



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, MORFOLÓGICA Y ULTRA ESTRUCTURAL
DEL NEMATODO HEMATÓFAGO *Uncinaria* sp. EN EL LOBO MARINO DE
GALÁPAGOS, *Zalophus wollebaeki***

Opción de titulación
Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
en licenciado en biología

Presenta:
Alejandra Herbert Mainero

Dirigido por:
Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Presidente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Secretario

Firma

Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Vocal

Firma

Dr. Juan Manuel Malda Barrera
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha (será el mes y año de aprobación del Consejo Universitario)

RESUMEN

Uncinaria es un nematodo hematófago que parasita comúnmente a roedores y carnívoros. Originalmente se describieron dos especies en hospederos otáridos, *U. lucasi* y *U. hamiltoni*. Sin embargo, numerosos registros de los parásitos en diferentes hospederos no concuerdan con ninguna de las características típicas descritas. Lo anterior, sugiere que hay una gran plasticidad dentro del género, o que existen más especies que las dos descritas. En esta tesis se registra y describe, por primera vez, a individuos adultos de *Uncinaria* en el lobo marino de Galápagos, *Zalophus wolfebaeki*. Se predijo que habría similitud de caracteres entre los parásitos del lobo marino de Galápagos y los caracteres de *Uncinaria* en un hospedero filogenéticamente cercano, el lobo marino de California, *Z. californianus*. La caracterización morfológica y molecular de los ejemplares parásitos sugiere la separación de los linajes previamente descritos, y constituye evidencia de que la *Uncinaria* recuperadas del lobo marino de Galápagos está más relacionadas con la que típicamente parasita al el lobo marino de California. Algunos de los caracteres observados, como las placas bucales, sugieren un potencial virulento de *Uncinaria* en el lobo marino de Galápagos, por lo que se debería explorar el posible riesgo para la conservación impuesto por este parásito en la especie, ya considerada en peligro de extinción.

Palabras clave: filogenia, nematodo hematófago, lobo marino de Galápagos, *Uncinaria*, *Zalophus wolfebaeki*.

SUMMARY

Uncinaria is a hematophagous nematode that commonly parasitizes carnivores. Initially two species were described infecting otariid hosts, *U. lucasi* and *U. hamiltoni*, however several specimens recovered from different host species fit neither of these descriptions, suggesting either plasticity of diagnostic traits or that the genus encompasses more species than previously thought for otariid hosts. This thesis is the first report and characterization of adult *Uncinaria* sp. in the Galapagos sea lion. This work hypothesized that there would be similarities between the parasites of the Galapagos sea lion, *Z. wollebaeki* and those of a closely related species, the California sea lion, *Z. californianus*. Characterization of the specimens using morphological and molecular methods suggests divergence from the two previously described species lineages, although the *Uncinaria* recovered from *Z. wollebaeki* were most similar to that reported in the sister taxon, *Z. californianus*. Some of the morphological traits observed, such as buccal plates, suggest a potentially high virulence of *Uncinaria* in the Galapagos sea lion, warranting future studies on the potential health risk of these parasites on an already threatened host species.

Key words: hematophagous nematode, phylogeny, *Uncinaria*, *Zalophus wollebaeki*.

DEDICATORIAS

Para mi familia, en especial a mi Mamá y Papá, gracias por su apoyo en todo momento. También para mí abuela porque nunca pierde el interés por el conocimiento y la vida.

A Karina por su pasión en la ciencia que logra transmitir a través de la enseñanza y que lleva más allá de los requisitos establecidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa FOFI-UAQ 2012 por el financiamiento otorgado para llevar a cabo la presente tesis.

También quiero agradecer al al parque Nacional Galápagos quien otorgó los permisos PC-18-09,N°101-2010-PNG y N°032-2010-PNG, para la colecta de muestras, y al proyecto 15-3530 de SEP-CONACYT por el financiamiento parcial para realizar esta tesis.

A Norma Hernández por su apoyo con aspectos técnicas del análisis parasitológico.

A Paddy Brock por permitirme usar las muestras de los parásitos y por sus comentarios a mi trabajo.

A mis asesores, Fausto Arellano Carbajal, Rolando Bárcenas Luna y Juan Malda; por su interés, paciencia y consejos. También a todos los integrantes del laboratorio GMEE por su apoyo.

Finalmente a todos mis amigos que me acompañaron y me escucharon en todo momento durante la realización de la tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido

I.	INTRODUCCIÓN.....	9
II.	ANTECEDENTES.....	12
II.1	El archipiélago de las Galápagos.....	12
II.2.1	Los pinnípedos.....	14
II.2.2	El lobo marino de Galápagos.....	15
II.3.1	Efectos de los parásitos sobre sus poblaciones hospederas.....	18
II.3.2	Co-evolución parásito-hospedero.....	18
II.4.1	El nematodo hematófago del género <i>Uncinaria</i> en pinnípedos.....	20
II.4.2	Historia del género <i>Uncinaria</i> en pinnípedos.....	24
II.4.3	Interacción entre <i>Uncinaria</i> y su hospedero.....	26
III.	HIPÓTESIS.....	29
IV.	OBJETIVOS.....	30
III.1	Objetivo general.....	30
III.2	Objetivos particulares.....	30
V.	MÉTODOS.....	31
V.1	Colecta de parásitos.....	31
V.2	Morfología.....	31
IV.3	Molecular.....	32
V.4	Elaboración de filogenias.....	34
VI.	RESULTADOS.....	36
VII.	DISCUSIÓN.....	49
VIII.	CONCLUSIONES.....	58
IX.	REFERENCIAS.....	59
X.	Anexos.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	12
Figura 2.....	15
Figura 3.....	17
Figura 4.....	22
Figura 5.....	39
Figura 6.....	40
Figura 7.....	42
Figura 8.....	43
Figura 9.....	44
Figura 10.....	44
Figura 11.....	45
Figura 12.....	47
Figura 13.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	20
Cuadro 2.	21
Cuadro 3.	33
Cuadro 4.	37
Cuadro 5.	40
Cuadro 6.	46

I. INTRODUCCIÓN

Los parásitos pueden regular las poblaciones de sus hospederos al alterar su comportamiento, y afectar sus tasas de mortalidad y de reproducción, entre otras. Se calcula que, en promedio, la diversidad de parásito helminto gastrointestinales por hospedero vertebrado mamífero es de 141 especies (Poulin y Morand 2000), dentro del 33% de los géneros parásitos de nematodos conocidos hasta el momento (Anderson, 2000). De estos, el género *Uncinaria* es un nemátodo hematófago que pertenece al orden Strongylida, familia Ancylostomatidae, y se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes especies de pinnípedos alrededor del mundo (Ionita et al. 2008). Los parásitos del género *Uncinaria* representan una constante presión de selección para poblaciones silvestres de otáridos debido a la mortalidad que pueden ocasionar en las crías infectadas (Castinel et al. 2007, Chilvers et al. 2008, Lyons et al. 2011). Sin embargo el parásito hematófago *Uncinaria* ocasiona diferentes patologías en sus hospederos, desde cuadros severos y causantes de alta mortalidad a manera de eventos epidémicos, como los reportados para colonias de lobo fino de Norte *Callorhinus ursinus* (DeLong 2006); o bien tener baja virulencia con pocos efectos observables a nivel poblacional, como ha sido reportado para el lobo fino de Juan Fernández, *Arctocephalus phillipi* y el lobo marino del Sur *Otaria flavescens* (Sepúlveda 1998, Berón-Vera et al. 2004). En algunas especies como el lobo marino de California, *Zalophus californianus*, o el lobo marino de Nueva Zelanda, *Phocarctos hookeri*, las infecciones ocasionadas por *Uncinaria* sp. son una de las principales causas de muerte de crías (Castinel, et al. 2007; Chilvers, et al. 2009, Lyons et al. 2001).

Taxonómicamente, a la fecha solo se han descrito dos especies de *Uncinaria* en pinnípedos. Primeramente *Uncinaria lucasi* (Stiles, 1901), encontrada en el lobo fino del Norte, y posteriormente *U. hamiltoni*, descrita en el lobo marino suramericano (Baylis, 1947) No obstante también se han encontrado fenotipos intermedios de las dos especies (Nadler et al. 2000; Lyons et al. 2012) y una subespecie, *U. hamiltoni platensis* (Botto y Mañe-Garzon, 1975).

Se han reportado estos patógenos en cinco especies de lobos marinos, cinco de lobos finos y cuatro fócidos (Lyons et al. 2011; Nadler et al. 2013); cada uno con sus respectivas variaciones morfológicas, de comportamiento, patogenia y genéticas; lo cual indica una gran diversidad a distintos niveles que aún nos falta por conocer (Castinel et al. 2006). A la fecha el género *Uncinaria* no ha sido descrita en el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*)

El lobo marino de Galápagos, es un pinnípedo otárido endémico del Archipiélago de las Galápagos, Ecuador (Wolf et al. 2007). Actualmente se encuentra en peligro de extinción, y su tendencia poblacional va en declive (IUCN, 2008). Este fenómeno demográfico se relaciona con las altas tasas de mortalidad asociadas principalmente a sus hábitos de forrajeo, que son afectados por eventos climáticos de repercusión ecosistémica, como el Niño Oscilación del Sur (ENSO) (Wolf et al. 2007). También ha sido afectada por la presencia de enfermedades infecciosas (Aurioles y Trillmich, 2008). Por lo tanto, cualquier registro "nuevo" de parásito que presente características semejantes al parásito del género *Uncinaria* que tiene características de alta virulencia y alta mortalidad en algunas especies hospederas filogenéticamente cercanas al lobo marino de Galápagos, es importante de identificar, pues podría llegar a tener un papel clave en la conservación de la especie.

En febrero de 2010 durante una revisión de rutina, se encontró una cría muerta en la Isla de Santa Fe y a la necropsia se observaron parásitos gastrointestinales que macroscópicamente asemejaban *Uncinaria* sp. Dada la estrecha relación filogenética entre *Zalophus wollebaeki* y *Zalophus californianus* (Wolf et al. 2007) se propuso que presentaría características morfológicas y genéticas semejantes a las descritas para esta especie. Debido a que *Uncinaria* no ha sido reportada ni descrita para el lobo marino de Galápagos, y a que su población es reducida y la especie se encuentra amenazada (IUCN 2008), es relevante identificar al parásito e investigar a futuro su potencial patogenicidad a nivel poblacional. El objetivo principal de esta tesis es caracterizar y describir por primera vez a éste parásito

tipo *Uncinaria* encontrado en el tracto intestinal de la cría de lobo marino de Galápagos. Se busca aportar datos para comprender la relación de este parásito con sus hospederos pinnípedos. La presente tesis propone una posible relación filogenética del parásito tomando en cuenta las interacciones ecológicas de *Uncinaria* en otros hospederos reportados como manera de ayudar a esclarecer la taxonomía difusa del género.

II. ANTECEDENTES

II.1 El archipiélago de las Galápagos

El archipiélago de las Galápagos ($01^{\circ}40'N-01^{\circ}25'S$ $89^{\circ}15'W-92^{\circ}00'W$; Fig. 1) se localiza en el océano Pacífico a 1000 km aproximadamente de la costa de Ecuador continental. El archipiélago se compone de 20 islas, 13 de ellas de gran tamaño con más de 10 km^2 de superficie, y seis pequeñas. Se encuentra también numerosos islotes de acumulaciones rocosas de origen volcánico (Groot, 1983). El 97 % del territorio del archipiélago se encuentra protegido por el Parque Nacional Galápagos y también posee más de 137000 km^2 de superficie marina protegido como Reserva Marina (Salazar, 2005). Las islas principales más conocidas: la Isabela, Santa Cruz, Fernandina, San Cristóbal, Española, Santa Fe, Pinzón, Rábida, Floreana y Darwin (Geist, 1996).



Figura 1. Mapa del archipiélago de las Galápagos. Tomada de googlearth

El movimiento de la placa de Nazca en zonas de alta actividad volcánica fue lo que dió origen a la formación individual de cada isla dentro del archipiélago (Geist, 1996). La edad de las islas se puede estimar utilizando isótopos radiactivos, y se sabe que las más antiguas están localizadas al sureste del archipiélago como la Española y San Cristóbal, con aproximadamente 6.3 Ma desde su formación (Geist 1996; Parent, et al., 2008).

El clima de la zona es árido, subtropical y con estacionalidad marcada. Se divide en una estación fría/seca y una cálida/húmeda. La primera abarca de junio a octubre y se caracteriza por aguas frías y vientos del suroeste; la temperatura varía entre los 18-35 °C. La corriente de Humboldt influye en esta estación porque trae agua fría de la Antártica lo largo de la costa de Suramérica, lo que provee productividad oceánica para la zona al entrar en las Galápagos por el lado oeste del archipiélago (Parent et al., 2008). La estación cálida/húmeda abarca de diciembre a abril y mantiene temperaturas por arriba de los 25 °C con lluvias (Cruz-Delgado et al., 2010). Las corrientes marinas que intervienen en el archipiélago son la cálida-norte de Panamá, la fría-sur de Humboldt y la fría-oeste de Cromwell. La corriente de Cromwell también se relaciona con alta productividad, al ser una corriente submarina presente durante todo el año que al toparse con las islas del oeste como Fernandina origina surgencias de agua fría rica en nutrientes (Salazar 2005).

La combinación de factores abióticos como la geología, latitud, corrientes marinas y el aislamiento oceánico ocasionó que los pocos organismos que pudieron colonizar Galápagos generaran un alto grado de endemismo de flora y de fauna. El archipiélago de las Galápagos alberga un estimado de 800 especies de plantas vasculares, de las cuales 250 son endémicas, y 500 especies de plantas no vasculares (Palmer y Rachowiecki, 2003) como helechos y musgos. Pocos animales terrestres alcanzaron las islas sin intervención antropogénica; los grupos más numerosos fueron el de los reptiles y las aves, y algunos diversificaron de sus ancestros continentales sudamericanos como los pinzones de Darwin (*Geospiza*

spp.). Habitan las Galápagos 58 especies de aves residentes, de las cuales aproximadamente la mitad son endémicas, y las islas provee de refugio a más de 300 spp. de aves migratorias. La mayoría de los reptiles del archipiélago también son especies endémicas, como la especie de tortuga gigante de Galápagos (*Chelonoidis* spp.), y la iguana marina (*Amblyrhynchus cristatus*). Sin embargo casi no hay mamíferos nativos terrestres o parcialmente terrestres (Parent, et al 2008). Entre las seis especies de mamíferos nativos descritas, dos pertenecen a los pinnípedos otáridos (el lobo marino de Galápagos, y el lobo fino de Galápagos, *Arctocephalus galapagoensis*), dos a murciélagos (*Lasiurius brachotys* y *Lasiurius cinereus villosissimus*) (McCracken et al. 1997) y dos a roedores (*Oryzomys bauri* y *Nesoryzomys* spp) (Dowler et al. 2000).

II.2.1 Los pinnípedos

Los pinnípedos son un grupo de mamíferos marinos que derivó de los carnívoros arctoideos, hace más de 30 millones de años, durante el oligoceno (Berta et al. 2006). Esta época se caracterizó por glaciaciones que cambiaron la dinámica de corrientes marina, así como la baja temperatura, lo que generó alta productividad y surgencias más localizadas que se cree fueron aprovechadas dando lugar a estas radiaciones evolutivas (Uhen 2007).

El suborden pinnipedia alberga tres familias, otariidae, odobenidae y phocidae. Sus relaciones filogenéticas aún no están resueltas; pero existe mayor apoyo para la hipótesis del origen monofilético del grupo, en dónde se propone que las tres familias derivan de un linaje basal de úrsidos dentro del orden carnívora. Los fócidos y los otáridos divergieron hace aproximadamente 25 millones de años, durante el oligoceno tardío (Deméré et al. 2003, Arnason et al. 2006, Uhen 2007). Posteriormente hubo radiaciones adaptativas durante el pleistoceno dando lugar a la formación de los grupos que conocemos como los pinnípedos actuales (Anarson 2006). Los integrantes de la familia otariidae surgieron en el hemisferio norte durante el mioceno medio; la divergencia se dio durante el plioceno tardío o

inicios del pleistoceno cuando migraron en el océano Pacífico desde el hemisferio norte hacia el sur y hacia el este; lo cual dio origen a los grupos del hemisferio sur, *Neophoca*, *Otaria* y *Phocarctos* (Deméré et al. 2003).

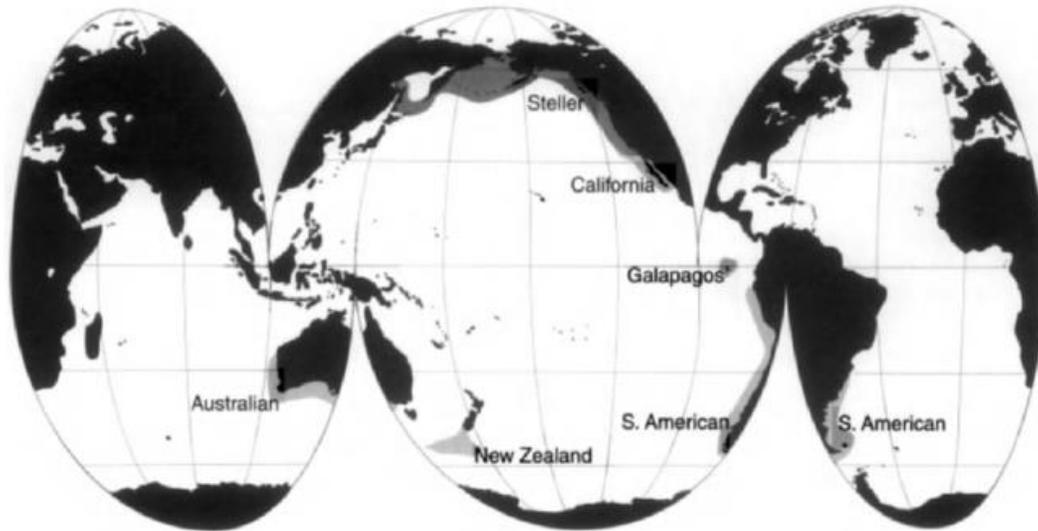


Figura 2. Distribución geográfica de los linajes de lobos marinos, de Berta y Surich (1999) basado en Riedman (1990).

II.2.2 El lobo marino de Galápagos

La familia otariidae agrupa a los lobos marinos y lobos finos o peleteros, y se compone de 14 especies y siete géneros (Fig 2). El archipiélago de las Galápagos solo posee dos representantes endémicos de esta familia, el lobo fino de Galápagos, *Arctocephalus galapagoensis* y el lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki* (Perrin et al. 2002). Estas dos especies juegan un papel clave en los ecosistemas marinos de Galápagos debido a que son depredadores tope. El lobo marino de Galápagos se distribuye a lo largo del archipiélago mientras el lobo fino de Galápagos se localiza en las islas del noroeste. A pesar de ser parcialmente simpátricos, ambas especies presentan múltiples diferencias en su comportamiento e historia de vida (Alava y Salazar 2006).

En las últimas décadas sus poblaciones han tenido un declive que se ha relacionado con cambios en la disponibilidad de alimento provocados por fluctuaciones climáticas como el Niño Oscilación del Sur (ENSO, por sus siglas en inglés), en donde la mortalidad de la especie aumenta. Por ejemplo, en 1960 las poblaciones de lobo marino de Galápagos oscilaban entre 20,000 a 50,000 individuos, pero conteos recientes los estiman en alrededor de 14,000 (Wolf, et al. 2007). También se ha propuesto la emergencia de enfermedades con reportes de transmisión entre fauna doméstica como los perros hacia los lobos marinos como factor de riesgo para la especie (Aurioles y Trillmich, 2008). Varios monitoreos de las poblaciones de lobos marinos y lobos finos de Galápagos han reportado diversas infecciones, algunas que representan una amenaza potencial a sus poblaciones, como el virus del distemper (moquillo) canino (Alava y Salazar, 2006). Debido a esto, además de su distribución restringida y el tamaños poblacional reducido, la especie se clasifica como 'en peligro de extinción' según los criterios de la IUCN, 2009 (Ceballos, et al. 2010).

El lobo marino de Galápagos se localiza a lo largo de las playas, en territorios de aproximadamente 30 individuos que son dominados por un macho con varias hembras y crías (Fig. 3). La estructura social es originada por su estrategia de reproducción poligínica. El lobo marino de Galápagos presenta un dimorfismo sexual marcado en individuos adultos (Pärshmann et al., 2006). Su época reproductiva se extiende de septiembre a febrero (Orr, 1967). Cada año las hembras tienen una cría y su período de gestación dura 11 meses (Huhtasaari, 2011). La dieta diurna del lobo marino se basa principalmente en crustáceos, cefalópodos y peces (Villegas-Amtmann et al. 2008); Sin embargo las dietas varían dependiendo de su distribución, y pueden ser epipelágicas o bentónicas según la competencia con el lobo fino de Galápagos, particularmente en las islas del noroeste (Wolf et al. 2008)



Figura 3. Lobos marinos de Galápagos descansan sobre la arena

Anteriormente se consideraba al lobo marino de Galápagos una subespecie hermana del lobo marino de California, *Zalophus californianus wollebaeki* (Maldonado, et al 1995). Pero las diferencias morfométricas, moleculares, genéticas y etológicas, además de su aislamiento reproductivo, han sido tomadas como evidencia de que se trata de otra especie, por lo que se conoce ahora como *Z. wollebaeki*. Esta especie comparte un ancestro común con el lobo marino de California que se calcula existió hace alrededor de 2.3 ± 0.5 millones de años (Wolf, et al. 2007). Posteriormente se estimó esta separación genética alrededor de 0.8 millones de años, menor que lo estimado anteriormente (Shramm, et al. 2009). Es por esto que cualquier interacción parásito-hospedero, que cause problemas de salud para las poblaciones de *Z. californianus particularmente en términos de mortalidad y reducción del tamaño poblacional*, debe ser tomado en cuenta para la conservación del lobo marino de Galápagos.

II.3.1 Efectos de los parásitos sobre sus poblaciones hospederas

El término 'parásito' es una clasificación ecológica que agrupa a organismos que establecen interacciones antagónicas con otros organismos, considerados hospederos en los que puede ocasionar un daño directo o indirecto generalmente observado como la disminución de su eficacia biológica (Huyse, y Poulin 2005). Hasta hace poco, se subestimaba la acción de los parásitos como fuerzas evolutivas, comparativamente con la competencia reproductiva y la depredación. Incluso se creía que todo parásito evoluciona para ser menos dañino a su hospedero (Schmid-Hempel, 2008). Sin embargo, ya se ha demostrado que los parásitos ejercen presiones selectivas sobre los hospederos al regular a sus poblaciones (Anderson y May 1978). En particular, los parásitos pueden alterar la supervivencia, conducta y éxito reproductivo de las especies hospederas y por lo tanto, influir sobre la evolución. Existe una desigualdad en la relación parásito hospedero, esta asimetría se basa en el hecho de que muchos parásitos poseen mayor presión selectiva debido a que sin su hospedero no pueden sobrevivir mientras que no siempre es el caso inverso para el hospedero (Schmid-Hempel, 2008). Algunas otras características que también influyen sobre el potencial evolutivo del parásito son por ejemplo: mayores tamaños poblacionales y menor tiempo generacional que las de sus hospederos (Huyse, y Poulin 2005).

II.3.2 Co-evolución parásito-hospedero

La co-evolución se refiere a procesos recíprocos de cambio por selección natural entre dos o más especies interactuantes, en este caso un hospedero y un parásito (Thompson, 2001); de manera tal que la evolución del hospedero es dependiente de la evolución del parásito y viceversa. Esta interacción se puede ver reflejada en patrones filogenéticos, e inclusive puede conducir a eventos de co-especiación de manera que para la especiación conjunta, cada evento de especiación del parásito

ocurre también en el hospedero. Sin embargo, procesos como la presencia de parásitos en la presa consumida, pérdida de parásitos durante cambios ambientales y errores o ausencia de muestreo dificultan la interpretación de estos patrones (Schmid-Hempel, 2008).

Para entender los patrones de co-evolución se necesita estudiar cómo se da la interacción entre los parásitos con sus hospederos. Los parásitos causan un decremento en la eficacia biológica de su hospedero por lo que ejercen una presión de selección negativa sobre los individuos susceptibles. De este modo los hospederos infectados que logran contrarrestar los efectos nocivos provocados por los patógenos, e idealmente eliminarlos, son lo que sobrevivirán, ejerciendo así una presión de selección sobre los patógenos. Por su parte, los patógenos deben contrarrestar estas defensas que les impone su hospedero. Por eso, algunas de las características bajo mayor presión selectiva involucran defensas inmunes, etológicas o fisiológicas, mientras que, por parte del patógeno hay evidencia de selección sobre características como el tipo de transmisión, el tipo de ciclo, la movilidad y la evasión de las defensas del huésped. Esta continua carrera evolutiva de oscilaciones genotípicas se conoce como la hipótesis de “La Reina Roja” (Van Valen 1973). Se predice bajo esta hipótesis que, durante cierto tiempo estas interacciones seleccionan para determinados parásitos, y a su vez, los hospederos contrarrestan cualquier cambio de los parásitos en un tiempo determinado (Dybdahl y Storfer 2003).

Este proceso co-evolutivo puede ocurrir sobre la virulencia, que es la magnitud del daño que ocasiona el parásito en su hospedero, aunque puede ser una propiedad no adaptativa, es decir “sin salida” (Ewald 1995), como ocurre con las fiebres hemorrágicas por arenavirus en humanos (Morens, et al. 2004). La virulencia, al ser una propiedad específica de la interacción, continuamente está cambiando por co-evolución entre interactuantes por lo tanto *per se* no es una condición “buena” para ninguno de los dos interactuantes; sin embargo, se tiende a asociar el daño con acciones provocadas por el parásito y no como una propiedad ecológica en la

que ocasionalmente la selección natural favorece un estado perjudicial. La inversión que realizan los hospederos para contrarrestar los efectos de la virulencia suelen tener un costo energético que impacta sobre su eficacia biológica.(Frank y Schmid-Hempel 2008). Al estudiar las interacciones hospedero-patógeno desde la perspectiva de la virulencia y las respuestas de defensa se puede reconstruir la historia coevolutiva hipotética entre ambos organismos. Se demuestra que linajes con la mayor tasa de sustituciones no sinónimas en sitios claves antigénicos son lo que dominan las epidemias (Bush et al 1999).

II.4.1 El nematodo hematófago del género *Uncinaria* en pinnípedos

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del genero *Uncinaria*

Dominio: Eukaryota
Reino: Animalia
Phylum: Nematoda
Clase: Secernentea
Orden: Strongylida
Familia: Ancylostomatoidea
Género: <i>Uncinaria</i>

El orden Strongylida se compone de cinco superfamilias, agrupando a los nematodos bursados de las cuales en una familia (Ancylostomatoidea), se agrupan los “gusanos de gancho” o hookworms (Cuadro1). *Uncinaria* deriva del latin ‘*uncus*’ que significa gancho o hook (Mehlhorn 2008). El género *Uncinaria* se compone de nemátodos hematófagos que pertenecen a la familia Ancylostomatidae (Mehlhorn 2008). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser parásitos gastrointestinales de mamíferos. Poseen placas bucales en vez de dientes y una cápsula bucal con paredes continuas (Anderson, et al 2009). *Uncinaria* posee una distribución cosmopolita e infecta hospederos carnivoros, roedores e incidentalmente al humano y al puerco. Dentro del género se reconocen, hasta el momento, 14 especies incluyendo *U. criniformis*, para la que aun está incierta la clasificación taxonómica. Algunas de las especies más

conocidas son: *U. criniformis*, *U. stenocephala*, *U. carinii*, *U. bidens*, *U. longespicum*, entre otras. Hasta la fecha, el género *Uncinaria* se había reportado en cinco especies de lobos finos, cinco especies de lobos marinos y cuatro fócidos (Nadler et al. 2013). Ver cuadro 2 de (Lyons, et al. 2011).

Cuadro 2. Hospederos pinnípedos de *Uncinaria* spp., tomado de Lyons et al (2011)

Name	Locality	Selected references
Australian fur seal (<i>Arctocephalus pusillus</i>)	Australia	Beveridge (1980)
Juan Fernandez fur seal (<i>Arctocephalus philippi</i>)	Chili	Sepulveda (1998)
New Zealand fur seal (<i>Arctocephalus forsteri</i>)	Australia	Beveridge (1980)
Northern fur seal (<i>Callorhinus ursinus</i>)	USA	Lucas (1899)
South American fur seal (<i>Arctocephalus australis</i>)	Uruguay	George-Nacimiento et al. (1992)
Australian sea lion (<i>Neophoca cinerea</i>)	Australia	Beveridge (1980)
California sea lion (<i>Zalophus californianus</i>)	USA	Dailey and Hill (1970)
New Zealand sea lion (<i>Phocarctos hookeri</i>)	New Zealand	Castinel (2006)
South American sea lion (<i>Otaria flavescens</i>)	Argentina Uruguay	Berón-Vera et al. (2004) George-Nacimiento et al. (1992)
Steller sea lion (<i>Eumatopias jubatus</i>)	USA	Olsen (1958)
Northern elephant seal (<i>Mirounga angustirostris</i>)	USA	Dailey (2001)
Southern elephant seal (<i>Mirounga leonina</i>)	Crozet Islands (Antarctica)	Johnston and Mawson (1945)
Ringed seal (<i>Phoca hispida</i>)	?	Dailey and Brownell (1972)

En los pinnípedos el modo de transmisión vertical de las uncinarias, por vía materna se describió para el lobo fino del Norte (Olsen y Lyons, 1965). La primera etapa es la fase de vida libre, en dónde las crías defecan los huevos que eclosionan a larva estadio L1 que muda a L2. La segunda etapa es la etapa infectiva, que abarca la muda larval al estadio L3 que es la larva infectiva, también conocida como “*larva migrans*”. La larva L3 penetra al hospedero por la piel intacta y migra hacia el tejido adiposo. Si el hospedero infectado fue una hembra adulta gestante, se completa la última etapa del ciclo del parásito, ya que al haber remoción de grasas previas a la lactancia, las larvas L3 son llevadas a las

glándulas mamarias y pasan a través de la leche materna al intestino de las crías, en donde terminan su maduración para reproducirse sexualmente y poner huevos (Fig 4). Desde esa primera descripción, se reporta el mismo modo de transmisión para el lobo fino de Juan Fernández (*Arctocephalus phillippi*) y el lobo marino de California (Sépulveda y Alcaíno, 1993; Lyons, 2000).

Un factor ambiental importante para la transmisión y desarrollo de las larvas es el sustrato arenoso sobre el cual se encuentran algunas de las colonias de lobos marinos (Ionita et al. 2008), ya que los sustratos rocosos dificultan la transmisión del parásito hacia su hospedero, lo cual también se puede observar como una baja en la prevalencia cuando se ocupan islas sin arena como colonia.

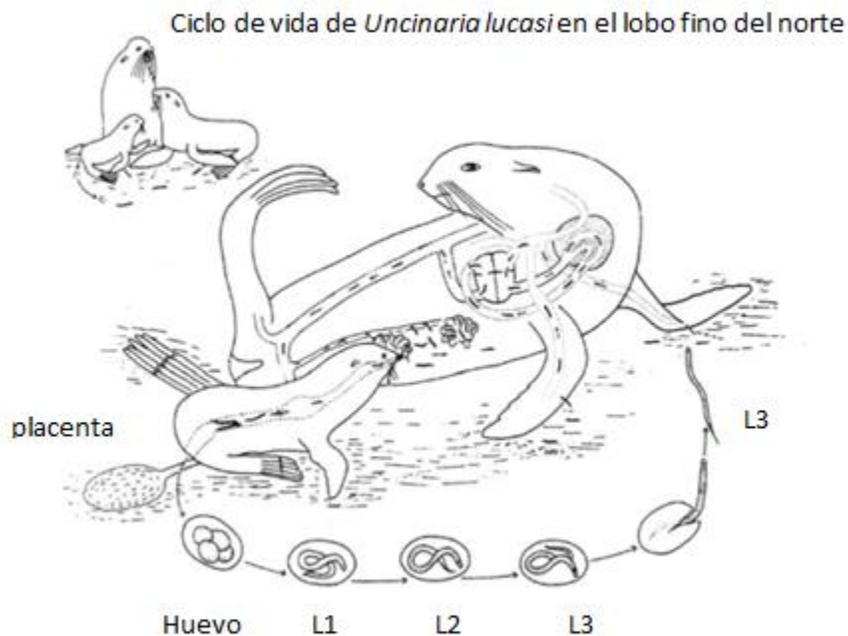


Figura 4. Ciclo de vida de *Uncinaria lucasi* en lobo fino del norte, imagen modificada de Lyons et al. (2011).

Se ha reportado que la infección por *Uncinaria* en otáridos es una de las principales causas de muerte en crías de lobos marinos y lobos finos (Lyons et al. 2003; Castinel et al. 2007). La muerte de las crías infectadas se debe a que, al ser

hematófagos, los parásitos ocasionan anemia, lo que debilita a los hospederos (Sepulveda et al. 1998). También puede darse un cuadro entérico hemorrágico combinado con infecciones bacterianas (Spraker 2004), e incluso se ha reportado que pueden llegar a causar peritonitis si atraviesan la pared intestinal (Spraker, 2007). Debido a su ciclo de vida directo y a su transmisión materna, en algunas poblaciones como las del lobo fino del norte en las islas de Saint Paul, Alaska; los ciclos de infección están estrechamente relacionados con la densidad del hospedero y el ciclo reproductivo de su hospedero, de manera que al iniciar la época reproductiva las uncinarias empiezan una fase en su ciclo de vida (Lyons, et al. 2011). En años de alta densidad del hospedero las tasas de transmisión se ven favorecidas por haber más hospederos potenciales (DeLong 2006). Es por esto que se cree que *Uncinaria* puede actuar como regulador demográfico. Por ejemplo; se ha reportado mortalidad de hasta 60% en crías de lobo marino de California en la isla San Miguel, California, EEUUA, debido a infecciones por *Uncinaria* (Lyons et al. 2000). Sin embargo, en otros pinnípedos como el lobo fino de Juan Fernández no siempre se comporta de la misma manera (Sepúlveda 1998) y en el lobo marino de Nueva Zelanda la patología asociada con uncinaria solo se hace aparente cuando existen eventos epidémicos concurrentes causados por otros patógenos (Chilvers et al. 2009). La prevalencia puede llegar a ser muy alta en las poblaciones, siendo de hasta un 100% en crías (Lyons et al. 2005 y Ionita et al. 2008). La carga parasitaria también es un factor epidemiológico importante, donde las crías de lobo fino de Juan Fernández pueden tener 17 ± 36 parásitos en su intestino (Sepulveda, 1998) comparado el lobo marino de California con 1,284 gusanos en promedio en (Lyons et al. 1997). La intensidad de la infección en cada individuo depende de factores como la condición, edad, sexo y genética de los cachorros (Lyons et al. 2000; Castinel et al. 2007 y Acevedo-Whitehouse et al. 2006, 2009)

El hábito hematófago de *Uncinaria* puede lastimar a su hospedero y se le asocia con la enfermedad conocida como Uncinariasis. *Uncinaria* comúnmente causa anemia y enteritis en el lobo marino de California pero también se ha visto que otro mecanismo mucho más virulento ocurre cuando algunos de los nematodos

hematófagos migran y traspasan la pared intestinal. En algunos casos se le suma a la peritonitis las bacterias oportunistas que se aprovechan de las condiciones ocasionan la muerte de muchas crías (Spraker, et al. 2007). En el lobo marino de Nueva Zelanda no se observó relación entre la condición o el sexo de los cachorros con la prevalencia de *Uncinaria*, sin embargo más crías machos se reportaban muertes por *Uncinaria*, además la intensidad de infección no se relaciona con la mortalidad (Castinel et al. 2007). Se desconoce la virulencia que *Uncinaria* podría tener en otras especies de hospederos otáridos, sin embargo debido al estado de conservación de algunas especies de hospederos potenciales este patógeno podría tener importantes repercusiones en la sobrevivencia y el mantenimiento de la población.

II.4.2 Historia del género *Uncinaria* en pinnípedos

El primer reporte de *Uncinaria* en pinnípedos fue descrito por Lucas en 1899 en el lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus*, en las islas Pribilof, Alaska (Ionita, et al. 2008). Inicialmente se describieron dos especies, *U. lucasi* (Stiles, 1901) y *U. hamiltoni* (Baylis, 1933), pero recientemente se han encontrado en otros hospederos pinnípedos organismos de *Uncinaria* que no encajan con las descripciones originales de las dos especies de *Uncinaria* (Baylis 1947; Daily y Hill, 1970; Berón-Vera et al., 2004; Castinel, et al., 2006); lo que sugiere que existe una gran diversidad de estos organismos que aún no está descrita; lo cual implica que su taxonomía permanece difusa (Lyons y De long, 2005). Algunas de las diferencias entre las dos especies descritas de *Uncinaria hamiltoni* comparada con *U. lucasi* son la cápsula bucal más grande y con estructuras cortantes en los ángulos, engrosamiento en la base de la pared cápsula bucal, espículas más largas, rayo anterolateral más corto que los otros dos, bursa más grande, dientes subventrales más grandes, y esófago más largo (Baylis, 1933). También se han encontrado diferencias en caracteres de historia de vida dependientes del hospedero al que parasitan como la longevidad, distribución heterogénea en el intestino y tamaño de los huevos (Nadler, et al. 2000).

En trabajos previos se observaron diferencias en el tamaño de los parásitos, prevalencia e intensidad de infección en especies hospederas con distribución simpátricas y alopátricas, como el lobo fino de sudamérica, *Arctocephalus australis*, y en el lobo marino de sudamérica, *Otaria flavescens*, y el estudio concluye que las diferencias observadas entre los parásitos se deben al tipo de hospedero y que no obedece a ser de diferentes especies, por lo que solo existe la especie *Uncinaria lucasi* con razas y subespecies hospederas (Nascimento et al. 1992). No obstante, otros investigadores se muestran en desacuerdo con la conclusión anterior, ya que encuentran bases taxonómicas con caracteres morfológicos y moleculares para diferentes especies de *Uncinaria*, y proponen que las Uncinarias del lobo marino de California y del lobo fino del Norte en la Isla de San Miguel son dos especies diferentes; contrario a lo que se creía (Nadler et al. 2000), resultado que es secundado por un estudio independiente que observó diferencias genéticas en los parásitos que concordaban con diferencias en la patogenia en las dos especies de hospederos, donde un genotipo era el que penetraba hasta la cavidad peritoneal y el otro genotipo no presentaba este comportamiento (Lyons et al. 2011). Se proponen al menos siete linajes distintos para todo el género *Uncinaria* en hospederos pinnípedos (Nadler et al. 2013). Más recientemente, apoyando las conclusiones sobre diversificación y especiación del género, se reporta una aparente divergencia biogeográfica de Uncinarias semejantes a *U. hamiltoni* en el hemisferio sur y a *U. lucasi* en el hemisferio norte, y se proponen tres clados para *Uncinaria*, un clado antártico para uncinarias presentes en *Mirounga leonina*, el segundo clado para uncinarias de la región de Australia y el tercero para uncinarias de California (Ramos et al. 2013). Posteriormente se utiliza una “aproximación de evidencia total”, para elaborar la filogenia, donde combina genes ribosomales y mitocondriales, obtuvo como resultado que el linaje de *Uncinaria* ha surgido múltiples veces en otáridos, al menos cinco veces, y en algunos casos nota procesos ecológicos de colonización como lo es el cambio de hospedero como *U. lucasi* en *Callorhinus ursinus* y *Eumetopias jubatus* (Nadler et al. 2013). En este mismo trabajo, también se argumenta que debido a la escasa divergencia genética, en el marcador

mitocondrial 12s, de algunas de estas especies interpreta que probablemente los patrones observados son filogenéticamente recientes; después de la especiación de sus hospederos, sin embargo no se cuenta con un marcador de tiempo independiente para la calibración así como diferencias intrínsecas en la tasa evolutiva de las secuencias analizadas.

II.4.3 Interacción entre *Uncinaria* y su hospedero

El estilo de vida parásito ha surgido múltiples veces en los nemátodos de manera independiente a lo largo de su historia (Blaxter, 2003). Este cambio ecológico probablemente involucró la adaptación de genes presentes en ancestros de vida libre en genes necesarios para parasitar. En los parásitos, genes involucrados en la evasión del sistema inmune o reconocimiento del hospedero se encuentran bajo selección positiva (Coghlan, 2005). Muchos de estos genes parásitos son recientes, resultado de procesos de duplicación o transferencia horizontal de genes (Coghlan, 2005).

Poco se conoce de los mecanismos por los que interactúan *Uncinaria* y sus hospederos. Sin embargo se sugiere que *Uncinaria* podría ser una presión de selección sobre los mecanismos asociados con la coagulación sanguínea (Acevedo-Whitehouse et al. 2009). A pesar de que se desconoce la interacción precisa que ocurre entre *Uncinaria* y sus hospederos, siendo un nemátodo gastrointestinal de hábitos hematófagos podría creerse que posee mecanismos semejantes a los que poseen sus parientes cercanos como *Ancylostoma caninum* y *Necator americanus* en términos de la degradación de la hemoglobina y así como algunos mecanismos de evasión del sistema inmune de su hospedero (Chopin 1998; Harrison 2002; y Williamson et al. 2003).

Los nemátodos hematófagos generalmente son especie-específicas (Traub et al. 2008). A pesar de poder infectar accidentalmente otras especies de hospederos, generalmente estas infecciones no son exitosas debido a que el parásito es incapaz de realizar los procesos que necesita para sobrevivir, como alimentarse, desarrollo o reproducirse (Williamson, et al. 2002). Por ejemplo, es común que el

humano se infecte con el nematodo hematófago *Ancylostoma caninum* (Brooker et al. 2008).

Las especies de *Uncinaria* en pinnípedos no parecen ser especie específicas ya que una misma especie de *Uncinaria* puede infectar a distintas especies de otáridos (Lyons et al. 2012). No obstante existen variaciones en la patogenicidad relacionada con la anemia que ocasiona que debieran tomarse en cuenta pues probablemente muestra relaciones históricas. Si la anemia ocasionada por *Uncinaria* y las respuestas del hospedero son factores de selección de peso, se esperaría que la *Uncinaria* de una especie de otárido determinada debiera poseer variantes fenotípicas específicas que sean reflejo de variantes fenotípicas específicas de su hospedero, por ejemplo en *Ancylostoma caninum* se ha observado que la degradación de hemoglobina es más eficiente en su hospedero común que en hospederos accidentales (Williamson, et al. 2002) infectando con parásitos de perros a humanos y viceversa. Por lo tanto, la caracterización de los factores de virulencia podría aportar claves acerca de sus relaciones evolutivas históricas en un hospedero pinnípedo determinado.

Los nemátodos pertenecientes a la familia Ancylostomatidae causan daño en la mucosa gastrointestinal al unirse a su hospedero por medio de dientes o placas bucales para alimentarse de la sangre de su hospedero (Loukas, 2005). Para lograr esto, los parásitos secretan de sus glándulas anteriores una gran cantidad de productos como proteínas anticoagulantes (AcAPc5, AcAP6, AcAP2) y proteasas, algunas de las cuales son proteínas hemolíticas que actúan en cascada; aspárticas (APR-1, APR-2), cisteine (Necpain) y metaloproteasas (Ac-Mep-1) para poder digerir la hemoglobina ingerida (Mulvenna, 2009). Los parásitos nematodos representan numerosos retos antigénicos derivados de su historia de vida, modo de transmisión y estado de desarrollo. Por ejemplo las proteínas expresadas diferencialmente a lo largo de su desarrollo ocasionan diferentes efectos sobre su hospedero (Loukas et al. 2005).

La respuesta generada en los hospederos por la infección de dichos parásitos solo se conoce en huéspedes humanos y en algunos modelos experimentales. De manera general, los parásitos helmintos inducen una respuesta inmune caracterizada por la participación de linfocitos T, eosinófilos, mastocitos en la mucosa y producción de IgE. De los componentes de la inmunidad innata, las células dendríticas (CD) disminuyen su activación en los hospederos, específicamente en cuanto a su capacidad de presentar antígenos, esto se observó en ratones infectados con *A. caninum* donde se reporta que se produce un inhibidor de metaloproteasas (Ac-TMP-1) que afecta la maduración de los CD (Gaze et al. 2012). Por otro lado, las células NK también aumentan durante la infección, sin embargo distintos nemátodos parásitos poseen diferentes estrategias de evasión inmune. Por ejemplo, *N. americanus* produce moléculas, como la proteína de unión celular NK (NKBP), que inhiben esta respuesta (Loukas, 2005). También estudios previos muestran que moléculas muy similares a las citoquinas secretadas por los nematodos con hábitos hematófagos sirven para evitar las respuestas inmune del hospedero por ejemplo el factor inhibidor de migración de macrófagos (MMIF) (Maizels y Yazdanbani, 2003). Se logró identificar su función cuando se clonó MMIF de *A. ceylanicum* (AceMIF) exitosamente y se observó que interviene cuando se une al receptor humano de MIF (Cho et al. 2007). Los basófilos activados por las proteasas liberadas de los gusanos activan a las células T, las cuales a pesar de circular en menor número, incrementan la producción de citoquinas como IL-4, IL5 y IL13 y IgE (Gaze et al. 2012).

III. HIPÓTESIS

Debido a su estrecha proximidad filogenética los nematodos hallados en el tracto digestivo del lobo marino de Galápagos presentarán características similares a los reportados para el lobo marino de California.

IV. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Identificar y describir al parásito encontrado en el intestino de la cría de lobo marino de Galápagos; mediante el empleo de caracteres diagnósticos y claves proponer una relación evolutiva con su especie hospedera.

III.2 Objetivos particulares

- Caracterizar morfológica y ultra estructuralmente a los ejemplares tipo *Uncinaria* aplicando técnicas de microscopia electrónica de barrido y compuesta.
- Identificar molecularmente a los ejemplares tipo *Uncinaria* utilizando regiones genéticas de valor diagnóstico, *ITS1*, *5.8s* *ITS2*.
- Identificar mediante la aproximación de genes candidatos genes de virulencia, específicos de la interacción hospedero parásito de *Uncinaria* en hospederos pinnípedos.
- Proponer un posible escenario evolutivo, para las especies de *Uncinaria* sp. previamente descritas en pinnípedos hospederos.

V. MÉTODOS

V.1 Colecta de parásitos

Los parásitos utilizados para esta tesis provienen de una cría muerta encontrada en la Isla Santa Fe, 0°49'0"S, 90°3'30"W (Snell et al. 1995) en el Archipiélago de las Galápagos durante un monitoreo de lobos marinos de Galápagos (Brock, 2013). Los nemátodos fueron extraídos del intestino delgado siguiendo el protocolo de necropsias (Dailey, 2001), todos los parásitos fueron almacenados en etanol 96% para su posterior análisis.

V.2 Morfología

Para la identificación morfológica se aclararon los especímenes en soluciones de ácido láctico de 25% hasta 100% de manera gradual en tratamientos de 20 min. Posteriormente se decidió someter algunas nematodos a un tratamiento de limpieza, para eliminar bacterias y tejido añanido, para esto se añadió Tween al 0.05% y después se metieron al sonicador por 60seg, para eliminar el detergente sobrante se hicieron tres lavados en agua destilada (Zhao et al. 2006). A continuación los ejemplares fueron montados y observados bajo el microscopio dónde se tomaron las medidas de estructuras como, longitud total del cuerpo, longitud esófago, distancia de la vulva a punta posterior, tamaño dientes subventrales, longitud espículas, alto y ancho de capsula bucal. Para posteriormente ser comparadas con las medidas en especies reportadas. Se siguieron las claves de identificación para nematodos parásitos de vertebrados (Anderson et al. 2009), además de la comparación de los caracteres medidos con las especies *Uncinaria lucasi* y *U. hamiltoni* (Baylis, 1933).

La observación ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se logró realizando cortes de las partes utilizadas para la identificación (el aparato bucal y la cola o bursa). La preparación de la muestra se hizo siguiendo protocolos

establecidos (Naem et al. 2010) en solución de DESS (DMSO, EDTA, NaCl) para la rehidratación y reacomodo estructural, y posterior fijación en AFA (alcohol 95%, formol 40%, y ácido acético). Los ejemplares se limpiaron con el protocolo descrito anteriormente, en seguida se deshidrataron progresivamente en etanol (10%-100%), se elaboró un secado a punto crítico por CO₂ líquido y finalmente, se recubrieron en oro (Barson y Marshall, 2004).

IV.3 Molecular

Se extrajo el ADN total a partir de una sección de aproximadamente 2 mm² del cuerpo medio del gusano. Se usó el protocolo propuesto por (Floyd et al. 2002). Brevemente, se colocó la sección del gusano en 20 µl de hidroxido de sodio (0.25 M), se incubó toda la noche a temperatura ambiente, después se calentó a 95°C por 3 min, se agregó 4 µl de HCl (1M), 10 µl de Tris-HCl (0.5M, pH 8), y 5 µl de tritonX-100 2%; nuevamente se calentó a 95°C por 3 min y se metió al congelador para utilizar, se volvió a calentar a 95°C por 3 min. Una vez obtenido el ADN total se analizó la pureza de las muestras en el espectrofotómetro, y ya que las extracciones no tenían la pureza recomendada para la PCR, se procedió a hacer una purificación mediante la técnica de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1). Para esto, se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se agitó por vortex durante 60 seg, se centrifugó 5 min a 13,000 rpm, se transfirió medio volumen a un tubo nuevo, se agregó ¼ de volumen de acetato de amonio (8M), se añadió un volumen de etanol al 96%, se congeló a -20°C por 30 min cuando mínimo, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15min, se decantó el sobrenadante para obtener el “pellet”, se agregó 1 volumen de etanol al 70% se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos, se vació el líquido por decantado y se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se resuspendió en 50 µl de agua estéril. Nuevamente se analizó su pureza en el espectrofotómetro para comprobar que los valores de absorción 260/280 se encontraran entre 1.8 y 2. Para analizar el genoma de los especímenes se escogió una región nucleica ribosomal, el espaciador intertranscripcional ribosomal (*ITS*) (Nadler et al. 2000; Gasser et al.

1996) además de algunos genes candidatos relacionados con la patogenicidad. Ver Cuadro 3.

Para el análisis del ITS los oligonucleótidos empleados fueron diseñados para amplificar el género *Uncinaria* spp. con la siguiente secuencia: ITS_Unc_F 5'-TGAACCGGGTAAAAGTCG-3'; ITS_Unc_R 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' que amplificarían un producto de aproximadamente ~1200 pb. Para la amplificación se siguieron los parámetros recomendados para la enzima HotStar taq (Qiagen) en el programa del termociclador: 95° por 5 min; 35 ciclos de, 94° por 30 seg, 53° por 30 seg, 72° por 1.15 seg, y 72° por 10 min. Posteriormente el producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio 10% y se confirmó que el tamaño del producto correspondiera al esperado para el gen (~1000pb). Una vez obtenido el producto deseado, este se purificó utilizando columnas QIAquick (Qiagen) y se mandó a secuenciar comercialmente de manera bidireccional.

Cuadro 3. Genes candidatos relacionados con la patogenicidad seleccionados

Gen	Oligonucleotidos	Tm
HPI, Platelet inhibitor <i>A. caninum</i>	Forward 5'CTGCGAGGAAAGGTCT3' Reverso Comp 5' CAACTGCGCAACCAAG3	54°
Necpain (proteasa)	Forward 5' GAWAATGSAACAGATTAYTGG3' Reverso Comp 5'CCGSWTTCTCCCCAGTC 3'	51°
Kunitz-like protease inhibitor precursor	Forward 5' TCGCTTCTACTTTGATCRAR 3 Reverso Comp 5' TTYKGCTTYGGTCATGAAATT3''	50°
Asp-2	Forward 5' AATTCCTYGAMDTGCACAA 3 Reverso Comp 5'TSCATCCTTKGCCTGTCC3'	51°
MMIF, factor inhibidor migración de macrófagos	Forward 5' TACGTGTTGCGACCAACCT3' Reverso Comp 5'ACTTCAATGGCAATTCTRTT 3'	48°
APC, proteína anticoagulante	Forward 5'TGAAWGGYTSGACKACTGTG3' Reverso Comp 5'CGTGTYYCTGTASAATCCGT3'	55°

Para los genes de factores de virulencia se hizo una revisión bibliográfica para seleccionar genes candidatos de nemátodos con patogenias similares al del organismo de estudio. Debido a la falta de datos genómicos, se diseñaron oligonucleótidos degenerados con base en secuencias de ADNc del GeneBank, escogiendo regiones conservadas de aproximadamente 100pb. Las secuencias que se usaron para elaborar los oligonucleótidos pertenecían a algunas especies cercanas emparentadas con *Uncinaria* como *Ancylostoma caninum*, *A. braziliensis*, *A. duodenale* y *Necator americanus*. Se eligieron los genes especificados en la Cuadro 3. Finalmente todos los oligonucleótidos fueron analizados en el programa blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmar su especificidad.

Los parámetros para el programa de PCR fueron los siguientes, 94°C por 3 min, 35 ciclos de: 94°C por 45 seg, Tm (Ver Cuadro 3) por 30 seg, 72°C por 2.30 min, y 72°C por 10 min. Posteriormente se corrió el producto en geles de agarosa al 2.2%. De encontrarse, los productos fueron extraídos y purificados del gel utilizando buffer TE para disolver la agarosa, extracción con fenol y Tris-HCL, y precipitación con acetato de amonio y etanol. Los productos purificados se mandaron secuenciar de manera bidireccional.

V.4 Elaboración de filogenias

Para el análisis de las secuencias primeramente se elaboró una secuencia consenso por individuo con las secuencias forward y reverso utilizando el programa CLC main workbench 6. Para elaborar la filogenia se comparó las secuencias consenso con todas las secuencias reportadas en BLAST, se elaboró un alineamiento de las cuatro secuencias consenso obtenidas con el numero de acceso KF640225, KF640226, KF640227 y KF640228 alineadas con 128 secuencias reportadas en Genbank. Para el análisis se codificaron diez indels y se incluyó como grupo externo funcional a *Necator americanus* y *Ancylostoma caninum*. Posteriormente para el análisis bayesiano se particionó la matrix de

datos (alineación) en dos, una parte consistió en el ADN con las secuencias de *ITS1*, 5.8s gen e *ITS2*, caracteres 1-912 y la segunda parte de la matrix codificaba los indels, 912-921. Se utilizó el programa MrModeltest ver.2.3 para seleccionar un modelo evolutivo para la parte de ADN de la matriz. Finalmente se corrieron los siguientes modelos evolutivos de ADN seleccionados utilizando el programa MrModeltest ver 2.3, para la región ITS se eligió el modelo GTR gamma, e indels con modelo variable. Para la construcción de los árboles se utilizó el programa Mr.Bayes ver. 3.2 con 5,000,000 de generaciones con aleatorización cada 1000 generaciones.

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron medidas morfométricas de 42 hembras y 33 machos nematodos adultos. De estos, se aclararon 47 para la caracterización morfológica y algunos de estos individuos se utilizaron para el análisis molecular. El tratamiento de limpieza de los organismos analizados morfológicamente se decidió emplear debido a que las múltiples bacterias asociadas encontradas sobre la cutícula de los nemátodos no permitían la observación de las características de los mismos, sin embargo a pesar de seguir los protocolos descritos para limpieza de nematodos no se logró eliminar completamente y numerosas muestras permanecieron “sucias” a pesar del tratamiento (ver Anexo 1)

Los parásitos encontrados a la necropsia de la cría del lobo marino presentaban características específicas del género *Uncinaria* como cápsula bucal con paredes continuas no articuladas, placas bucales desarrolladas, ausencia de dientes en la capsula, un par de dientes subventrales, cutícula estriada, y dimorfismo sexual marcado (Cuadro 4: Fig. 5) (Anderson et al. 2009). La población muestreada presentó un equilibrio en los sexos, siendo aproximada la proporción 1:1. (Ver Anexo 1). También se observó un nematodo hembra dentro de la muestra que no poseía características típicas de *Uncinaria* pero que fue colectado junto con los otros nematodos. Su apariencia macroscópica era muy similar; sin embargo al ser aclarado se observaron características morfológicas muy diferentes y se intentó identificar; pero las fotografías no permitieron la observación de caracteres claves para su identificación (Anexo 3).

Cuadro 4. Características morfométricas de *Uncinaria* en distintos hospederos pinnípedos. En negritas se indican las características más similares a los organismos de estudio.

	<i>Uncinaria</i> sp. Ramos (2013)	<i>Uncinaria</i> sp. Ramos (2013)	<i>Uncinaria</i> sp. Ramos (2013)	<i>Uncinaria</i> sp. Castinel (2006)	<i>Uncinaria</i> <i>hamiltoni</i> Berón-Vera (2004)	<i>Uncinaria</i> <i>lucasi</i> Baylis (1947) y Nadler (2000)	<i>Uncinaria</i> sp. Nadler (2000)	<i>Uncinaria</i> sp (presente tesis)
Hospedero	<i>Mirounga</i> <i>leonina</i>	<i>Arctocephalu</i> <i>s pusillus</i>	<i>Nephocoen</i> <i>a cinerea</i>	<i>Phocarctos</i> <i>hookeri</i>	<i>Otaria</i> <i>flavescens</i>	<i>Callorhinus</i> <i>ursinus</i>	<i>Zalophus</i> <i>californianus</i>	<i>Z. wollebaeki.</i>
Longitud total	H= 25 M= 8.5	H=20.79 M= 11.15	H=15.7 M= 10.5	H=10.35±0.56 M=6.82±0.49	H=11.37±2.94 M=7.85±1.52	H= 11.61±0.88 M= 6.82±0.57	H=12.61±.82 M=8.33± 0.77	H=11.08±0.8453 M=7.57±0.766
Longitud esófago	H=1.35 M= .85	H=1.31 M= 1.06	H=1.19 M=1.04	H= 1.07±0.021 M=0.91±0.021	H=1.15±0.11 M=1.09±0.19	H=.818±0.006 M=.794±0.11	H=0.828±0.004 M=0.809±0.007	H= 1.19±0.114 M= 0.9±0.0503
Alto cápsula bucal	H=0.24 M= 0.13	F=0.29 M=0.23	F=0.29 M= 0.23	H= 0.23±0.004 M=0.2±0.004	H= 0.28±0.03 M=0.24±0.02	H=0.22±0.023 M=0.183±0.11	H=0.241±0.012 M=0.203 ± 0.015	H= 0.219±0.014 M=0.186±0.0176
Ancho cápsula bucal	H=0.20 M=0.09	H=0.24 M= 0.16	H=0.22 M=0.16	H=.19±0.007 M 0.17±0.005	H= 0.24±0.02 M= 0.19± 0.06	H=NA M=NA	H=NA M=NA	H=0.1845±0.019 M= 0.154±0.0145
Espículas	0.47	0.85	0.75	0.69±0.016	0.89±0.09	0. 508±0.045	0.686±0.04	0.596 ±0.0499
Vulva a parte posterior	NA	8.16	NA	4.01±0.16	4.33 ± 1.34	4.73±0.45	4.55±0.46	3.79 ±0.852

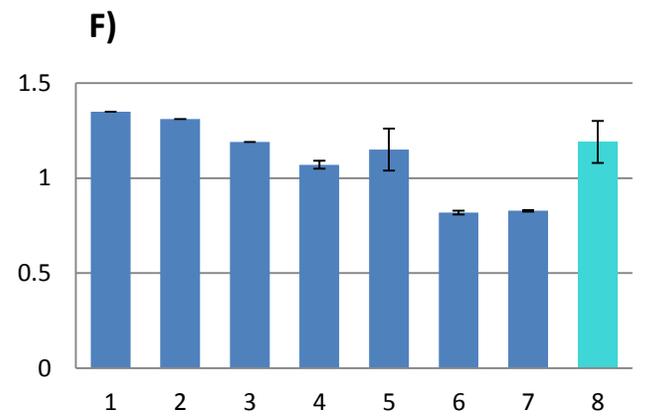
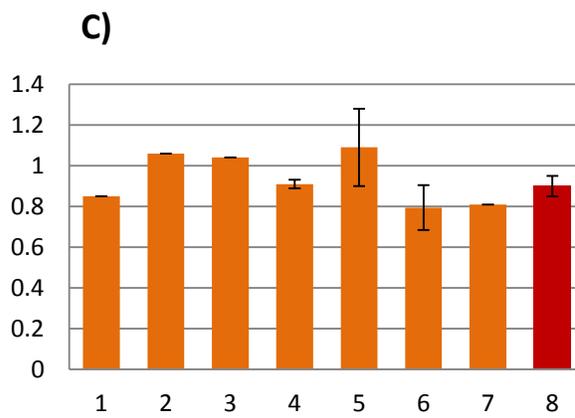
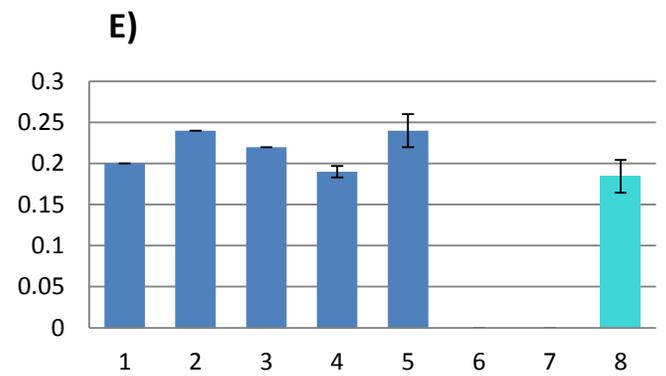
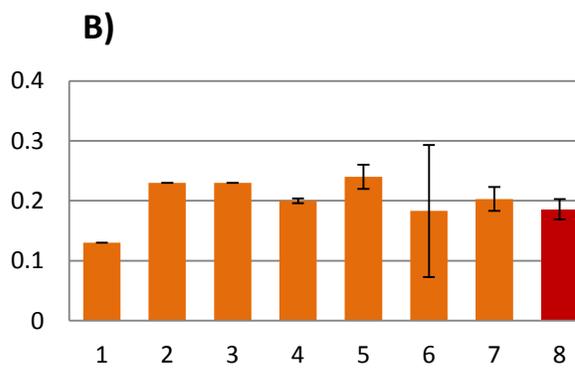
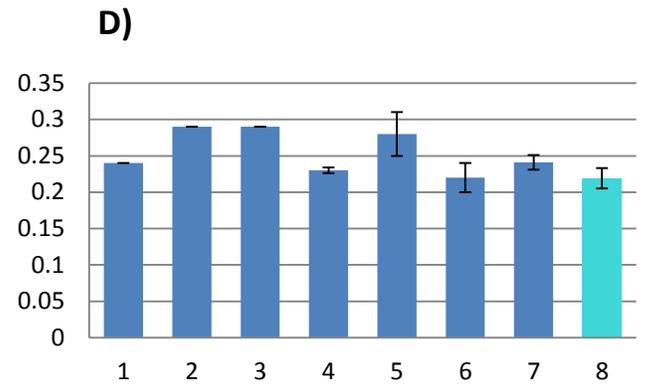
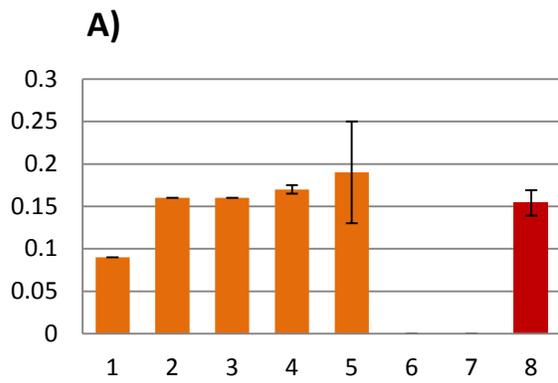


Figura 5. Siguiete página.

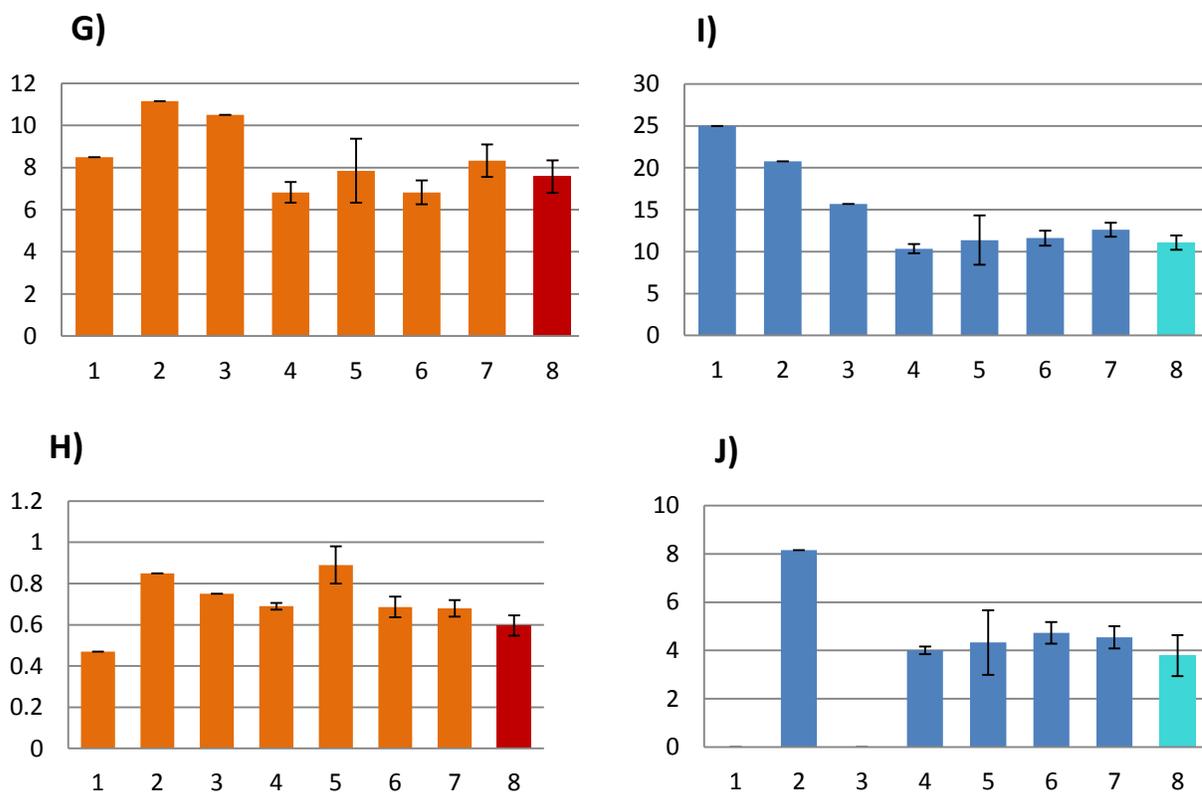


Figura 5. (Cont.). Medidas de caracteres morfológicos reportados para *Uncinaria*. A) Ancho capsula bucal machos. B) Alto capsula bucal machos C) Longitud esófago machos D) Alto capsula bucal hembras E) Ancho capsula bucal hembras F) Longitud esófago hembras G) Longitud total machos H) Espículas I) Longitud total hembras J) Vulva a parte posterior. Los hospederos pinnípedos se representan por los números del eje de las abscisas) *Uncinaria* sp. *Mirounga leonina*, 2) *Uncinaria* sp.-*Arctocephalus pusillus*, 3) *Uncinaria* sp. *Nephocoena cinérea*, 4) *Uncinaria* sp *Phocarcos hookeri*, 5) *Uncinaria hamiltoni*, *Otaria flavescens*, 6) *Uncinaria lucasi*, *Callorhinus ursinus*, 7) *Uncinaria* sp. *Zalophus californianus*, 8) Ejemplares de la presente tesis, ***Uncinaria* spp. *Z. wollebaeki***. Las barras naranjas son ejemplares machos, las barras azules representan las medidas de las hembras, las barras rojas y azul claro hacen referencia a los machos y a las hembras, respectivamente, del presente estudio. Las barras indican \pm desviación estándar.

Cuadro 5. Medidas de uncinarias encontradas en el intestino de una cría de lobo marino de Galápagos. Medidas en mm, número de individuos entre paréntesis, columna P es el resultado de la pruebas de t de dos colas para ver la diferencia entre sexos.

	Machos		Hembras		P
Longitud total	7.57 (33)	± 0.77 S.D.	11.08 (42)	± 0.85 S.D.	2.20 x 10 ⁻¹⁶
Longitud esófago	0.90 (10)	± 0.05 S.D.	1.19 (9)	± 0.11 S.D.	1.54 x 10 ⁻⁰⁶
Alto capsula bucal	0.19 (9)	± 0.02 S.D.	0.22 (9)	± 0.01 S.D.	2.88 x 10 ⁻⁰⁴
Ancho capsula bucal	0.15 (9)	± 0.01 S.D.	0.18 (9)	± 0.02 S.D.	1.55 x 10 ⁻⁰³
Dientes subventrales	0.04 (9)	± 0.05 S.D.	0.05 (7)	± 0.85 S.D.	0.33

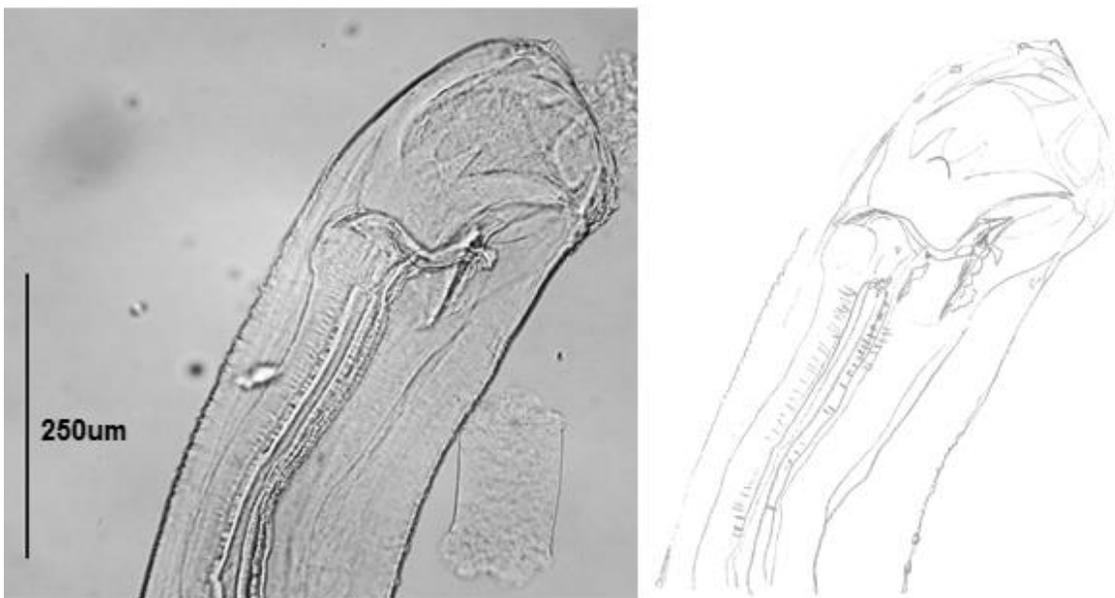


Figura 6. Parte anterior de un individuo aclarado, nematodo macho adulto muestra la capsula bucal, dientes subventrales, parte del esófago, papilas cefálicas entre otras características.

En el Cuadro 4 y Figura 5 se muestran algunos caracteres morfométricos comparando las uncinarias recuperadas dentro del hospedero *Z. wollebaeki* con registros previos de uncinarias en otros pínipedos. La longitud total de los machos (n=33) fue desde 5.22 mm a 8.35 mm, la longitud del esófago varía entre 0.8 a 0.95 mm (n=10). Los machos presentan una capsula bucal con placas bucales bien desarrolladas y dientes subventrales de gran tamaño (Fig 6). La bursa copulatoria posee una distribución de lóbulos y rayos bursales típicos del género *Uncinaria* (Baylis, 1947), La bursa se compone por tres lóbulos, dos laterales, y uno dorsal asimétrico. Tres rayos bursales se distribuyen lateralmente, dos son externos y uno dorsal (Fig 7). El rayo dorsal externo es de mayor tamaño que el rayo dorsal interno, el dorsal se encuentra doblemente bifurcado en la punta. En los lóbulos laterales el rayo anterolateral es un poco menor en relación a los otros dos rayos fenotipo parecido a *U. hamiltoni* (Baylis, 1947). Las dos espículas salen del cono genital y se observó una gran variabilidad de forma y tamaños, entre .51 hasta .68 mm (n=9). Se lograron identificar dos fenotipos diferentes en las espículas (Fig 8), al observarse bajo el microscopio electrónico algunas espículas poseían estructuras prolongadas que asemejaron espinas y otras estrías transversales previamente descritas.

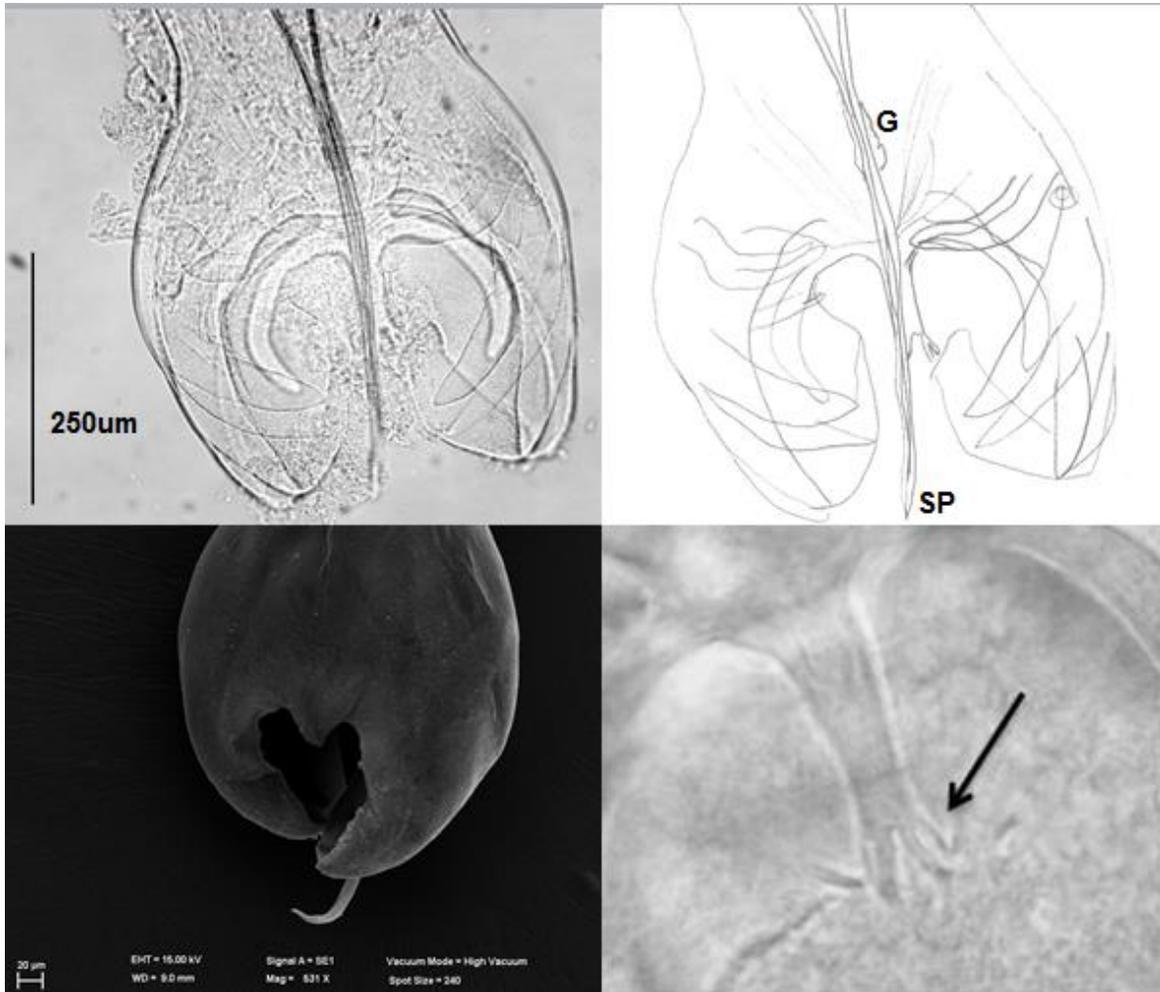


Figura 7. Parte posterior individuo macho, bursa copuladora y espículas. Cuadro superior derecho, fotografía y a la izquierda dibujo del mismo. Se identifican elementos de la bursa copuladora bajo el microscopio de luz, G=gubernaculum, SP=espículas, y arreglo de los rayos bursales. Cuadro inferior derecho, microfotografía de la bursa copuladora en el microscopio electronico de barrido. Cuadro inferior izquierdo, muestra el rayo dorsal flecha señala la bifurcación, tridigitado.

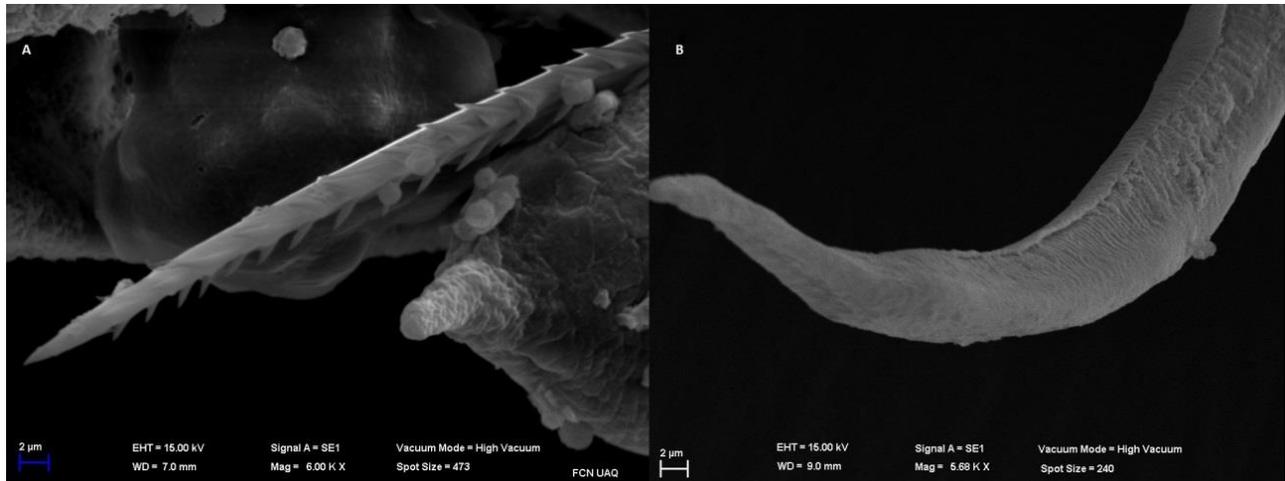


Figura 8. Fenotipos de las espículas observadas bajo el microscopio electrónico de barrido.

La longitud total de las hembras estuvo entre 8.79 a 12.23 mm (n=42), la longitud del esófago varía entre 1.06 a 1.4 mm (n=9). Estas poseían una capsula bucal con menor longitud y anchura pero presentó dientes subventrales de gran tamaño $0.046 \text{ mm} \pm 0.01363 \text{ DE}$ (Fig 9) y se notó un engrosamiento anular en la base de la capsula (Fig 10 y Anexo1). La vulva se encontró en la posición cerca de la tercera parte del cuerpo, aproximadamente a 3.79mm (n=4) desde la parte posterior. La forma de la vulva fue prominente y redondeada, todas las hembras eran individuos adultos y contenían huevos a lo largo de sus gónadas. La cola poseía una punta delgada terminal o también conocida como espina (Fig 11). El dimorfismo sexual marcado se evidencia en el tamaño, se mostró que las hembras tuvieron mayor que los machos en todas las medidas analizadas en esta tesis, excepto los dientes subventrales (Cuadro 5).

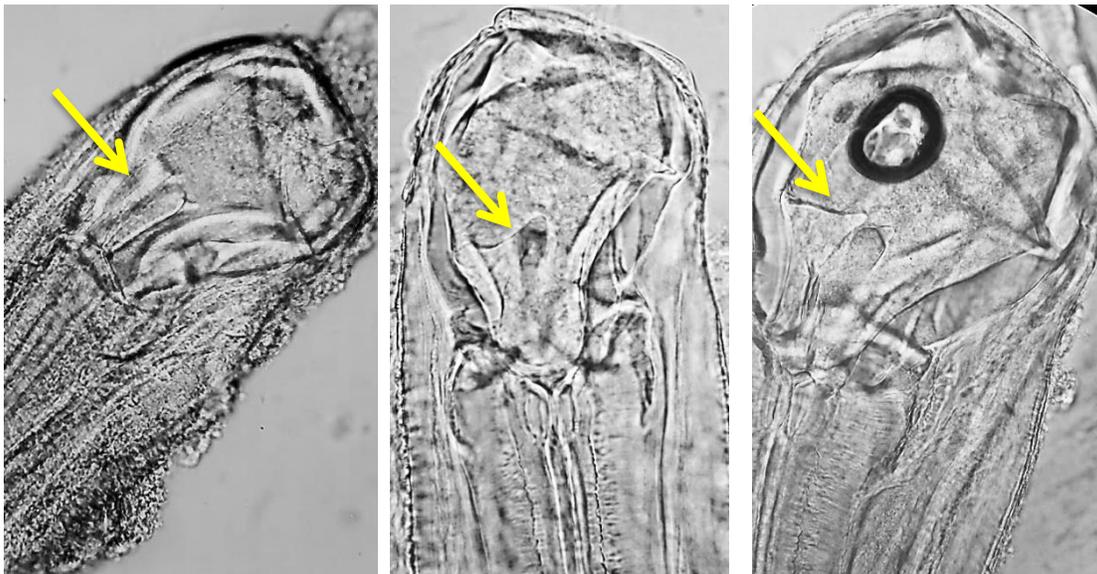


Figura 9. Cápsula bucal de nematodos hembras aclaradas en ácido láctico, flecha señala los dientes subventrales de gran tamaño presentes en los distintos individuos

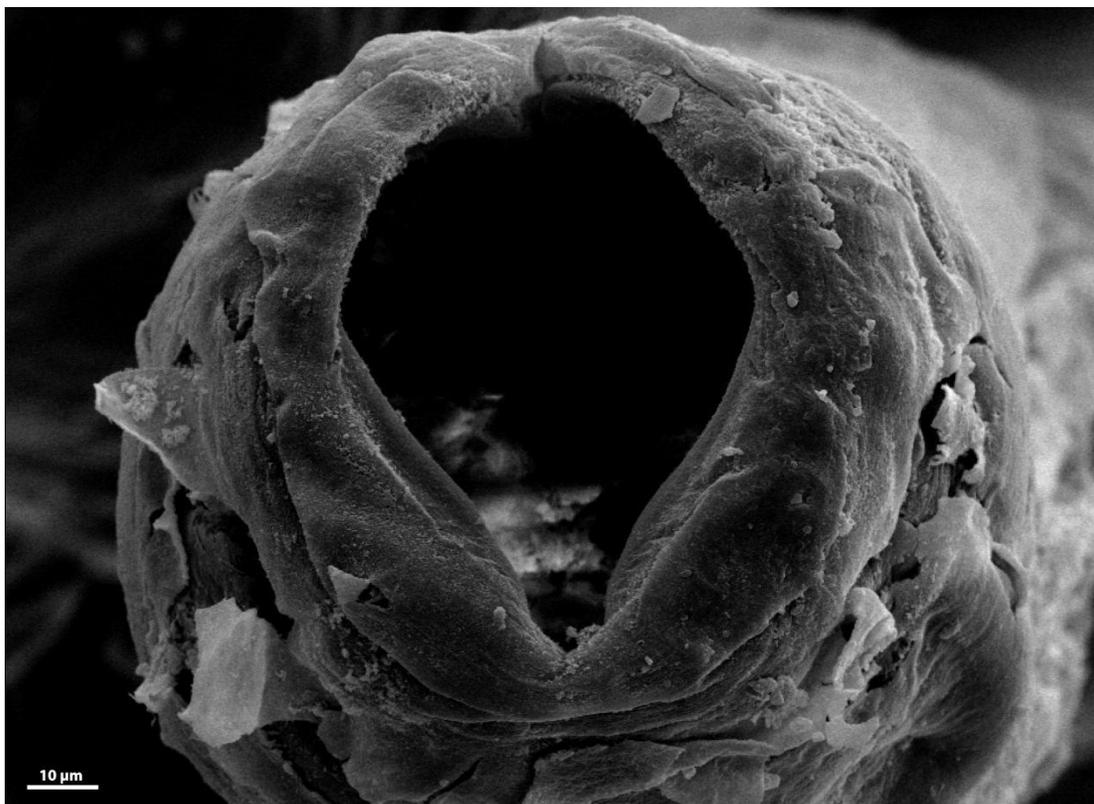


Figura 10. MEB de la apertura cápsula bucal hembra con placas bucales



Figura 11. Hembras aclaradas se muestra el extremo posterior de cola de una hembra se observa la espina terminal, y el ano

En el análisis molecular se logró amplificar la región *ITS1*, *5.8s* y *ITS2*, corroborando de esta manera, lo observado morfológicamente, la identificación del nematodo *Uncinaria* en *Z. wollebaeki*. Se registraron cuatro secuencias de individuos en el GenBank con los número de acceso KF640225, KF640226, KF640227 y KF640228. El análisis filogenético del espaciador ribosomal *ITS* obtenido dio como resultado un gran apoyo a la hipótesis propuesta para la relación encontrada entre las uncinarias presentes en *Z. wollebaeki* y *Z. californianus*, asimismo agrupadas sobre un clado mayor junto con *U. lucasi* en *Eumejotopias jubatus* y *Callorhinus ursinus* (Fig 12). Alineaciones entre pares de las secuencias consenso *Uncinaria* sp. en *Z. wollebaeki* y uncinarias en *Z. californianus*, reveló que la gran mayoría posee hasta un 100% de similitud, excepto la secuencia consenso del macho25 que probablemente se debe a problemas en la secuenciación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentajes de similitud entre pares, secuencias de *Uncinaria* en *Z. wolfebaeki* y *Z. californianus*. Pairwise alignments, Optimal Global alignment posiciones 1-914.

	Unc sec1	m25	sec2	secm4
	KF640225	KF640226	KF640227	KF640228
HQ262061	1	0.99	1	1
HQ262062	1	0.99	1	1
HQ262063	1	0.99	1	1
HQ262060	1	0.99	1	1
HQ262067	0.989	0.983	0.989	0.989

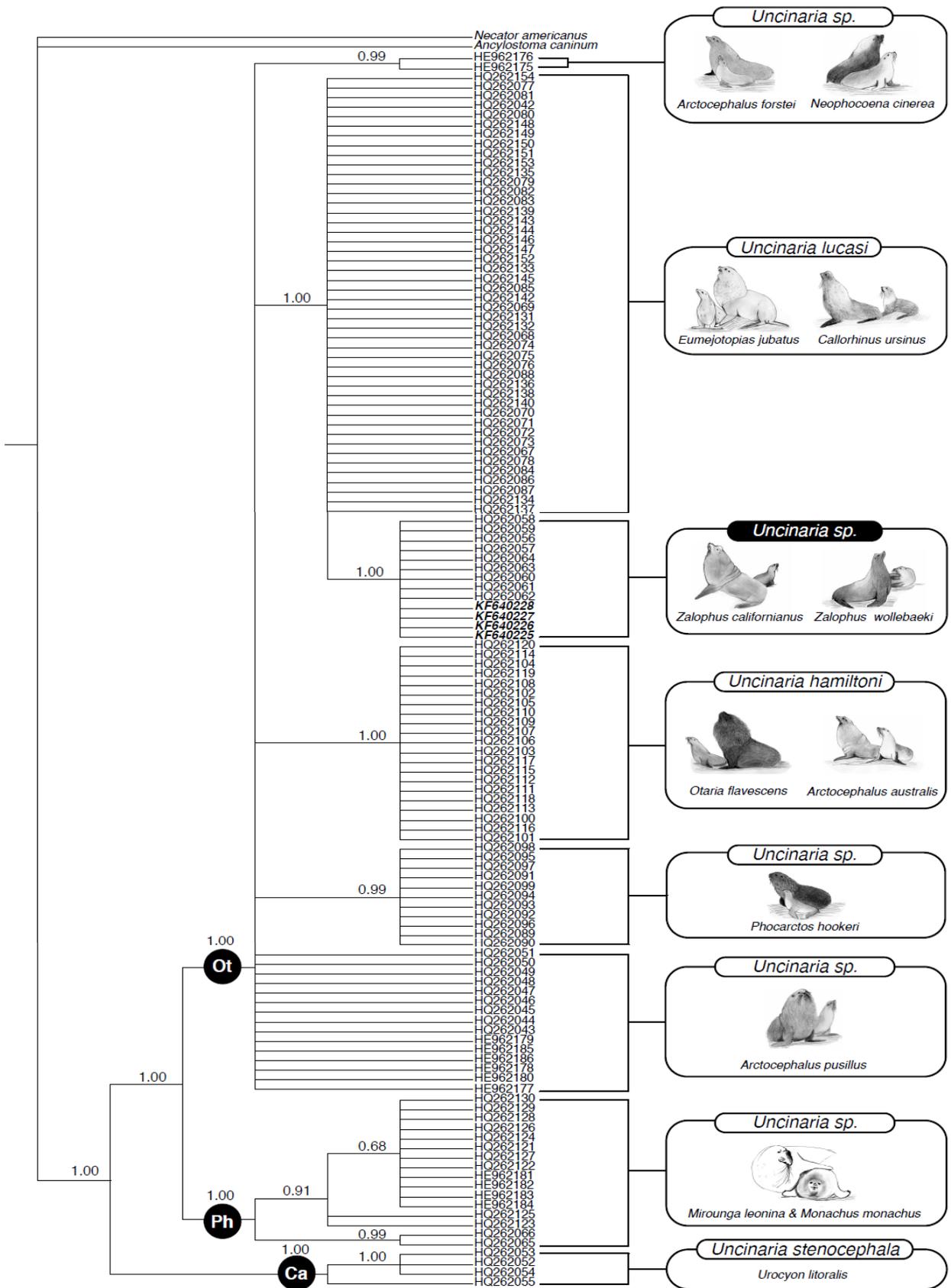


Figura 12. Árbol consenso obtenido del análisis bayesiano. Sobre las ramas se muestra la probabilidad posterior. Nodos: Ot=Otáridos, Ph=fócidos, Ca=Cánidos. Cada taxón muestra el número de acceso de la secuencia del GenBank

El árbol consenso obtenido del análisis bayesiano muestra un posible ancestro común entre las uncinarias presentes en el lobo marino de California y el lobo marino de Galápagos, sin embargo el marcador no pudo resolver diferencias dentro del mismo clado formado entre uncinarias presentes en *Z. wollebaeki* y *Z. californianus* (Anexo 2). La separación entre linajes tuvo un soporte que varió entre 99% y 100%, excepto por las diferencias **dentro** del clado de los fócidos que incluye a *Uncinaria* en elefante marino, *Mirounga leonina*. En la filogenia obtenida se resalta claramente una separación entre las uncinarias que infectan otáridos, las presentes en fócidos y las presentes en cánidos a pesar de tener una distribución simpátrica.

Se lograron amplificar exitosamente algunos fragmentos ~80pb del gen de virulencia Necpain (Fig 13). Sin embargo no fue suficiente la longitud del producto para secuenciar.

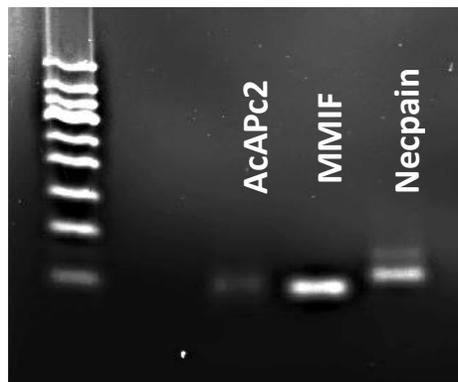


Figura 13 Electroforesis gel de agarosa 2%. Pozo 1 escalera Gelpilot 50, pozo 2 control negativo (agua), pozo 3 AcpApc2, pozo 4 MMIF y pozo 5 Necpain.

VII. DISCUSIÓN

Este trabajo describe por primera vez a ejemplares nemátodos adultos del género *Uncinaria* sp. en el lobo marino de Galápagos. Anteriormente se había notado nematodos similares a *Uncinaria* infectando cachorros de lobos marinos de Galapagos pero no se había reportado (Brock, 2012). Sin embargo, los organismos hallados no concuerdan con las dos especies *U. lucasi*, y *U. hamiltoni* descritas para hospedero otáridos (Baylis, 1947; Berón-Vera et al. 2004; Castinel et al. 2006); ni en caracteres fenotípicos y ni moleculares. Las medidas y caracteres encontrados en los ejemplares adultos caracterizados parecen ser intermedios entre las dos especies descritas originalmente de *Uncinaria*. Específicamente, los parásitos aquí descritos poseen características similares a *U. hamiltoni* como el tamaño y el arreglo de los rayos bursales (Nadler et al., 2000; Castinel et al., 2006), pero también poseen fenotipos de *U. lucasi* como el tamaño de las espículas y de la capsula bucal (Baylis, 1947). Esta aparente plasticidad fenotípica se ha notado en varios reportes de *Uncinaria* en distintos hospederos otáridos (Lyons y DeLong, 2005; Castinel et al. 2006; Ramos et al. 2013).

De acuerdo con la hipótesis de esta tesis las uncinarias en *Z. wollebaeki* descritas en este trabajo tendrían características muy similares a las uncinarias presentes en *Z. californianus*. Morfológicamente es evidente esta semejanza ya que posee ciertos caracteres como el tamaño y forma de los dientes subventrales, la longitud de las espículas, además de la forma de la capsula bucal y las placas bucales bien desarrollada. Estas son características más similares entre estos dos grupos comparados con las características presentes en todos los grupos, como se ha observado previamente (Baylis 1933; Nadler et al. 2000; Lyons y De Long 2005). A pesar de que recientemente muchos de estos caracteres fenotípicos cualitativos se han descartado porque varían dependiendo de la posición en la que son observadas. Se propusieron que *Uncinaria* en *Zalopus californianus* es una especie diferente a *U. lucasi* y a *Uncinaria hamiltoni* (Nadler et al. 2000), mediante el uso de caracteres genéticos (marcadores ribosomales 18s, 28s y regiones intertranscripcionales con diferentes tasas de cambio) y así como algunas

caracteres morfológicos, anteriormente en una revisión compara distintas especies de *Uncinaria* en varios hospederos y basándose en diferencias morfológicas de nematodos de *Uncinaria* en *Zalophus californianus* los separa de *Uncinaria* presentes en otros hospederos pinnípedos (Baylis, 1933). El presente trabajo converge con la literatura previa; los nematodos presentes en el lobo marino de Galápagos al igual que los presentes en el lobo marino de California no parecen similares a los encontrados en los demás hospederos pinnípedos. Por lo que, por el momento aun falta la descripción taxonómica de este parásito que se sabe esta presente en ambos hospederos.

Se observó que bajo el microscopio electrónico los nematodos examinados poseen múltiples bacterias asociadas sobre su cutícula y desconocemos si esto se relaciona o posee un potencial efecto patógeno como lo observado en otros pinnípedos, enteritis más bacteremia que causa mayor mortalidad (Spraker et al. 2004). A futuro se podría conocer si las bacterias asociadas a su cutícula en los diferentes nematodos en sus respectivos hospederos dependen la patogenia ocasionada. Además la ultraestructura también reveló un fenotipo desconocido en la espícula de uno de los machos observados, desconocemos si fue causa de una aberración mutante o plasticidad fenotípica en la forma de las espículas, no obstante es poco probable que se deba solo a plasticidad ya que las espículas son órganos reproductores muy específicos que intervienen en el proceso de la copula (Anderson et al. 2009). Además que se desconoce si este fenotipo se podría correlacionar con el daño que pueda infligir sobre su hospedero.

En los parásitos suele ser muy amplia la plasticidad fenotípica, no sólo en forma si no también en métrica, ya que dependen en gran medida del hospedero (Lambrechts et al. 2006) lo cual complica y confunde los rasgos observados (George-Nascimento et al. 1992). Por mencionar un ejemplo en uno de los experimentos realizados para conocer la vía de transmisión se infectaron de manera artificial cachorros de lobo fino de norte con *Uncinaria* con leche y dieron como resultado tamaños más pequeños de los parásitos (Lyons, et al. 2011). También se debe agregar el error que existe por el muestreo que involucra la

manipulación dada y el estado del lobo marino de Galápagos durante la necropsia. Para disminuir este tipo de error se decidió excluir medidas como el ancho del parásito que se distorsionó aun más cuando se montaron para verlos bajo el microscopio. Cabe mencionar que muchas de las especies de nemátodos están subestimadas pues generalmente no se aplican técnicas que cuenten con la resolución necesaria, como la microscopía electrónica, que permiten detectar mayor diversidad morfológica (De ley, 2005). Los parásitos son un grupo muy diverso, por lo que una caracterización con base en caracteres genéticos es crucial (Nadler et al., 2000; Huyse et al., 2005; De ley et al., 2005). Sin embargo se limita al utilizar un número restringido de genes como los espaciadores ribosomales, los genes de virulencia o mitocondriales resulta poco probable representen la variación morfológica observada ya que mayormente para un mismo carácter morfológico intervienen múltiples genes.

La toma de datos estaba delimitada a los organismos colectados durante la necropsia de la cría; por lo tanto la escasez de datos hace difícil la validez estadística de ciertas medidas, comparación y análisis. Por ejemplo en cuanto al dimorfismo sexual las hembras parecen tener caracteres de mayor tamaño excepto los dientes subventrales pero esta medida podría deberse a un sesgo en el número de muestras analizadas. Asimismo la toma de datos solo permitió ver la variabilidad dentro de una sola población de un solo hospedero pero desconocemos la variabilidad entre poblaciones y en distintos hospederos. Por esto, la epidemiología y el papel de *Uncinaria* a nivel de poblacional aun permanece desconocida para el lobo marino de Galápagos así como sus posibles efectos ecológicos y su relación con factores abióticos. Cabe mencionar que comparado con lo que ocurre con algunas otras especies de otárido, el lobo marino de Galápagos no tiene patrones de migración extensos. Además las poblaciones de lobo marino de Galápagos se enfrentan a condiciones ambientales cambiantes e impredecibles durante años en los que ocurren fenómenos como El Niño-Oscilación del Sur (ENSO). En ese sentido, por un lado, el ciclo de las uncinarias y la historia de vida de los lobos marinos podrían ser afectadas. Por ejemplo, las crías pueden tener un desarrollo retardado durante años ENSO y

depender más tiempo de la leche materna, en vez de comenzar a consumir presas en su dieta (Pörschmann et al. 2010 y Jeglinski et al. 2012). Si es así, podría ser diferente la dinámica de la interacción entre los lobos marinos de Galápagos y las uncinarias que lo reportado para otras especies.

La transmisión transmamaria de *Uncinaria* no ha sido confirmada para todas las especies hospederas. Entender la transmisión es crucial para conocer su epidemiología e impacto a nivel de poblaciones silvestres. Los resultados obtenidos en esta tesis también sugieren que es posible que esta infección pudiera ocurrir en especies simpátricas como el lobo fino de Galápagos, especie en la que hasta la fecha no se ha reportado *Uncinaria*.

La presencia de algunos caracteres autopomórficos podrían sugerir la separación e independencia de linajes de éste parásito con respecto a otras especies de *Uncinaria* (Nadler et al. 2000). En estudios con parásitos, además de potenciales sesgos de muestreo, se puede identificar erróneamente una especie debido a diferencias morfológicas impuestas por el tipo de hospedero. Esta plasticidad puede llevar a identificar muchas especies diferentes, siendo que se trata de una sola. De manera inversa, una especie identificada como tal, podría agrupar a varias especies crípticas (Poulin y Morand 2000). Por lo tanto la variación morfológica observada no permite decir inequívocamente que hubo un evento de especiación ya que los parásitos poseen un amplio rango de plasticidad fenotípica (Adams, 1998). Sin embargo, la co-evolución entre parásito-hospedero generaría dichas diferencias ya que cada hospedero presenta presiones de selección diferentes para sus parásitos (Lambrechts et al., 2005). Además, el aislamiento geográfico del archipiélago podría llevar a un posible aislamiento reproductivo de los parásitos, lo que podría reflejarse en diferencias feno-genotípicas. Sin embargo, no puede especularse más al respecto ya que, por un lado, se desconoce cuándo aparecieron estos parásitos en el lobo marino de Galápagos, y por otro, se desconoce el tiempo en el cual se comenzarían a ver dichas diferencias producto del aislamiento. La filogenia que resultó de esta tesis distingue entre especies de uncinaria entre el lobo marino de Galápagos y el lobo

marino de California, especies que divergieron hace relativamente poco por lo que probablemente el origen de este hallazgo habla de un proceso ecológico de colonización o cambio de hospdero “reciente”. Es probable que si el tiempo pasado de la especiación o separación es relativamente corto no se refleje en variación genética en ninguno de los locus estudiados. Por otro lado, esta filogenia también podría reflejar la presencia de *Uncinaria* en el ancestro común de sus especies hospederas pero no hay congruencia del tiempo de divergencia entre *Uncinaria* y *Zalophus* que algunos especulan que debiera ser similar (Nadler et al 2013). Bajo esta perspectiva, el género *Zalophus* divergió hace aproximadamente 2.3 Ma (Wolf et al. 2007) mientras que la divergencia de la region *ITS* entre los dos parásitos es casi nula (99% de similitud).

Los resultados aquí encontrados ofrecen apoyo a la hipótesis planteada originalmente ya que la *Uncinaria* encontrada en el lobo marino de Galápagos parecen estar más emparentadas con las uncinarias presentes en el lobo marino de California. Por lo tanto, aunque no se observó evidencia de lesiones entéricas provocadas por los parásitos, es importante considerar que podrían ocasionar una patogenicidad similar a la que ocasiona *Uncinaria* en su hospedero hermano. En lobos marinos de California infectados con *Uncinaria* sp. se observan fenotipos muy virulentos en donde hay penetración de la cavidad peritoneal por los nematodos adultos presentes en el intestino, ocasionando la muerte de crías y siendo una de las principales causas de alta mortalidad (Spraker et al. 2007). Posteriormente se tendría que evaluar el posible papel de este parásito en la conservación y para el manejo del lobo marino de Galápagos, especie endémica en peligro de extinción.

Otra característica interesante fue la proporción de sexos en la población de los nematodos colectados. La proporción de machos y de hembras en el intestino del lobo marino de Galápagos fue ligeramente sesgada hacia las hembras, pero este sesgo fue marcadamente menor que lo reportado para el elefante marino de Sur, donde se han encontrado intestinos con 40 parásitos hembras por cada macho (Ramos et al. 2013). De manera general estudios de poblaciones naturales en nematodos no patógenos realizados en diferentes cepas de *C. elegans* reportan

que se mantiene una diferencia en la frecuencia del número de machos a los mantenidos en el laboratorio, siendo cercano al 0.2 % en ambos casos (Hodgking y Doniach, 1997). A pesar de que los nematodos bursados (Strongylida) comparten un ancestro con nematodos rabditios, como *C. elegans*, *Uncinaria* es dioica y *C. elegans* es hermafrodita por lo que una variación en la frecuencia de sexos sería poco favorable en poblaciones parásitas. A futuro la recolección de muestras deberían tomarse de poblaciones completas de los parásitos para tomar los datos sobre la estructura y composición de sus poblaciones y así tener la variación de la frecuencia total de machos y hembras en una población.

El análisis bayesiano muestra que el marcador ribosomal *ITS* agrupa *Uncinaria* de *Zalopus wollebaeki* y *Z. californianus*. La filogenia separa en tres clados las Uncinarias, presentes en fócidos, las presentes en otáridos y las de cánidos. Dentro del grupo de otáridos existen diversos clados que poseen congruencia biogeográfica, de manera que se separan las presentes en el hemisferio norte en un clado que abarca a *U. lucasi* y *Uncinaria* sp del organismo de estudio. La filogenia expone la posibilidad de la presencia de más que dos especies de uncinaria en hospederos pinnípedos, sin embargo no se posee evidencias suficientes ni se cuenta con independencia evolutiva basándose en estos caracteres analizados.

Desde el marco teórico de la biogeografía, se esperaría que los organismos encontrados en las islas provengan de la isla continental más cercana. Sin embargo, a pesar de que geográficamente Galápagos se encuentra más cerca de las costas continentales de Ecuador, las secuencias del gen *ITS* de las uncinarias presentes en el lobo marino de Galápagos no fueron tan similares a las presentes en el lobo marino de sudamérica infectado con *Uncinaria hamiltoni*. Aunque la distribución del lobo marino de sudamérica no coincide con la del lobo marino de Galápagos, se han reportado varamientos en el archipiélago y así como expansión en años niño hasta las costas de Ecuador continental (Alava y Salazar 2006). En la filogenia obtenida se resalta claramente una separación entre las uncinarias que infectan otáridos y las presentes en fócidos, lo cual aporta más pistas sobre la

historia evolutiva y divergencia del grupo. El clado obtenido del marcador ribosomal evidencia la falta de conocimiento del grupo y la ausencia de resolución por parte del marcador para resolver relaciones dentro de grupos de *Uncinaria* en ciertos otáridos como las presentes en *Arctocephalus pusillus* y en el grupo de estudio. El árbol consenso de las distintas uncinarias colectadas en los diferentes fócidos muestra una relación parásito-hospedero muy estrecha y posiblemente coevolutiva pues está presente en casi todos los grupos. A pesar de la baja divergencia genética el patrón hace hipotetizar que la diversificación del hospedero pudo también resultar en la diversificación de *Uncinaria* siguiendo la filogenia de su hospedero, lo que que podría ser el resultado de procesos de colonización pero también de eventos vicariantes. Una explicación probable de la diversificación de *Uncinaria* en pinnípedos entrelaza la evolución de ambos grupos, de esta manera los fócidos a pesar de compartir áreas con hospederos pinnípedos no poseen las mismas especies que los lobos marinos y la divergencia de los otáridos se asemeja y concuerda con linajes basales al norte y diversificación en los grupos del sur *Neophoca*, *Phocarctos* y *Otaria* con Uncinarias tipo *hamiltoni* (Baylis, 1933; Beveridge 1980; Berón-Vera et al. 2004), además se muestran procesos de cambio de hospedero o que comparten hospederos por lo que no son especie específicos y esto complica su taxonomía. Se menciona que en parásitos con amplia distribución geográfica generalmente son arcaicos (Hoberg , 1992). Sin embargo la incongruencia entre las filogenia de los parásitos, *Uncinaria* y los hospederos, pinnípedos según Nadler (2013) denota un proceso ecológico reciente de colonización. Existe un patrón biogeográfico similar de relación parásito-hospedero de la distribución de céstodos en hospederos pinnípedos, *Anophrycephalus* spp. que es semejante a la de uncinaria en pinnípedos exepctuando en ambos casos a los odobenidos en donde la incongruencia de las filogenias entre hospederos y parásitos se explica por patrones de cambio de hospedero recientes más que coevolutivos (Hoberg, 1992). No obstante podría ser un problema de desfase de tiempo ya que los procesos coevolutivos están sucediendo y se desconoce el tiempo evolutivo de las secuencias con las cuales se elaboraron los árboles además que puede no estar

reflejado en la hipótesis filogenética construida. Estudios previos de filogenias en *Uncinaria* muestran que el marcador *ITS* comparado con otros marcadores ribosomales posee una tasa de mutación mayor y que es bueno para delimitar especies, sin embargo la resolución de la filogenia obtenida en la presente tesis no fue suficiente para definir diferentes grupos por lo tanto el empleo de otro marcador con una mayor tasa de mutación, que revele presiones selectivas específicas podría diferenciar dentro de los clados. Por otro lado la filogenia también da pie a nuevas inferencias como la probable presencia de uncinarias en otras especies de otáridos. A la fecha, sin tomar en cuenta el presente trabajo, se ha descrito *Uncinaria* en 10 de las 18 especies de otáridos existentes. Es posible que a lo largo de la historia evolutiva de los pinnípedos otáridos, diferentes eventos, como lo podría ser el tipo de sustrato sobre el cual habita el hospedero o la competencia entre parásitos, no hayan permitido el establecimiento de *Uncinaria* como patógeno. Alternativamente, la falta de reportes en las otras especies puede ser reflejo de que no se han buscado.

Los genes de virulencia son una aproximación para ver co-evolución porque la virulencia siempre conlleva un costo evolutivo sobre la eficacia biológica, además de ser específica para cada interacción parasito/hospedero. A pesar de que se logró amplificar exitosamente uno de los genes seleccionados este producto obtenido no fue suficiente para elaborar filogenias, posteriormente se podría clonar este fragmento o elaborar primers nuevos de mayor extensión. Aún de este modo no se podría alcanzar el objetivo planteado dada la falta de datos, secuencias de otras especies de uncinarias en distintos hospederos, necesarios para llevar a cabo una comparación de los genes de virulencia de *Uncinaria* en *Z. wollebaeki* con las demás especies en sus respectivos hospederos. Por otro lado cabe mencionar que la evolución no es direccional por lo que puede no haber ningún cambio, por el momento, en estos genes evaluados que en otros nematodos hematófagos resultaron claves como; MMIF, AcACP, HIP, NECPAIN, KUNITZ y ASP o también que el tiempo de divergencia genere solo cambios a otros niveles como mayor o menor expresión y debido a esto no lo podamos observar con esta aproximación. Estudios futuros podrían asociar genes de virulencia con genes

hospederos que potencialmente estén bajo selección, y relacionar patrones apareados en dichos genes para examinar procesos coevolutivos. Por ejemplo, trabajos previos reportaron cierta evidencia de que la presión selectiva ocasionada por *Uncinaria* puede observarse en los genes relacionados con factores de coagulación (Acevedo-Whitehouse, 2006; 2009). Por eso, analizar las secuencias de genes de los factores de coagulación y compararlos con los genes de los nematodos como *AcACp* y el *HIP*, sería una vía interesante para explorar.

Estudios comparativos de macroparásitos en sus hospederos pueden ser empleados como indicadores biogeográficos por su asociación dado que los patrones resultantes son eventos conjuntos ecológicos y evolutivos (Koehler et al. 2009). Asimismo en este estudio las uncinarias y los pinnípedos muestran cierta correlación con su distribución actual e histórica y parece que los patrones filogeográficos generados revelan también factores ecológicos dependiente de su interacción, como diferencias epidemiológicas o patogénicas.

VIII. CONCLUSIONES

El nematodo hematófago *Uncinaria* está presente en el lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*. Este nematodo presenta un fenotipo intermedio entre las especies descritas del género *Uncinaria*. Hace falta una descripción formal de las especies dentro del género *Uncinaria*, incluyendo *Uncinaria* sp. en *Z. wollebaeki* y *Z. californianus*.

Ya que el hallazgo fue a partir de un solo hospedero, falta conocer su prevalencia y relevancia a nivel poblacional. Conocer aspectos de la epidemiología de uncinariasis, como la prevalencia, intensidad de infección, y su patogenia, serían aspectos importantes de estudiar en el futuro ya que los resultados aquí obtenidos muestran un potencial virulento alto como el descrito para la especie que infecta al hospedero hermano *Z. californianus*. Es importante tomar en cuenta estas características de potencial virulencia para la conservación del lobo marino de Galápagos.

Estudios futuros sobre genes de virulencia y de respuesta del hospedero podrían dar información valiosa sobre coevolución de un sistema parásito-hospedero de amplia distribución.

IX. REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse, Karina. Spraker, Terry R. Lyons, Eugene. Melin, Sharon. Gulland, Frances. DeLong, Robert L. Amos, William. 2006. Contrasting effects of heterozygosity on survival and hookworm resistance in California sea lion pups. *Molecular Ecology*. (15) p 1973-1982.
- Acevedo-whitehouse Karina, Laura Petetti, Pdraig Duignan, Aurelie Castinel. 2009. Hookworm infection , anaemia and genetic variability of the New Zealand sea lion Hookworm infection, anaemia and genetic variability of the New Zealand sea lion. *The Royal Society*. (September) p. 3523-3529
- Alava, Juan Jose y Sandie Salazar. 2006. Status and Conservation of Otariids in Ecuador and the Galápagos Islands Otariids in the Galápagos Islands. Sea Lions of the World Alaska Sea Grant College Program • AK-SG-06-01, 2006 p. 495-520
- Anderson, R., 2000. *Nematode Parasites of vertebrates Their development and transmission* 2nd ed., Cabi publishing.
- Anderson, Roy C. Alain Gabriel Chabaud. y Sheila Willmott. 2009. Keys to the nematode parasites of vertebrates: Archival volume. CABI, 463pp.
- Anderson, R.M. & May, R.M., 1978. REGULATION AND STABILITY OF HOST-PARASITE POPULATION INTERACTIONS. *Journal of Animal Ecology*, 47, pp.219–247.
- Arnason, U., Anette Gullberg, Axel Janke, Morgan Kullberg, Niles Lehman, Evgeny a Petrov, Risto Väinölä. 2006. Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(2), pp.345–54.
- Aurioles, D. & Trillmich, F. (IUCN SSC Pinniped Specialist Group). 2008. *Zalophus wollebaeki*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 September 2013.
- Barson, M. y Marshall, B. E. 2004. First record of *Contraecaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) in fish-eating birds from Zimbabwe. *J S Afr Vet Assoc*, 75(2), 74–8.
- Baylis, H. 1933. A new species of the nematode genus *Uncinaria* from a sea-lion, with some observations on related species. *Parasitology*, pp.308–316.
- Baylis, H, 1947. A redescription of *Uncinaria lucasi* Stiles, A hookworm of seals. *Parasitology*, pp.160–162.

- Berón-Vera et al. 2004. *Uncinaria hamiltoni* (Nematoda: Ancylostomatidae) in South American Sea Lions , *Otaria flavescens* , From Northern Patagonia , Argentina. *Journal of parasitology*, 90(4), pp.860–863.
- Berta, Annalisa. James L. Sumich, Kit M. Kovacs. 2006. Marine Mammals: Evolutionary Biology. Academic press 2nd. Evolutionary Biology Ecology And Behavior p 132
- Beveridge, I. 1980. FROM THE AUSTRALIAN ANCYLOSTOMATIDAE) WATER RAT , HYDROMYS. *The Journal of parasitology*, 66(6), pp.1027–1031.
- Blaxter, Mark L. 2003. Nematoda: Genes, Genomes and the Evolution of Parasitism. *ADVANCES IN PARASITOLOGY* VOL 54 p 102-168
- Botto C, Mañe-Garzón. 1975. Sobre una nueva especie del género *Uncinaria* (Nematoda, Strongyloidea) de *Otaria flavescens* Shaw y la especiación en el género *Uncinaria* en pinnípedos americanos. *Rev Biol Uruguay*, 2, 127–141.
- Brock, P.M. 2012. *Immunity, life history and conservation in the Galapagos sea lion*. University of Leeds, Faculty of Biological Sciences.
- Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M. & Acevedo-Whitehouse, K. 2013. Immune activity, body condition and human-associated environmental impacts in a wild marine mammal. *PLoS ONE* 8(6): e67132. doi:10.1371/journal.pone.006713
- Brooker, S., Bethony, J. & Hotez, P.J. 2008. Human Hookworm Infection in the 21 st Century. *Adv. Parasitology*, 58(04), pp.1–59.
- Bush, R., Catherine A. Bender, Kanta Subbarao, Nancy J. Cox, Walter y M. Fitch. (1999) Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 286, 1921–1925
- Castinel, a, Duignan, P. J., Pomroy, W. E., Lyons, E. T., Nadler, S. a, Dailey, M. D., Chilvers, B. L. 2006. First report and characterization of adult *Uncinaria* spp. in New Zealand Sea Lion (*Phocarctos hookeri*) pups from the Auckland Islands, New Zealand. *J Parasitol Res*, 98(4), 304–309. doi:10.1007/s00436-005-0069-8
- Castinel, a et al., 2007. Neonatal mortality in New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*) at Sandy Bay, Enderby Island, Auckland Islands from 1998 to 2005. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3), pp.461–474.
- Castinel, A., Duignan, P.J. & Lyons, E.T., 2007. Epidemiology of hookworm (*Uncinaria* spp .) infection in New Zealand (Hooker ' s) sea lion (*Phocarctos hookeri*) pups on Enderby Island , Auckland Islands (New Zealand) during the breeding seasons from 1999 / 2000 to 2004 / 2005. *Parasitology research*, pp.53–62.

- Ceballos, Gerardo. Sandra Pompa, Eduardo Espinoza, Andrés García. 2010. Extralimital Distribution of Galapagos (*Zalophus wollebaeki*) and Northern (*Eumetopias jubatus*) Sea Lions in Mexico. *Aquatic Mammals* 36 (2) p. 188-194
- Chilvers, B.L., P J Duignan, B C Robertson, A Castinel, I S Wilkinson. 2009. Effects of hookworms (*Uncinaria* sp.) on the early growth and survival of New Zealand sea lion (*Phocarctos hookeri*) pups. *Polar Biology*, 32(2), pp.295–302.
- Cho, Yoonsang., Brian F Jones, Jon J Vermeire, Lin Leng, Lisa Difedele, Lisa M Harrison, Huabao Xiong, Yuen-kwan Amy Kwong, Yibang Chen, Richard Bucala, Elias Lolis, Michael Cappello. 2007. Structural and Functional Characterization of a Secreted Hookworm Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) That Interacts with the Human MIF Receptor CD74 282 (32) p. 23447-23456.
- Chopin, V., Matias, I., Stefano, G. B. and Salzet, M. 1998. Amino acid sequence determination and biological activity of therin, a naturally occurring specific trypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. *European Journal of Biochemistry* 254, 565–570
- Coghlan, A. 2005. Nematode genome evolution WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.15.1, <http://www.wormbook.org>.
- Cruz-Delgado, Francisco. Gonzáles, José y Wiedenfeld, David.. 2010. Breeding biology of the Critically Endangered Galapagos Petrel *Pterodroma phaeopygia* on San Cristobal Island: conservation and management implications *Bird Conservation International* (2010) 20:306–319.
- Dailey MD y Hill BL. 1970. A survey of metazoan parasites infecting the California (*Zalophus californianus*) and Steller (*Eumetopias jubatus*) sea lion. *Bull Soc Cal Acad Sci* 69:126–132
- DeLong, R.L., 2006. The Dynamics of Hookworm Disease in Northern Fur Seals. , (July), pp.1–5.
- De Ley, Paul. Irma Tandingan De Ley, Krystalynne Morris, Eyuaalem Abebe, Manuel Mundo-Ocampo, Melissa Yoder, Joseph Heras, Dora Waumann, Axayácatl Rocha-Olivares, a H Jay Burr, James G Baldwin, W Kelley Thomas. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360 (1462) p. 1945-5

- Deméré, T.A. Berta, Annalisa. Adam, Peter J. Deme, Thomas A, 2003. Chapter 3 Pinnipedimorph Evolutionary Biogeography. In pp. 32–76.
- Dowler, R.C., Carroll, D.S. & Edwards, C.W., 2000. Rediscovery of rodents (Genus *Nesoryzomys*) considered extinct in the Galapagos Islands. *Oryx*, 34(2), pp.109–117.
- Dybdahl, M.F. y Storfer, A., 2003. Parasite local adaptation : Red Queen versus Suicide King. *Trens in Ecology and Evolution*, 18(10), pp.523–530.
- Ewald, P.W., 1995. THE EVOLUTION OF VIRULENCE: A UNIFYING BETWEEN AND ECOLOGY PARASITOLOGY. *the journal of para*, 81(5), pp.659–669.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol*, 11(4), 839–50.
- Frank, S. a & Schmid-Hempel, P.2008. Mechanisms of pathogenesis and the evolution of parasite virulence. *Journal of evolutionary biology*, 21(2), pp.396–404.
- Gasser, P., Stewart, L. & Speare, R.1996. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Tropica*, 62, pp.15–21.
- Gaze, S., Mcsorley, H. y Loukas, A., 2012. Nematoda: Hookworm. In Tracey J. Lamb, ed. *Immunity to Parasitic Infection*. JohnWiley & Sons.
- Geist, D. 1996. ON THE EMERGENCE AND SUBMERCENCE OF THE GALÁPAGOS ISLANDS By: Dennis Geist. *NOTICIAS DE GALAPAGOS*, 5.
- George-Nascimento, M., Lima, M. & Ortiz, E., 1992. A case of parasite-mediated competition? Phenotypic differentiation among hookworms *Uncinaria* sp. (Nematoda: Ancylostomatidae) in sympatric and allopatric populations of South American sea lions *Otaria byronia*, and fur seals *Arctocephalus australis* (Carni. *Marine Biology*, 533.
- Groot, R. S. 1983 Tourism.and Conservation in the Galapagos Islands *Biological Conservation* 26 (1983) 291-300
- Harrison, Lisa M. Nerlinger, Andrew. Bungiro, Richard D. Córdova, José Luis Kuzmic, Petr Cappello, Michael. 2002. Molecular characterization of *Ancylostoma* inhibitors of coagulation factor Xa. Hookworm anticoagulant activity in vitro predicts parasite bloodfeeding in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (8) 6223-6229
- Hoberg, E P. 1992. Congruent and synchronic patterns in biogeography and speciation among seabirds, pinnipeds, and cestodes. *The Journal of parasitology* 78 (4) p. 601-15

- Hodgkin, Jonathan y Tabitha Doniach. 1997. Natural Variation and Copulatory Plug Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 146: 149-164
- Huhtasaari, K. 2011. "*Zalophus wollebaeki*" (On-line), Animal Diversity Web. at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Zalophus_wollebaeki/
- Huyse, Tine y Robert Poulin. 2005. Speciation in parasites : a population genetics approach. *Trends in parasitology* 21 (10)
- Ionita, M. M G Varela, E T Lyons, T R Spraker, S C Tolliver. 2008. Hookworms (*Uncinaria lucasi*) and acanthocephalans (*Corynosoma* spp. and *Bolbosoma* spp.) found in dead northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska in 2007. *Parasitology Research*, 103(5), pp.1025–1029.
- Jeglinski, J. W. E., Werner, C., Robinson, P. W., Costa, D. P., & Trillmich, F. 2012. Age, body mass and environmental variation shape the foraging ontogeny of Galapagos sea lions. *Marine Ecology Progress Series*, 453, 279–296.
- Koehler, Anson V. Eric P. Hoberg, Nikolai E. Dokuchaev, Nina a. Tranbenkova, Jackson S. Whitman, David W. Nagorsen, Joseph a. Cook. 2009. Phylogeography of a Holarctic nematode, *Soboliphyme baturini*, among mustelids: climate change, episodic colonization, and diversification in a complex host-parasite system. *Biological Journal of the Linnean Society* 96 (3) p. 651-663
- Lambrechts, L., Fellous, S. y Koella, J.C., 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in parasitology*, 22(1).
- Loukas, A., Constant, S.L. & Bethony, J.M. 2005. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS immunology and medical microbiology*, 43, pp.115–124.
- Lyons, E.T. R.L. DELONG. S.R., MELIN.,y S.C. TOLLIVER.1997. Uncinariasis in northern fur seal and California sea lion pups from California. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 848-852.
- Lyons, A.E.T. et al., 2000. Comparative Biology of *Uncinaria* Spp . in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*) and the Northern Fur Seal (*Callorhinus ursinus*) in California Infection by *Paragonimus miyazakii* Cercariae of Their Crab Hosts , *Geothelphusa dehaani* , by Percu. , 86(6), pp.1348–1352.
- Lyons, E.. et al., 2003. Observations in 2001 on hookworms (*Uncinaria* spp .) in otariid pinnipeds. *Parasitology Research*, pp.503–505.
- Lyons, E.y De Long, R.L. 2005. Photomicrographic images of some features of *Uncinaria* spp (Nematoda: Ancylostomatidae) from otariid pinnipeds. *Parasite research*, 95, pp.346–352.

- Lyons, E.T., Spraker, T.R., et al., 2011. Review of research on hookworms (*Uncinaria lucasi* Stiles, 1901) in northern fur seals (*Callorhinus ursinus* Linnaeus, 1758). *Parasitology Research*, 109(2), pp.257–265.[Accessed April 20, 2013].
- Lyons, E.T., DeLong, R.L. y Nadler, S.A.. 2011. Investigations of peritoneal and intestinal infections of adult hookworms (*Uncinaria* spp .) in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) pups on San Miguel Island , California (2003). *Parasitology Research*, 109, pp.581–589
- Lyons, E.T. Kuzmina, T A. Spraker, T R. Jaggi, N, 2012. Parasitological examination for presence of hookworms (*Uncinaria* spp .) in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) at Año Nuevo State Reserve , California (2012). *Parasitology Research*.
- Maizels,Rick M y Maria Yazdanbakhsh. 2003. IMMUNE REGULATION BY HELMINTH PARASITES : CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS. *Nature reviews* 3 (September)
- Maldonado, O, Stewart, Geffen, Robert K Wayne. 1995.INTRASPECIFIC GENETIC DIFFERENTIATION IN CALIFORNIA SEA LIONS (*ZALOPHUS CALIFORNIANUS*) FROM SOUTHERN CALIFORNIA AND THE GULF OF CALIFORNIA. *Marine mammal science* (January) p. 46-58
- McCracken, G. Hayes, J.P. Cevallos, J Guffey, S.Z. Romero, C.F. 1997. Observations on the distribution, ecology, and behaviour of bats on the Galapagos Islands. *The zoological Society of London*, 243(1 997), pp.757–770.
- Mehlhorn, H., 2008. *parasitology Encyclopedia* 3rd ed. H. Mehlhorn, ed., Springer.
- Morens,David M., Gregory K. Folkers., y Anthony S. 2004. Fauci.The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases *Nature* 430, 242-249 (8 July 2004)
- Mulvenna, Jason. Hamilton, Brett. Nagaraj, Shivashankar H. Smyth, Danielle. Loukas, Alex. Gorman, Jeffrey J. 2009. Proteomics Analysis of the Excretory / Secretory Component of the Blood-feeding Stage of the Hookworm , *Ancylostoma caninum*. *Molecular and Cellular Proteomics* (8.1) p109-121
- Nadler, S.A. Byron, J. Lyons, E.T. DeLong, R. Melin, S. 2000. Molecular and morphometric evidence for separate species of *Uncinaria* (Nematoda:Ancylostomatidae) in California sea lions and Northern fur seals: Hypothesis testing supplants verification. *Journal of parasitology*, 86(5), pp.1099–1106.

- Nadler, Steven A. Lyons, Eugene T. Pagan, Christopher. Hyman, Derek. Lewis, Edwin E. Beckmen, Kimberlee. Bell, Cameron M. Castinel, Aurelie Delong Robert L. Duignan, Padraig J. Farinpour, Cher. Huntington, Kathy Burek. Kuiken, Thijs. Morgades, Diana. Naem, Soraya. Norman, Richard. Parker Corwin. Ramos, Paul. Spraker, Terry R. Berón-Vera, Bárbara. 2013. Molecular systematics of pinniped hookworms (Nematoda: Uncinaria): species delimitation, host associations and host-induced morphometric variation. *International Journal for Parasitology* 43 (2013) 1119–1132
- Naem, S. Pagan, Christopher. Nadler, Steven A. 2010. Structural Restoration of Nematodes and Acanthocephalans Fixed in High Percentage Alcohol Using Dess Solution and Rehydration Structural Restoration of Nematodes and Acanthocephalans Fixed in High Percentage Alcohol Using Dess Solution and Rehydration. *Journal of parasitology*, 96(4), pp.809–811.
- Olsen O. Wilford y Eugene T. Lyons. 1965. Life Cycle of *Uncinaria lucasi* Stiles, 1901 (Nematoda : Ancylostomatidae) of Fur Seals, *Callorhinus ursinus* Linn., on the Pribilof Islands, Alaska. Source: *The Journal of Parasitology*, Vol. 51, No. 5 (Oct., 1965), pp. 689-700.
- Orr, R. 1967. The Galapagos Sea Lion. *Journal of Mammalogy*, Vol 48: 62-69.
- Parent,Christine E., Adalgisa Caccone, Kenneth Petren. 2008.Colonization and diversification of Galapagos terrestrial fauna: a phylogenetic and biogeographical synthesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2008) 363, 3347–3361
- Palmeree, Danny y Rachowiecki, Rob. 2003. Ecuador and the galapagos islands. 5 ed. lonely planet.
- Perrin, W., Würsig, B. y Thewissen, J.G. 2002. *Encyclopedia of Marine Mammals* 1st ed. A. P. and I. of Elsevier, ed., USA.
- Pörschman, Ulrich. Trillmich, Fritz. Mueller, Birte y Wolf, Jochen B. 2010. Male reproductive success and its behavioural correlates in a polygynous mammal, the Galapagos sea lion (*Zalophus wollebaeki*). *Molecular Ecology* (2010) 19, 2574–2586
- Poulin,Robert y Serge Morand. 2000. The Diversity of Parasites. *The Quarterly Review of Biology* 75 (3). p. 277-293
- Ramos, P., Lynch, M., Arnould, J., Norman, R., & Beveridge, I. 2013. Morphometric and molecular characterization of the species of *Uncinaria* Frolich, 1789 (nematoda) parasitic in the Autralian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* (screber) with notes on hookworms in three other pinniped hosts. *Syst Parasitol.*
- Salazar, S., 2005. *Variación temporal y espacial del espectro trófico del lobo marino de Galápagos (Zalophus wollebaeki)*. I.P.N.

- Sepúlveda, M. S. y Alcaíno. 1993. Fauna helmintológica en el lobo fino de Juan Ferndndez, *Arctocephalus philippii* (Peters,1866). *Parasitologia al Dia* 17: 19-24
- Sepúlveda, M.S., 1998. Hookworms (*Uncinaria* sp .) in Juan Fernandez Fur Seal Pups (*Arctocephalus philippii*) from Hookworms (*Uncinaria* sp .) in Juan Fernandez Fur Seal Pups (*Arctocephalus philippii*) from Alejandro Selkirk Island , Chile. *Journal of parasitology*, 84(6), pp.1305–1307.
- Schramm, Y., Mesnick, S. ., De la Rosa, J., M, P. D., Lowry, M. S., Auriolos-gamboa, D., Escorza-treviño. 2009. Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, 156, 1375–1387. doi:10.1007/s00227-009-1178-1
- Spraker, T. R., Lyons, E. T., DeLong, R. L., & Zink. 2004. Penetration of the small intestine of a California sea lion (*Zalophus californianus*) pup by adult hookworms (*Uncinaria* spp). *Parasitol Res*, 92, 436–438. doi:10.1007/s00436-003-1050-z
- Thompson, John N. 2001. Coevolution. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. Nature Publishing Group p 1-5
- Traub, Rebecca., J Tawin Inpankaew, Chantira Sutthikornchai, Yaowalark Sukthana, R C Andrew Thompson. 2008. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok. *Veterinary parasitology* 155 (1-2) p. 67-73
- Uhen, M.D., 2007. Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 290(6), pp.514–22.
- Van Valen L. 1974. Molecular evolution as predicted by natural selection. *Journal of molecular evolution* 3 (2) p. 89-101
- Villegas-Amtmann, S. et al., 2008. Multiple foraging strategies in a marine apex predator , the Galapagos sea lion *Zalophus wollebaeki* . , 363, pp.299–309.
- Williamson, Angela. L Paul J Brindley, Giovanni Abbenante, Paul Prociv, Colin Berry, Karen Girdwood, David I Pritchard, David P Fairlie, Peter J Hotez, John P Dalton, Alex Loukas. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (11) p. 1458-60
- Williamson, A.L. Paul J Brindley, David P Knox, Peter J Hotez, Alex Loukas. 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in parasitology*, 19(9), pp.417–423.
- Wolf, J.B.W., Tautz, D. & Trillmich, F. 2007. Galápagos and Californian sea lions are separate species: Genetic analysis of the genus *Zalophus* and its

implications for conservation management. *Frontiers in Zoology*, 4(20), pp.1–13.

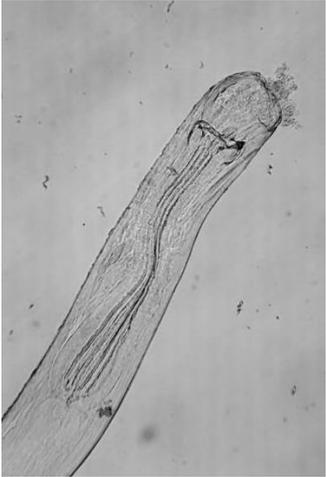
Wolf, J.B.W. et al., 2008. Tracing early stages of species differentiation : Ecological , morphological and genetic divergence of Galápagos sea lion populations. , 14, pp.1–14.

Zhao, Zeng Q. Davies, Kerrie, A. Riley, Ian, T. and Nobbs, Jackie M. 2006. *Laimaphelenchus australis* sp. nov. (Nematoda: Aphelenchina) from exotic pines, *Pinus radiata* and *P. pinaster*, in Australia. *Zootaxa*1248: 35–44

X. Anexos

Anexo 2.- Aclaraciones de nematodos

A



B



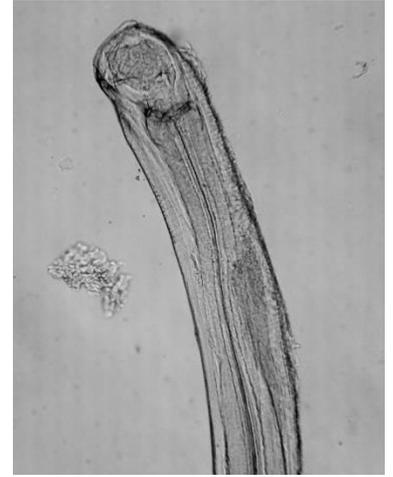
C



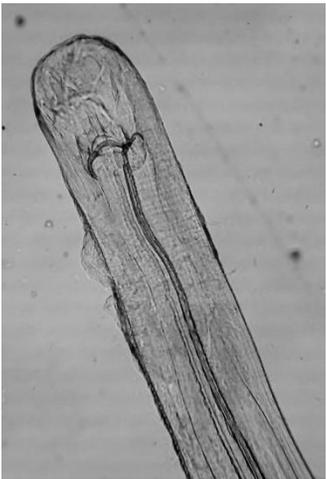
D



E



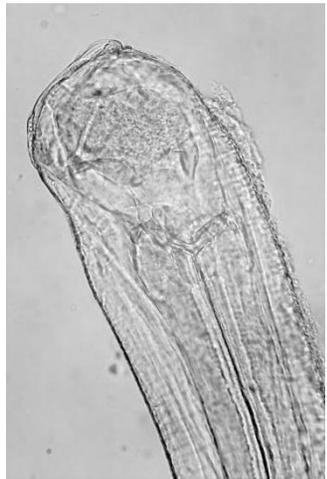
F



G



H



I



J



K



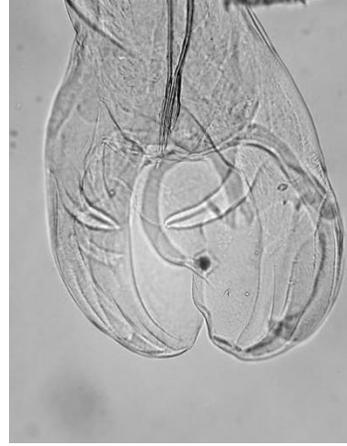
L



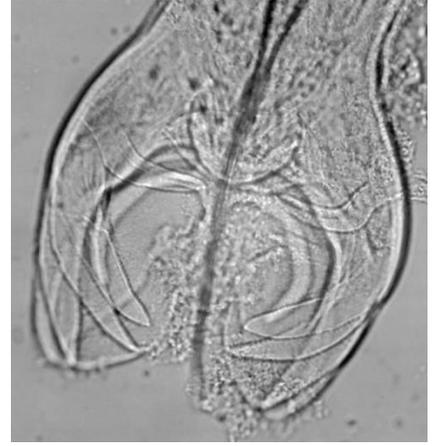
M



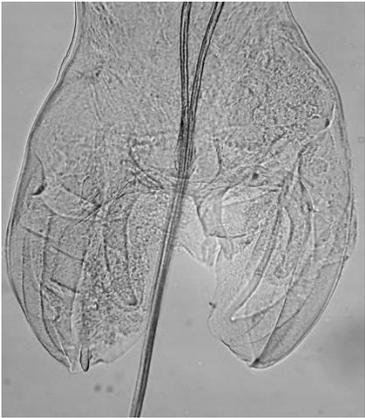
N



O



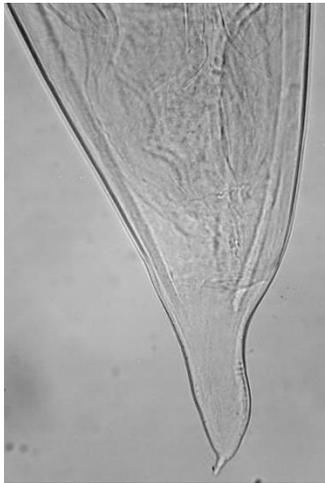
P



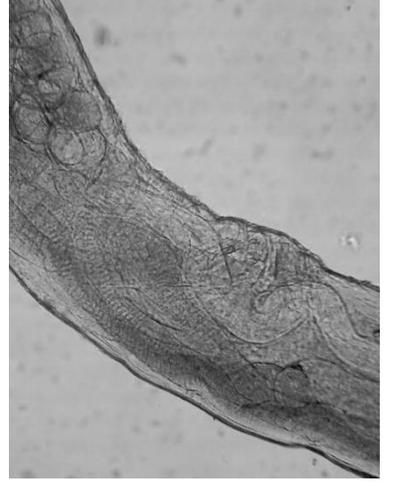
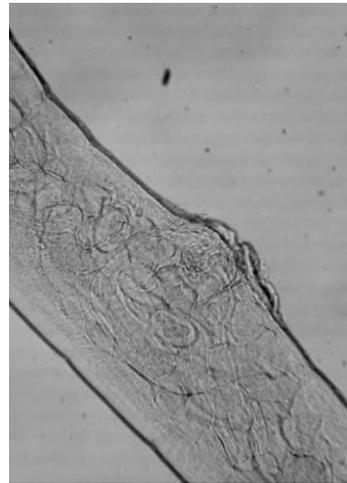
Q



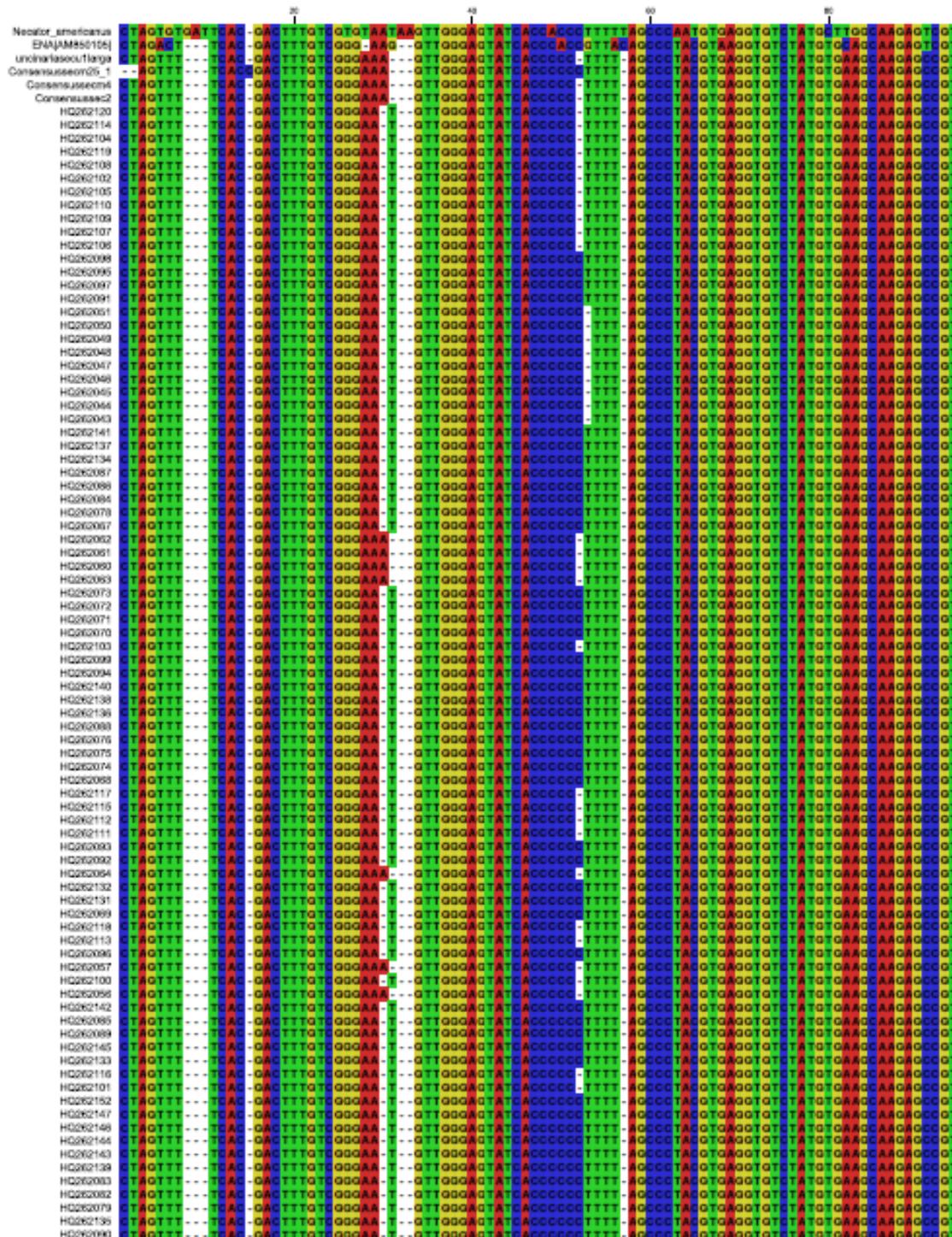
R



S



Anexo 2 Alineación del fragmento ITS1 5.8s ITS2 de *Uncinaria* spp. (KF640225-
 KF640228) *N. americanus* (AF217891.1) y *A. caninum* (AM850105)



Anexo 3

Microfotografías de un nematodo hembra colectado del tracto gastrointestinal del lobo marino de Galápagos. Presenta características morfológicas diferentes a las que presenta *Uncinaria*.

