre. Sin duda, la inflamación es un proceso vital e importante en un organismo vivo, y aunque es indispensable su modulación para la reparación de heridas y para combatir patógenos infectivos o controlar microorganismos comensales durante una disbiosis; la realidad es que debe estar controlada eficientemente para evitar un daño mayor, como ocurre durante la inflamación crónica. Esta cumple un papel importante en el proceso carcinógeno, sobre todo al estar altamente regulado por la secreción de citocinas como la IL-1 y la IL-6 (García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000; Ward, 2010; Briukhovetska *et al.*, 2021). Ambas se han visto relacionadas con el inicio, desarrollo y migración de un tumor; por lo que su presencia es fundamental para procesos de cáncer asociado a la inflamación (Meira *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010; Briukhovetska *et al.*, 2021).

La ausencia o bajo nivel de las dos citocinas pro-inflamatorias en la mayoría de las muestras analizadas sugiere dos escenarios. Para empezar, aquellos individuos con concentraciones positivas podrían estar cursando por algún proceso que requiera la activación de estos mecanismos inflamatorios, como combatir alguna infección o alguna herida. Infecciones como la de *Leptospira interrogans*, sobre todo en crías, son muy comunes en esta especie (Ávalos-Tellez *et al.*, 2016; 2023; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). También otras infecciones causadas por hongos como *Coccidioides immitis* o infestaciones por nemátodos como *Acanthocheilonema odenthali* son reportadas frecuentemente en animales de vida libre que llegan a varar en las costas (Van Bonn, 2015). No se cuenta con datos sobre estos procesos infecciosos potenciales, pero ya que algunas de las hembras tenían niveles relativamente altos de IL-10, se puede inferir que cualquier estado infeccioso estaría en su fase final caracterizada por una subregulación de la inflamación (Fonfara *et al.*, 2008; Briukhovetska *et al.*, 2021). Esto fue analizado en crías de foca común (*Phoca vitulina*), en las que al inicio de su ingreso a un centro de rehabilitación presentaron altos niveles de expresión de mARN de citocinas proinflamatorias mientras que durante su rehabilitación la señal de citocinas antiinflamatorias, como IL-4, fue tomando mayor protagonismo (Fonfara *et al.*, 2008). Por otra parte, las hembras adultas de lobo marino de California que tenían ausencia de IL-1 y de IL-6 probablemente no se encontraban pasando por algún proceso donde se necesitara la producción de estas señales, e incluso los organismos con epitelio LSIL y nula producción de IL-1 e IL-6 tendrían la opción de activar mecanismos alternos, como activación de células NK (Briukhovetska *et al.*, 2021) por producción de IL-12, IL-15 e interferón-γ, para evitar la progresión de la transformación del epitelio.

El establecimiento e invasión de células tumorales está regulado por la immunovigilancia, por lo que la mayoría de las veces el sistema inmune es capaz de identificar y eliminar estas células transformadas (Briukhovetska *et al.*, 2021; Kroemer *et al.*, 2024). Sin embargo, cuando hay un ambiente “hóstil” como la inflamación crónica, se da una producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias debido a la presencia de células como linfocitos cooperadores tipo

2, macrófagos asociados a tumores y magrófagos M2 que promueve una mayor producción de citocinas inflamatorias, convirtiendo el microambiente en inflamatorio, lo que facilita el desarrollo de la transformación celular maligna (García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000; Grivennikov *et al.*, 2010; Ward, 2010; Briukhovetska *et al.*, 2021). Si bien se puede pensar que la solución sería la activación de mecanismos antiinflamatorios, la realidad es que esta reacción, bajo condiciones crónicas, favorece aún más la migración del tumor a otros sitios. Algunas citocinas como la IL-10, detienen las acciones antitumorales (Briukhovetska *et al.*, 2021). Es por eso que se ha encontrado que, con un tumor más avanzado, la producción de interleucinas antiinflamatorias es mayor que cuando el tumor está localizado (Alcocer Gonzalez, 1997; Botella Estrada *et al.*, 2002). Finalmente, la progresión o promoción del cáncer va más allá del hecho que células estén presentes en el ambiente. Esto estará determinado por el tipo de señales químicas emitidas por las células (como los macrófagos) presentes en este microambiente, inclinando la balanza hacia un lado u otro de la patología (Smyth *et al.*, 2006; Lin y Karin, 2007; Grivennikov *et al.*, 2010).

Considerando que los análisis realizados en este capítulo muestran que las hembras adultas tienen bajo grado de transformación, sin llegar todavía a un carcinoma, se puede hipotetizar que la producción elevada de citocina IL-10 funciona como parte de un sistema regulador de inmunovigilancia evitando la progresión de la transformación del epitelio (Mumm *et al.*, 2011; Briukhovetska *et al.*, 2021). No es posible determinar esto con certeza en este momento, y estudios futuros podrían intentar incrementar el número de muestras y estudiar la importancia de IL-10 en animales que sí tiene cáncer, como ocurre en las cosas de California (Deming *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando los macrófagos M1 y M0 producen IL-10, los linfocitos T citotóxicos aumentan su actividad, volviéndose más letales para las células tumorales (Mumm *et al.*, 2011; Briukhovetska *et al.*, 2021). Incluso para algunos tipos de cáncer humano se ha sugerido el uso de esta interleucina como tratamiento para combatir la enfermedad (Briukhovetska *et al.*, 2021).

En otras especies de mamíferos marinos, como la foca de Ross (*Ommatophica rossii*) se ha reportado una sobreexpresión del transcripto de IL-

10 en animales adultos, y se propuso que esto se debía al estado reproductivo y de muda de pelaje ya que los valores eran más altos en hembras que en machos (Lehnert *et al.*, 2017). También se ha relacionado el nivel de IL10 en la marsopa común (*Phocoena phocoena*) con el estado del hábitat, el estado de salud y las infecciones bacterianas crónicas, lo que lleva a especular que la producción de citocinas anti-inflamatorias es una respuesta a una continua estimulación del sistema inmune e inducción de mecanismos immunomoduladores en cetáceos (Beineke *et al.*, 2007).

Hasta antes de la realización de la presente tesis, la exploración de la inflamación en el lobo marino de California en vida libre en la zona de estudio se ha centrado en etapas tempranas del desarrollo de la especie. Específicamente, se reportó que la magnitud de la respuesta inflamatoria de las crías neonatas se relaciona a su condición corporal (limitado por cual puede ser su gasto energético), mientras que las de mayor edad responden dependiendo su estado previo de infección (Vera-Massieu *et al.*, 2015). Lo anterior puede concordar con lo encontrado en este trabajo para las hembras adultas, donde aunque muchas hembras adultas presentaban evidencia de infección por OtHV-1 o por Papillomavirus, tenían una mayor producción de IL-10 (respuesta anti-inflamatoria) las que mostraban inicios de transformación celular premaligna. Esto sugiere que se está evitando un proceso inflamatorio crónico y, presumiblemente, una inversión de recursos energéticos, semejante a lo que se reportó en las crías recién nacidas (Vera-Massieu *et al.*, 2015).

Con la poca exploración que hay en vida silvestre sobre los mecanismos inflamatorios y sobre como podrían estar relacionados con otros padecimientos o en diferentes etapas de desarrollo de los organismos, es importante reconocer y entender que los procesos biológicos son un entramado de reacciones químicas poco exploradas y comprendidas, por lo que pequeños pasos podrán ayudar para que en un futuro podamos tener una visión más completa de los procesos biológicos de diversos organismos. Este capítulo constituye un primer acercamiento al tema.

## **8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES**

El padecimiento del carcinoma urogenital que afecta al lobo marino de California en vida libre representa una oportunidad invaluable para explorar esta enfermedad para la especie, la vida silvestre e incluso para el ser humano. A pesar de que algunos tipos de cáncer han sido estudiados en mamíferos, como ratones, o en insectos, como la mosca de la fruta; las claves que algunas especies no tradicionales nos podrían dar para el conocimiento y tratamiento de este padecimiento no han sido valoradas ni consideradas lo suficiente, pudiendo perder información valiosa (Vittecoq *et al.*, 2013; Ujvari *et al.*, 2018; Hamede *et al.*, 2020). El cáncer ha cobrado gran importancia para el humano ya que se considera que, actualmente, cerca del 25% de la mortalidad anual es a causa de esta patología, y es considerada de las tres primeras causas de mortalidad en muchos países industrializados (Cooper, 2000; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018; Puente y de Velasco, 2019). Por esta razón los recursos para la investigación de los factores de riesgo, el desarrollo y el tratamiento no han sido escatimados (Hanahan y Weinberg, 2011; World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, 2018). Sin embargo, los factores identificados como desencadenantes no solo participan individualmente, sino que lo hacen en una especie de red que se va tejiendo dando como resultado la formación de un tumor que promueve un padecimiento que podría llevar a la muerte al organismo (Weinberg, 2014; Instituto Nacional de Cáncer, 2015). Dadas investigaciones en el ser humano, se sabe que el estilo de vida y la nutrición son factores fundamentales para el desarrollo del cáncer (Nova *et al.*, 2002; Villegas Valverde y Faxas García, 2014). Sin embargo, dada la enorme variación en estos, y otros, factores, resulta complejo estudiar su relevancia para la transformación celular maligna. Esto significa que el estudio del cáncer en el humano es tremadamente complejo.

Es interesante que en una especie silvestre como el lobo marino de California sea tan prevalente un tipo específico de cáncer, y que este carcinoma urogenital parezca delimitado a su distribución en las costas de

California (Browning *et al.*, 2015, mientras que para su distribución en el Golfo de California no parece ser prevalente (Barragán-Vargas *et al.*, 2015; Peñín *et al.*, 2019). En esta tesis, concurriendo con estudios previos, la transformación epitelial más alta observada fue del tipo LSIL, es decir, no se observó evidencia de carcinoma sino de estados previos de transformación. Estas diferencias epidemiológicas nos dan una pista para explorar los factores diferentes entre sí y aspirar a identificar factores claves para el desarrollo de la enfermedad. Ciertamente, algunos ya se conocen, como la genética (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Bowen *et al.*, 2005), virus (Lipscomb *et al.*, 2001) y contaminación (Ylitalo *et al.*, 2005), y han sido revisados en conjunto (Browning *et al.*, 2015), pero hasta la realización de esta tesis, otros factores asociados a la transformación celular, como la nutrición, no habían sido explorados.

Los cambios en la nutrición resultan fundamentales en estos tiempos donde las variaciones climático-oceanográficas pueden ser muy abruptas y pueden modificar rápidamente la cadena alimenticia (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016; Adame *et al.*, 2020). Especies presa altamente frecuentes del lobo marino (*Loligo* *diomedae*, *Trichiurus lepturus*, *Sardinops caeruleus*, *Engraulis mordax*, *Scomber japonicus*, *Cetengraulis mysticetus* y *Trachurus symmetricus*; García-Rodríguez y Auriolos-Gamboa, 2004; Mellink y Romero-Saavedra, 2005) pueden ser desplazadas por otras con diferente calidad nutritiva (McClatchie *et al.*, 2016). Algunos marcadores evaluados en este trabajo nos dan información importante de la dinámica de los organismos con su entorno y que en un futuro podría ser clave para comprender la evolución del carcinoma urogenital. Es así que como en el ser humano, los cambios de dieta podrían ser clave para el desarrollo de un carcinoma.

Con los métodos aquí utilizados, como el análisis de isótopos estables, se puede ver que aunque el nivel trófico no se ha modificado respecto a reportes anteriores (García-Rodríguez y Auriolos Gamboa, 2004; Rosas-Hernández *et al.*, 2018), hay una interesante asociación de este valor con las ecorregiones y el estado de transformación del epitelio. Fue particularmente interesante observar que en ciertas regiones ecológicas, a niveles tróficos más altos había una transformación de más alto grado (sección 5.3.2., capítulo 5).

Esto permite plantear que pueden estar asociados los cambios de dieta en algunas regiones a modificaciones en la nutrición y, a su vez, al funcionamiento del sistema inmune, derivando en que esta transformación se detenga o continúe, como ocurre en otras zonas de la distribución de la especie.

A pesar de que los marcadores nutricios no presentaron diferencias significativas con respecto al estado de transformación, si lo hicieron con su concentración en las cuatro ecorregiones (sección 6.3.2., capítulo 6). Esto permitió inferir que las diferencias oceanográficas de estas regiones modifican el comportamiento y la dinámica de vida de los organismos. Mientras algunas hembras adultas deben de buscar alimento en regiones de corrientes marinas fuertes, como las Grandes Islas, otras tienen variedad alimenticia sin tanto esfuerzo físico, como ocurre en la zona sur. Es plausible que los valores atípicos observados, como la creatinina, reflejan esto. Adicionalmente, nutrientes como los lípidos dieron una pista de la calidad de alimento que las hembras de lobo marino están consumiendo, y complementando estos resultados con las condiciones actuales de las zonas de estudio, es posible tener un panorama más completo del por qué la mayoría de las colonias del Golfo de California presentan un declive en su abundancia (Adame *et al.*, 2020). Si la alimentación impacta la fisiología, incluyendo al sistema inmune, y las respuestas a estresores, también puede haber impacto demográfico debido a esto. Finalmente, el consumo de una presa determinada en vez de otra también modifica las reservas de algunos nutrientes, como el hierro, que puede impactar el sistema inmune (Alkhateeb *et al.*, 2013) e incluso llegar a modificar hasta la microbiota (Moreira *et al.*, 2020).

Debido a que en los últimos años se ha reconocido a la inflamación crónica como una pieza clave para el desarrollo del cáncer (Nova *et al.*, 2002; Alpízar-Alpízar *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010), conocer cómo se podría manifestar esta en el lobo marino de California es un punto fundamental. Los resultados encontrados en esta tesis permitieron ver que la producción de IL-10, citocina anti-inflamatoria, es favorecida en los individuos analizados. Esto incluso en aquellos con alguna infección viral o con epitelios transformados en el grado más alto para esta zona (sección 7.3.2., capítulo 7). Hay una amplia

gama de temas a explorar en el futuro en relación a esto; la primera y más importante sería evaluar a los organismos con procesos cancerígenos locales o avanzados, poder usar otros marcadores como la proteína reactiva C e incluso explorar otros marcadores asociados a la inflamación crónica. Todo esto permitiría continuar investigando si el lobo marino de California tiene una tendencia a producir citocinas anti-inflamatorias, y en elucidar cómo impactaría esto al desarrollo de enfermedades como el cáncer.

Al ser esta investigación parte de otra más grande, fue posible contar con datos adicionales como la presencia de virus de interés y la presencia de células binucleadas y de coilocitos, típicas de transformación celular asociada a virus. Se encontró que la presencia de OtHV-1 está predicha por la región y la interacción de nivel trófico y  $\delta^{13}\text{C}$ , de igual manera sucedió con la presencia de coilocitos (sección 5.3.3., capítulo 5), mientras que las células binucleadas solo se asociaron a la región ecológica. Esto permite advertir que la zona donde se encuentra la lobera, así como las presas que los individuos consumen interactúan entre sí para favorecer o no la presencia de factores clave en la transformación epitelial genital. En cuanto a los marcadores nutricios: el colesterol, los triglicéridos y OtHV-1 presentaron una relación con la transformación que ya ha sido reportada en ratones y en seres humanos (Lange *et al.*, 2018; Aurubin *et al.*, 2021) y que hasta ahora no se había reportado para lobos marinos de California. Por otra parte, el colesterol y la glucosa presentaron concentraciones diferentes en los organismos con o sin células binucleadas, permitiendo comprender fenómenos asociados con la transformación maligna, como la modificación del consumo de glucosa en organismos con células epiteliales transformadas (Shaw, 2006; Matus-Ortega *et al.*, 2020).

Adicionalmente, en esta tesis se propuso una nueva división, longitudinal, de las colonias del Golfo de California. Esta división permite integrar un nuevo e importante factor que impacta a la vida silvestre: las actividades y el desarrollo antropogénico. En las colonias de California se permite especular que la cercanía a zonas de alto desarrollo antropogénico tiene impacto en rubros como los contaminantes (Ylitalo *et al.*, 2005; Del Toro

*et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2015), por lo que es fundamental comenzar a considerar esta perspectiva en el Golfo de California. En los últimos años se han propuesto desarrollos turísticos e industriales de gran impacto (Avendaño, 2024; Secretaría de Economía, 2024); por esto, la nueva propuesta de división permitiría conocer con más profundidad como las condiciones actuales de las zonas con disturbio y sin disturbio han modificado la vida y la salud de especie centinela como el lobo marino de California, con esto se fundamentaría el apoyo o no a estos proyectos.

Considerando esta división de la zona de estudio, se encontró información importante como el aumento de la probabilidad de que los individuos presenten un mayor grado de transformación epitelial, infección del virus OtHV-1 y la presencia de coilocitos o de células binucleadas (detalles en la sección 5.3.3. del capítulo 5). Con estos resultados, sería importante seguir explorando esta propuesta para ver en que otros aspectos la dinámica de la especie está bajo impacto antrópico.

Esta tesis es un estudio de algunos factores que conforman un proceso complejo. Se exploró cómo algunos factores, como la dieta y la nutrición, pueden impactar la fisiología de un organismo. La dieta y la nutrición son determinados por las condiciones del ecosistema, e impactan en el crecimiento y persistencia de las poblaciones de depredadores. Es cierto que la mayoría de los procesos cancerígenos que desarrollan los organismos en vida silvestre pasan inadvertidas, y que muchas de ellas cobran interés cuando el número de organismos disminuye como en el caso del demonio de Tasmania (Hawkins *et al.*, 2006; Siddle *et al.*, 2007), la zorra de la Isla Catalina, *Urocyon littoralis catalinae* (Vickers *et al.*, 2015) o las belugas de St Lawrence (Martineau *et al.*, 2002). Sin embargo, hay también reportes de tumores, que aunque sea improbable que impacten a nivel demográfico, pueden ser importantes de considerar, ya que podrían disminuir la longevidad de los organismos, como se ha discutido para la foca gris (*Halichoerus grypus*) en el Báltico (Bäcklin *et al.*, 2003) queo para la nutria (*Enhydra lutris*; William and Pulley, 1981).

Ante el cáncer como un padecimiento complejo y ante el panorama actual de cambios ecosistémicos antrópicos y naturales, es fundamental

identificar las patologías que puedan impactar, de manera directa e indirecta, la dinámica poblacional de especies claves. También es primordial acelerar el conocimiento y reconocimiento del impacto antrópico en la viabilidad de las poblaciones silvestres. Desde la presencia de asentamientos humanos hasta la presencia de grandes industrias que nos alimentan y nos visten, las actividades humanas generan un impacto en la salud y el bienestar de los organismos silvestres. El cáncer espontáneo es un ejemplo claro de que los cambios repentinos e impredecibles a diversos aspectos de la historia natural de una especie pueden afectar su fisiología y hábitos de vida, impactando potencialmente su salud e incluso, su papel ecológico dentro del ecosistema. Esta tesis sentó las bases para un primer acercamiento a este tema.

## 9. REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422:35.
- Aceves-Bueno E, Davids L, Rodriguez-Valencia JA, Jaramillo-Legorreta AM, Nieto-Garcia E, Cárdenas-Hinojosa G, Hidalgo-Pla E, Bonilla-Garzón A, Diaz-de-Leon AJ, Rojas-Bracho L, Cisneros-Mata MA. 2023. Derelict gear from an illegal fishery: Lessons from gear retrieval efforts in the Upper Gulf of California. *Marine Policy* 147:105387. doi:10.1016/j.marpol.2022.105387.
- Adame K, Elorriaga-Verplancken FR, Beier E, Acevedo-Whitehouse K, Pardo MA. 2020. The demographic decline of a sea lion population followed multi-decadal sea surface warming. *Scientific Reports* 10:10499.
- Aebischer T, Fischer A, Walduck A, Schlotelburg C, Lindig M, Schreiber S, Meyer TF, Bereswill S, Göbel UB. 2006. Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46:221-229. doi: 10.1111/j.1574-695X.2005.00024.x
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* 72:1605–1621.
- Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor- $\kappa\beta$ : the enemy within. *Cancer cell* 6:203-208.
- Ahmed ASS, Sultana S, Habib A, Ullah H, Musa N, Hossain MB, Rahman M, Sarker SI. 2019. Bioaccumulation of heavy metals in some commercially important fishes from a tropical river estuary suggests higher potential health risk in children than adults. *PLOS ONE* 14(10): e0219336. doi:[10.1371/journal.pone.0219336](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219336)
- Alava JJ, Gobas FAPC. 2012. Assessing biomagnification and trophic transport of persistent organic pollutants in the food chain of the Galapagos sea lion (*Zalophus wollebaeki*): conservation and management implications. En: Romero A, Keith EO (eds.). New approaches to the study of marine mammals. IntechOpen. doi: 10.5772/2731.
- Alcocer Gonzalez JM. 1997. Expresión de citoquinas Th1 y Th2 en cáncer cervical avanzado y su relación a la presencia y expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Alkhateeb AA, Connor JR. 2013. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1836:245–254.
- Alpízar-Alpízar W, Une C, Sierra R. 2009. La inflamación y su papel en el desarrollo del cáncer gástrico. *Acta Médica Costarricense* 51:76-82.
- Álvarez-Borrego S, Rivera JA, Gaxiola-Castro G, Acosta-Ruiz MJ, Schwartzlose RA. 1978. Nutrientes en el Golfo de California. *Ciencias Marinas* 5:53-71.
- Álvarez-Borrego S. 1983. Gulf of California. En: Ketchum BH (ed.). *Estuaries and enclosed seas*. Ed. Elsevier. Amsterdam. 500pp.
- Álvarez-Borrego S. 2008. Oceanografía de la región de las Grandes Islas. En: Danemann G, Ezcurra E. Bahía de los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad. Ed. SEMARNAT, Instituto de Ecología, Pronatura noroeste,

- A.C. y San Diego Natural History Museum. México. 45-65pp.
- Álvarez-Borrego S. 2010. Physical, chemical and biological oceanography of the Gulf of California. En: Brusca R (Ed.). The Gulf of California: Biodiversity and Conservation. Ed. The University of Arizoa Press and ASDM. USA. 24-48p.
- Álvarez-Molina LL, Álvarez-Borrego S, Lara-Lara JR, Marinone SG. 2013. Annual and semiannual variations of phytoplankton biomass and production in the central Gulf of California estimated from satellite data. Ciencias Marinas 39:217-230.
- Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharmaceutical Research 25: 2097- 2116.
- Antonelis GA, Jr., Fiscus CH. 1980. The pinnipeds of the California current. CalCOFI Rep 21: 68-78.
- Arosio P, Carmona F, Gozzelino R, Maccarinelli F, Poli M. 2015. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. The Biochemical journal 472:1-15. doi: 10.1042/BJ20150787.
- Arthur JR, McKenzie R, Becket GJ. 2003. Selenium in the immune system. J Nutr 133: S1457-1459.
- Aurioles D, Fox C, Sinsel F, Tanos G. 1984. Prey of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the bay of La Paz, Baja California Sur, Mexico. J Mamm 65:519-521.
- Aurioles-Gamboa D, Hernández-Camacho J. 2015. *Zalophus californianus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T41666A45230310. doi: 10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T41666A45230310.en. Downloaded on 19 May 2020.
- Aurubin CA, Knaack DA, Sahoo D, Tarakanova VL. 2021. Low-density lipoprotein receptor suppresses the endogenous cholesterol synthesis pathway to oppose gammaherpesvirus replication in primary macrophages. J Virol 95:e00649-21. doi: 10.1128/JVI.00649-21.
- Avalos-Téllez R, Carrillo-Casas EM, Atilano-López D, Godínez-Reyes CR, Díaz-Aparicio E, Ramírez-Delgado D, Ramírez-Echenique MF, Leyva-Leyva M, Suzán G, Suárez-Güemes F. 2016. Pathogenic Leptospira serovars in free-living sea lions in the Gulf of California and along the Baja California coast of Mexico. J Wildl Dis. 52:199-208. doi: 10.7589/2015-06-133.
- Avalos-Téllez R, Limón-González M, Díaz-Arellano M, Martínez-González OR, Palomares Resendiz EG, Díaz-Aparicio E. 2023. Serologic studies of bacterial zoonoses in free-living sea lion pups *Zalophus californianus*, in the Gulf of California, Mexico. Latin Am J Aquat Res 51: 452-458. doi: 10.3856/vol51-issue3-fulltext-3009.
- Avendaño, E. 2024. Megaproyecto en Punta Arenas, ¿amenaza ecológica o turismo sustentable?. Disponible en: <https://bcs.posta.com.mx/mexico/megaproyecto-en-playa-punta-arenas-amenaza-ecologica-o-turismo-sustentable/vl1591378>.
- Bäcklin BM, Eriksson L, Olovsson M. 2003. Histology of uterine leiomyoma and occurrence in relation to reproductive activity in the Baltic gray seal

- (*Halichoerus grypus*). Vet. Pathol. 40:175–180.
- Barragán Vargas C. 2015. Transformación celular epithelial y apoptosis: un marco ecológico y molecular para el lobo marino de California. Tesis de Maestría en Recursos Bióticos. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro, México.
- Barragán-Vargas C, Montano-Frías J, Ávila Rosales G, Godínez-Reyes CR, Acevedo-Whitehouse K. 2016. Transformation of the genital epithelial tract occurs early in California sea lions development, R. Soc. open sci. 3:150419. doi: 10.1098/rsos.150419.
- Beineke A, Siebert U, Müller G, Baumgärtner W. 2007. *Increased blood interleukin-10 mRNA levels in diseased free-ranging harbor porpoises (Phocoena phocoena)*. Veterinary Immunology and Immunopathology 115:100–106. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.006.
- Bender DA, Mayes PA. 2018. Capítulo 17: Glucólisis y oxidación del piruvato. En: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (eds.) Harper Bioquímica Ilustrada. Ed. McGraw Hill, 31st edition.
- Bergeron C. 2003. El Sistema Bethesda 2001. Salud Publica Mex 45:S340-S344.
- Berwald Y, Sachs L. 1965. In Vitro Transformation of Normal Cells to Tumor Cells by Carcinogenic Hydrocarbons. Journal of the National Cancer Institute 35:641–661. doi:[10.1093/jnci/35.4.641](https://doi.org/10.1093/jnci/35.4.641)
- Boccio J, Salgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Goldman C, Weill R, Caro R. 2003. Metabolismo del hierro:conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 53:119-132. Disponible en: <[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-0622](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000200002&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0004-0622.
- Boosalis MG, Snowdon DA, Tully CL, Gross MD. 1996. Acute phase response and plasma carotenoid concentrations in older women: Findings from the nun study. Nutrition 12:475-478.
- Borgå K, Fisk ATM Hoekstra PF, Muir DCG. 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Artic marine food webs. Environmental Toxicology and Chemistry 23:2367-2385.
- Bossart GD. 2006. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. Vet Pathol 48:3.
- Botella Estrada R, Escudero M, O'Connor JE, Dasi F, Fenollosa B, Nagore E, Sanmartín O, Sevilla A, Guillén C. 2002. Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. Actas Dermosifiliogr 93: 87-101.
- Bowen L, Aldridge BM, DeLong R, Melin S, Buckles EL, Gulland F, Lowenstein 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 56:846-848.
- Boyd IL. 1998. Time and energy constraints in pinniped lactation. Am Nat. 152:717-28. doi: 10.1086/286202.
- Browning HM, Acevedo-Whitehouse K, Gulland FMD, Hall AJ, Finlayson J, Dagleish MP, Billington KJ, Colegrave K, Hammond JA. 2014. Evidence for a

- genetic basis of urogenital carcinoma in the wild California sea lion. Proc. R. Soc. B 281:20140240. doi: 10.1098/rspb.2014.0240.
- Browning HM, Gulland FMD, Hammond JA, Colegrave KM, Hall AJ. 2015. Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. Phil. Trans. R. Soc. B 370: 20140228. doi:10.1098/rstb.2014.0228.
- Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. 2021. Interleukins in cancer: from biology to therapy. Nat Rev Cancer 21: 481–499. doi: 10.1038/s41568-021-00363-z
- Brusca RC, Álvarez-Borrego S, Hastings PA, Findley LT. 2017. Colorado River flow and biological productivity in the Northern Gulf of California, Mexico. Earth-Science Reviews 164:1-30.
- Buckles EL, Lowenstein LJ, Funke C, Vittore RK, Wong H-N, St Leger JA, Greig DJ, Duerr RS, Gulland FMD, Stott JL. 2006. Otarine herpesvirus-1, not papillomavirus, is associated with endemic tumours in California sea lions (*Zalophus californianus*). J. Comp. Pathol. 135:183–189. doi:10.1016/j.jcpa.2006.06.007.
- Burns JM, Clark CA, Richmond JP. 2004. The impact of lactation strategy on physiological development of juvenile marine mammals: implications for the transition to independent foraging. International Congress Series 1275: 341-350.
- Busher JT. 1990. Serum albumin and globulin. Clinical methods: The history, physical, and laboratory examinations 3:497-499.
- Burton SA, Honor DJ, Mackenzie AL, Eckersall PD, Markham RJ, Horney BS. 1994. C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. Am J Vet Res. 55:613-8. PMID: 8067607.
- Calder PC, Kew S. 2002. The immune system: a target for functional foods? Br J Nutr 88: S165-176.
- Calderon-Aguilera L E. 2019. Illegal fishing of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* is rampant in the Gulf of California, Mexico. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 39:42–46. <https://www.spc.int/digitallibrary/get/qpb0f>
- Candido J, Hagemann T. 2013. Cancer-related inflammation. Journal of Clinical Immunology 33:79-84.
- Capdeville-García D, Martínez-Garza SG, Gutiérrez-Constante S, Coronado-Pérez H, Piña-Aguilar RE, Gutiérrez-Gutiérrez AM. 2009. Human papillomaviruses detection in patients with lack of koilocytosis but presenting nuclear changes in cervical paps. Gaceta Mexicana de Oncología 8:184-188.
- Carvalho C, Caramujo M. 2018. The Various Roles of Fatty Acids. Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry 23. doi: [10.3390/molecules23102583](https://doi.org/10.3390/molecules23102583).
- Carvajal Carvajal C. 2019. Bilirrubina: metabolismo, pruebas de laboratorio e hiperbilirrubinemia. Rev Med Legal de Costa Rica 36:73-83.
- Caspi D, Snel FW, Batt RM, Bennett D, Rutteman GR, Hartman EG, Baltz ML, Gruys E, Pepys MB. 1987. C-reactive protein in dogs. Am J Vet Res. 48:919-21. PMID: 3605808
- Castro-Gonzalez I, Auriolles-Gamboa D, Montano-Benavides S, Romo F, López-Orea N. 2001. Total lipids, cholesterol and plasmatic triglycerides in

- California Sea Lion pups (*Zalophus californianus*) from the Gulf of California. Ciencias Marinas. 27. 375-396. doi:10.7773/cm.v27i3.491.
- Champagne CD, Crocker DE, Fowler MA, Houser DS. 2012. Fasting Physiology of the Pinnipeds: The Challenges of Fasting While Maintaining High Energy Expenditure and Nutrient Delivery for Lactation. En: McCue M. (ed.) Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: [10.1007/978-3-642-29056-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29056-5_19)
- Chen Q, Wu J, Li X, Ye Z, Yang H, Mu L. 2023. Amphibian-Derived Natural Anticancer Peptides and Proteins: Mechanism of Action, Application Strategies, and Prospects. Int. J. Mol. Sci. 24:13985. doi:10.3390/ijms241813985
- Choy ES, Kimpe LE, Mallory ML, Smol JP, Blais JM. 2010. Contamination of an arctic terrestrial food web with marine-derived persistent organic pollutants transported by breeding seabirds. Environmental Pollution 158:3431-3438. doi: 10.1016/j.envpol.2010.07.014.
- Cifuentes M, Verdejo HE, Castro PF, Corvalan AH, Ferreccio C, Quest AFG, Kogan MJ, Lavandero S. 2024. Low-Grade Chronic Inflammation: a Shared Mechanism for Chronic Diseases. Physiology (Bethesda) Epub 2024 Jul 30. doi: 10.1152/physiol.00021.2024.
- Clínica Universidad de Navarra. 2020. Diccionario médico. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico>.
- Clyne B, Olshaker JS. 1999. The C-reactive protein. The journal of Emergency Medicine 17:1019-1025. doi: 10.1016/S0736-4679(99)00135-3
- Cohen LA. 1987. Diet and Cancer. Scientific American 257:42-48.
- Cooper GM. 2000. The development and causes of cancer, en The Cell: a molecular approach. Cooper GM (Ed.). Sunderland: Sinauer Associates. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. Nature 420: 860–867.
- Cruz-Vallejo RA, Elorriaga-Verplancken FR, Rosales-Nanduca H, Hernández-Camacho CJ, Moncayo-Estrada R, Gómez-Gutiérrez J, González-Armas R, Rodríguez-Rafael ED, González-López I. 2024. Abundance, isotopic amplitude, and pups body mass of California sea lions (*Zalophus californianus*) from the southwest Gulf of California during anomalous warming events. Marine Biology 171: 133. doi: 10.1007/s00227-024-04446-x
- Cuba Reyes M, González Pérez M, Scull Martínez M, Panuncia Hechavarria Y, Casamor Cabrera G. 2019. Importancia del sistema Bethesda en el diagnóstico citológico de lesiones precancerosas del cérvix. Revista Médica Electrónica 41: 203-210.
- Davidson B, Cliff G. 2014. Comparison of pinniped and cetacean prey tissue lipids with lipids of their elasmobranch predator. In vivo 28: 223-8.
- Davis R, Pierotti V, Lauer S, Hubl S, John W, McLean, Witztum JL, Young SG. 1991. Lipoproteins in pinnipeds: analysis of a high molecular weight form of apolipoprotein E. Journal of lipid research 32:1013-23 .
- De la Fuente M. 2002. Effects of antioxidants on immune system ageing. Eur J Clin Nutr 56:S5-S8.
- Debier C, Ylitalo GM, Weise M, Gulland F, Costa DP, Le Boeuf BJ, de Tillesse T, Larondelle Y. 2005. PCBs and DDT in the serum of juvenile California sea

- lions: associations with vitamins A and E thyroid hormones. *Environmental Pollution* 134:323-332.
- Del Toro L, Heckel G, Camacho-Ibar VF, Schramm Y. 2005. California sea lions (*Zalophus californianus californianus*) have lower chlorinated hydrocarbon contents in northern Baja California, México, than in California, USA. *Environmental Pollution* 142:83-92.
- Deming AC, Colegrove KM, Duignan PJ, Hall AJ, Wellehan JFX, Gulland FMD. 2018. Prevalence of urogenital carcinoma in stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from 2005-2015. *Journal of Wildlife Disease* 54. doi: 10.7589/2017-08-208.
- DeNiro, MJ y Epstein S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:495-506.
- Díaz Portillo J, Fernández del Barrio MT, Salido Paredes F. 1997. Aspectos básicos de bioquímica clínica. Ediciones Díaz de Santos, 83-84 pp.
- Don B, Kaysen G. 2004. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Seminars in Dialysis* 6: 432-437.
- Elorriaga-Verplancken F y Auriolles-Gamboa D. 2008. Trace metal concentrations in the hair of *Zalophus californianus* pups and their relation to feeding habits. *Biol Trace Elem Res* 126:148-164.
- Elorriaga-Verplancken FR, Auriolles-Gamboa D, Newsome SD, Martínez-Díaz S. 2013.  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values in dental collagen as a proxy for sex and age variation in foraging strategies of California sea lions. *Marine Biology* 160: 641-652. doi: 10.1007/s00227-012-2119-y
- Elorriaga-Verplancken FR, Sierra-Rodríguez GE, Rosales-Nanduca H, Acevedo-Whitehouse K, Sandoval-Sierra J. 2016. Impact of the 2015 El Niño-Southern Oscillation on the abundance and foraging habits of Guadalupe fur seals and California sea lions from the San Benito Archipelago, México. *PLoS ONE*. 11, e0155034. doi: 0.1371/journal.pone.0155034.
- Elorriaga-Verplancken FR, Paniagua-Mendoza A, Robles-Hernández R, Rebolledo-Villa F, Rojas-Silva P, Salcido-Olguín RE, González-López I, Preciado-Carrillo RD. 2022. Interacción entre lobos marinos y pesquerías: Enfoque de conservación multi-institucional. *Resonancia Científica-COSCYT*. Disponible en: [https://resonanciacientifica.coscyt.mx/ciencia/ciencias-naturales/interaccion-entre-lobos-marinos-y-pesquerias-enfoque-de-conservacion-multi-institucional/?fbclid=IwAR1bA8VFrWbicQbEO\\_NfhAmFCedyzkzc4586luW3IWsGLm6ELyP9IEOSOPw](https://resonanciacientifica.coscyt.mx/ciencia/ciencias-naturales/interaccion-entre-lobos-marinos-y-pesquerias-enfoque-de-conservacion-multi-institucional/?fbclid=IwAR1bA8VFrWbicQbEO_NfhAmFCedyzkzc4586luW3IWsGLm6ELyP9IEOSOPw).
- Erdman SE, Poutahidis T. 2010. Cancer inflammation and regulatory T cells. *Int. J. Cancer* 127:768-779.
- Erren T, Dominique Z, Steffany F, Meyer-Rochow B. 2009. Increase of wildlife cancer: an echo of plastic pollution? *Nature Reviews*. doi: 10.38/nrc2665-c1.
- Escalante F, Valdez-Holguín JE, Álvarez-Borrego S, Lara-Lara JR. 2013. Temporal and spatial variation of sea surface temperature, chlorophyll a, and primary productivity in the Gulf of California. *Ciencias Marinas* 39:203-215.
- Espinosa de los Reyes Ayala MG. 2007. Variabilidad especial de la dieta del lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*, Lesson

- 1828). Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Failla ML, Hopkins RG. 1998. Is low copper status immunosuppressive? Nutr Rev 56: 59-64.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2007. Nutritional status and food security. Learner notes, course by the European Union and implemented by FAO.
- Farhana A, Lappin SL. [Actualización 2023 May 1]. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>
- Farré R. 2005. Evaluación del estado nutricional (dieta, composición corporal, bioquímica y clínica), en: Mataix J. Nutrición y alimentación humana: situaciones fisiológicas y patológicas. Ed. Océano-Ergon. España, p. 751-800.
- Fayolle C, Leray C, Ohlmann P, Gutbier G, Cazenave J, Gachet C, Groscolas R. 2000. Lipid composition of blood platelets and erythrocytes of Southern Elephant Seal (*Mirounga leonina*) and Antarctic Fur Seal (*Arctocephalus gazella*). Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology 126: 39-47. doi: 10.1016/S0305-0491(00)00175-9
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardello F, Loguercio C. 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int. J. Cancer 121: 2381-2386.
- Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci. 1;2:d12-26. doi: 10.2741/a171. PMID: 9159205.
- Figueroa JM, Marinone SG, Lavín MF. 2003. A description of geostrophic gyres in the southern Gulf of California. En: Velasco Fuentes OU, Sheinbaum J, Ochoa J (eds). Nonlinear Processes in Geophysical Fluid Dynamics. Ed Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 237-255 pp.
- Fiorino S, Bacchi-Reggiani L, De Biase D, Fornelli A, Masetti M, Tura A, Grizzi F, Zanello M, Mastrangelo L, Lombardi R, Acquaviva G, Di Tommaso L, Bondi A, Visani M, Sabbatani S, Pontoriero L, Fabbri C, Cuppini A, Pession A, Jovine E. 2015. Possible association between hepatitis C virus and malignancies different from hepatocellular carcinoma: A systematic review. World journal of gastroenterology 21:12896-953. doi:10.3748/wjg.v21.i45.12896.
- Fischbach FT, Dunning MB. 2009. A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. 8<sup>th</sup> edition, Ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 1317 pp
- Fonfara S, Kakuschke A, Rosenberger T, Siebert U, Prange A. 2008. Cytokine and acute phase protein expression in blood samples of harbour seal pups. Mar Biol 155: 337–345. doi: 10.1007/s00227-008-1031-y.
- Fridlander ZG, Kapoor V, Buchlis G, Cheng G, Sun J, Wang LC, Singhal S, Snyder LA, Albelda SM. 2011. Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8<sup>+</sup> cells. Am J Respir Cell Mol Biol 44:230–237
- Fujiwara S, Nakamura H. 2020. Animal Models for Gammaherpesvirus Infections: Recent Development in the Analysis of Virus-Induced Pathogenesis. Pathogens 9:116. doi:10.3390/pathogens9020116.

- Galdiero MR, Marone G, Mantovani A. 2017. Cancer inflammation and cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a028662.
- Galland L. 2010. Diet and inflammation. *Nutrition in Clinical Practice* 25:634-640.
- García de Lorenzo y Mateos A, López Martínez J y Sánchez Castilla M. 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina intensiva* 24:353-360.
- García-Rodríguez FJ, Auñoles-Gamboa D. 2004. Spatial and temporal variation in the diet of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Fish. Bull.* 102:47-62.
- Gates RJ, Woolf A, Caithamer DF, Moritz WE. 1992. Prevalence of spindle cell sarcomas among wild Canada geese from Southern Illinois. *J. Wildl. Dis.* 28, 666–668.
- Gbur EE, Stroup WW, McCarter KS, Durham S, Young L, Christman M, West M, Kramer, M. 2012. Analysis of generalized linear mixed models in the agricultural and natural resources sciences. Ed. Book and Multimedia Publishing Committee, USA:109-184p. 10.2134/2012.generalized-linear-mixed-models.
- Gibson R. 2005. Principles of nutritional assessment. Oxford University Press. Oxford.
- Gimeno E. 2003. Medidas empleadas para evaluar el estado nutricional. *OFFARM* 22:96-100
- Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. 2009. Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Upper Respiratory Tract Infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch. Intern. Med.* 169:384-390.
- Gittleman JL, Thompson SD. 1988. Energy Allocation in Mammalian Reproduction. *American Zoologist* 28: 863–875. doi: [10.1093/icb/28.3.863](https://doi.org/10.1093/icb/28.3.863).
- Giron-Nava A, Ezcurra E, Briás A, Velarde E, Deyle E, Cisneros-Montemayor AM, Munch SB, Sugihara G, Aburto-Oropeza O. 2021. Environmental variability and fishing effects on the Pacific sardine fisheries in the Gulf of California. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 78:623-630. doi: [10.1139/cjfas-2020-0010](https://doi.org/10.1139/cjfas-2020-0010)
- Godínez Reyes C, Santos del Prado Gasca K, Zepeda López H, Aguirre A, Anderson DW, Parás González A, Velarde González E, Zavala-González A. 2006. Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en islas del norte del Golfo de California, México. *Gac. Ecol.* 81:31–45.
- González-Acosta AF, Balart EF, Ruiz-Campos G, Espinosa-Pérez H, Cruz-Escalona VH, Hernández-López A. 2018. Diversidad y conservación de los peces de la bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89:705-740. doi: [10.22201/ib.20078706e.2018.3.2145](https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.3.2145)
- González Naranjo LA y Molina Restrepo JF. 2010. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Revista Colombiana de Reumatología* 17: 35-47.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29:415–445.

- Greig DJ, Gulland FMD, Kreuder C. 2005. A decade of live California Sea Lion (*Zalophus californianus*) strandings along the central California coast: causes and trends, 1991-2000. *Aquatic Mammals* 31:11-22. doi: 10.1078/AM.31.1.2005.11
- Greig DJ, Ylitalo GM, Hall AJ, Fauquier DA, Gulland FMD. 2007. Transplacental transfer of organochlorines in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:37-44.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation and cancer. *Cell* 140:883-899.
- Guerra Montemayor A. 2010. Indicadores bioquímicos. En: El ABCD de la evaluación del estado de nutrición; Suverza Fernández A, Haua Navarro K (eds.). Mc Graw Hill. México. 175pp.
- Guerra-Ruiz A, Crespo J, López Martínez RM, Iruzubieta P, Casals Mercadal G, Lalana Garcés M, Lavin Gomez BA, Morales Ruiz M. 2021. Bilirrubina: Medición y utilidad clínica en la enfermedad hepática. *Adv Lab Med* 2:362-372. doi: 10.1515/almed-2021-0016.
- Gulland FMD, Trupkiewicz JG, Spraker TR, Lowenstine LJ. 1996. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *Journal of Wildlife Diseases* 32:250-258.
- Gulland FMD, Hall AJ, Yitalo GM, Colegrove KM, Norris T, Dulgnan PJ, Halaska B, Acevedo Whitehouse K, Lowenstine LJ, Deming AC, Rowles TK. 2020. Persistent contaminants and herpesvirus OtHV1 are positively associated with cancer in wild California sea lions (*Zalophus californianus*). *Frontiers in Marine Science* 7:602565.
- Gutiérrez L. 2015. Hierro: fundamental para la vida y causante de enfermedades. *Revista de Química* 29:17-22. Publicado en: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/14586>.
- Hajjar DP, Fabricant CG, Minick CR, Fabricant J. 1986. Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol*. 122:62-70. PMID: 2934987; PMCID: PMC1888139.
- Haley KP, Gaddy JA. 2016. Nutrition and *Helicobacter pylori*: host diet and nutritional immunity influence bacterial virulence and disease outcome. *Gastroenterology Research and Practice* 1:1-10.
- Hamede R, Owen R, Siddle H, Peck S, Jones M, Dujon AM, Giraudeau M, Roche B, Ujvari B, Thomas F. 2020. The ecology and evolution of wildlife cancers: Applications for management and conservation. *Evolutionary Applications* 00: 1-14.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hardman WE. 2014. Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* 8:233-240.
- Harrison Pitner MK, Saavedra HI. 2013. Cdk4 and nek2 signal binucleation and centrosome amplification in a her2+ breast cancer model. *PLoS One* 8(6), e65971.
- Hastie T, Tibshirani R. 1990. Generalized Additive Models. Ed. Chapman and Hall, 352 pp.

- Hawkins CE, Baars C, Hesterman H, Hocking GJ, Jones ME, Lazenby B, Mann D, Mooney N, Pemberton D, Pyecroft S, Restani M, Wiersman J. 2006. Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. Biological Conservation 131: 307-324.
- Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S. 2001. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. Vet Res Commun. 25:117-26. doi: 10.1023/a:1006404902214.
- Heath CB, Perrin WF. 2008. California, Galapagos and Japanese Sea Lions: *Zalophus californianus*, *Z. wollebaeki* and *Z. japonicus*. En Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds.) Encyclopedia of Marine Mammals. Second edition. London, UK: Academic Press. pp.170-175.
- Herrera-Cervantes H, Lluch-Cota DB, Lluch-Cota SE, Gutiérrez-de-Velasco G. 2007. The ENSO signature in sea-surface temperature in the Gulf of California. Journal of Marine Research 65:589-605.
- Herrera-Cervantes H, Lluch-Cota SE, Cortés-Ramos J, Farfán L, Morales-Aspeitia R. 2020. Interannual variability of surface satellite-derived chlorophyll concentration in the bay of La Paz, Mexico, during 2003–2018 period: The ENSO signature. Continental Shelf Research, 104254. doi:10.1016/j.csr.2020.104254.
- Hoekstra PF, O'Hara TM, Fisk AT, Borgå K, Solomon KR, Muir DCG. 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Artic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. Environmental Pollution 124:509-522.
- Howerth EW, Schorr LF, Nettles VF. 1986. Neoplasia in free-flying ruffed grouse (*Bonasa umbellus*). Avian Dis. 30, 238-240.
- Hyodo F. 2015. Use os stable carbon and nitrogen isotopes in insect trophic ecology. Entomological Science 18:295-312. doi: 10.1111/ens.12128.
- Ibarretxe D, Masana L. 2021. Metabolismo de los triglicéridos y clasificación de las hipertrigliceridemias. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 33:1-6. doi: 10.1016/j.arteri.2021.02.004
- INC, Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU. 2016. Diccionario de Cáncer del NCI. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>
- Inclán Magaña L. 1999. Estimación del tamaño de la población del lobo marino de california (*Zalophus californianus californianus*) en la región de las Grandes Islas, Golfo de California, México, utilizando tablas de vida. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, BC, México.
- Hagino-Yamagishi K, Toyoshima K. 2019. Oncogene. Cancer & chemotherapy 10:1557-63. doi: 10.32388/072089.
- Instituto Nacional de Cáncer. 2015. ¿Qué es el cáncer?. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#causantes>.
- Jefferson T, Webber M, Pitman R, Gorter U. 2015. Marine Mammals of the World: a comprehensive guide to their identification. Second edition. London, UK: Academic Press. pp. 413-420.

- Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. 2012. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 94: 2242–2263.
- Johnson S, Lowenstine L, Gulland F, Jang S, Imai D, Almy F, DeLong R, Gardner I. 2006. Aerobic bacterial flora of the vagina and prepuce of California sea lions (*Zalophus californianus*) and investigation of associations with urogenital carcinoma. *Veterinary Microbiology* 114: 94–103.
- Karin M. 2006. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 441:431–436.
- Keller U. 2019. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. *J. Clin. Med.* 8: 775. doi: 10.3390/jcm8060775.
- Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. 2011. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews: Cancer* 11:886–895.
- King DP, Hure MC, Goldstein T, Aldridge BM, Gulland FM, Saliki JT, Buckles EL, Lowenstine LJ, Stott JL. 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 86:131–137. doi:10.1016/S0378-1135(01)00497-7.
- Kneller RW, Guo WD, Hsing AW, Chen JS, Blot WJ, Li JY, Forman D, Fraumeni JF Jr. 1992. Risk factor for stomach cancer in sixty-five chinese counties. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1: 113-118.
- Kovacs G, Soudah B, Hoene E. 1988. Binucleated cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes. *Cancer genetics and cytogenetics* 31: 211–215.
- Kovacs KM, Lavigne D. 1992. Maternal investment in otariid seals and walruses. *Can. J. Zool.* 70: 1953–1964.
- Kroemer G, Chan TA, Eggermont AMM, Galluzzi L. 2024. Immunosurveillance in clinical cancer management. *CA Cancer J Clin* 74:187–202. doi: 10.3322/caac.21818. Epub 2023 Oct 25. PMID: 37880100; PMCID: PMC10939974.
- Kuhn CE, Costa DP. 2014. Interannual variation in the at-sea behavior of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar Mam Sci* 30:1297–1319. doi: 10.1111/mms.12110.
- Kupfer A, Langel R, Scheu S, Himstedt W, Maraun M. 2006. Trophic ecology of a tropical aquatic ad terrestrial food web: insights from stable isotopes ( $^{15}\text{N}$ ). *Journal of Tropical Ecology* 22:469–476. doi: 10.1017/S0266467406003336.
- Laake JL, Lowry MS, Delong RL, Melin SR, Carretta JV. 2017. Population growth and status of California Sea Lions. *Journal of Wildlife Management*. doi: 10.1002/jwmg.21405.
- Lange PT, Darrah EJ, Vonderhaar EP, Mboko WP, Rekow MM, Patel SB, Sidjanin DJ, Tarakanova VL. 2016. Type I interferon counteracts antiviral effects of statins in the context of gammaherpesvirus infection. *J Virol* 90:3342–3354. doi:10.1128/JVI.02277-15.
- Lange PT, Schorl C, Sahoo D, Tarakanova VL. 2018. Liver X receptors suppress activity of cholesterol and fatty acid synthesis pathways to oppose gammaherpesvirus replication. *mBio* 9:e01115-18. doi:10.1128/mBio.01115-18.
- Lara-Lara JR, Álvarez-Borrego S. 2014. Phytoplankton biomass and production

- at the entrance of the Gulf of California. En: Wehncke EV, Lara-Lara JR, Álvarez-Borrego S, Ezcurra Exequiel. Conservstion science in Mexico's northwest (Ecosystem status and trends in the Gulf of California). UC MEXUS, The University of California, Institute for Mexico and the United States. México. 137-153p.
- Lara-Lara JR, Arenas V, Bazán C, Díaz V, Escobar E, García M de la C, Gaxiola G, Robles G, Sosa R, Soto LA, Tapia M, Valdés-Holguín JE. 2008. Los ecosistemas marinos. Pp: 135-159, en: Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Lavín M, Castro R, Beier E, Cabrera C, Godínez V, Amador-Buenrostro A. 2014. Surface circulation in the Gulf of California in summer from surface drifters and satellite images (2004–2006). *Journal of Geophysical Research* 119: 4278-4290. doi: [10.1002/2013JC009345](https://doi.org/10.1002/2013JC009345).
- Lehnert K, Weirup L, Harding KC, Häkkinen T, Karlsson O, Teilmann J. 2017. Antarctic seals: Molecular biomarkers as indicators for pollutant exposure, health effects and diet. *Science of the Total Environment* 599-600:1693–1704. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.224.
- Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F, Libra M. 2018. Ageing: from an inflammation to cancer. *Immunity & Ageing* 15:1. doi: 10.1186/s12979-017-0112-5.
- Levin M, Romano T, Matassa K, De Guise S. 2014. Validation of a commercial canine assay kit to measure pinniped cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 160:90-96.
- Lee R, Nieman DC. 2007. Nutritional Assessment: Measuring Diet. Ed. L Meyers. 4 ed. New York. McGraw-Hill.
- López Mariscal M, Candela Pérez J. 2015. Los rápidos submarinos del Golfo de California. *Ciencias* 117:48-51.
- Lin M, King L, Chung R. 2015. Hepatitis C virus-associated cancer. *Annual review of pathology* 10:345-70. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040323.
- Lin WW, Karin M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117:1175–1183.
- Linder M, Belhaj N, Sautot P, Tehrany EA. 2010. From krill to whale: an overview of marine fatty acids and lipid compositions. *OCL* 17:194-204. doi:10.1051/ocl.2010.0328
- Lipscomb TP, Scott DP, Garber RL, Krafft AE, Tsai MM, Lichy JH, Taubenberger JK, Schulman FY, Gulland FMD. 2000. Common metastatic carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*): Evidence of genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Vet Pathol* 37:609-617.
- Li C, Munalisa R, Lee H, Lien T, Chan H, Hung S, Sun D, Cheng C, Chang H. 2023. Restraint Stress-Induced Immunosuppression Is Associated with Concurrent Macrophage Pyroptosis Cell Death in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 24. doi:10.3390/ijms241612877.
- Liwanag H, Berta A, Costa D, Budge S, Williams T. 2012. Morphological and thermal properties of mammalian insulation: the evolutionary transition to blubber in pinnipeds. *Biological Journal of The Linnean Society* 107:774-787. doi: [10.1111/J.1095-8312.2012.01992.X](https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.2012.01992.X).

- Lluch-Cota SE. 1999. Coastal upwelling in the Eastern Gulf of California. *Oceanologica Acta* 23:731-740.
- Lluch-Cota SE. 2004. Gulf of California. En: *Marine Ecosystems of the North Pacific*. PICES Spec. Publ. No. 1, 1280 p.
- Lluch-Cota SE, Aragón-Noriega EA, Arreguín-Sánchez F, Auriolles-Gamboa D, Bautista-Romero JJ, Brusca RC, Cervantes-Duarte R, Cortés-Altamirano R, Del-Monte-Luna P, Esquivel-Herrera A, Fernández G, Michel E, Hendrickx, Sergio Hernández-Vázquez, Hugo Herrera-Cervantes, Mati Kahru, Miguel Lavín, Lluch-Belda D, Lluch-Cota DB, López-Martínez J, Marinone SG, Nevárez-Martínez MO, Ortega-García S, Palacios-Castro E, Parés-Sierra A, Ponce-Díaz G, Ramírez-Rodríguez M, Salinas-Zavala CA, Schwartzlose RA, Sierra-Beltrán AP. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* 23:1-26. doi:10.1016/j.pocean.2007.01.013.
- Lluch-Cota SE, Parés-Sierra A, Magaña-Rueda VO, Arreguín-Sánchez F, Bazzino G, Herrera-Cervantes H, Lluch-Belda D. 2010. Changing climate in the Gulf of California. *Progress in Oceanography* 87:114-126.
- Lowry MS, Carretta JV. 1999. Market squid (*Loligo opalescens*) in the diet of California sea lions (*Zalophus californianus*) in southern California (1981-1995). CalCOFI Rep 40: 196-207.
- Lowry MS, Maravilla-Chávez O. 2005. Recent abundance of California sea lions in western Baja California, Mexico and the United States. En Garcelon DK, Schwemm CA (eds.). National Park Service Technical Publication CHIS-05-01. Institute for Wildlife Studies, Arcata, CA. pp. 485-497.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. 2006. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research* 4: 221–233. doi:10.1158/1541-7786.mcr-05-0261
- Luan Y, Yao Y. 2018. The clinical significance and potential role of C-reactive protein in chronic inflammatory and neurodegenerative diseases. *Front Immunol* 9:1302. doi: 10.3389/fimmu.2018.01302.
- Madsen T, Arnal A, Vittecoq M, Bernex F, Abadie J, Labrut S, Garcia D, Faugére D, Lemberger K, Beckmann C, Roche B, Thomas F, Ujvari B. 2017. Chapter 2: Cancer prevalence and etiology in wild and captive animals. En Ujvari B, Roche B, Thomas F (eds.). *Ecology and evolution of cancer*. Academic Press. pp. 11-46.
- Mahan K, Escott-stump S. 2004. Krause's food, nutrition and diet therapy. Ed. W.B. Saunders. Michigan.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444.
- Martineau D, Lemberger K, Dallaire A, Labelle P, Lipscomb TP, Michel P, Mikaelian I. 2002. Cancer in wildlife, a case study: Beluga from the St. Lawrence Estuary, Québec, Canada. *Environmental Health Perspectives* 110:285-292
- Martínez-Jiménez VC, Méndez-Mancilla A, Portales-Pérez DP. 2018. miRNAs in nutrition, obesity, and cancer: The biology of miRNAs in metabolic disorders and its relationship with cancer development. *Mol. Nutr. Food Res.* 62:1600994. doi: 10.1002/mnfr.201600994.

- Martyshkina YS, Tereshchenko VP, Bogdanova DA, Rybtsov SA. 2023. Reliable Hallmarks and Biomarkers of Senescent Lymphocytes. *Int J Mol Sci* 24:15653. doi: 10.3390/ijms242115653.
- Masper A, Gallo-Reynoso-Reynoso JP, Cisneros-Mata MA, García-Hernández J. 2019. Review of California sea lion (*Zalophus californianus*) abundance, and population dynamics in the Gulf of California. *Revista de Biología Tropical*, 67:833-849.
- Matus-Ortega G, Romero-Aguilar L, Luqueño-Bocardo OI, Hernández-Morfín K, Guerra-Sánchez G, Matus-Ortega M, Martínez-Montes F, Pardo-Vázquez JP. 2020. Las funciones metabólicas, endocrinas y reguladoras de la expresión genética del lactato. *Rev Facultad de Medicina de la UNAM* 63:7-17. doi: 10.22201/fm.24484865e.2020.63.5.02
- McAloose D y Newton A. 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Reviews* 9:517-526.
- McClatchie S, Field J, Thompson AR, Gerrodette T, Lowry M, Fiedler PC, Watson W, Nieto KM, Vetter RD. 2016. Food limitation of sea lion pups and the decline of forage off central and southern California. *R. Soc. open sci.* 3: 150628. doi: 10.1098/rsos.150628.
- MedlinePlus [Internet]. Actualizado 2023 Jun 20. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Total Protein and Globulins. Disponible en: <https://medlineplus.gov/ency/article/003483.htm> <https://medlineplus.gov/labs-tests/globulin-test/>
- Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD. 2008. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 118:2516–2525.
- Melin S, Trillmich F, Auriolles-Gamboa D. 2017. California, Galapagos, and Japanese Sea Lions: *Zalophus californianus*, *Z. wollebaeki*, and *Z. japonicus*. En Würsig B, Thewissen J, Kovacs K (eds.) *Encyclopedia of Marine Mammals*. Tercera edición. London, UK: Academic Press. pp. 153-157.
- Mellink E, Romero-Saavedra AL. 2005. Diet of California sea lions, *Zalophus californianus*, at San Jorge Island, northern Gulf of California, Mexico, 1998-1999. *Ciencias Marinas* 31: 369-377.
- Merrick RL, Chumbley MK, Byrd GV. 1997. Diet diversity of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) and their population decline in Alaska: a potential relationship. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:1342-1348. doi: 10.1139/f97-037.
- Minagawa M, Wada E. 1984. Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence on the relation between  $\delta\text{15N}$  and animal age. *Geochimica Cosmochimica Acta* 48:1135-1140.
- Mitchell J, Lemon S, McGivern D. 2015. How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer?. *Current opinion in virology* 14:101-8. doi: [10.1016/j.coviro.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.003).
- Morales B. 1990. Parámetros reproductivos del lobo marino de la Isla Ángel de la Guarda, Golfo de California, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

- Moreira AC, Mesquita G, Gomes MS. 2020. Ferritin: An Inflammatory Player Keeping Iron at the Core of Pathogen-Host Interactions. *Microorganisms* 8:589. doi: 10.3390/microorganisms8040589.
- Mori C, Morsey B, Levin M, Nambiar PR, De Guise S. 2006. Immunomodulatory effects of In vitro exposure to organochlorines on T-cell proliferation in marine mammals and mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69:283-302. doi: 10.1080/15287390500227472.
- Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, Blaisdell S, Basham B, Dai J, Grein J, Sheppard C, Hong K, Cutler C, Turner S, LaFace D, Kleinschek M, Judo M, Ayanoglu G, Langowski J, Gu D, Paporello B, Murphy E, Sriram V, Naravula S, Desai B, Medicherla S, Seghezzi W, McClanahan T, Cannon-Carlson S, Beebe AM, Oft M. 2011. IL-10 Elicits IFNy-Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell* 20: 781-796. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.003.
- Nair U, Bartsch H, Nair J. 2007. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 43:1109-1120. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.012
- Nakajima M, Ohno K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. 2014. Plasma transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs with nutritional treatment. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 539-543. doi: 10.1292/jvms.13-0583.
- Nascimento H, Alves AI, Coimbra S, Catarino C, Gomes D, Bronze-da-Rocha E, Costa E, Rocha-Pereira P, Aires L, Mota J, Ferreira Mansilha H, Rêgo C, Santos-Silva A, Belo L. 2015. Bilirubin is independently associated with oxidized LDL levels in young obese patients. *Diabetol Metab Syndr* 23:7:4. doi: 10.1186/1758-5996-7-4.
- Navarrete Prida O. 2000. Las quimiocinas. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González* 3: 30-32.
- Nevárez-Martínez MO, Lluch-Belda D, Cisneros-Mata MA, Santos-Molina JP, Martínez-Zavala MA, Lluch-Cota SE. 2001. Distribution and abundance of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) in the Gulf of California and their relation with the environment. *Progress in Oceanography* 49:565-580. doi:10.1016/S0079-6611(01)00041-6.
- Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S, Phillips DL. 2007. A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ* 5: 429-436. doi: 10.1890/060150.01.
- Niño-Torres C, Gardner S, Zenteno-Savín T, Ylitalo G. 2008. Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in California Sea Lions (*Zalophus californianus californianus*) from the Gulf of California, México. *Arch Environ Contam Toxicol.* doi: 10.1007/s00244-008-9181-y.
- NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration. 2019. California Sea Lion (*Zalophus californianus*): U.S. Stock. Disponible en: <<https://www.fisheries.noaa.gov/national/marine-mammal-protection/marine-mammal-stock-assessment-reports-species-stock#pinnipeds---otariids%C2%A0eared-seals-or-fur-seals-and-sea-lions>>
- Nordøy ES, Blix AS. 1991. Glucose and ketone body turnover in fasting grey seal pups. *Acta Physiol Scand.* 141:565-71. doi: 10.1111/j.1748-1716.1991.tb09118.x.

- Nova E, Montero A, Gómez S, Marcos A. 2002. La estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmunitario, en: Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico; Gómez Candela C y Sastre Gallego A (eds.); Ed. You & US. España, 327pp.
- Oftedal OT. 2000. Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. Proceedings of the Nutrition Society 59:99-106. doi: 10.1017/S002966510000024.
- Oftedal OT. 2000. Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. Proceedings of the Nutrition Society 59:99-106. doi: 10.1017/S002966510000024.
- Orr AJ, VanBlaricom GR, DeLong RL, Cruz-Escalona VH, Newsome SD. 2011. Intraspecific comparison of diet of California sea lions (*Zalophus californianus*) assessed using fecal and stable isotope analyses. Ca. J. Zool. 89:109-122.
- Ortega-Ortiz CD, Elorriaga-Verplancken F, Rodríguez-Téllez L, Olivos-Ortiz A, Gaviño-Rodríguez JH. 2013. First record of a neonate California sea lion (*Zalophus californianus*) in Manzanillo, Colima, Mexico. Revista mexicana de biodiversidad 84:705-708. doi: [10.7550/rmb.28385](https://doi.org/10.7550/rmb.28385)
- Páez-Osuna F, Sanchez-Cabeza JA, Ruiz-Fernández AC, Alonso-Rodríguez R, Piñón-Gimate A, Cardoso-Mohedano JG, FloresVerdugo FJ, Carballo-Cenizo JL, Cisneros-Mata MA, 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.doi:10.1016/j.earscirev.2016.09.015 .
- Páez-Osuna F, Álvarez-Borrego S, Ruiz-Fernández AC, GarcíaHernández J, Jara-Marini ME, Bergés-Tiznado ME, Piñón-Gimate A, Alonso-Rodríguez R, Soto-Jiménez MF, Frías-Espericueta MG, RuelasInzunza J, Green-Ruiz C, Osuna-Martínez CC, Sanchez-Cabeza JA. 2019. Estatus ambiental de la contaminación en el golfo de California: una síntesis actualizada. p. 71-94. En: Botello AV, Villanueva S y Gutiérrez J (coord.). Costas y Mares Mexicanos: Contaminación, Impactos, Vulnerabilidad y Cambio Climático. UNAM, UAC. 652 p. doi:10.26359/epomex.0419.
- Pancaldi F. 2020. Bioacumulación de sustancias contaminantes en tiburón ballena, *Rhincodon typus*, en el Golfo de California. Bioagrociencias 13: 1-12.
- Papaparaskeva K, Nagel H, Droese M. 2000. Cytologic diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. Diagnostic cytopathology 22:351-358.
- Pelayo-González EL. 2018. Efecto de variables ambientales en el número de nacimientos de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Peñín I, Levin M, Acevedo-Whitehouse K, Jasperse L, Gebhard E, Gulland FMD, De Guise S. 2018. Effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on California sea lion (*Zalophus californianus*) lymphocyte functions upon in vitro exposure. Environ Res. 167:708-717. doi: 10.1016/j.envres.2018.08.028.
- Peñín I, Figueroa-Cabañas ME, Guerrero-de la Rosa F, Soto-García LA, Álvarez-Martínez R, Flores-Morán A, Acevedo-Whitehouse K. 2019. Transcriptional profiles of California sea lion peripheral NK and CD+8 T cells reflect ecological regionalization and infection by oncogenic viruses. Front.

- Immunol. 10:413. doi: 10.3389/fimmu.2019.00413.
- Pepys MB, Hirschfield. 2003. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111:1805–1812. doi: [10.1172/JCI18921](https://doi.org/10.1172/JCI18921).
- Pereida-Aguilar JC, Barragán-Vargas C, Domínguez-Sánchez C, Álvarez-Martínez RC, Acevedo-Whitehouse K. 2023. Bacterial dysbiosis and epithelial status of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California. *Infection, genetics and evolution* 113:105474. doi:10.1016/j.meegid.2023.105474
- Porras-Peters H, Auriolles-Gamboa D, Cruz-Escalona VH, Koch PL. 2008. Trophic level and overlap of sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Mammal Science* 24: 554-576.
- Pesavento PA, Agnew D, Keel MK, Woolard KD. 2018. Cancer in wild life: patterns of emergence. *Nature Reviews, Cancer* 18: 646-661.
- Post DM. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- Pourahmad J, Salimi A, Seydi E. 2016. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development and Treatment, en: Ahmad R (ed) *Free Radicals and Diseases*. doi:10.5772/64787
- Powell SR. 2000. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 130: S1447-1454.
- Proneth B, Conrad M. 2019. Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link. *Cell Death Differ* 26:14–24.
- Puente J, de Velasco G. 2019. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Sociedad Española de Oncología Médica. Disponible en: <<https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>>.
- Pyecroft SB, Pearse AM, Loh R, Swift K, Belov K, Fox N, Noonan E, Hayes D, Hyatt A, Wang L, Boyle D, Church J, Middleton D, Moore R. 2007. Towards a Case Definition for Devil Facial Tumour Disease: What Is It?. *EcoHealth* 4:346–351. doi: 10.1007/s10393-007-0126-0.
- Qu X, Tang Y, Hua S. 2018. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Front. Immunol.* 9:563. doi: 10.3389/fimmu.2018.00563
- Randhawa N, Gulland F, Ylitalo GM, DeLong R, Mazet JAK. 2015. Sentinel California sea lions provide insight into legacy organochlorine exposure trends and their association with cancer and infectious disease. *One Health* 1:37-43.
- Ríos-Yuil JM, Moreno-López LM, Mercadillo-Pérez P. 2012. Relationship between the presence of histological features suggestive of human papillomavirus infection and the diagnosis of genital malignant and pre-malignant neoplasms. *Revista Médica del Hospital General de México* 75:155-161.
- Rodríguez-Martínez MI, Moreno-Sánchez XG, Moncayo-Estrada R, Elorriaga-Verplancken FR. 2024. Impact of anomalous ocean warming on the abundance and foraging habits of the California sea lion (*Zalophus californianus*) from the San Benito Archipelago in the Mexican Pacific. *Journal of Mammalogy* gyae122. doi:10.1093/jmammal/gyae122
- Roletto J. 1993. Hematology and serum chemistry values for clinically healthy and sick pinnipeds. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24:145-157.

- Rosas-Hernández MP, Auriolos-Gamboa D, Hernández-Camacho CJ. 2018. Differences in the isotopic niche a trophic position of female California sea lion (*Zalophus californianus*) in distinct oceanographic conditions. *Aquatic Mammals* 44:374-388. doi: 10.1002/jwmg.21405.
- Rosas-Hernández MP, Auriolos-Gamboa D y Hernández-Camacho CJ. 2019. Specialized foraging habits of adult female California sea lions *Zalophus californianus*. *Marine Mammal Science* 000:1-26.
- Ruus A, Ugland KI, Skaare JU. 2002. Influence of trophic position on organochlorine concentrations and compositional patterns in a marine food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:2356-2364.
- Saldana JI. 2020. Interleucina 10 (IL-10); Un mordisco a la inmunología por Sociedad Británica de Inmunología. Disponible en: <http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/interleucina-10-il-10>.
- Sandoval Sierra J. 2018. Nichos isotópicos del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y su papel como indicador de cambios ambientales en el Golfo de California, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S., México.
- Santamaría-del-Angel E, Álvarez-Borrego S, Muller-Karger FE. 1994. Gulf of California biogeographic regions base don coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research* 99:7411-7421.
- Salvia PN, Bergo SM, Bonesso-Sabadini PI, Tagliarini EB, Hackel C, De Angelo Andrade LA. 2004. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int J Gynecol Cancer* 14:126-32. doi: 10.1111/j.1048-891x.2004.014030.x.
- Santos RG, Martins AS, Torezani E, Baptista C, Farias JN, Horta PA, Work TM, Balazs GH. 2010. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Dis. Aquat. Organ.* 89:87–95.
- Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. 2010. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31: 37-49.
- Schramm Y, Mesnick S, De la Rosa J, Palacios D, Lowry M, Auriolos-Gamboa D, Snell H. 2009. Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within California sea lion. *Marine Biology* 156: 1375-1387.
- Secretaría de Economía. 2024. Gobierno de México impugnará fallo a favor de proyecto minero en Baja California Sur. Disponible en: <https://www.gob.mx/se/prensa/gobierno-de-mexico-impugnara-fallo-a-favor-de-proyecto-minero-en-baja-california-sur-378203?idiom=es>.
- SEER Training Modules. 2020. What is cancer?/ Categories of cancer. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Disponible en: <https://training.seer.cancer.gov/citation.html>.
- Segurola Gurrutxaga H, Cárdenas Lagranja G, Burgos Peláez R. 2016. Nutrientes e inmunidad. *Nutrición Clínica en Medicina* 10:1-19.
- SePesca, 1990. Anuario estadístico de pesca 1988. México: Secretaría de Pesca. Dirección General de Programación e Informática, México.
- Sermini CG, Acevedo MJ, Arredondo M. 2017. Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 34:690-8. doi:

- 10.17843/rpmesp.2017.344.3182
- Shi Q, King RW. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437:1038–1042. doi:10.1038/nature03958.
- Shini S, Huff G, Shini A, Kaiser P. 2010. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poultry science* 89:841-51. doi: [10.3382/ps.2009-00483](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00483).
- Sica A, Allavena P, Mantovani A. 2008. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Letters* 264: 204-215.
- Siddle HV, Kreiss A, Eldridge MDB, Noonan E, Clarke CJ, Pyecroft S, Woods GM, Belov K. 2007. Transmission of a fatal clonal tumor by biting occurs due to depleted MHC diversity in a threatened carnivorous marsupial. *PNAS* 104: 16221-16226. doi: 10.1073/pnas.0704580104.
- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. 2006. Cancer immuno surveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 90:1–50.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 86:1065-1073. doi:10.1189/jlb.0609385.
- Song Y, Lynch M, McClements R. 2009 A retrospective investigation of the prevalence and significance of hemosiderosis in captive pinnipeds, en: Ward A, Treiber K, Schmidt D, Coslik A y Maslanka M (eds.). Proceedings of the Eighth Conference on Zoo and Wildlife Nutrition. AZA Nutrition Advisory Group. EEUU.
- Suverza A. 2010. Introducción a la evaluación del estado de nutrición, en: Suverza A y Haua K (eds.). El ABCD de la evaluación del estado de nutrición. Ed. Mc Graw Hill. México, p. 1-14.
- Szteren D, Auriolles D, Gerber LR. 2006. Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Sea Lions of the World*. Alaska Sea Grant College Program. doi: 10.4027/slw.2006.25.
- Szteren D, Auriolles-Gamboa D. 2011. Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas* 37:349-368.
- Thompson PA, Khatami M, Baglole CJ, Sun J, Harris SA, Moon E-Y, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Brown D, Colacci A, Mondello C, Raju J, Ryan E, Woodrick J, Scovassi I, Singh N, Vaccari M, Roy R, Forte S, Memeo L, Salem HK, Amedei A, Hamid RA, Lowe L, Guarnieri T, Bisson WH. 2015. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis* 36(Suppl 1): S232–S253. doi:10.1093/carcin/bgv038
- Trisos CH, Merow C, Pigot AL. 2020. The projected timing of abrupt ecological disruption from climate change. *Nature* 580:496–501. doi: [10.1038/s41586-020-2189-9](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2189-9).
- Ujvari B, Klaassen M, Raven N, Russell T, Vittecoq M, Hamede R, Thomas F, Madsen T. 2018. Genetic diversity, inbreeding and cancer. *Proc. R. Soc. B* 285:20172589.
- Urquiza Ayala G, Arteaga Coarite R, Chacón Yucra P. 2019. Utilidad de los

- reactantes de fase aguda en el diagnóstico clínico. Rev. Méd. La Paz 25: 91-98.
- Valer V, Jara D, Asmat G, Tello D. 2005. Correlación clínico patológica del cáncer cervical y precursores en una población de Lima periférica. Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos 66:100-106.
- Van Bonn WG. 2015. Pinnipedia, en: Miller RE y Fowler ME (eds.) Fowler's Zoo and Animal Medicine Volume 8. Saunders (Elsevier). pp. 446-447. doi: [10.1016/C2012-0-01362-2](https://doi.org/10.1016/C2012-0-01362-2)
- Vargas-González HH, Arreola-Lizárraga JA, García-Hernández J, Mendoza-Salgado RA, Zenteno-Savín T, Méndez-Rodríguez LC. 2017. Calidad de sedimentos asociada a actividades antrópicas en lagunas costera semiáridas subtropicales de la costa central este del Golfo de California. Rev. Int. Cantam. Ambie. 33:7-22. doi: 10.20937.RICA.2017.33.esp02.01.
- Velázquez-Muñoz F, Filonov A. 2021. Tidal Energy Flows between the Midriff Islands in the Gulf of California. Energies. doi: [10.3390/EN14030621](https://doi.org/10.3390/EN14030621).
- Vera-Massieu C, Brock PM, Godínez-Reyes C, Acevedo-Whitehouse K. 2015. Activation of an inflammatory response is context-dependent during early development of the California sea lion. R. Soc. Open Sci. 2:150108. doi: [10.1098/rsos.150108](https://doi.org/10.1098/rsos.150108).
- Vickers TW, Clifford DL, Garcelon DK, King JL, Duncan CL, Gaffney PM, Boyce WM. 2015. Pathology and Epidemiology of Ceruminous Gland Tumors among Endangered Santa Catalina Island Foxes (*Urocyon littoralis catalinae*) in the Channel Islands, USA. PLoS One 10:e0143211. doi:10.1371/journal.pone.0143211
- Villegas Valverde CA, Faxas García ME. 2014. La nutrición en la inmunidad y el cáncer. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo 51:30-36.
- Vittecoq M, Roche B, Daoust SP, Ducasse H, Missé D, Abadie J, Labrut S, Renaud F, Gauthier-Clerc M, Thomas F. 2013. Cancer: a missing link in ecosystem functioning?. Trends in Ecology & Evolution 28:628-635.
- Ward PA. 2010. Acute and chronic inflammation, en: Serhan CN, Ward PA y Gilroy DW (eds.) Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press. China, pp. 1-16.
- Weinberg RA. 2014. The biology of cancer. Garland Science, second edition. EE UU. pp. 31-70.
- Weise MJ, Harvey JT. 2008. Temporal variability in ocean climate and California sea lion diet and biomass consumption: implications for fisheries management. Marine Ecology Progress Series 373: 157-172. doi: 10.3354/meps07737.
- Weise MJ. 2000. Abundance, food habits, and annual fish consumption of California sea lion (*Zalophus californianus*) and its impact on salmonid fisheries in Monterey Bay, California. Master's Theses, San Jose State University. 2117. doi: [10.31979/etd.ut2v-j72k](https://etd.sjtu.edu.tw/2017.07.172k).
- White JR, Francis-Floyd R. 1988. Nutritional Management of Marine Mammals: A Review. International Association for Aquatic Animal Medicine Archive, Nutrition and Behavior.
- Whitehead DA, Becerril-Garcia EE, Petatán-Ramírez D, Vázquez-Haikin A, González-Armas R, Galván-Magaña F. 2018. Whale shark *Rhincodon typus*

- strandings in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Fish Biology* 94: 165-167.
- Williams K. M. 2013. Clinical values of blood variables in wild and stranded California sea lion (*Zalophus californianus*) and blood sample storage stability. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas. California State University Monterey Bay.
- Williams TD, Pulley LT. 1981. Leiomyomas in two sea otters, *Enhydra lutris*. *J. Wildl. Dis.* 17:401–404.
- Wilkinson T, Wiken E, Bezaury J, Hourigan T, Agardy T, Herrmann H, Janishevski L, Madden, C., Morgan, L. & Padilla, M. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte. Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal. p 200.
- Work TM, Balazs GH, Schumacher JL, Marie A. 2005. Epizootiology of spirorchid infection in green turtles (*Chelonia mydas*) in Hawaii. *J. Parasitol.* 91, 871–876.
- World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. 2018. The cancer process. Continous Update Project Expert Report. Disponible en: [dietandcancerreport.org](http://dietandcancerreport.org)
- Ylitalo GM, Stein JE, Hom T, Johnson LL, Tilbury KL, Hall AJ, Rowles T, Greig D, Lowenstine LJ, Gulland FM. 2005. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar Pollut Bull.* 50:30-9.
- Yonezawa T, Kohno N, Hasegawa M. 2009. The monophyletic origin of sea lions and fur seals (Carnivora;Otariidae) in the Southern Hemisphere. *Gene* 441:89-99.
- Young B, Gleeson M, Cripps AW. 1991. C-reactive protein: a critical review. *Pathology* 23:118-124. doi:10.3109/00313029109060809
- Zavala-González A, Godínez C, Enríquez R. 2004. La conservación de las islas del Mar de Cortés: experiencias en Baja California. En: Rivera Arriaga E, Villalobos GJ, Azuz Adeath I y Rosado May F (eds.). El manejo costero en México. Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo. pp. 353-365. Citado en: Reserva de la Biosfera Isla San Pedro Mártir y Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California. 2011. Monitoreo de Lobo Marino de California (*Zalophus californianus californianus*) en la Reserva de la Biosfera Isla San Pedro Mártir y Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Disponible en internet desde: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/lobo/fichitas/index.html>. Consulta: 21 de febrero de 2020.
- Zhao L, Chen Y, Varghese Z, Huang A, Tang R, Jia B, Moorhead JF, Gong J, Ruan X. 2011. Murine gamma herpes virus 68 infection promotes fatty liver formation and hepatic insulin resistance in C57BL/6J mice. *Hepatol Int* 6:520-530. doi:10.1007/s12072-011-9283-x.
- Zitvogel L, Pietrocola F, Kroemer G. 2017. Nutrition, inflammation and cancer. *Nature Immunology* 18:843-850. doi: 10.1038/ni.3754.

