



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Expresión genética relacionada con la
transformación epitelial genital del lobo
marino de California

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el
Grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. Diana Paulina Nieves Martínez

Dirigido por:

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Querétaro, Qro. a Abril, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Expresión genética relacionada con la transformación epitelial genital del lobo marino de California

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en
Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

Diana Paulina Nieves Martínez

Dirigido por:

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Presidente

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Secretario

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez

Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Suplente

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

junio, 2022

México.

RESUMEN

El lobo marino de California es considerado como modelo potencial para el estudio de la carcinogénesis debido a que presenta una alta e inusual prevalencia de cáncer. Al ser una especie silvestre, proporciona información sobre las complejas interacciones entre la genética, las infecciones y el medio ambiente. El carcinoma urogenital presenta una prevalencia que fluctúa entre el 18-23% de los varamientos totales en las costas de California. Se ha asociado a la infección por dos virus con potencial oncogénico, factores genéticos, y altos niveles de contaminantes organoclorados. Las diferencias ecológicas a lo largo de la distribución del lobo marino de California, hacen que sea idóneo para el estudio del sistema inmunitario y su relación con los factores ambientales posiblemente asociados con el cáncer. El principal objetivo de esta tesis fue evaluar el perfil transcripcional de genes clave involucrados en procesos antivirales y antitumorales a nivel del epitelio genital del lobo marino de California. En el primer capítulo se investigó el perfil transcripcional de linfocitos del epitelio genital de hembras adultas de lobos marinos de California en libertad, y evaluamos la expresión de 10 genes involucrados en respuestas antivirales y antitumorales (KIR, Ly49, perforina, granzima B, STAT-1, eomes, Tbx21, GATA-3, STAT-6 y FOXP3) con el objetivo de buscar diferencias de acuerdo a los años de muestreo, a diferencias regionales, a la infección por dos virus oncogénicos, el gammaherpesvirus otárico (OthV-1) y el papillomavirus otárico (ZcPV-1) y a la transformación pre oncogénica. Debido las diferencias en la prevalencia del carcinoma urogenital en las distintas poblaciones del lobo marino en aguas mexicanas y las que habitan las costas de California, fueron evaluados los cambios morfológicos celulares que se presentan en las hembras adultas con carcinoma urogenital para identificar los cambios morfológicos celulares sugestivos a neoplasias intraepiteliales, y determinar si existe una concordancia diagnóstica entre los cambios morfológicos que se dan en las lesiones cervicales obtenidas mediante estudios citológicos con las lesiones macroscópicas halladas a la necropsia de hembras varadas en las costas de California E.E.U.U., además de buscar fenotipos celulares característicos de infección por papillomavirus. Se encontraron diferencias en los niveles de expresión relativa de varios genes entre los años de muestreo, lo cual tiene relación a la variabilidad de importantes

factores ambientales como elevada temperatura del agua y escasez de alimento que están directamente relacionadas a alteraciones de respuestas inmunitarias. También se observaron diferencias regionales en la expresión de genes relacionados a respuestas citotóxicas y a respuestas de tipo Th1 y patrones de regulación a la baja en CSL infectados con OtHV-1 en comparación con CSL no infectados o infectados con papilomavirus. Se observaron cambios morfológicos celulares indicativos de displasia leve, y la presencia de coilocitos, pero no fueron evidentes cambios sugestivos a displasia grave o cáncer. Este estudio generó conocimiento para comprender la influencia de virus potencialmente oncogénicos y la displasia celular leve en los principales efectores inmunológicos en CSL a nivel del epitelio genital, además de tener una mejor integración de la información existente sobre la competencia inmunológica en el contexto del carcinoma urogenital en CSL.

Palabras clave:

Carcinoma urogenital, lobo marino de California, oncogénesis, inmunovigilancia, displasia celular.

ABSTRACT

The California sea lion is considered a potential model for the study of carcinogenesis due to its high and unusual prevalence of cancer. Being a wild species, it provides insight into the complex interactions between genetics, infection, and the environment. Urogenital carcinoma has a prevalence that fluctuates between 18-23% of total strandings on the California coast. It has been associated with infection by two viruses with oncogenic potential, genetic factors, and high levels of organochlorine contaminants. Ecological differences throughout the distribution of the California sea lion make it ideal for studying the immune system and its relationship to environmental factors possibly associated with cancer. The main objective of this thesis was to evaluate the transcriptional profile of key genes involved in antiviral and antitumor processes at the level of the genital epithelium of the California sea lion. In the first chapter, the transcriptional profile of lymphocytes from the genital epithelium of adult female California sea lions in the wild was investigated, and we evaluated the expression of 10 genes involved in antiviral and antitumor responses (KIR, Ly49, perforin, granzyme B, STAT- 1, eomes, Tbx21, GATA-3, STAT-6 and FOXP3) with the aim of looking for differences according to sampling years, regional differences, infection by two oncogenic viruses, otarino gammaherpesvirus (OthV-1) and otarino papillomavirus (ZcPV-1) and pre-oncogenic transformation. Due to the differences in the prevalence of urogenital carcinoma in the different sea lion populations in Mexican waters and those that inhabit the coasts of California, the cellular morphological changes that occur in adult females with urogenital carcinoma were evaluated to identify cellular morphological changes suggestive of intraepithelial neoplasias, and to determine if there is a diagnostic concordance between the morphological changes that occur in the cervical lesions obtained by cytological studies with the macroscopic lesions found at necropsy of females stranded on the coast of California, USA. In addition to looking for cellular phenotypes characteristic of papillomavirus infection. Differences were found in the relative expression levels of several genes between the sampling years, which is related to the variability of important environmental factors such as highwater temperature and food scarcity that are directly related to alterations in immune responses. Regional differences

in the expression of genes related to cytotoxic responses and Th1-like responses and downregulation patterns were also observed in OtHV-1-infected CSL compared to uninfected or papillomavirus-infected CSL. Cellular morphological changes indicative of mild dysplasia and the presence of koilocytes were observed, but no changes suggestive of severe dysplasia or cancer were evident. This study generated knowledge to understand the influence of potentially oncogenic viruses and mild cell dysplasia on the main immunological effectors in CSL at the genital epithelial level, in addition to having a better integration of existing information on immunological competence in the context of urogenital carcinoma. in CSL.

Keywords:

Urogenital carcinoma, California sea lion, oncogenesis, immunosurveillance, cellular dysplasia.

DEDICATORIAS

Dedico este esfuerzo a cada uno de mis seres queridos, quienes están al pendiente de cada logro y me impulsan siempre a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que de alguna forma me ayudaron a poder realizar este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Naturales y a la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable por permitirme completar mi programa de estudios.

A CONACYT por el financiamiento otorgado para que yo pudiera realizar esta tesis.

A Karina por inspirarme a ser mejor y por permitirme ser parte de su equipo.

A mis sinodales el Dr. Fausto, Dr. Roberto, Dra. Gaby y Dra. Andrea, por sus enseñanzas y por brindarme su apoyo.

Al Dr. Germán Silva por compartirme su tiempo y sus valiosos conocimientos en el campo de la citología.

A The Marine Mammal Center por proporcionarnos el material citológico utilizado en esta tesis, y por brindarnos los elementos e información necesaria. Gracias al Dr. Padraig por brindarme la información requerida.

A todos los que me apoyaron con sus conocimientos en el lab, Carlos, Marina, Ceci, Nacho, Aldo y los demás miembros del LGMEE, gracias por sus enseñanzas y buenos consejos.

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y ÉTICA PROFESIONAL

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

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

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

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y ÉTICA PROFESIONAL	VII
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE CUADROS	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER	4
2.1.1 <i>Transformación neoplásica</i>	7
2.1.2 <i>Alteraciones de ganancia y pérdida de función</i>	10
2.1.3 <i>Papel de los virus en el desarrollo de cáncer</i>	12
2.1.4 <i>Características distintivas del cáncer</i>	14
2.2 PAPEL DE SISTEMA INMUNITARIO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER	16
2.2.1 <i>Sistema inmunitario innato</i>	18
2.2.2 <i>Sistema inmunitario adquirido</i>	22
2.2.3 <i>Respuestas inmunitarias en epitelios mucosales</i>	24
2.3 CÁNCER EN ANIMALES SILVESTRES	26
2.4 CARCINOMA UROGENITAL DEL LOBO MARINO DE CALIFORNIA	27
2.4.1 <i>Cambios morfológicos celulares en el epitelio genital en la transformación oncogénica y su clasificación</i>	29
2.4.2 <i>Factores involucrados en el desarrollo de CUG</i>	37

III.	JUSTIFICACIÓN	41
IV.	HIPÓTESIS	42
V.	OBJETIVOS	43
	5.1 <i>Objetivo general</i>	43
	5.2 <i>Objetivos específicos</i>	43
VI.	METODOLOGÍA	44
	<i>Especie de estudio</i>	44
	<i>Área de estudio</i>	46
	<i>Toma de muestras</i>	48
	<i>Citología</i>	49
	<i>Extracción y Purificación de ADN</i>	51
	<i>Detección de ADN de OtHV-1</i>	52
	<i>Detección de ADN de ZcPV-1</i>	52
	<i>Extracción de ARN total y síntesis de ADNc</i>	53
	<i>Expresión genética</i>	53
	<i>Análisis estadístico</i>	56
VII.	RESULTADOS.....	58
VIII.	DISCUSIÓN	97
IX.	CONCLUSIÓN	114
X.	BIBLIOGRAFIA	116
XI.	ANEXO I.....	134
XII.	ANEXO II.....	138
XIII.	ANEXO III.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del cérvix.....	29
Figura 2. Células endocervicales	30
Figura 3. Histología del exocérvix. Estratos celulares que lo conforman	31
Figura 4. Tipos celulares del epitelio exocervical	33
Figura 8. Transcripción relativa de KIR en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	59
Figura 9. Transcripción relativa de Ly49 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	60
Figura 10. Transcripción relativa de perforina en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	61
Figura 11. Transcripción relativa de granzima B en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020	62
Figura 12. Transcripción relativa de STAT-1 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	63
Figura 13. Transcripción relativa de eomes en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	64
Figura 14. Transcripción relativa de Tbx21 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	65
Figura 15. Transcripción relativa de GATA-3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	66
Figura 16. Transcripción relativa de STAT-6 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	67
Figura 17. Transcripción relativa de FOXp3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.....	68

Figura 18. Transcripción relativa de KIR en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	69
Figura 19. Transcripción relativa de Ly49 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	70
Figura 20. Transcripción relativa de perforina en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	71
Figura 21. Transcripción relativa de granzima B en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	72
Figura 22. Transcripción relativa de STAT-1 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	73
Figura 23. Transcripción relativa de eomes en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	74
Figura 25. Transcripción relativa de GATA-3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	76
Figura 26. Transcripción relativa de STAT-6 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	77
Figura 27. Transcripción relativa de FOXP3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.	78
Figura 30. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de granzima B entre las diferentes regiones.	82
Figura 31. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de STAT-1 entre las diferentes regiones.	83

Figura 32. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de eomes entre las diferentes regiones.	84
Figura 33. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de Tbx21 entre las diferentes regiones	85
Figura 34. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de GATA-3 entre las diferentes regiones	86
Figura 35. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de FOXp3 entre las diferentes regiones.....	87
Figura 36. Niveles de transcripción de Ly49 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	89
Figura 37. Niveles de transcripción de eomes según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	90
Figura 38. Niveles de transcripción de Tbx21 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	91
Figura 39. Niveles de transcripción de STAT-6 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	92
Figura 40. Interpretación citológica de las laminillas analizadas	93
Figura 41. Cambios morfológicos celulares encontrados en el tracto genital de hembras de lobo marino de California	95
Figura 42. Coilocitos observados en la citología de <i>CSL-13737</i>	95
Figura 43. Coilocitos observados en la citología de <i>CSL-13729</i>	96
Figura 44. Coilocitos observados en la citología de <i>CSL-14128</i>	96
Figura 65. Niveles de expresión de KIR de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).	143
Figura 66. Niveles de expresión de Ly49 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).	144

Figura 67. Niveles de expresión de perforina de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	145
Figura 68. Niveles de expresión de granzima B de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	146
Figura 69. Niveles de expresión de STAT-1 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	147
Figura 70. Niveles de expresión de eomes de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	148
Figura 71. Niveles de expresión de Tbx21 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	149
Figura 72. Niveles de expresión de GATA-3 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	150
Figura 73. Niveles de expresión de STAT-6 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	151
Figura 74. Niveles de expresión de FOXP3 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).....	152
Figura 75. Niveles de transcripción de KIR según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	153
Figura 76. Niveles de transcripción de perforina según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	154
Figura 77. Niveles de transcripción de granzima B según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	155
Figura 78. Niveles de transcripción de STAT-1 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	156
Figura 79. Niveles de transcripción de GATA-3 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.....	157

Figura 80. Niveles de transcripción de FOXp-3 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, 158

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familia de ciclinas y CDKs en mamíferos	6
Cuadro 2. Propiedades de los agentes carcinogénicos causantes de daño al ADN.....	9
Cuadro 3. Clasificación funcional de los genes asociados al cáncer	12
Cuadro 4. Genes con funciones marcadoras de citotoxicidad NK y CD8 ⁺ , respuesta tipo Th2 e inmunomodulación.	55
Cuadro 5. Morfología observada en la citología cervical y su interpretación según el sistema Bethesda. NS= No satisfactoria	94

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial en la población humana. Su aparición se debe a una combinación de factores extrínsecos e intrínsecos, que incluyen alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan a cambios en la expresión génica (Ponder, 2001). Estas alteraciones causan inestabilidad del genoma que lleva a la activación de oncogenes y al silenciamiento de genes supresores tumorales que juegan un papel muy importante en el control de la proliferación y transformación celular (Cheung *et al.*, 2009).

Lamentablemente, el estudio del cáncer en el humano es complicado por la gran cantidad de factores de confusión, como variaciones en la dieta, en la microbiota, en los fármacos utilizados, en el estado de inflamación crónico y las enfermedades crónico degenerativas concomitantes, entre otros factores, que dificultan comprender la importancia de los factores que pueden dar lugar a la transformación maligna celular. Por eso, el estudio del cáncer en modelos no humanos aporta información importante sobre aspectos biológicos, genéticos y ecológicos, lo que permite tener un enfoque sistémico y objetivo de la compleja naturaleza de esta enfermedad (Efron *et al.*, 1977).

El lobo marino de California, *Zalophus californianus*, (en adelante, CSL) es considerado como un modelo para el estudio de la carcinogénesis debido a que presenta una alta e inusual prevalencia de cáncer, y al ser una especie silvestre, proporciona información sobre las complejas interacciones entre la genética, las infecciones y el medio ambiente, sin otros factores de confusión (Browning *et al.*, 2015). Además, el tipo de cáncer, carcinoma urogenital, desarrollado por esta especie pinnípeda, presenta ciertos paralelismos epidemiológicos con el cáncer cervicouterino de las mujeres, por lo que su estudio puede llevar a comprender mejor los factores causales más importantes para esta transformación cancerígena en el humano (Browning *et al.*, 2015).

El carcinoma urogenital presenta una prevalencia que fluctúa entre el 18 y el 23% de los varamientos totales en las costas de California, una inusual prevalencia para una especie en vida libre (Gulland *et al.*, 2020). Al igual que otros tipos de cáncer, el

carcinoma urogenital tiene un origen multifactorial. La infección por virus oncogénicos es uno de los factores mayormente asociado a la enfermedad, en particular, se ha asociado correlativamente la presencia del gammaherpesvirus otárico (OthV-1) a la ocurrencia de cáncer urogenital (Lipscomb *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002; Gulland *et al.*, 2020), mientras que se ha propuesto que el papillomavirus otárico (ZcPV-1) podría estar asociado a la pre-transformación cancerígena del epitelio cervical (Barragán-Vargas *et al.*, 2016). Además, se han relacionado estadísticamente diversos factores con la ocurrencia del carcinoma urogenital. Por ejemplo, factores genéticos, como bajos niveles de heterocigosidad (Acevedo *et al.*, 2003), variantes alélicas de algunos microsatélites (Browning *et al.*, 2018) y genes específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC de clase II) (Bowen *et al.*, 2005), pérdida de receptores de estrógenos (Colegrove *et al.*, 2009), y altas concentraciones de agentes contaminantes, como organoclorados, el PCBs y DDT, en la grasa y sangre de los lobos marinos (Ylitalo *et al.*, 2005).

Curiosamente, hasta el día de hoy no hay evidencia de carcinoma urogenital en lobos marinos de California que habitan aguas mexicanas, es decir en las islas del Golfo de California y del Pacífico Norte Mexicano, y únicamente se han observado casos de transformaciones pre-oncogénicas del epitelio genital en el grado de displasia intraepitelial leve (Barragán-Vargas *et al.*, 2015). Una posible explicación a la diferencia en la ocurrencia de este fenómeno patológico son las marcadas diferencias en las concentraciones de organoclorados reportadas en la grasa de lobos marinos de las costas de California en comparación con la de individuos del Golfo de California y Pacífico Mexicano. Se ha observado que los niveles de organoclorados siguen un gradiente hacia el sur de California, disminuyendo su concentración, siendo dos a tres órdenes de magnitud más altos en California que en los animales del Pacífico mexicano y que en el Golfo de California (Ylitalo *et al.*, 2005; Del Toro *et al.*, 2006; Niño-Torres *et al.*, 2009). Altas concentraciones de organoclorados y otros pesticidas pueden ocasionar cambios en la inmunomodulación de los individuos, lo que fue propuesto para explicar diferencias en la expresión de genes de subpoblaciones de linfocitos circulantes encargados de la oncogvigilancia en el contexto de la carcinogénesis en el CSL (Peñín *et al.*, 2018).

A la fecha, se desconoce el perfil de expresión genético del epitelio genital de los lobos marinos, ni su relevancia para la pre-transformación oncogénica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión del epitelio genital de genes clave para las respuestas inmunitarias, particularmente en respuestas antivirales y antitumorales mediadas por células NK, linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ y linfocitos T reguladores, involucrados en la inmunomodulación en el contexto de la transformación pre oncogénica y de acuerdo a las infecciones por virus oncogénicos. Además, se busca comprender el papel del sistema inmunitario a nivel local en el control del carcinoma urogenital en etapas iniciales.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial en la población humana, fue descrita en la antigüedad como un grupo de “enfermedades raras” y con base en los reportes médicos de la época, puede verse que su incidencia incrementó gradualmente desde el siglo XVIII; desde entonces, a pesar de los esfuerzos realizados por combatirlo, es una de las principales causas de muerte en el mundo (Capasso, 2005; Salaverry, 2013). El término ‘cáncer’ engloba a un conjunto de patologías que se caracterizan por presentar la proliferación clonal descontrolada de células que forman un tejido (OMS, 2019). Además de la proliferación celular desmedida, el término cáncer involucra una transformación maligna, es decir, las células pierden las características de una célula normal y adquieren otras que promueven el desarrollo de un proceso neoplásico (Hanahan & Weinberg, 2000). Se conoce también como neoplasia al crecimiento excesivo y sin control de masas celulares que se desarrollan en cualquier tipo de tejido sólido, con rasgos funcionales diferentes a las de un tejido normal (Ouchen, 2008). Por el contrario, puede haber crecimiento excesivo sin malignización, como serían los casos de hiperplasia, que no tienen que volverse un cáncer.

El desarrollo del cáncer se conoce como oncogénesis o carcinogénesis y es un proceso complicado, pues hasta hace unas pocas décadas se ignoraba el cómo una célula era capaz de iniciar esta transformación y desencadenar cáncer. Actualmente se sabe, gracias a los avances en estudios moleculares y al desarrollo de herramientas de secuenciación genómica, que el cáncer es un desorden genético esporádico, que inicia debido a una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que como consecuencia llevan a alteraciones en la expresión génica (Ponder, 2001; Sharma *et al.*, 2010).

En esencia, el cáncer se desarrolla por la alteración en la expresión de ciertos genes que participan activamente en la regulación del ciclo celular, particularmente genes que controlan la división mitótica y la apoptosis, además de alteraciones en genes

implicados en los mecanismos de reparación del ADN, al menos en las primeras etapas de su desarrollo (Ponder, 2001).

Todas las células eucariotas siguen una serie de pasos escritos en su programa genético que les ayuda a llevar un adecuado crecimiento y proliferación, y para esto, se necesita la expresión de un conjunto de genes que codifican para proteínas específicas que “controlan” la transición de cada una de las fases (Fotedar & Fotedar, 1995). La importancia de la expresión de estos genes radica en que las proteínas para las que codifican ejercen su función solamente en una “ventana” de tiempo durante el ciclo celular, la cual es muy precisa y es dependiente de señales internas y externas (Hulleman, 2001; Fragoso *et al.*, 2004). Existen diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Las ciclinas, por ejemplo, son proteínas que tienden a aparecer y desaparecer a lo largo del ciclo, controlando la transición de una fase a otra (Nigg, 1995). Las ciclinas tienen un complemento, y estas son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), juntas forman una macromolécula funcional con actividad de cinasa (Gao & Zelenka, 1997). Existen diferentes complejos ciclina/CDK, y sus diversas combinaciones ejercen diferentes funciones, por ejemplo, la ciclina E/CDK2 está implicada en la transición entre las fases G1 a S; otras combinaciones diferentes ejercen otras funciones, como la de regular diferentes procesos celulares mediante la fosforilación de proteínas que activan a genes que participan en la síntesis del ADN (Koff *et al.*, 1992; García-Foncillas *et al.*, 2001). En el cuadro 1 se enlistan las ciclinas activadoras de las CDKs y su función.

El ciclo celular tiene un papel extremadamente significativo en el desarrollo del cáncer. Es un proceso de varios eventos, donde el objetivo es el crecimiento y la división de las células de forma controlada; este proceso se divide en 4 fases: La fase G1 o de crecimiento 1, la fase S de síntesis, la fase G2 o de crecimiento 2 y la fase M o mitosis (Fragoso *et al.*, 2004). La primera fase, G1, inicia en una célula que concluyó su división. En esta fase, la célula crece y produce diversas proteínas necesarias para la siguiente fase, la S. En la fase S se duplica el ADN; al terminar esta fase, el núcleo tiene el doble de ADN y de proteínas nucleares y la célula está lista para entrar a la siguiente fase, la G2. En esta fase se continúa con la síntesis de ARN y la producción de proteínas y demás

organelos, por lo que la célula aumenta de tamaño (Israels & Israels, 2000). A este periodo entre las dos mitosis, G1, S y G2 se denomina interfase (García-Foncillas *et al.*, 2001). Existe otra fase llamada G0, en donde la célula no produce ni sintetiza ADN, únicamente se mantiene en quiescencia. La fase de mitosis llega sólo cuando la célula es estimulada para hacerlo, por ejemplo, al haber una sobreexpresión de factores de transcripción (señal intracelular) o por la estimulación generada por factores de crecimiento, hormonas, o mitógenos (señales endócrinas o parácrinas) (Fragoso *et al.*, 2004).

Cuadro 1 Familia de ciclinas y CDKs en mamíferos		
CDK	Principales ciclinas activadoras	Función en la célula
CDK1	A1, A2, B1, B2	Ciclo celular (G2 – M)
CDK2	A1, A2, E1, E2	Ciclo celular (G1 – S)
CDK3	E1, E2, A1, A2, C	Ciclo celular (G0 – G1 – S)
CDK4	D1, D2, D3	Ciclo celular (G1 – S)
CDK5	p35, p39	Desarrollo cerebral y migración neuronal
CDK6	D1, D2, D3	Ciclo celular (G1 – S)
CDK7	H	Transcripción
CDK8	C	Transcripción
CDK9	T1, T2, K	Transcripción
CDK10	Desconocido	Transcripción, ciclo celular (G2 – M)
CDK11	L1, L2	Transcripción, ciclo celular (M)

(Malumbres & Barbacid, 2005).

La progresión del ciclo celular es un proceso crítico y es por eso que es sumamente regulada. Para lograr esto, existen puntos de control, que evitan la progresión del ciclo en caso de que el ADN esté dañado (Lagunas Cruz *et al.*, 2015). Estos puntos de control se encuentran activos en sitios importantes de ciclo, por ejemplo, el punto de control de restricción R, que tiene su participación al final de la fase G1, en donde se asegura que las condiciones intracelulares (tamaño celular apropiado, presencia de nutrientes) y extracelulares (presencia de factores de crecimiento) sean las apropiadas para progresar a la fase S (García-Foncillas *et al.*, 2001).

Los diversos complejos ciclina/CDKs participan activamente en los puntos de control, su ensamblaje y activación son importantes para progresar en el ciclo celular (Díaz *et al.*, 2003). La integridad de los puntos de control es esencial para el buen funcionamiento del ciclo celular y para mantener la integridad del genoma, debido a que su inestabilidad conduce a ciclo celulares alterados y por consecuencia hacia la carcinogénesis (Hartwell & Weinert, 1989; Nishitani, & Lygerou, 2002).

2.1.1 Transformación neoplásica

Pero entonces, ¿Cuál es el origen de la desregulación de la expresión de genes? El proceso de la carcinogénesis implica una serie de pasos; generalmente hay un primer suceso, un proceso que da inicio y que es el responsable de la alteración de la homeostasis celular y un proceso que promueve el desarrollo de la neoplasia (Kobets *et al.*, 2019). El primer paso, que es el inicio de la conversión neoplásica, se da con la alteración genómica de una célula normal, y puede ser mediante diferentes mecanismos, principalmente originados por mutaciones puntuales o alteraciones cromosómicas, que pueden llevar a translocaciones, deleciones, amplificaciones y aneuploidía de cromosomas completos, haciendo que una célula se vuelva susceptible al proceso neoplásico (Loeb & Loeb, 2000).

Las mutaciones son cambios en la secuencia del ADN de células somáticas o germinales, que ocurren durante el copiado del genoma, por errores de la enzima polimerasa (García-Foncillas *et al.*, 2001). Esos errores generan cambios con respecto al fenotipo original y pueden incrementar en frecuencia como resultado de la exposición a agentes externos con potencial mutagénico (García-Foncillas *et al.*, 2001). Por eso, un agente “mutágeno” es aquel capaz de dañar el ADN, y que la célula en su intento de repararlo, lo procesa en una mutación (Shaughnessy & DeMarini, 2009). Los agentes carcinógenos son aquellos que por su ingestión, inhalación o penetración cutánea son capaces de producir daños en el ADN de un individuo, por ejemplo, daños físico-químicos que distorsionen las moléculas del ADN, la oxidación y la fragmentación de bases o la rotura de las hebras que lo conforman (Barnes *et al.*, 2018).

Estos agentes pueden dañar el ADN de manera directa, es decir que no necesitan ninguna modificación molecular ni activación para causar daño, como por ejemplo las nitrosaminas, los agentes alquilantes e intercalantes, las radiaciones UV y algunos otros destacados por su capacidad de interactuar de manera directa con el ADN (Cohen & Arnold, 2011). También existen agentes que dañan el ADN de manera indirecta, pues son compuestos que necesitan que la célula los transforme en metabolitos que funcionan como intermediarios para ocasionar diferentes tipos de daños, por ejemplo, las aminas aromáticas heterocíclicas (HAA), las micotoxinas o los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Smith *et al.*, 2016; Cohen & Arnold, 2011). Se sabe que existe una gran diversidad de sustancias con actividad cancerígena tanto para humanos como para animales, con diferentes mecanismos que aumentan la probabilidad de desarrollar neoplasias (Kobets *et al.*, 2019).

Los agentes carcinógenos actualmente descritos tienen en común distintas propiedades las cuales sirven como mecanismos para inducir cáncer. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (*IARC*) por sus siglas en inglés, enlista los diversos agentes con potencial de causar cáncer en los humanos, así como también ha identificado algunas de las propiedades de estos agentes que son clave para inducir carcinogénesis y que pueden clasificarse con base en su mecanismo de acción (Cuadro 2).

Otra forma en la que pueden surgir daños en el ADN es mediante procesos metabólicos endógenos, en donde se generan radicales libres de oxígeno (RLO) y nitrógeno (RLN) que son capaces de alterar las bases y ser la causa de la aparición de mutaciones espontáneas (Tafurt Cardona & Marin Morales, 2014). El mecanismo de desaminación es uno de los daños espontáneos que aparece con frecuencia, y consiste en la pérdida de grupos amino en las bases nitrogenadas, haciendo que las citocinas se conviertan en uracilos, o la depurinización, que es la pérdida del enlace N-glucosídico que se da entre la base y el azúcar desoxirribosa y que causa la pérdida de purinas causando un daño genético importante (Enríquez *et al.*, 2011; Shigenaga *et al.*, 1989).

En el proceso de replicación también pueden ocurrir errores endógenos, en donde la ADN polimerasa agrega nucleótidos erróneos no complementarios y esto ocurre con frecuencia a lo largo de la vida de un individuo (García-Foncillas *et al.*, 2001; Imran *et al.*, 2017). Alrededor de 10^5 errores espontáneos suceden a diario en el proceso de replicación del ADN en las células humanas (Tafurt Cardona & Marin Morales, 2014).

Cuadro 2. Propiedades de los agentes carcinogénicos causantes de daño al ADN	
<u>Propiedad carcinogénica</u>	<u>Mecanismo de daño</u>
Electrófilico	Formación de aductos de ADN
Genotoxicidad	Rotura de las cadenas del ADN, entrecruzamiento, mutaciones genéticas etc.
Alteración de los mecanismos de reparación del ADN	Falla en los mecanismos que reparan el daño al ADN (Topoisomerasa II, escisión de bases o reparación de rotura de doble hebra)
Altera la epigenética	Metilación del ADN, modificación de histonas, expresión de microARN
Induce a estrés oxidativo	Daño mediante radicales libres de oxígeno a macromoléculas
Induce a inflamación crónica	Tormenta de citocinas y leucocitos elevados
Inmunosupresor	Disminuye inmunovigilancia, alteración en la función del sistema inmunológico

Sin embargo, la inducción del daño al ADN, ya sea por agentes carcinogénicos o errores endógenos, suele activar los mecanismos de reparación de daños, que son mecanismos de complejos enzimáticos que son capaces de reconocer el daño al ADN, de removerlo y repararlo, por lo que su buen funcionamiento garantiza la integridad del genoma (Tafurt Cardona & Marin Morales, 2014) Es por esto que la generación endógena de mutaciones, y la exposición a un mutágeno o a un compuesto genotóxico no siempre ocasiona la carcinogénesis.

El proceso de carcinogénesis comienza cuando el daño genético ocurre en genes críticos, como por ejemplo, genes que codifican para ADN polimerasas o para proteínas reparadoras del ADN, porque puede ocasionar fallas en el copiado del genoma o reparaciones defectuosas en caso de daño; mismas que pueden ocurrir cuando la estructura de la cromatina es compacta, haciendo inaccesible la entrada de cualquier molécula; por lo que es muy factible que muchas de las lesiones y mutaciones escapen

de los mecanismos reparadores (Shaughnessy & DeMarini, 2009; Loeb & Loeb, 2000). Si las lesiones no son reparadas correctamente, se produce una cascada de mutaciones que son heredadas a las células que resultan de la mitosis y, con el paso del tiempo, llegan a acumularse hasta presentar una gran cantidad de ellas (Loeb & Loeb, 2000). La acumulación de mutaciones en el genoma de la célula causa una inestabilidad del genoma, ocasionando la alteración de genes críticos para la progresión del ciclo celular, genes que vigilan el buen funcionamiento y que participan en puntos de control, en los mecanismos de reparación del ADN, encargados de la apoptosis, e incluso aquellos que participan en la adhesión celular. Esta inestabilidad promueve el desarrollo de una neoplasia, alterando el funcionamiento normal de la célula y afectando la síntesis de proteínas críticas para su función (Meza-Junco *et al.*, 2006).

2.1.2 Alteraciones de ganancia y pérdida de función

De manera general, las alteraciones genéticas que se encuentran implicadas en el proceso de la carcinogénesis pueden ser de dos tipos: 1) alteraciones de ganancia de función que implica la activación de oncogenes y 2) alteraciones de pérdida de función que se relaciona con los genes supresores tumorales (Teh & Fearon, 2020). A los genes que participan en el crecimiento de una célula normal se les conoce como protooncogenes, y estos favorecen la progresión de la proliferación de forma regulada. Los *oncogenes* son estos mismos genes, pero alterados por mutaciones, activados por algún promotor o por la presencia de algún gen viral que enciende su transcripción, o presentes de forma atípica en virus transductores. Normalmente, los protooncogenes se expresan únicamente en etapas clave del ciclo celular, sólo cuando la célula necesite crecer y dividirse, y el que estén activos o reprimidos también dependerá de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo, por ejemplo, etapa embriogénica, fetal o adulta (Kontomanolis *et al.*, 2020). Algunos de los protooncogenes dirigen la producción de proteínas como las ciclinas, otros son receptores los cuales su activación promueve la proliferación y otros son factores de crecimiento (Imran *et al.*, 2017).

Los cambios estructurales en los protooncogenes hacen que se altere su función, convirtiéndolos en oncogenes que se expresan fuera de tiempo. Los productos génicos de los oncogenes (ver Cuadro 3) pueden dividirse en seis grupos, factores de

transcripción, remodeladores de la cromatina, receptores, factores de crecimiento, transductores de señales, receptores nucleares y reguladores de la apoptosis, de manera que al perder estos el control de la regulación, contribuyen a un crecimiento y a una proliferación aumentada (Croce, 2008). La activación de los oncogenes puede suceder por diferentes mecanismos; por ejemplo, mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, inserción de fragmentos de ADN, amplificación génica, o sobre expresión génica (Bacardí & Castellanos, 2013).

Resulta importante no perder de vista que la evolución de la multicelularidad, que requiere de un control estricto y separación de funciones dio pie al desarrollo y selección de diferentes mecanismos que ayudan a evitar la proliferación descontrolada y la tumorigénesis (Casás-Selves & DeGregori, 2011). Como ya sabemos, los puntos de control en el ciclo celular evitan que una célula se divida más de lo normal o incluso que sobreviva más de lo que debería; estos puntos de control están regulados por los genes supresores tumorales, los cuales codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo celular e inducen la apoptosis, en pocas palabras, son los responsables de mantener la integridad genómica para que la célula funcione con normalidad, por lo que una inactivación o alteración de estos genes conllevaría a la carcinogénesis (Imran *et al.*, 2017).

Cuadro 3 Clasificación funcional de los genes asociados al cáncer	
<i>Categoría I. Genes que inducen la proliferación celular (oncogenes)</i>	
<u>Factores de crecimiento:</u>	
sis	Una forma del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
<u>Receptores de factores de crecimiento:</u>	
fms	Receptor para factor estimulante de colonias 1 (CSF-1)
erbB	Receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGF)
erbA	Receptor para hormona tiroides
neu	Proteína (HER2) relacionada con el receptor de RGF
<u>Transductores de señales</u>	
scr	Tirosina cinasa
abl	Tirosina cinasa
Ha-ras	Proteína de unión a GTP con actividad de GTPasas
N-ras	Proteína de unión a GTP con actividad de GTPasas
K-ras	Proteína de unión a GTP con actividad de GTPasas
<u>Factores de transcripción</u>	
jun	Componente del factor de transcripción AP1
fos	Componente del factor de transcripción AP1
myc	Proteína de unión al DNA
<i>Categoría II. Genes que inhiben la proliferación celular (supresores tumorales)</i>	
Rb	Supresor de retinoblastoma
TP53	Fosfoproteína nuclear
DCC	Supresor de carcinoma de colon
APC	Supresor de poliposis adenomatosa
NF1	Supresor de neurofibromatosis
WT1	Supresor de tumor de Wilms
<i>Categoría III. Genes que regulan apoptosis</i>	
Bcl-2	Supresor de apoptosis
Bcl- XL	Supresor de apoptosis
Bax	Supresor de apoptosis
Bim	Supresor de apoptosis
Puma	Supresor de apoptosis

(Owen *et al.*, 2014)

2.1.3 Papel de los virus en el desarrollo de cáncer

Los virus son agentes que pueden causar diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, de forma directa o indirecta (es decir, debido a las respuestas inmunes del hospedero). Aproximadamente el 20% de los cánceres humanos tienen una contribución viral (Akram *et al.*, 2017). Estos microorganismos se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados; es decir, requieren la maquinaria de una célula huésped para poder llevar a cabo su replicación y para expresar sus proteínas; y son subcelulares, lo que significa

que son moléculas complejas que se componen por material genético (ADN o ARN), una cubierta proteica llamada cápside que rodea y protege al material genético y, en algunos virus, una membrana lipídica llamada envoltura viral (Lagunas-Rangel, 2018).

Los oncogenes se identificaron por primera vez en los retrovirus, y años más tarde se supo que la historia evolutiva de los virus tiene una relación estrecha con sus huéspedes vertebrados (Bishop, 1985). En 1960, Howard Temin desarrolló un ensayo *in vitro* en donde los fibroblastos de embriones de pollos eran infectados por el virus del sarcoma de Rous (familia Retroviridae) y observó que las células eran alteradas morfológicamente. Años después se identificaron algunos genes virales específicos causantes de la transformación celular, uno de ellos es el gen *src* con funciones relacionadas al control del crecimiento y proliferación celular, que cuando se activan de manera inapropiada por diversos mecanismos resulta en una transformación maligna de la célula (Martin, 2001). Existen diversos mecanismos por los que un virus es capaz de inducir carcinogénesis. Uno de ellos es la inserción de un oncogén viral al genoma celular, este mecanismo llamado mutagénesis insercional, consiste en la adición al azar de secuencias virales en varios sitios del genoma del huésped, de tal manera que puede regular la expresión de oncogenes y genes supresores tumorales (Lagunas-Rangel, 2018).

El virus del sarcoma de Rous fue el primer virus oncogénico utilizado para el estudio del desarrollo molecular del cáncer (Temin, 1960). Hoy en día, se han identificado diferentes virus con la capacidad de causar cáncer en humanos y otros animales, algunos de ellos son transductores (tienen oncogenes) y otros no transductores (tienen genes que inactivan a genes supresores de tumores). El virus del papiloma humano, relacionado con el desarrollo del cáncer de cérvix y anogenital, el virus de la hepatitis B y C, asociados al carcinoma hepatocelular, y el herpesvirus humano 4 (virus de Epstein Barr) asociado a linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo, son algunos ejemplos de virus que infectan a humanos que pueden provocar cáncer (Walboomers *et al.*, 1999; Ringehan *et al.*, 2017; Farrell, 2019).

Un aspecto importante respecto a los virus que están asociados con el cáncer (de ahora en adelante, oncovirus) es que se sabe que pueden ser necesarios para inducir

cáncer, pero no son estrictamente suficientes para hacerlo, es decir, debe haber una combinación de diferentes factores para que un individuo sea susceptible a la carcinogénesis, incluso estando infectado por el virus (Alonio *et al.*, 1997). La inflamación crónica, la exposición a mutágenos ambientales y la inmunosupresión son los principales cofactores para que la oncogénesis por virus sea más probable (Akram *et al.*, 2017). La carcinogénesis por virus ocurre cuando hay una persistencia de infecciones crónicas virales y la interacción con el sistema inmunitario resulta no ser la adecuada para el organismo hospedero (Hausen, 2009).

2.1.4 Características distintivas del cáncer

La inestabilidad en el genoma de una célula somática con alteraciones genéticas y epigenéticas puede romper la base de la cooperación intercelular de los animales multicelulares, que se basa en la comunicación, la adhesión, y la regulación estricta, y a buscar ventajas reproductivas y de supervivencia para una sola célula clonal, más que para el organismo multicelular en sí mismo (Caulin & Maley, 2011). El éxito del cáncer está íntimamente relacionado con la adquisición de características bioquímicas y morfológicas que le permiten a la célula sobrevivir, tener una ventaja sobre las otras células no transformadas, y eso lleva al estado de patogénesis tumoral (Ponder, 2001).

Hanahan & Weinberg (2011) han identificado ciertas características biológicas que distinguen a todos los tipos de cáncer y que son necesarias para el desarrollo tumoral y la metástasis. La primera y más fundamental de las características distintivas es sin duda la proliferación celular aumentada, consecuencia de la desregulación del ciclo celular. La producción de ligandos de factores de crecimiento por parte de células del estroma y la sobre expresión membranal de los receptores afines en las células cancerosas hacen que éstas se vuelvan más sensibles a cantidades limitantes de factores de crecimiento, lo que hace que se mantenga una proliferación persistente (Bhowmick *et al.*, 2004; Witsch *et al.*, 2010). Las tensiones fisiológicas y de estrés celular, como ocurre durante el daño al ADN o una hiperproliferación celular desregulada, normalmente desencadenan apoptosis, una protección natural que evita que las células se vuelvan cancerígenas al inducir el 'suicidio' de la célula alterada (Ponder, 2001). Sin embargo, las células

cancerígenas también desarrollan la capacidad de resistirse a la apoptosis, evadiendo señales de senescencia para convertirse, en pocas palabras, en células inmortales. A su vez, estas alteraciones provocan cambios en el metabolismo celular, se estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis, se incrementa el uso de glucosa y se disminuye el consumo de oxígeno, comienza la invasión hacia otros tejidos y se estimulan las respuestas proinflamatorias crónicas, que a su vez son promotoras de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

Otro atributo no menos importante es la evasión de células del sistema inmunológico que tienen funciones de oncovigilancia. Estudios en ratones inmunosuprimidos han evaluado el desarrollo de tumores inducidos por carcinógenos y han observado que el desarrollo de tumores es significativamente más frecuente y más rápido que en ratones inmunocompetentes; particularmente las deficiencias en linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ y de linfocitos T cooperadores (Th1) CD4⁺ y de células asesinas naturales (NK) conducen a una mayor incidencia de tumores (Teng *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha observado que los tumores de colon y ovario que presentan una mayor infiltración de células citotóxicas como NK y CTL tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellos que carecen de estas células (Nelson, 2008; Pagès *et al.*, 2010; Barnes & Amir, 2017). Dada la presión selectiva que ejercen estos efectores inmunes sobre las células cancerosas, aquellas que desarrollaron la capacidad de evadir las respuestas de estas células inmunitarias, como la inhabilitación de ciertos componentes para evitar su destrucción, tienen una ventaja evolutiva; por ejemplo, las células cancerosas son capaces de evadir a los CTL y NK al secretar TGF- β , que ejerce una supresión inmunitaria sistémica y por lo tanto, inhibe la inmunovigilancia y la erradicación (Yang *et al.*, 2010). Otros mecanismos de inmunosupresión característico de muchas células cancerosas son la activación de células T reguladoras (Tregs) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), que son capaces de suprimir las respuestas anti-cáncer de los linfocitos citotóxicos (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009; Mougiakakos *et al.*, 2010; Barnes & Amir, 2017)

Estas capacidades biológicas, llamadas comúnmente “características distintivas del cáncer” se adquieren de manera progresiva provocando una alta diversidad genética

en las células transformadas, que acelera el desarrollo (Hanahan & Weinberg, 2000). Cabe mencionar la importancia de estos sellos distintivos, pues un tumor cancerígeno en desarrollo no está conformado por una misma población celular, es decir, no son homogéneos, existen diferentes subpoblaciones, cada una con características biológicas diferentes, algunas presentan el rasgo de la proliferación aumentada, otras pueden tener la capacidad de migrar a otros tejidos y otras cuantas ser capaces de estimular la angiogénesis, esto hace que los tumores cancerígenos sean heterogéneos. Un tumor más heterogéneo, con diferentes subpoblaciones celulares que presenten diversas características biológicas, presenta más probabilidades evolutivas para alcanzar la patogénesis tumoral (West *et al.*, 2016; Kotler & Brown, 2020).

2.2 Papel de sistema inmunitario en el desarrollo del cáncer

El sistema inmunitario puede eliminar a los tumores en desarrollo e incluso es capaz de controlarlos en etapas avanzadas mediante la activación de respuestas efectoras (Swann & Smyth, 2007). La vigilancia constante por parte de células inmunitarias es primordial para proteger al organismo contra infecciones, células dañadas y en transformación maligna. Este proceso llamado inmunovigilancia, propuesto hace más de un siglo por Paul Ehrlich y retomado por Burnet en la década de 1950's nos dice que las poblaciones de linfocitos T son capaces de reconocer y eliminar de manera constante células cancerosas y pre cancerosas antes de que se ocasione daño al organismo (Ehrlich, 1908; Burnet, 1957; Burnet, 1970). Desde entonces, diversos estudios han demostrado que las células inmunitarias participan activamente en la eliminación de tumores y que el buen funcionamiento de éste es primordial para evitar la carcinogénesis (Kaplan *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 2000; Dunn *et al.*, 2006;). No obstante, debido a que los tumores son capaces de aparecer en individuos con un sistema inmunitario funcional, se ha propuesto una nueva teoría que va más allá de sólo la inmunovigilancia tumoral, llamada inmunoedición, en donde se ha propuesto que mediante la interacción con el sistema inmunitario las células tumorales pueden dar lugar a la "escultura" de nuevos fenotipos tumorales, con menor inmunogenicidad, que incrementan la evasión inmunitaria (Shankaran *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2006).

La inmunoedición del cáncer, propuesta por Dunn y Schreiber, se refiere a un proceso dinámico que se compone por tres fases: la eliminación de las células transformadas, equivalente a lo que logra la inmunovigilancia, en donde las células NK y los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ eliminan de manera eficaz a las células tumorales; la fase de equilibrio, un balance entre las células tumorales e inmunitarias; y la fase de escape, en donde la tumorigénesis tiene éxito al poder evadir al sistema inmunitario (Dunn *et al.*, 2002). Estas fases comúnmente son llamadas “las tres Es de la inmunoedición del cáncer” (Dunn *et al.*, 2002), y es análogo a lo que ocurre a nivel poblacional entre presas y depredadores: la selección natural operando a nivel celular.

Fase de eliminación

En esta primera etapa, el sistema inmunitario innato y el adaptativo trabajan en conjunto para montar respuestas eficientes que eliminen a las células tumorales. La respuesta inmunitaria adaptativa se produce frente a antígenos tumorales y a cambios en el microambiente tumoral, y se logra mediante la activación inicial de respuestas innatas por parte de las células NK, los macrófagos y las células dendríticas (CD) que desencadenan acciones de los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y T cooperadores (Th) CD4⁺ (Silva *et al.*, 2021). Existen cambios en el microambiente tumoral como la remodelación del estroma que, junto con células tumorales, secretan diversas moléculas que son expresadas en la membrana y que funcionan como ligandos específicos para activar o reprimir respuestas inmunitarias, promoviendo la secreción de mediadores pro inflamatorios y citocinas que hacen que las células inflamatorias migren al sitio de la neoplasia (Rao *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021).

Fase de equilibrio

La fase de equilibrio es la más larga de las fases de la inmunoedición, llegando a persistir por varios años o durante toda la vida de un individuo (Silva *et al.*, 2021)

El equilibrio se refiere a la fase en la que las células tumorales sobreviven a la fase de eliminación y entran en un estado de equilibrio con el sistema inmunitario, en pocas palabras, entran en estado de latencia (Rao *et al.*, 2019). Este estado es promovido por el sistema inmunitario, al no eliminar la totalidad de las células tumorales,

pero logrando evitar que continúen su desarrollo (Disis, 2010). En esta etapa es donde puede ocurrir la “edición” de las células tumorales, y el proceso se asemeja al proceso de selección darwiniana, donde hay una selección de las variantes neoplásicas más resistentes y menos inmunogénicas que permitan la progresión del cáncer, y la evasión de la inmunidad es fundamental para este proceso. Por lo tanto, las células tumorales se ven bajo una presión selectiva por parte del sistema inmunitario, y deben de someterse a una inmunoedición para poder sobrevivir (Rao *et al.*, 2019).

Fase de escape

Las células tumorales en estado de latencia pueden “escapar” y crecer incluso en presencia del sistema inmunitario (Tu *et al.*, 2017). La reducción de la inmunogenicidad de estas células puede ser por varios factores, por ejemplo, un microambiente tumoral inmunodeprimido o el reclutamiento de células que regulan las respuestas antitumorales, como las T reguladoras (Tregs) o células supresoras de origen mieloide (Chow *et al.*, 2012). La exposición persistente a antígenos tumorales también perjudica la respuesta antitumoral. El mecanismo de agotamiento está bien descrito en las infecciones virales crónicas, por ejemplo, durante las infecciones por hepatitis C se ha observado que ocurre agotamiento inmune, y este reduce el daño colateral (inmunopatología) que puede sufrir el tejido del hospedero. En el caso del cáncer, las infecciones crónicas y el agotamiento inmune por estimulación antigénica constante también pueden socavar la inmunidad efectiva (Wherry & Kurachi, 2015).

2.2.1 Sistema inmunitario innato

Las células NK constituyen la primera línea de defensa, son células mononucleares formadas en la médula ósea, a partir de células madre linfoides (Gross *et al.*, 2013). Las células NK forman del 5 al 10% de los linfocitos totales en sangre periférica (Dębska-Zielkowska *et al.*, 2021); además de circular en la sangre, se localizan en los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea, y pueden migrar hacia los sitios donde hay mediadores de la inflamación (Robertson, 2002). Está bien documentado el papel de las células NK en los procesos antitumorales, ya que participan activamente en el reconocimiento de células en transformación, además de ejercer mecanismos de acción

lítica que eliminan a las células transformadas e infectadas por virus (Guerra *et al.*, 2008). Fenotípicamente se caracterizan por expresar en su membrana las moléculas CD16 y CD56, y basándose en su expresión se han dividido en dos subpoblaciones, las CD16Low/CD56Hi que representan el 10% de las NK totales en sangre, caracterizadas por producir grandes cantidades de quimiocinas y citocinas como el IFN- γ , además de presentar receptores altamente afines para interleucina 12 (IL-12) y su actividad citotóxica antitumoral es baja; la otra subpoblación es la CD16Hi/CD56Low, que representa el 90% de las células NK de sangre periférica, producen poco IFN- γ pero sus respuestas citotóxicas son potentes, además participan en el proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Mavilio *et al.*, 2005).

Dado que los mecanismos líticos de las células NK suelen ser espontáneos, es decir, sin alguna activación previa, es importante que los mecanismos estén bien regulados para evitar el ataque a células sanas, es por eso que expresan diversos receptores en la superficie celular, y la respuesta dependerá de la interacción entre estos receptores y la célula blanco (Vivier *et al.*, 2008). Las células NK reconocen a las células tumorales mediante la acción de varios receptores activadores e inhibidores en su superficie (Bottino *et al.*, 2004). Cuando domina en la interacción la señal de los receptores inhibidores, no hay activación de las NK, pero si, por el contrario, en la interacción predomina la señal de los receptores activadores, se elimina a la célula blanco (Backström *et al.*, 2004).

Un conjunto de receptores inhibidores en las células NK reconocen motivos específicos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, por sus siglas en inglés, (*Major Histocompatibility Complex*) MHC I, que resulta en una inhibición o activación de los mecanismos efectoras, por lo que la regulación está dada mediante un balance entre ambas señales (Parham, 2005). Los receptores inhibidores específicos del MHC I incluyen los receptores tipo inmunoglobulina, por sus siglas en inglés, (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) (KIR) en humanos, los dímeros Ly49 similares a lectina en ratones y los heterodímeros CD94-NKG2 similares a lectina (Woo *et al.*, 2015).

Los receptores tipo inmunoglobulina (KIR) son glicoproteínas transmembranales con dos o tres dominios similares a Ig en la porción extracelular y una porción

transmembrana no polar, además de una cola intracitoplásmica (Bottino *et al.*, 2004). La descripción en la nomenclatura incluye el número de dominios similares a Ig, que es '2D' para dos dominios o '3D' para tres dominios, y la longitud de la cola citoplasmática, que es 'S' para corto o 'L' para largo (Dębska-Zielkowska *et al.*, 2021). Según la longitud de la cola intracitoplasmática (S o L) son activadores o inhibidores, respectivamente (Moreno Fernández *et al.*, 2007). Los receptores inhibidores KIR se activan mediante los dominios ITIM (inmunoreceptores con motivos inhibitorios de tirosina), los cuales reclutan y activan fosfatasa de tirosina citoplasmáticas (SHP-1 y SHP-2), que inactivan moléculas de señalización de las vías de activación de las células NK (Backström *et al.*, 2004).

La familia de receptores Ly49 similar a la lectina de ratón tiene una función homóloga a los KIR en humanos, reconociendo MHC I en células diana potenciales (Tu *et al.*, 2017). Una observación crucial para el entendimiento de las funciones de las células NK fue que las células que expresan niveles normales de MHC I propios anclados a su membrana son reconocidas como “normales” para las NK, por lo que la expresión de moléculas propias del MHC representa una característica protectora que evita el ataque de las NK, según la hipótesis del “yo perdido” (Ljunggren & Kärre, 1990). En pocas palabras, la expresión adecuada de MHC-I transmite una señal inhibitoria a la célula NK mediante sus receptores inhibidores, por otro lado, una falta de señal inhibitoria por la pérdida aberrante de la expresión de MHC-I en la superficie de la célula diana transmite una señal activadora, fenómeno conocido como reconocimiento de "ausencia de sí mismo" (Tu *et al.*, 2017). El motivo por el cual las células cancerosas mantienen bajos sus niveles de MHC I es debido a que lo utilizan como mecanismo para evadir la detección por parte de los linfocitos T citotóxicos (Lanier, 2005).

Los receptores CD94/NKG2 se expresan tanto en células NK humanas como de ratón. De CD94/NKG2 existen isoformas inhibitorias y activadoras (Wada *et al.*, 2004). Las isoformas inhibitorias NKG2A/CD94 y NKG2B/CD94, de manera similar a los KIR, presentan residuos intracitoplasmáticos largos con dominios ITIM, que inhiben señales de acción lítica por parte de las NK. Sus ligandos son MHC I no clásica (Backström *et al.*, 2004).

Las células NK también tienen receptores activadores que reconocen moléculas distintas al MHC I, como la molécula NKG2D, perteneciente a la familia de los receptores NKG2/CD94 (Moreno Fernández *et al.*, 2007). NKG2D es una isoforma activadora que forma homodímeros capaces de reconocer ligandos inducidos por estrés, que son proteínas autocodificadas con homología estructural con las MHC. (Raulet, 2003). Los ligandos de la familia de proteínas A (MICA) y B (MICB), y la familia de proteínas de unión a UL16 (ULBP), también conocida como transcrito temprano del ácido retinoico 1 (RAET1) sirven como ligandos de activación vía NKG2D (Cosman *et al.*, 2001; Bacon *et al.*, 2004). La expresión de RAE-1 está directamente ligada a la proliferación celular, por lo tanto, en la hiper proliferación del cáncer, ésta aumenta su expresión (Jung *et al.*, 2012). Se ha observado en ratones que la deficiencia de NKG2D lleva a una mayor incidencia de cáncer y una progresión tumoral acelerada (Guerra *et al.*, 2008). Otros receptores activadores son Nkp30, Nkp44 y Nkp46 (Disis, 2010), y finalmente, las células NK expresan el receptor CD16 de Fc de baja afinidad, el cual permite reconocer células tumorales cubiertas de anticuerpos y mediar ADCC (Moreno Fernández *et al.*, 2007).

Las funciones efectoras de las NK pueden ser por mecanismos líticos y no líticos (Robertson, 2002). Dentro de los mecanismos líticos se incluye la eliminación directa de la célula diana, mediante la liberación de perforinas y granzimas y mediante la ADCC (Robertson, 2002). La perforina es una proteína monomérica y oligomérica que forma poros en la membrana de la célula diana, provoca lisis osmótica de la célula y además, permite la entrada de granzimas, que inducen la apoptosis a través de la activación de caspasas (Vivier *et al.*, 2008). La lisis de la célula diana libera antígenos tumorales que pueden ser captados por las células dendríticas, lo cual induce su activación y maduración (Zamai *et al.*, 2007). El mecanismo no lítico corresponde a la producción de diversas citocinas que regulan diferentes eventos y respuestas inmunes (Moreno Fernández *et al.*, 2007). La granzima B puede seguir diferentes vías para la inducción de la apoptosis celular, puede promover la liberación de deoxirribonucleasa activada por caspasas (CAD), la cual es una enzima fragmentadora del ADN, o puede romper la procaspasa para activar a la caspasa 3 y se dé la apoptosis, o también activando la proteína proapoptótica BID, que migra a la mitocondria y libera el citocromo C, molécula que también activa la vía de las caspasas (Abbas & Lichtman, 2003). Las células NK

producen citoquinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-13, GM-CSF, TGF- β 1, RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) y MIP-1 β (CCL4) que participan en la modulación de diversas respuestas inmunitarias (Moreno Fernández *et al.*, 2007).

El IFN- γ secretado por las NK promueve el reclutamiento de más células inmunitarias, como los macrófagos, que a su vez liberan IL-12, lo que induce el reclutamiento de células NK, promoviendo un sistema de retroalimentación positiva (Silva *et al.*, 2021). El IFN- γ derivado de células NK, por lo tanto, promueve la liberación de citocinas que a su vez generan respuestas inmunitarias mediadas por diversas células protectoras (Ikeda *et al.*, 2002). Entre ellas, las CD son activadas por citocinas, por interacción con NK o mediante la captación de antígenos productos de lisis celular. Son las células presentadoras de antígeno más potentes y las que vinculan el sistema inmunitario innato y el adquirido mediante la producción de IL-15, inductor de actividad de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ (Strioga *et al.*, 2013).

2.2.2 Sistema inmunitario adquirido

Presenta respuestas que requieren del reconocimiento de antígenos y la generación de células de memoria. Estas respuestas se dan por las células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) y células T CD4⁺. Los CTL CD8⁺ y los T CD4⁺ montan una respuesta inmunitaria posterior a la captación de un antígeno presentado a través del MHC clase I y clase II, respectivamente. El MHC II se expresa de manera restringida en la membrana de las células presentadoras de antígeno (APC), que son células dendríticas, macrófagos y células B, las cuales captan el antígeno y lo fagocitan para presentarlo mediante MHC II a los linfocitos T CD4⁺ (Haabeth *et al.*, 2014). Los linfocitos T CD4⁺ secretan citocinas que se ven implicadas en regular la respuesta inflamatoria, por ejemplo, producen IL-2 que, en asociación con IL-15 estimulan la proliferación de CTL, además de ayudar a las células B con la producción de anticuerpos, por lo que se denominan linfocitos T cooperadores (Th) (Disis, 2010). Los CTL son las células principalmente efectivas en las respuestas inmunitarias antitumorales, son capaces de destruir células transformadas, pues también producen proteínas como la perforina y la granzima B, eficientes para activar la lisis celular (Disis, 2010).

Los Th presentan varios fenotipos: los Th1 secretan citocinas como (IFN- γ), FNT- α e IL-2, promueven el desarrollo de macrófagos y ayudan a las CTL a la destrucción, promoviendo un ambiente pro inflamatorio (Ruffell *et al.*, 2010). El IFN- γ juega un importante papel en el desarrollo de Th1, mejorando la síntesis de IL-12, aumentando hasta 50 veces más su producción en las CPA asegurando un adecuado suministro para impulsar el desarrollo de células Th1. También juega un papel crítico en asegurar la capacidad de respuesta de IL-12 en el desarrollo de T CD4⁺ (Ikeda *et al.*, 2002).

Los Th2 secretan citocinas como la IL-10, IL-4 e IL-5, promueven las respuestas mediadas por anticuerpos y limitan la proliferación de CTL, además los Th2 se asocian a menudo con la promoción tumoral. Se ha observado que una relación Th2:Th1 más alta se relaciona con mal pronóstico en los pacientes con cáncer (Ruffell *et al.*, 2010).

El desarrollo de Th1 depende de dos principales factores de transcripción que se activan después de la unión de los ligandos a los receptores de IFN- γ e IL-12, STAT-1 y STAT-4, respectivamente. Por el contrario, la IL-4 es la principal citocina que promueve el desarrollo de las células Th2 (Murphy *et al.*, 2000). El desarrollo de Th2 depende de uno de los principales factores de transcripción que se activan con la estimulación del receptor de IL-4, STAT-6 y GATA3 (Zheng & Favell, 1997; Murphy *et al.*, 2000).

Por otro lado, los factores de transcripción de la familia T-box, Tbx21 y eomesodermina (eomes) son necesarios para la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ (Pearce *et al.*, 2003). La deficiencia de T-bet y eomes en las células T de ratón manifiestan una actividad citolítica deficiente y son incapaces de combatir infecciones virales (Intlekofer *et al.*, 2008)

La manera en que los linfocitos T reconocen antígenos es mediante sus receptores TCR (*T cell receptors*) por sus siglas en inglés, en el contexto de los MHC I y II en las células presentadoras de antígeno (CPA). Existen dos mecanismos por los cuales se procesan los antígenos tumorales: la vía endógena en donde las células tumorales degradan péptidos que son expuestos en el MHC I anclados en la superficie celular, y presentados a los TL y la vía exógena, en donde las CPA fagocitan y fragmentan antígenos que son expuestos en MHC II en la superficie celular y presentados a los linfocitos T CD4⁺ (Hwang, 2016). Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes o ingenuas (es decir,

aún no estimuladas) se unen a los complejos péptido-MHC II de la CPA y promueven la síntesis y maduración de los T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 y Treg), comienza la producción de anticuerpos mediante las células B y la inflamación tumoral (Disis, 2010). Los CTL ejercen su acción citotóxica reconociendo el complejo péptido-MHC I y producen lisis celular mediante la vía perforina- granzimaB (Swann & Smyth, 2007).

Las células Tregs secretan IL-10 y TGF- β , que amortiguan las respuestas inmunitarias, su principal factor de transcripción es FOXP3 (Sallusto & Lanzavecchia, 2009). La función de las células Treg es suprimir la actividad antitumoral para prevenir la autoinmunidad y el daño a los propios tejidos que pueden ocurrir a través de respuestas demasiados exhaustivas (Ruffell *et al.*, 2010).

2.2.3 Respuestas inmunitarias en epitelios mucosales

El mantenimiento de los epitelios mucosales (tejidos de barrera) es crucial para una buena salud y supervivencia de los mamíferos. Gran parte de los microorganismos patógenos entran a través de las superficies mucosales, como el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Por lo tanto, los tejidos de barrera presentan un sistema complejo de defensa inmunitaria que protege al huésped y mantiene una coexistencia pacífica con la microbiota local (Belkaid & Artis, 2013). La especialización inmune específica de tejido integra un conjunto de respuestas tanto innatas como adaptativas, además de la protección dada por capas de células epiteliales que forman una barrera física que limita la exposición a patógenos y al medio externo (Saenz *et al.*, 2008; Belkaid & Artis, 2013). Dado que los tejidos de barrera están expuestos al medio externo, los agentes patógenos deben ser controlados rápida y eficazmente por parte de las respuestas inmunitarias del tejido, sin embargo, las respuestas adaptativas por parte de las células T depende de respuestas primarias generadas en los ganglios linfáticos, lo que implica que sea una respuesta tardada (Mueller *et al.*, 2013).

Recientemente se ha descubierto un nuevo subtipo de células T, llamadas células T de memoria residentes de tejidos (T_{RM}) caracterizadas por estar en tejidos por largos periodos de tiempo con el objetivo de almacenar memoria inmunitaria que les permite reconocer y eliminar rápida y eficazmente patógenos de infecciones previas (Ordovas-

Montanes *et al.*, 2020). A diferencia de las células T de memoria central circulantes (T_{cm}) y las células T de memoria efectoras (T_{em}), las células T_{RM} persisten en los tejidos y no recirculan en la sangre (Wu *et al.*, 2018).

Las células T_{RM} se encuentran en diversos órganos periféricos como la piel, el intestino, pulmones, glándulas salivales y aparato reproductor femenino (Sun *et al.*, 2019). También se ha identificado la existencia de células NK residentes de tejido (trNK) y se han encontrado en útero, piel, riñón, tejido adiposo y glándulas salivales (Sun *et al.*, 2019). Presentan un fenotipo único; CD103 y CD69 son dos marcadores de superficie comunes para distinguir las células T_{RM} de otras células T de memoria (Wu *et al.*, 2018).

El principal objetivo de las células T_{RM} y trNK es montar una respuesta inmune rápida al encontrarse con un patógeno de infección previa y de esta manera restringir la infección dentro del tejido local (Schenkel *et al.*, 2014). Esta propiedad de las células T_{RM} ha sido demostrada a través de estudios en animales y humanos (Gebhardt *et al.*, 2009; Gebhardt *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2018). Los factores transcripcionales involucrados en la regulación de la diferenciación T_{RM} incluyen Hobit, Blimp-1, KLF2, Eomes y T-bet. (Mackay *et al.*, 2013).

Después de la activación de células T_{RM}, éstas secretan rápidamente diversas citocinas pro inflamatorias como como IFN- γ , TNF- α e IL-12, y un reclutamiento local de células inmunitarias innatas y adaptativas. La secreción de IFN- γ por las células T_{RM} en el tracto reproductivo del ratón lleva a un reclutamiento de células T, células B y células NK, mientras que la secreción de TNF- α por las células T_{RM} conduce a la maduración de APC. Las células T_{RM} también ejercen su función citotóxica mediante la lisis de las células infectadas por virus (Sun *et al.*, 2019).

Las células T_{RM} también están involucradas en la inmunovigilancia tumoral (Gebhardt *et al.*, 2018). Se han descrito linfocitos T CD8⁺ humanos asociados a tumores con un fenotipo CD69⁺ CD103 en pacientes que padecían una variedad de cánceres incluidos el cáncer urotelial, de ovario, de endometrio, de cuello uterino, entre otros. (Cresswell *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2007; Boddupalli *et al.*, 2016). Además, se correlaciona una elevada acumulación de T_{RM} con una supervivencia prolongada en

pacientes humanos e incluso se sabe que es un mejor marcador de pronóstico que los T CD8⁺ totales (Gebhardt *et al.*, 2018).

En general, las células T_{RM} desempeñan un papel protector en la inmunidad viral y antitumoral al brindar respuestas inmunitarias más fuertes y rápidas contra los patógenos invasores.

2.3 Cáncer en animales silvestres

El cáncer es una patología característica de la multicelularidad, por lo que la carcinogénesis es un proceso que podría considerarse inevitable en los metazoarios (Aktipis *et al.*, 2015), aunque algunas especies parecen particularmente resistentes al desarrollo del cáncer y otras, más susceptibles. El estudio del cáncer en modelos no humanos aporta información importante sobre aspectos biológicos, genéticos y ecológicos, lo que permite tener un enfoque sistémico y objetivo de la compleja naturaleza de esta enfermedad (Efron *et al.*, 1977).

Se ha observado diversos tipos de cáncer en la mayoría de vertebrados, si bien, los factores que determinan su desarrollo están perfectamente estudiados en humanos y animales de laboratorio, el estudio de cáncer espontáneo en animales de vida libre suele ser complicado (Efron *et al.*, 1977). A pesar de esto se sabe que algunas especies silvestres presentan cáncer recurrente; el caso del Demonio de Tasmania (*Sacrophilus harrisi*) con el desarrollo de tumores faciales contagioso es uno de los más documentados (Murchison *et al.*, 2010)

Debido al aumento de monitoreo de la salud en mamíferos marinos en los últimos 30 años, se han identificado distintos tipos de neoplasia (Newman & Smith, 2006; McAloose & Newton, 2009). Un ejemplo conocido es el de las ballenas beluga (*Delphinapterus leucas*) que habitan en el estero de San Lorenzo, Canadá, un ambiente acuático con altos niveles de contaminantes, y en donde la especie ha desarrollado una alta incidencia de distintos tumores (Guise *et al.*, 1994). El otro ejemplo es el del lobo marino de California (*Zalophus californianus*), especie en la que puede ocurrir carcinoma urogenital (CUG), actualmente con alta prevalencia en animales adultos, lo que ha

llevado a que la especie sea propuesta como modelo no tradicional para el estudio de la carcinogénesis (Browning *et al.*, 2015).

2.4 Carcinoma Urogenital del lobo marino de California

Cada año, en las costas de California E.E.U.U se varan cientos de lobos marinos debido a múltiples causas, siendo las más comunes la intoxicación por ácido domóico, infecciones por *Leptospira* spp., malnutrición, trauma y carcinoma urogenital (Greig *et al.*, 2005).

A pesar de que los animales varados no son una muestra representativa de la población normal sana, brindan una excelente oportunidad para investigar e identificar diferentes enfermedades. Desde principios de los años 80's se reportó cáncer metastásico de origen indeterminado en los animales varados de California (Brown *et al.*, 1980; Joseph *et al.*, 1986). Tiempo después, entre 1979 y 1994 se calculó que el carcinoma metastásico, de probable origen de células transicionales, tenía una prevalencia del 18% en las costas del Norte de California (Gulland *et al.*, 1996). En The Marine Mammal Center (TMMC) en Sausalito, California, un centro de investigación y rehabilitación de mamíferos marinos, se estima actualmente que los lobos marinos con carcinoma urogenital varados en las costas de California representan alrededor del 18-23% de los varamientos totales, una inusual prevalencia para una especie en vida libre (Gulland *et al.*, 2020).

El CUG afecta a hembras y machos adultos y sub adultos en edad reproductiva y en menor medida en juveniles, afectando el cuello uterino y la vagina de las hembras y el pene y prepucio de los machos (Deming *et al.*, 2018). Estas neoplasias son de origen intraepiteliales (IEN), con una histología y epidemiología similares a las del carcinoma cervicouterino en mujeres (Lipscomb *et al.*, 2000). El cuadro se puede observar cómo displasia epitelial leve en animales sin metástasis hasta carcinoma *in situ* en animales con metástasis (Lipscomb *et al.*, 2000). La metástasis suele ser frecuente, se expande a ganglios linfáticos sublumbar, uréteres, riñones, hígado, linfonodos pélvicos y abdominales, y esporádicamente a bazo y pulmones (Gulland *et al.*, 1996). Los hallazgos a la necropsia se describen como grandes masas caseosas de color canela, diseminadas

por toda la cavidad, y ocasionalmente hidronefrosis e hidrouréter a causa de la compresión por parte de masas tumorales localizadas alrededor de los uréteres. Las lesiones en el tracto reproductivo suelen ser nódulos de color canela y consistencia firme en el epitelio del cérvix y la vagina; los machos presentan placas de color canela, irregulares y delimitadas en el pene y el prepucio (Gulland *et al.*, 1996).

Los signos clínicos en etapas avanzadas de la enfermedad incluyen anorexia y emaciación, parálisis de aletas posteriores, hinchazón y edema genital y prolapso uterino o peneano (Deming *et al.*, 2018). El cáncer metastásico provoca la muerte del 95% de los animales (Deming *et al.*, 2018).

Con base en estudios inmunohistoquímicos, han identificado que las células neoplásicas presentan un origen epitelial, y que, debido a la morfología tumoral, es posible que el tumor primario comience su desarrollo en el tracto urinario (Gulland *et al.*, 1996). Sin embargo, un estudio más reciente realizado por Lipscomb y colaboradores, identificaron por histopatología que las lesiones neoplásicas que dan lugar a los carcinomas metastásicos presentan un origen epitelial genital, debido a que observaron en 10 lobos marinos, lesiones genitales con similitud a los carcinomas epiteliales (Lipscomb *et al.*, 2000). Además, observaron que se trataba de lesiones celulares no invasivas (LEI) pero que pueden desarrollarse a carcinoma invasivo. Colegrove y colaboradores (2009) usaron la clasificación de las neoplasias cervicales usadas en humanos, clasificando en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LGIL) como nivel 1 si presentaban displasia leve y si la proliferación se limitaba al tercio inferior del epitelio, y lesiones intraepiteliales de alto grado (HGIL) como nivel 2 si presentaban displasia de moderada a marcada y si la proliferación de células atípicas iba más allá de un tercio o todo el espesor del epitelio, similar a (CIN 1-2 y 3) respectivamente en lesiones escamosas en mujeres, según Kurman y colaboradores (1990). Barragán-Vargas y colaboradores (2015) utilizaron el protocolo de Papanicolaou con algunas modificaciones para la tinción de citología cervical de hembras adultas del Golfo de California con el objetivo de realizar un diagnóstico citológico tomando en cuenta la terminología del Sistema Bethesda 2001, y han observado la presencia de cambios morfológicos sugestivos a cambios pre neoplásicos pero sin encontrar lesiones indicativas de

carcinoma *in situ*. Además, han observado la presencia de coilocitos en citologías con lesiones de bajo grado, indicativas de infección por el virus del papiloma, sin embargo, este virus no ha sido asociado a la transformación oncogénica en animales diagnosticados con CUG en California (Barragán-Vargas *et al.*, 2015).

2.4.1 Cambios morfológicos celulares en el epitelio genital en la transformación oncogénica y su clasificación

El cérvix es un órgano de forma tubular que se encuentra en la parte inferior del útero y la parte superior de la vagina (Hilario, 2007). Se divide en dos partes, una parte interna, el endocérvix, y una parte externa, el exocérvix, el cual comunica con la vagina (Fig. 1) (Botero *et al.*, 2004). El endocérvix conforma la porción tubular o el canal, que separa la vagina del útero. Presenta dos orificios, el orificio cervical interno comunica con el útero y el orificio cervical externo comunica con el exocérvix y con la vagina (Hilario, 2007). El endocérvix está conformado por un epitelio columnar simple, con células epiteliales productoras de moco (Cardinal *et al.*, 2008).

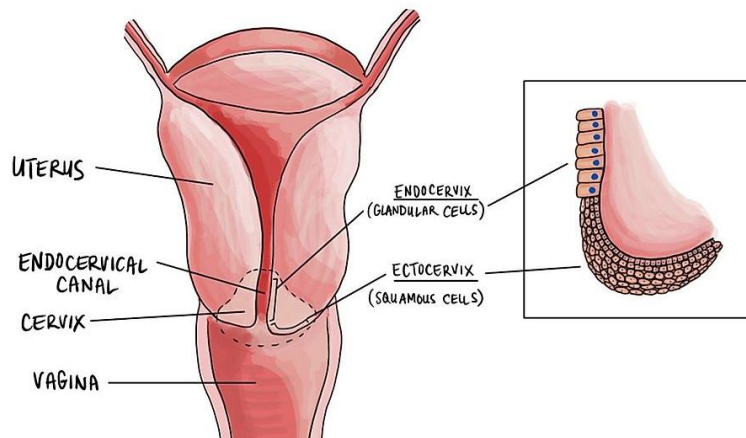


Figura1. Anatomía del cérvix. El endocérvix, la porción interna que forma parte del cuello uterino, y la salida de este, el exocérvix, en donde se encuentra la zona de transformación (Wasserman, 2022).

Comúnmente, en frotis citológicos, se pueden observar células endocervicales en grupos, formando hileras o conglomeradas; su aspecto depende de la perspectiva de observación, cuando son vistas desde arriba se observan redondas y generalmente con

disposición de tipo “panal de abejas” y cuando se observan lateralmente presentan forma cilíndrica (Fig. 2a) (Pelea & González, 2003). En el exocérnix las células comienzan a cambiar su morfología, ocurre un cambio metaplásico del epitelio columnar a un epitelio escamoso estratificado que reviste la vagina y el exocérnix (Martínez-Girón, 2017). En la metaplasia escamosa, las células de reserva que se encuentran debajo de las células columnares comienzan a dividirse formando capas de células indiferenciadas, con formas irregulares o poligonales, con apariencia de estrellas (Fig. 2b) (Botero *et al.*, 2004). En el progreso del proceso metaplásico, las células de reserva se transforman a células escamosas inmaduras (metaplasia inmadura) para posteriormente madurar para formar estratos celulares de epitelio metaplásico estratificado maduro (metaplasia madura). La zona en donde el epitelio columnar se convierte en epitelio escamoso es la unión escamo-columnar o también es llamada zona de transformación (Botero *et al.*, 2004).

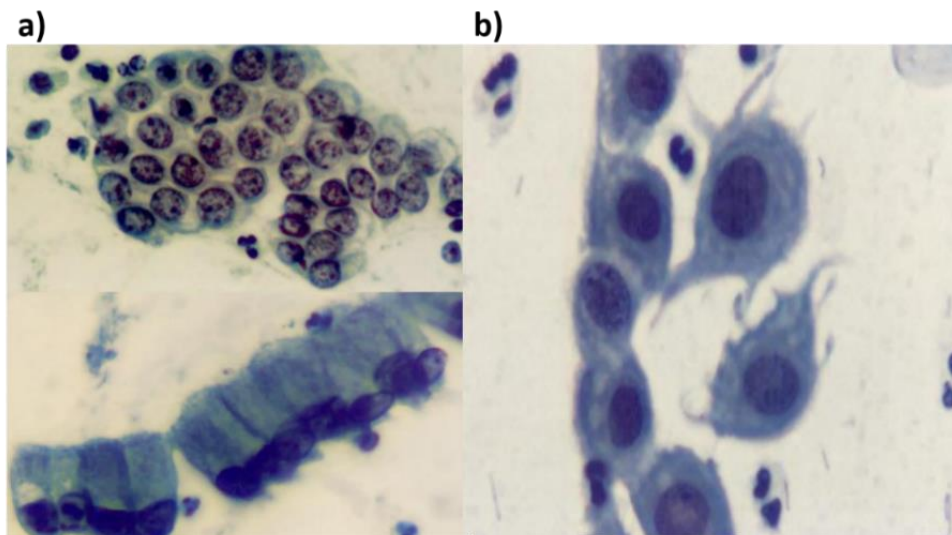


Figura 2. Células endocervicales a) en tipo panel de abejas, vista desde arriba. Abajo, células endocervicales, vista lateralmente, con estructura cilíndrica y núcleo en posición basal. b) Células metaplásicas, con proyecciones que dan la apariencia de estrellas. (Botero *et al.*, 2004).

De acuerdo al patrón de maduración, que responde de forma cíclica a las hormonas sexuales, se puede observar mediante histología, diferentes capas de células (Fig. 3) (Martínez-Girón, 2017). La capa más profunda es la capa basal, se compone por células basales que se caracterizan por ser células pequeñas, con formas circulares y

ovales, núcleos prominentes de cromatina finamente granulada, y con relación núcleo/citoplasma reducido (Fig.4a) (Pelea & González, 2003).

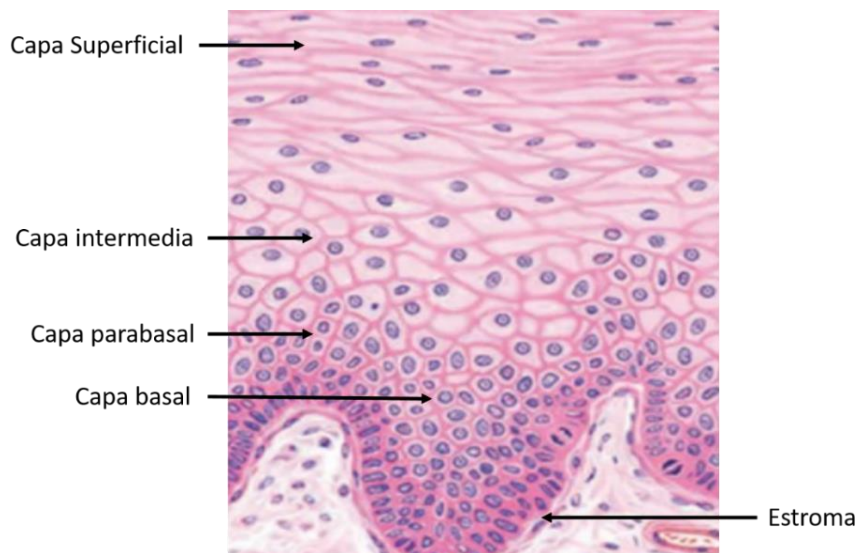


Figura 3. Histología del exocervix. Estratos celulares que lo conforman (Martínez-Girón, 2017).

Generalmente, las células basales no se descaman, a excepción de cuando se realiza una exfoliación del epitelio atrofiado. A partir de las células basales y parabasales, debido a estímulos estrogénicos, el epitelio comienza a madurar (Pelea & González, 2003). La siguiente capa es la parabasal; son células similares a las basales, tienen grandes núcleos, mayor tamaño y su forma es circular u oval, el citoplasma es denso y es mayor que en las células basales (Fig. 4b). Generalmente no se encuentran en muestras de epitelio hormonalmente maduro, por lo que suelen ser comunes antes de la madurez sexual y en la menopausia, donde se presenta por lo general atrofia celular debido a ausencia de estimulación hormonal (Cardinal *et al.*, 2008). Conforme se secretan las hormonas esteroideas, se va adquiriendo una tercera capa compuesta por células intermedias, que se caracterizan por presentar formas poligonales con citoplasmas delgados de diferentes tamaños y núcleos de cromatina finamente granular, más pequeños que los núcleos de las células basales y parabasales (Fig. 4 c) (Cardinal *et al.*, 2008). Son las más frecuentes en la fase post ovulatoria y en el embarazo. Las células intermedias también suelen presentar citólisis debido a la presencia de los bacilos

de Döderlein, que forman parte de la microbiota vaginal y son necesarios para la producción de ácido láctico, importante en disminuir el pH vaginal (Pelea & González, 2003). La capa superficial del epitelio contiene células con forma poligonal irregular, con citoplasmas traslúcidos, núcleos picnóticos y con cromatina condensada y puntiforme (Fig. 4d); también son muy abundantes en la etapa pre ovulatoria, lo que indica que han llegado a su máxima maduración. Se pueden observar gránulos de queratohialina en el citoplasma (Botero *et al.*, 2004). En ocasiones, las células superficiales pueden observarse como escamas anucleadas, debido a que pierden el núcleo y se vuelven muy delgadas, lo que caracteriza una hipermaduración (Pelea & González, 2003).

A principios del siglo XX ya se utilizaba el término de carcinoma temprano para caracterizar los cambios en las lesiones epiteliales que eran adyacentes a carcinomas cervicales (Rubin, 1910). Años después se comenzó a utilizar la definición de carcinoma *in situ* (CIS) para hacer referencia al cuadro clínico (Broders, 1932). Después, gracias a la progresión de las técnicas de tinción en la citología, fue cuando se pudo observar que existen otros cambios epiteliales menos severos que el CIS y además ocurren más frecuentemente (Buckley, 1982). Los frotis citológicos e histológicos ayudan a revelar lesiones precancerosas, displasias celulares, así como carcinoma *in situ* y metaplásico (Buckley, 1982). La displasia celular se refiere a la combinación de alteraciones citológicas, de maduración epitelial y de la proliferación celular en un tejido (Aguirre & Aguirre, 2008).

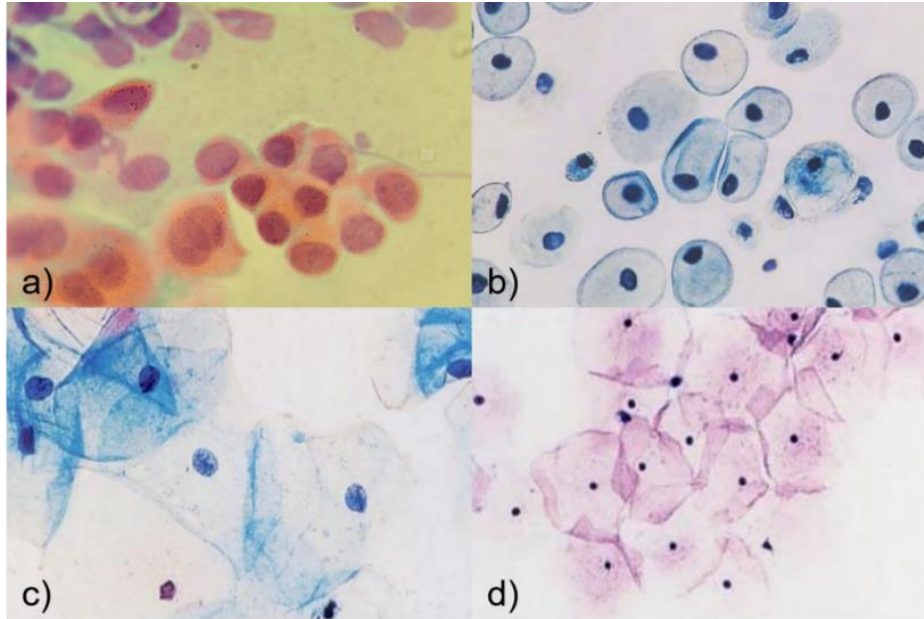


Figura 4. Tipos celulares del epitelio exocervical. a) Células basales, b) Células parabasales, c) Células intermedias y d) Células superficiales.

Los cambios en el epitelio cervical se pueden dividir en aquellas que por sus características presentan un potencial de riesgo de progresión a carcinoma y aquellas incapaces de transicionar hacia un carcinoma de tipo invasivo. Estos cambios incluyen hiperplasia, metaplasia escamosa inmadura y metaplasia escamosa madura que se consideran cambios de tipo benigno, ya que forman parte de procesos fisiológicos normales. En contraste, los cambios que pueden progresar a cáncer y que por lo tanto son anormales, se conocen como displasia (Buckley, 1982). Los cambios sugestivos a displasia conocidos como lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) suelen ser un conjunto de anomalías celulares. Los criterios de malignidad a tomar en cuenta es la binucleación y multinucleación, pérdida de polaridad nuclear, irregularidad de los bordes nucleares (pleomorfia nuclear) y citoplasmáticos, alteración de la proporción núcleo/citoplasma, aumento del volumen nuclear, anisonucleosis, distribución anormal de la cromatina, hipercromasia nuclear y cambios característicos de infección por el virus del papiloma humano (VPH), que presentan halos claros citoplasmáticos, llamados coilocitos (Ver Fig. 5) (Nayar & Wilbur, 2017).

Se debe presentar particular atención a la proporción núcleo/ citoplasma (menor a 50%), bordes nucleares lisos, sin muescas o ranuras, y con una cromatina con distribución homogénea para las células normales (Nayar & Wilbur, 2017). Un cambio no neoplásico incluye los cambios queratósicos (paraqueratosis e hiperqueratosis) que se observan con pequeños núcleos picnóticos y citoplasma anaranjado a eosinofílico. Sin embargo, estas células no deben presentar pleomorfismos nucleares, aumento del tamaño nuclear ni cromasia (paraqueratosis atípica o pleomórfica). La atrofia celular es característica de la falta de estimulación hormonal, normal en el envejecimiento, que consiste en la falta de maduración celular. Presenta únicamente células basales y parabasales inmaduras, no indicativos de LEI. Otro cambio normal del epitelio son los cambios reactivos/reparativos, que pueden presentar variaciones, particularmente se caracteriza un agrandamiento nuclear, nucléolos prominentes, binucleación por regeneración y halos perinucleares, pero sin engrosamiento periférico (Nayar & Wilbur, 2017).

La citología cervical es considerada una prueba primaria que provee información sobre la morfología celular y que contribuye al diagnóstico de carcinomas (Solomon *et al.*, 2002). Existe un sistema de terminología que ofrece un diagnóstico descriptivo para el informe de hallazgos morfológicos que pueden ser indicativos de presencia de infecciones, o de lesiones escamosas (Bollmann, 2001; Nayar & Wilbur, 2017). Este sistema, llamado Bethesda (TBS), el cual tuvo su última actualización en el año 2001, fue desarrollado por el Instituto Nacional de Cáncer (NIH) en 1988 con el objetivo de proveer una terminología que facilitara el diagnóstico de neoplasias cervicales en humanos y que facilitara la comunicación entre patólogos y clínicos (Bergeron, 2003; Kurman, 2012). Es comúnmente utilizado en clínica humana para facilitar los diagnósticos citológicos.

Actualmente, las categorías para informar los resultados son:

Negativo a lesión intraepitelial o malignidad, que incluye aquellas muestras que carecen de anomalías celulares, aunque puede existir la presencia de microorganismos bacterianos (*Actinomyces*), protozoos (*Trichomonas*), virales (herpes

simple VHS) y micóticos (*Candida*), alteraciones hormonales y cambios o reactividad celular asociado a inflamación y reparación (Solomon *et al.*, 2002).

Lesiones intraepiteliales escamosas son clasificadas como **lesiones escamosas de bajo grado (LSIL)** por sus siglas en inglés (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) y **lesiones escamosas de alto grado (HSIL)** por sus siglas en inglés (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*). Ambas categorías se asocian a la infección por virus oncogénicos de alto riesgo, incluyendo infección por papillomavirus (VPH). LSIL es interpretada como la presencia transitoria de infección por VPH que ha provocado el desarrollo de una displasia leve (cambios celulares anormales), mientras que HSIL se interpreta como una infección viral persistente que ha provocado el desarrollo de una displasia moderada-grave y es altamente probable que esa displasia progrese a carcinoma. En estas categorías se tiene particular énfasis en encontrar o descartar lesiones intraepiteliales cervicales neoplásicas (Solomon *et al.*, 2002; Bergeron, 2003; Pelea, 2003; Kurman, 2012).

Otros cambios anormales que se toman en cuenta en la evaluación citológica se pueden clasificar en: **células escamosas atípicas (ASC)** por sus siglas en inglés (*Atypical Squamous Cells*). Esta categoría representa anomalías celulares que son más marcadas que cambios reactivos. ASC presenta dos subtipos, **células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US)** por sus siglas en inglés (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) que presenta anomalías más marcadas que simples cambios reactivos y que son sugestivas a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL) pero debido a la ausencia de características cualitativas y cuantitativas no se puede clasificar como una lesión intraepitelial al momento de la toma de muestra; la otra categoría es **células escamosas atípicas**; esta categoría no puede descartar que se trate de una **lesión intraepitelial escamosa de alto grado (ASC-H)** por sus siglas en inglés (*Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL*) y son aquellos casos donde hay sospecha de una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL), pero esto no puede ser confirmado debido a la falta de características cualitativas y cuantitativas (Bergeron, 2003; Kurman, 2012).

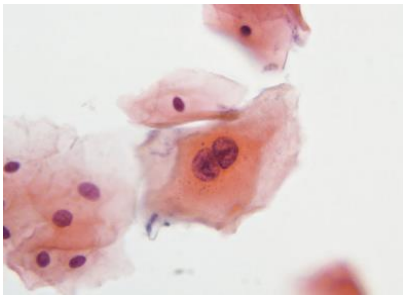
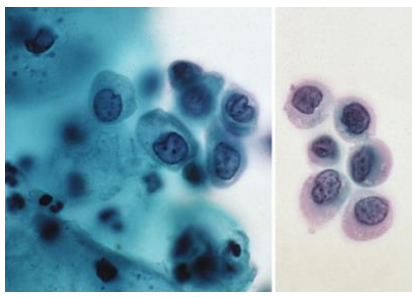
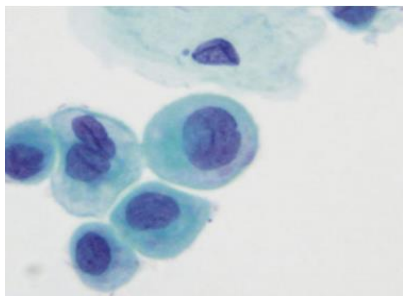
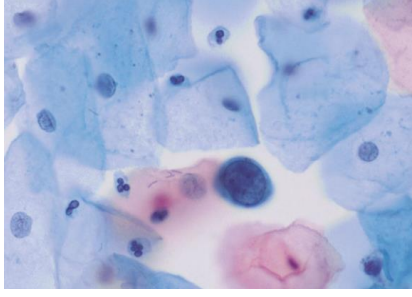
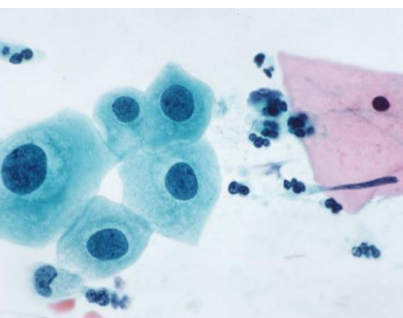
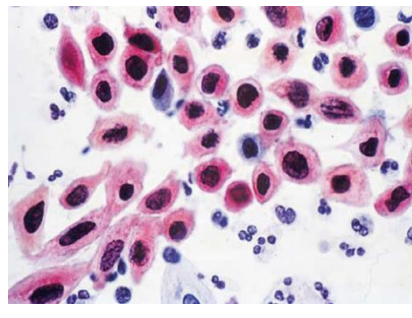
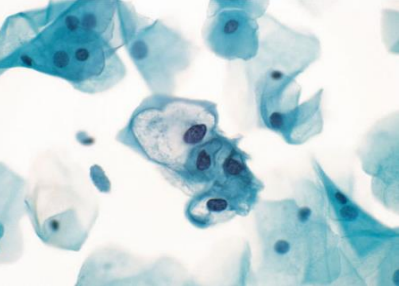
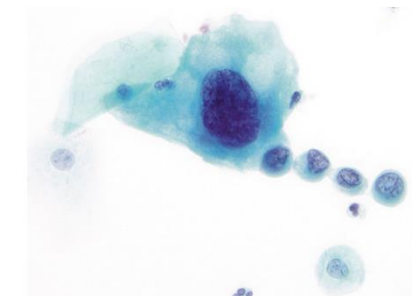
<p style="text-align: center;">Binucleación</p> 	<p style="text-align: center;">Pleomorfía nuclear</p> 
<p style="text-align: center;">Proporción nuclear / citoplasmática ↑</p> 	<p style="text-align: center;">Volumen nuclear ↑</p> 
<p style="text-align: center;">Anisonucleosis</p> 	<p style="text-align: center;">Hiperchromasia</p> 
<p style="text-align: center;">Coilocitos</p> 	<p style="text-align: center;">Células displásicas</p> 

Figura 5. Características de malignidad celular epitelial.

2.4.2 Factores involucrados en el desarrollo de CUG

Al igual que otros tipos de cáncer, el CUG tiene un origen multifactorial, y hasta la fecha, el factor que más se ha asociado estadísticamente a la ocurrencia del CUG es la infección por virus oncogénicos. Un virus filogenéticamente parecido al gammaherpesvirus humano (virus del Sarcoma de Kaposi y de Epstein Barr), el gammaherpesvirus otárico (OthV-1), se encontró en el 100% de los animales con CUG evaluados para estos estudios (Lipscomb *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002; Gulland *et al.*, 2020; Deming *et al.*, 2021), y se cree que se transmite sexualmente (Buckles *et al.*, 2007). Sin embargo, la potencial asociación causal de este virus con el cáncer y su posible transmisión sexual es controversial debido a que también se ha identificado la presencia de OthV-1 en el epitelio genital de lobos marinos sanos e inclusive en animales jóvenes no maduros sexualmente (Barragán-Vargas *et al.*, 2016). Por otro lado se ha propuesto que la infección por un papilomavirus otárico (ZcPV-1), identificado por primera vez en el 2012 por Rivera y colaboradores, juega un papel importante en el desarrollo de la transformación maligna que puede llevar al CUG, ya que se han identificado lesiones intracitoplasmáticas características de VPH en la citología de animales con pre cáncer y se ha detectado la presencia de este virus en el epitelio genital (Barragán-Vargas *et al.*, 2016); sin embargo, también es una asociación controversial debido a que el papilomavirus no se ha podido identificar en animales con carcinoma (Lipscomb *et al.*, 2000; Buckles *et al.*, 2006). Otros de los factores asociados estadísticamente al CUG son bajos niveles de heterocigosidad, en donde se observó que los animales con CUG eran más consanguíneos a comparación de los que no tenían CUG (Acevedo *et al.*, 2003) y se encontró evidencia independiente de que esto podría incluir una homocigosidad en un microsatélite en particular, Pv11, encontrado dentro de un intrón del gen Heparanasa 2 (Browning & Acevedo-Whitehouse *et al.* 2015). Por otro lado, un gen específico del MHC II del CSL (ZACA-DRB.A) se asoció a un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Bowen *et al.*, 2005); otro estudio por Colegrove y colaboradores (2009), encontró que una sub expresión del receptor de estrógenos alfa (ER alfa) en lobos marinos con IEN y una ausencia del mismo receptor en animales con metástasis.

Otro factor importante asociado al desarrollo de cáncer tanto en humanos como en animales es la exposición a contaminantes ambientales químicos, en particular los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y organoclorados (OCs) (Metcalf *et al.*, 1999; Freeman & Kohles, 2012). Su naturaleza persistente y lipofílica hace que aún se encuentren en ambientes terrestres y marinos a pesar de que su uso ha sido prohibido desde la década de 1980 (Freeman & Kohles, 2012). Además, son moléculas que se bioacumulan y se biomagnifican en toda la cadena trófica, es decir, aumentan su concentración conforme aumenta la jerarquía trófica, siendo mayor en los depredadores tope (Toft, 2014). Ylitalo y colaboradores (2005) determinaron los niveles de contaminantes policlorobifenilos (PCB) y de dicloro difenil tricloroetano (DDT) en la grasa de animales que murieron por CUG y observaron que las concentraciones eran más altas en comparación con animales que habían muerto por otras causas no relacionadas al CUG. Otro estudio realizado por Randhawa y colaboradores (2015) determinaron las concentraciones de OCs en la grasa de lobos marinos varados en un periodo de 15 años, de 1992-2007, concluyendo que los OCs presentan importantes complicaciones a la salud de los lobos marinos y aumentan el riesgo a que desarrollen CUG. Esto fue demostrado *in vitro* utilizando cultivos de linfocitos de CSL que fueron expuestos a concentraciones ambientales de diferentes congéneres de PCB, donde se vio que los linfocitos NK disminuyen su actividad citotóxica en presencia de ciertos congéneres, en particular del PCB 138 (Peñín *et al.* 2018).

Es interesante mencionar que a pesar de que el CUG presenta una alta prevalencia en los animales de las costas de California, E.E.U.U.A, hasta ahora no hay evidencia de CUG en animales que habitan aguas mexicanas, específicamente en el Golfo de California y el Pacífico Norte Mexicano, y únicamente se han observado transformaciones pre-oncogénicas del epitelio genital con un grado de displasia intraepitelial leve (Barragán-Vargas *et al.*, 2015). Una razón plausible de esta diferencia son las concentraciones de OCs reportadas en la grasa de lobos marinos de las costas de California en comparación con la reportada para estos animales en el Pacífico Mexicano y el Golfo de California. Por ejemplo, Del Toro y colaboradores (2006) encontraron que las concentraciones de PCB y DDT en la grasa de lobos marinos de California en el Golfo de California eran significativamente menores a las reportadas por

Kajiwara y colaboradores (2001) y Kannan y colaboradores (2004) en animales varados a lo largo de las costas de California, EE.UU. También se sabe que los niveles de OCs siguen un gradiente hacia el sur de California, disminuyendo su concentración, y llegando a ser de dos a tres órdenes de magnitud más altos en California ($77,000 \text{ ng g}^{-1}$ en machos y $83,000 \text{ ng g}^{-1}$ en hembras) (Ylitalo *et al.*, 2005) que en los animales del Pacífico mexicano ($2,960 \text{ ng g}^{-1}$) (Del Toro *et al.*, 2006) y del Golfo de California (1600 ng g^{-1} en machos, 1300 ng g^{-1} en hembras) (Niño-Torres *et al.*, 2009). Esas diferencias en la concentración de OCs en la grasa de los animales podría ser la causa de la aparente ausencia de CUG en lobos marinos de California en aguas mexicanas. La inmunosupresión inducida por altas concentraciones de algunos tipos de OCs se ha propuesto para explicar la importancia de la exposición a diferentes concentraciones de OCs en las regiones de California, el Pacífico mexicano y el Golfo de California (Peñín *et al.*, 2018). De hecho, en concordancia con esto Peñín y colaboradores (2019) cuantificaron la expresión de genes con actividades citotóxicas y antitumorales a nivel sistémico en leucocitos de animales adultos del Golfo de California y observaron diferencias regionales en la expresión de los genes. El Golfo de California, al tener características oceanográficas diferentes, se regionaliza o se divide según Szteren y Auriol (2011) en región norte, región media, central, sur y por la parte del Pacífico está la región del Pacífico norte mexicano. De acuerdo a los perfiles de expresión de los genes cuantificados por Peñín y colaboradores (2019) lograron hacer agrupaciones, en donde se observaron diferencias marcadas de norte a sur, agrupándose la región norte y media juntas y la otra agrupación con la región central, sur y la del Pacífico mexicano, lo que podría reflejar variaciones regionales en la cantidad de contaminantes y de otros estimuladores inmunes.

Otro factor causante de alteraciones del sistema inmunológico son las anomalías climáticas. El aumento de la temperatura superficial del mar (TSM) es una de las variaciones más estudiadas debido a las consecuencias desastrosas que conlleva, por ejemplo, La Oscilación del Sur (ENSO) con la categoría de El Niño y La Oscilación Decadal del Pacífico (PDO) con patrones de oscilaciones de TSM frías y cálidas (Bond & Harrison, 2000). A finales del año 2013, comenzó una anomalía de la TSM ($\sim 100 \text{ m}$ superiores) en el Golfo de Alaska, la anomalía de TSM más alta antes registrada, llamada

“The blob”, que fue creciendo por todo el noreste del Océano Pacífico, con una temperatura que excedió hasta 2-3 desviaciones estándar (Bond *et al.* 2015). Esta ola de calor, tuvo una duración hasta el otoño e invierno del 2015-2016 (Di Lorenzo & Mantua, 2016).

La TSM elevada tiene efectos negativos en la productividad primaria, lo que causa una disminución de la abundancia de presas. Banuet y colaboradores (2017) estudiaron la competencia inmunológica de crías de CSL que nacieron en años con condiciones climáticas anómalas. Observaron que la condición corporal y los niveles de glucosa en sangre eran más bajos en años con TSM elevada, y las respuestas inmunitarias dependientes de glucosa como las concentraciones séricas de IgG e IgA también se vieron afectadas.

III. JUSTIFICACIÓN

El carcinoma urogenital del lobo marino de California tiene una prevalencia que oscila entre el 18 y el 23% de los animales varados en las costas de California, E.E.U.U. Se asocia estadísticamente a diferentes factores, pero principalmente a la infección por virus oncogénicos y a la exposición a altas concentraciones de organoclorados, que impactan de manera directa la capacidad de ejercer respuestas por parte del sistema inmunitario. Existen diferencias regionales en la expresión de genes con actividades citotóxicas y antitumorales a nivel sistémico en animales adultos del Golfo de California, que podrían estar relacionadas con las diferencias ecológicas entre regiones. Sin embargo, aún se desconoce el papel de estos genes inmunitarios a nivel local en el contexto de la transformación celular pre oncogénica y la infección por los virus oncogénicos, ni se han investigado diferencias en los estadios celulares de pretransformación y transformación maligna en animales de las aguas costeras de los Estados Unidos y del Golfo de California. Evaluar los perfiles transcripcionales de genes clave en el sistema inmune nos permite entender el papel que juegan los mecanismos inmunitarios en la eliminación de células transformadas en sus primeras etapas y su modulación por parte de virus oncogénicos.

IV. HIPÓTESIS

1. La expresión de genes clave para la vigilancia antiviral y antitumoral varía temporalmente.
2. La expresión de genes clave para la vigilancia antiviral y antitumoral es diferente entre regiones ecológicas de la distribución del lobo marino de California en el Golfo de California.
3. La expresión de genes clave para la vigilancia antiviral y antitumoral es diferente a nivel local que a nivel sistémico.
4. La expresión de genes clave para la vigilancia antiviral y antitumoral varía entre los niveles de displasia celular.
5. La expresión de genes clave para la vigilancia antiviral y antitumoral es influida por el estatus de infección viral.
6. El perfil transcripcional del epitelio genital del lobo marino de California difiere entre individuos sanos e individuos con transformación pre oncogénica.
7. Los animales con carcinoma urogenital presentan cambios morfológicos celulares detectables a la evaluación citológica.
8. Los cambios morfológicos característicos de infección por papilomavirus están presentes en citologías con displasia leve.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el patrón transcripcional de genes clave involucrados en procesos antivirales y antitumorales a nivel del epitelio genital del lobo marino de California y dilucidar su papel para la transformación pre oncogénica.

5.2 Objetivos específicos

1. Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre los años 2014, 2016 y 2020.
2. Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre las regiones.
3. Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras a nivel sistémico y a nivel local.
4. Evaluar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función del nivel de displasia celular.
5. Evaluar el patrón transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función de infección por OtHV-1 y papillomavirus.
6. Caracterizar el transcriptoma del epitelio genital del lobo marino de California en función del nivel de transformación celular y la presencia de virus oncogénicos.
7. Identificar cambios morfológicos celulares sugestivos a neoplasias intraepiteliales en hembras adultas varadas en las costas de California e identificar fenotipos celulares característicos de infección por el papiloma virus
8. Determinar la concordancia diagnóstica entre la interpretación citológica y los hallazgos a la necropsia relacionados al carcinoma urogenital.

VI. METODOLOGÍA

Este proyecto forma parte de un proyecto de investigación sobre la Etiología de la transformación epitelial del lobo marino de California, financiado por CONACYT (Ciencia Básica 2018, proyecto A1-S-16417). Como parte de este proyecto, fueron colectadas muestras citológicas y de sangre del epitelio genital de hembras adultas de lobo marino de California durante una expedición a las colonias reproductivas en el Golfo de California en 2020. Previamente, como parte de un proyecto financiado por CONACYT (Fronteras de la Ciencia 2015, proyecto 446) se habían colectado muestras en otro crucero científico durante el 2016. Estas muestras disponibles se utilizaron para realizar análisis citológicos del epitelio, para preservar ADN y ARN, y para detectar la presencia de virus oncogénicos. Este proyecto fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales con número de folio 102FCN2019. La metodología se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular y Plasticidad Inmune ubicado en Campus Aeropuerto, UAQ.

Especie de estudio

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*), CSL, pertenece a la familia Otariidae y es la especie de pinnípedo más abundante y de distribución más amplia que hay en México (Szteren *et al.*, 2006); Su distribución abarca desde Columbia Británica, en el norte del Océano Pacífico, hasta las costas de Jalisco, México, incluido el Golfo de California (Schramm *et al.*, 2009). De acuerdo al análisis del ADN mitocondrial, se identifican poblaciones geográficas distintas: (1) una población que abarca toda la costa de California hasta la frontera entre E.E.U.U. y México; (2) la población del oeste de Baja California, que abarca toda la costa occidental de la Península de Baja California, en el Océano Pacífico; (3) el sur del Golfo de California, (4) el centro y (5) el norte del Golfo de California (5) (Caretta *et al.*, 2016).

En las islas San Miguel, Santa Bárbara, San Nicolás y San Clemente en Estados Unidos se asientan las principales colonias reproductivas de CSL, con una población que

suma 182,000 animales. En México, existen 19 colonias principales desde la isla Coronado hasta la isla Margarita en el Océano Pacífico incluyendo las islas en el Golfo de California (Schramm *et al.*, 2009), que en total se estiman en 118,000 individuos (Szteren & Auriolos Gamboa, 2011).

La especie se encuentra por lo general en aguas cercanas a la plataforma continental y playones, también es posible encontrarlo en islas mar adentro y muy alejadas de la costa. Frecuentemente se distribuyen en zonas costeras, en bahías y puertos e incluso en desembocaduras de ríos, por lo que es una especie de hábitos costeros (Auriolos-Gamboa & Zavala-González, 1994). Además, son animales gregarios, que suelen agruparse en islas o islotes formando loberas que les sirven de refugio contra depredadores (Peterson, 1967). Estas colonias tienen una zona acuática que les sirve para su reproducción y otra área terrestre en donde también ocurren los apareamientos, y en donde las hembras paren y pasan su etapa de lactación y crianza (Peterson, 1967).

El lobo marino de California presenta un grado de dimorfismo sexual muy marcado: mientras los machos pueden llegar a pesar hasta 250 kg y medir 2.5 metros, las hembras apenas alcanzan los 100 kg y llegan a medir en promedio 1.8 metros (Perrin *et al.*, 2009). Este dimorfismo solamente se observa cuando los animales dejan de ser juveniles y los machos comienzan a desarrollar caracteres sexuales secundarios.

La temporada de reproducción abarca de junio a agosto, y en el periodo de un año sucede el parto, el celo, la preñez (incluida la diapausa embrionaria y gestación placentaria activa) y la lactancia (Greig *et al.*, 2005). El destete suele ser a los 10-12 meses de edad, y la madurez sexual se alcanza a los 5 años (Heath & Perrin, 2009).

Las hembras adultas presentan una gran fidelidad tanto a sus sitios de nacimiento como a las zonas de alimentación, lo cual puede tener un impacto en la estructura social y genética (Wolf & Trillmich, 2007). Después de la temporada de reproducción, las hembras lactantes se quedan en las colonias y suelen alimentarse algunos km a la redonda de su zona reproductiva, mientras que los machos migran al norte para alimentarse (Auriolos-Gamboa 2003). Algunas de las especies preferidas como presa son el calamar común (*Loligo vulgaris*), sardina del Pacífico (*Sardinops sagax*), anchovetas (*Engraulis mordax*), pez sapo (*Porichthys sp*), merluza del Pacífico

(*Merluccius productos*), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) entre otras. La alimentación varía de acuerdo a la región y a las fluctuaciones temporales de la abundancia de recursos. Los lobos marinos que habitan en el alto Golfo de California tienen una diversidad de dieta baja, mientras los que habitan en la región de las Grandes Islas del Golfo de California presentan una diversidad de dieta de baja a media; en el Golfo central tienen baja diversidad y en la región Sur una alta diversidad (Szteren & Aurióles-Gamboa, 2011).

Área de estudio

El Golfo de California se encuentra en el noroeste de México, entre la Península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa. Es una extensión del océano Pacífico, con una longitud de 1126 km y un rango de 48 a 241 km de ancho. Dentro del golfo de California hay 13 colonias reproductivas de lobos marinos (Fig. 6), en las cuales se recolectaron las muestras para esta tesis. La toma de muestras se llevó a cabo en el verano del 2014, 2016 y 2020. Se muestrearon hembras adultas de diferentes colonias reproductivas del Golfo de California. Islotes (24°59'N, 110°40'W), San Pedro Nolasco (27°96'N, 111°37'W), San Pedro Mártir (28°38'N, 112°30'W), San Esteban (28°70'N, 112°57'W), Rasito (28°83'N, 112°99'W), Partido (28°91'N, 113°04'W), Machos (29°29'N, 113°50'W), Granito (29°56'N, 113°53'W), Cantiles (29°50'N, 113°44'W), Lobos (30°05'N, 114°48'W), San Jorge (31°01'N, 113°24'W), y Rocas Consag (31°20'N, 114°68'W).

Para términos de conservación del CSL, el Golfo de California ha sido dividido en cuatro regiones (Fig. 7) de acuerdo a variables biológicas, ecológicas, físicas y bioquímicas. El golfo norte o región norte incluye a Isla Lobos, San Jorge y Rocas Consag, y se caracterizan por presentar una TSM y clorofila alta y una diversidad de dieta baja. La región Media, también llamada Ángel de la Guarda o región de las Grandes Islas incluye a Granito, Los Cantiles, Los Machos y El Partido, presentan TSM alta y concentraciones de clorofila baja, la diversidad de la dieta es de baja a media y presentan alta incidencia de osteoartritis. La Región Central tiene a las islas San Esteban, San Pedro Mártir, Nolasco y El Rasito, la TSM es de media a baja, las concentraciones de

clorofila de medias a altas, la diversidad de dieta es alta y la incidencia de osteoartritis es de media a baja. La Región Sur incluye Farallón de San Ignacio y Los Islotes, los cuales se caracterizan por presentar TSM alta, concentraciones de clorofila bajas, una alta diversidad de dieta y baja incidencia de osteoartritis (Szteren & Auriolles-Gamboa, 2011).



Figura 6. Colonias reproductivas del lobo marino de California

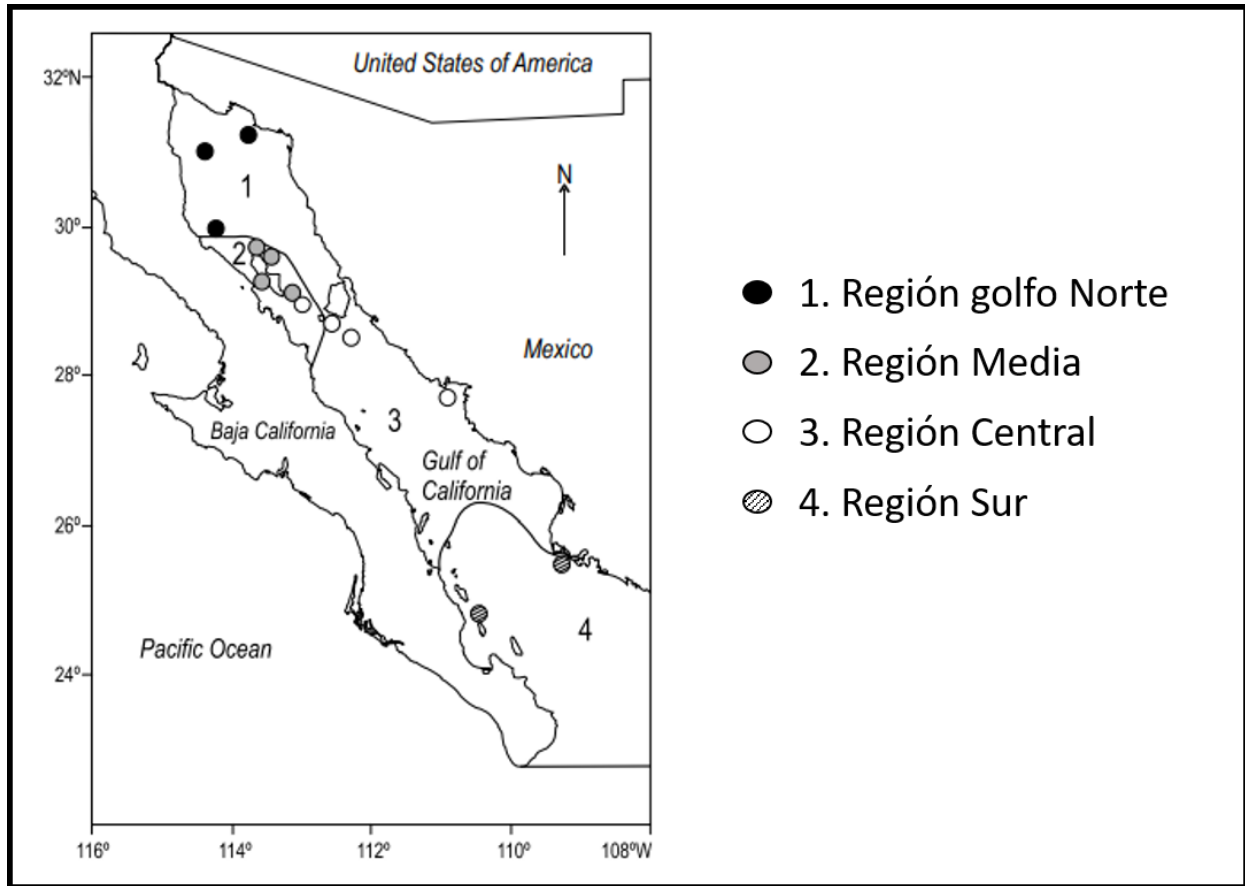


Figura 7. Regionalización del Golfo de California según Szteren & Aurióles-Gamboa (2011).

Toma de muestras

Se capturaron 55 hembras adultas mediante redes mariposeras y por contención física. La toma de muestras de epitelio cervical se realizó con la ayuda de un espejo vaginal para la visualización del cérvix. Se introdujo un cepillo estéril en la cavidad genital hasta la entrada del cuello uterino, frotando suavemente con movimientos circulares para tomar la mayor cantidad de células. Se realizaron tres cepillados cervicales por hembra. Con el primero se realizaron frotis citológicos en laminillas de cristal y se fijaron inmediatamente con spray Cytofix de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se dejaron secar a temperatura ambiente y se protegieron de la luz solar en una cajilla para laminillas hasta su tinción. El segundo y el tercer cepillo se guardaron en tubos crioales de 1.5 mililitros,

uno con una solución estabilizadora de ARN (RNAlater) para la extracción de ARN y otro en etanol al 96% para extracción de ADN.

Citología

Se analizaron 12 laminillas del epitelio genital de hembras adultas muestreadas en el 2020. Ya se contaba con el diagnóstico citológico de las muestras del 2014 y 2016, las cuales fueron proporcionadas por Barragán-Vargas (Barragán-Vargas *et al.*, 2016).

Se analizaron 22 laminillas de epitelio genital tomadas de lobos marinos de California varados en las costas de California E.E.U.U durante los años 2018 y 2019. Las laminillas fueron proporcionadas por The Marine Mammal Center.

Para la detección de la transformación celular cervical, las laminillas se tiñeron con la técnica de tinción de Papanicolaou modificada por Barragán-Vargas (2013). La tinción consta de una tinción nuclear y un contraste citoplasmático. Se utilizaron 3 colorantes, la hematoxilina de Harris, tiñe los núcleos, el colorante Orange G y la Eosina A 50 para teñir los citoplasmas de las células. El procedimiento consiste en sumergir las laminillas en un tren de tinciones que tiene 4 pasos importantes, la fijación, la tinción de núcleo con Hematoxilina de Harris, la tinción de citoplasma con Orange G y EA50 y el aclaramiento.

Procedimiento:

- Se sumergieron las laminillas en etanol al 80% por 30 seg.
- A continuación, se sumergieron en etanol al 70% por 30 seg.
- Enseguida en etanol al 50% por 30 seg.
- Agua destilada por 30 seg. para enjuagar alcoholes
- Hematoxilina de Harris por 4 minutos con 30 seg. para la tinción de los núcleos.
- Agua destilada por 30 seg.
- Sumergir en ácido clorhídrico (HCl) al 0.25% 4 veces continuas para quitar exceso de colorante.
- Agua corriente por 6 min.
- Agua destilada por 30 seg.

- Etanol al 50% por 30 seg.
- Etanol al 70% por 30 seg.
- Etanol al 80% por 30 seg.
- Sumergir en el colorante OG6 por 90 seg.
- Etanol al 95% por 30 seg. para la fijación del color.
- Repetir paso anterior
- Sumergir en colorante EA50 por 90 seg.
- Etanol al 95% por 30 seg.(Repetir 3 veces)
- Etanol al 100% por 30 seg.
- Sumergir en una solución xilol-alcohol (1:1) por 30 seg.
- Sumergir en xilol al 100% por 30 seg.
- Dejar secar a temperatura ambiente

Una vez que estaban secas las laminillas, se montaron en resina sintética a base de xilol al 60%. Se agregó 50 µl de resina en la parte central de la laminilla y se cubrió con un cubreobjetos, haciendo ligera presión con los pulgares para extender la resina sobre la laminilla, evitando dejar burbujas. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas para su visualización al microscopio.

Se observaron las laminillas a un objetivo de 40X y 100X para visualizar las diferentes características celulares que determinan una transformación celular.

Los fenotipos celulares que se tuvieron en cuenta fueron los criterios de malignidad descritos previamente en la Figura 5.

Se realizó el diagnóstico para cada hembra de acuerdo al Sistema Bethesda 2001. Cada individuo fue colocado en una categoría diagnóstica de la siguiente manera: negativo para lesión intraepitelial de malignidad (negativo), atipia de células escamosas (ASC), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) según la Terminología del Sistema Bethesda de 2001. De acuerdo con esta terminología citológica, ASCUS incluye células para las cuales no se puede hacer una interpretación confiable de las lesiones intraepiteliales escamosas, aunque contienen características que son más marcadas que

los cambios meramente reactivos y su diagnóstico no debe ignorarse, ya que a menudo progresa a lesiones intraepiteliales escamosas o malignidad. LSIL incluye displasia leve y neoplasia intraepitelial cervical grado I. ASC se refiere a la presencia de células atípicas que no tienden a transformarse en un estado maligno y podrían ser causadas por una infección por varios patógenos. La presencia de leucocitos en los frotis cervicales se marcó con el signo (+) cuando la inflamación era leve, con (++) cuando era moderada y con (+++) cuando la inflamación fue severa.

Se consideró como muestra insatisfactoria aquellas que presentaran:

- Poca celularidad
- Presencia de eritrocitos y células inflamatorias que impidan la correcta visualización y valoración de más del 75% de la laminilla.
- Mala fijación
- Extensión gruesa
- Cambios por desecación y presencia de artefactos

Se solicitaron las historias clínicas y los reportes de necropsia de los animales muestreados a la Dra. Cara Field y al Dr. Pádraig Duignan del The Marine Mammal Center para su posterior comparación con las interpretaciones citológicas. Posteriormente, se procedió a buscar en los reportes de necropsia lesiones macroscópicas asociadas con CUG para posteriormente comparar los resultados con la citología cervical.

Extracción y Purificación de ADN

Para el diagnóstico viral se realizó extracción de ADN genómico de los cepillos genitales preservados en etanol al 96%. Se utilizó el kit de extracción QIAamp® DNA mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó y se evaluó la calidad en un espectrofotómetro NanoDrop (Qiagen).

Detección de ADN de OtHV-1

Se utilizaron las muestras del año 2020 para detectar la presencia de infección por OtHV-1. Ya se contaba con los diagnósticos de las muestras de 2014 y 2016, que fueron realizadas por Ignacio Peñin y Cecilia Barragán-Vargas (Barragán-Vargas, 2015; Peñin, 2018).

Se amplificó un fragmento de 210 pb del gen de la ADN polimerasa (Dpol) de la gamma herpesvirus otárico tipo I (OtHV-1) en el ADN extraído de los cepillos genitales (Dpol 697 5'-GCGGGAACGCAACTATATCCT-3' y Dpol 65 5'-TCTTCGTCCAGTATCATTG-3') (Velez, 2012). Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las reacciones de PCR de 12,5 µl se realizaron utilizando un sistema de PCR ABI 3100 (Applied Biosystems, Inc.). Las condiciones fueron 95 ° C durante 15 min, 30 ciclos de 94 ° C durante 40 s, 52 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 40 s y un paso de extensión final a 72 ° C durante 10 min. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Detección de ADN de ZcPV-1

Se amplificó un fragmento de 539 pb del gen L1 (secuencia HQ293213.1) de GenBank F (5'-ATACAGGACGGGGACATGG-3') y R (5'-TCATATTCCTCAGCGTGCCT-3').. Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las reacciones de PCR de 12,5 µl se realizaron utilizando un sistema de PCR ABI 3100 (Applied Biosystems, Inc.). Las condiciones fueron 95 ° C durante 3 min, 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 52 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 15 s, un paso de extensión final a 72 ° C durante 15 min.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

El ARN de las células epiteliales cervicales se extrajo de los cepillos preservados en solución amortiguadora de ARN RNA later^{TM} (Invitrogen $^{\text{TM}}$). Se utilizó el protocolo Trizol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) Para obtener una mayor cantidad de material, después de incubar las muestras en Trizol durante 1 hr a temperatura ambiente se utilizaron agujas de insulina 31Gmm x 6mm para romper las células. La fase de separación se llevó a cabo con cloroformo (0.2 μl / μl de trizol utilizado). Al sobrenadante (fase que contiene el ARN) se le agregó acetato de sodio 3M (10% del sobrenadante) y 400 μl de isopropanol frío. Después de incubar por 12 hrs a -20°C se hicieron lavados con etanol al 75%, se dejaron secar a temperatura ambiente y se hidrataron con agua libre de RNAsas. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y la pureza se determinó mediante espectrofotometría Nanodrop.

Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) se utilizó el kit de transcripción reversa QuantiTect (Qiagen, EE. UU.). Utilizando 200 ng de ARN en reacciones de 20 μL . Según las instrucciones del fabricante, el procedimiento incluyó 2 min incubación a 42°C con tampón de eliminación de ADNg para garantizar aún más la eliminación de la contaminación del ADN genómico. El cDNA se congeló en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Para verificar la síntesis viable de cDNA se realizó un PCR amplificando el gen G3p (gliceraldehído3-fosfato-deshidrogenasa).

Expresión genética

Se seleccionaron 10 genes (Cuadro 4) que juegan un papel importante en las respuestas inmunitarias relevantes para procesos antivirales y antitumorales y que han sido amplificadas y estudiadas anteriormente en sangre de esta especie (Peñin *et al.* 2019).

Se evaluó la cuantificación de la expresión relativa de estos genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en un sistema de detección de secuencias CFX

Connect™ (BioRad, EE. UU.) con los cebadores (ver Cuadro 4) previamente optimizados por Peñin *et al.* (2019).

Para evaluar la función de las células NK y su actividad citotóxica se midió la transcripción de los genes KIR, Ly49, perforina y granzima B, se sabe que son genes funcionales en el CSL (Hammond *et al.*, 2009). La evaluación de la actividad de los linfocitos CD4⁺ (Th1) se midió mediante la expresión del factor de transcripción STAT-1, responsable de mediar la respuesta celular a los interferones (IFN) (Nguyen *et al.*, 2000); eomes que se considera un marcador de activación de T CD8⁺ (Pearce *et al.*, 2003), y Tbx21, responsable de regular la diferenciación de células Th ingenuas a Th1 (Zhu *et al.*, 2012). Para los fenotipos de Th2 se evaluaron los genes GATA3, y STAT-6 y la actividad de las células T reguladoras se evaluó mediante los niveles de transcripción de FoxP3.

Las reacciones de RT-qPCR contenían contenían 4 µL de cDNA, 0.5 µL de cada cebador, 5 µL de QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit (QIAGEN), 10 µL de volumen final. Las reacciones se sometieron según el siguiente protocolo:

95 ° C durante 15 min

40 ciclos de

- 95 ° C por 15 s
- 55 ° C por 60 s
- 72 ° C por 60 s.

95 ° C durante 15 s

y un paso final para la curva de fusión a 60 a 90 ° C (aumento de 0.5 ° C y 15 s de medición de la longitud de onda para cada temperatura).

Las reacciones de cada gen se realizaron por duplicado y se utilizaron controles de mezcla sin muestra para controlar la contaminación. El umbral se estableció manualmente después del despegue de la amplificación. Se utilizaron los datos que tuvieron una diferencia entre replicas inferior a un ciclo. Si fallaba la fiabilidad de los genes de referencia, las muestras se volvían a analizar para todos los pares de cebadores de una placa.

Cuadro 4. Genes con funciones marcadoras de citotoxicidad NK y CD8+, respuesta tipo Th2 e inmunomodulación.

Gen	Proteína codificada y función	Oligonucleótidos (5'-3')
Ly49	Receptor inhibitor de células NK. Se une a MHC I en células normales y alteradas.	F. TGTCAGAGAGGAAATGAAGGCA R. TGGCAAGTCTGTTTACATCCGT
Granzima B	Proteasa proapoptótica dependiente de perforina. Ejerce respuestas antivirales y antitumorales.	F. CACTCTGCAAGTAGTGAGGCT R. CAGCTGAATGGTGTGGTCGTA
Perforina	Crea poros o canales a través de la membrana celular de las células diana mediante el cual, entran proteínas citolíticas.	F. CCTGCTGCAGTTCTTCCAAC R. CTGGCACTGACCGACTGG
Eomes	También llamada T-box brain protein (Tbr2) (proteína T-box cerebral 2). Codifica para el factor de transcripción Eomesodermina, importante durante el desarrollo y en la diferenciación de células T CD8+ durante la respuesta inmune regulando la expresión de genes efectores líticos.	F. TCAGTCCTTCTCCCGGAGC R. GGTTGACCACCTTTCGTTCTG
STAT-1	Transductor de señales y activador de la transcripción que media la respuesta celular a los interferones (IFN).	F. GGTGAACTGGACCCCAGTCT R. CTATGGGACCGCACCTTCAA
Tbx21	Codifica para el factor de transcripción (Tbet). Define el linaje que inicia el desarrollo del linaje Th1 a partir de células precursoras Th ingenuas activando los programas genéticos Th1 y reprimiendo los programas genéticos Th2 y Th17.	F. GAGGCTGAGTTTCGAGCAGT R. AGTAGGACATGGTGGGTCCG
GATA-3	Induce la secreción de citocinas antiinflamatorias por las células Th2; inhibe la expresión de IFN γ ; suprime la diferenciación de células Th ingenuas a las células Th1.	F. CATGACACGCTGGAGGACTT R. AGGGAGGTCATGTGTCTGGA
FoxP3	Factor de transcripción que media la función antiinflamatoria y antiapoptótica. Moldea la tolerancia inmunológica.	F. TGCAGTCTCTGGAACAGCAG R. TTTGGTCAGGGCCATCTTCC

Para normalizar la expresión de cada gen de interés se seleccionaron dos genes de referencia, expresados constitutivamente en los tejidos del organismo a evaluar, *HPRT* y *RPS5*.

La estrategia utilizada para medir la expresión fue la cuantificación relativa, restando los valores del ciclo umbral Ct de los genes de referencia de los valores Ct de los genes objetivo para obtener ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ de genes de referencia}$$

Debido a que los valores más bajos de ΔCt representan niveles más altos de expresión, se transformaron las variables respuesta a valores negativos ($-\log \Delta Ct$).

Análisis estadístico

Se utilizó la expresión relativa de genes representativos de las respuestas relevantes para este estudio: (i) actividad y diferenciación de NK y CD⁸⁺ (*Ly49*, *perforina*, *granzima B*, *STAT-1*, *Tbx21* y *eomes*), (ii) Th2 y modulación inmune (*GATA3* y *FoxP3*).

La distribución de las variables respuestas se examinó mediante la prueba de Shapiro Wilks para determinar la normalidad de los datos. Para la visualización de la distribución de los datos se realizaron gráficos de q-q plot. A continuación, se realizaron gráficos Cullen y Frey para identificar el tipo de distribución a la que más se asemejaban (Anexo I).

Se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM), modelo que nos permite tener una distribución no normal de los datos. Se realizaron GLM para cada uno de los genes de interés, y en cada modelo se incluyeron las siguientes variables explicativas: año de muestreo, región, estado citológico (LSIL, ASC, N) y la infección por virus oncogénicos. Se realizó un GLM independientes para examinar si el nivel de transcripción de cada gen se vio afectados por la presencia de OtHV-1, ZcPV-1 o la infección simultánea por ambos virus en el epitelio genital, y si los niveles de transcripción

de genes fueron influenciados por el nivel de displasia celular. En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente significativos si el valor de p era inferior a 0,05. Se realizaron modelos de regresión lineal simple (lm) para saber si la expresión a nivel local impactaba en la expresión a nivel sistémico para cada uno de los genes.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R v3.4.2 (RStudio Team, 2021) y se utilizó Tableau v22.1 para la realización de las gráficas.

VII. RESULTADOS

Se incluyeron 53 muestras de hembras adultas del lobo marino de California para realizar este estudio. Para verificar si tenían una distribución normal, los datos de expresión se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk, en donde se obtuvieron los siguientes valores de p: KIR ($p = 0.241$), Ly49 ($p = 0.052$), perforina ($p = 0.060$), granzima B ($p = 0.001$), STAT-1 ($p = 0.021$), eomes ($p = 7.895e-05$), Tbx21 ($p = 0.008$), GATA-3 ($p = 7.365e-05$), FoxP3 ($p = 0.01367$) y STAT-6 ($P = 0.000$). KIR, Ly49 y perforina mostraron una distribución normal, mientras el resto de los genes no presentó evidencia de normalidad. Para la visualización de las distribuciones se realizaron gráficos q-q plot (Anexo I) y para obtener el tipo de distribución a la que más se ajustaban se realizaron gráficos de Cullen & Frey (Anexo II). Para los genes que no tuvieron una distribución normal, se ajustaron a una distribución beta (conversión a valores entre 0 y 1) a excepción de GATA-3 que presentó una distribución lognormal, ajustándose a una escala logarítmica para su análisis. Los GLM se realizaron incluyendo una distribución cuasibinomial.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre los años 2014, 2016 y 2020.

KIR

En los tres años del estudio, la expresión de KIR se expresó a niveles menores que los genes de referencia y solo cuatro individuos presentaron una sobre expresión de KIR. Sin embargo, los niveles de transcripción relativa para el gen KIR variaron en los tres diferentes años (GLM, $F_{1, 40} = 12.91$, $p = 0.00$; Fig. 8), con una mayor expresión relativa en el 2020 (-1) y menor expresión (-4) en el 2016.

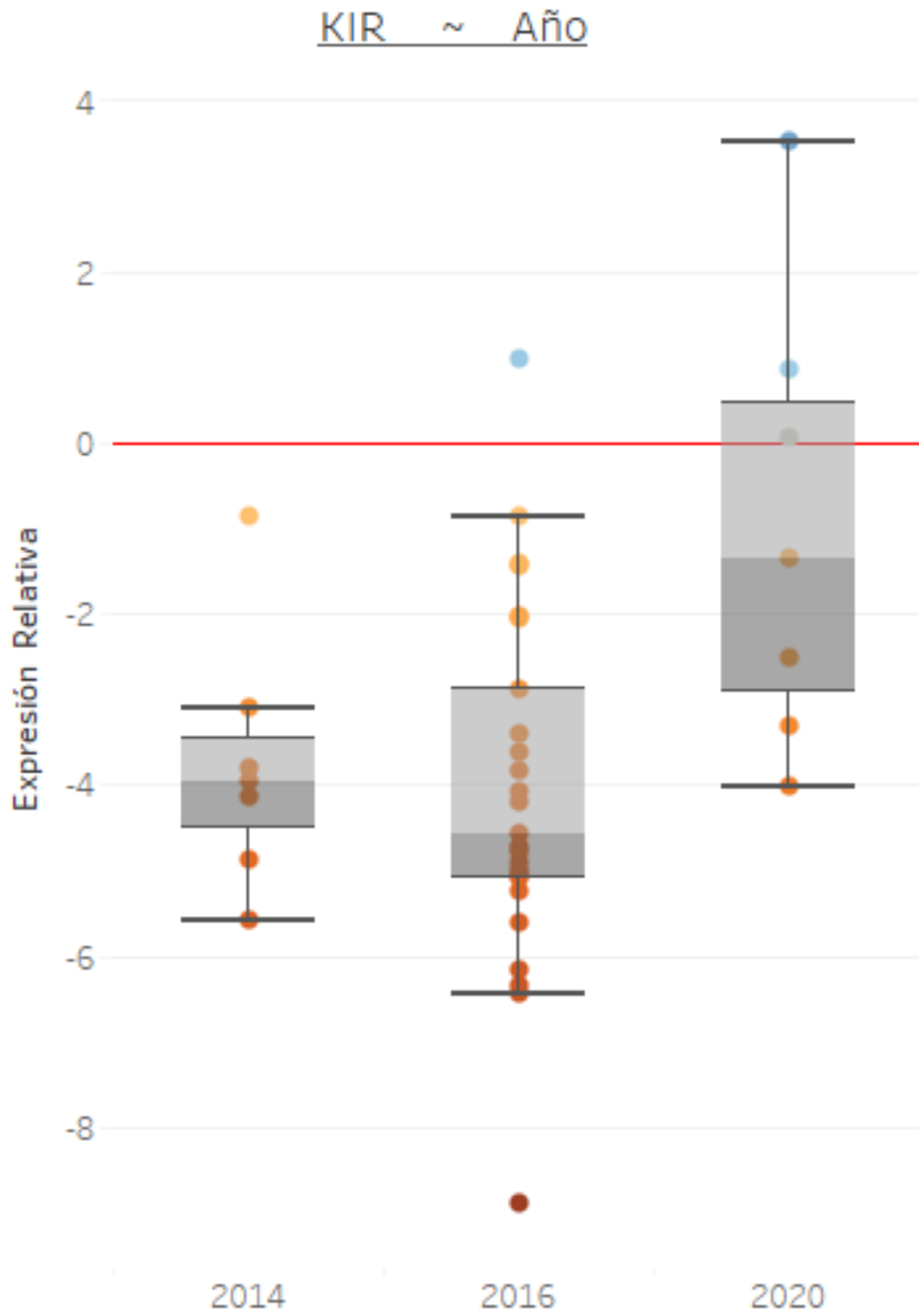


Figura 8. Transcripción relativa de KIR en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

Ly49

La transcripción del gen Ly49 no varió de forma detectable entre los años (GLM, $F_{1,46} = 1.24$, $p = 0.26$; Fig. 9).

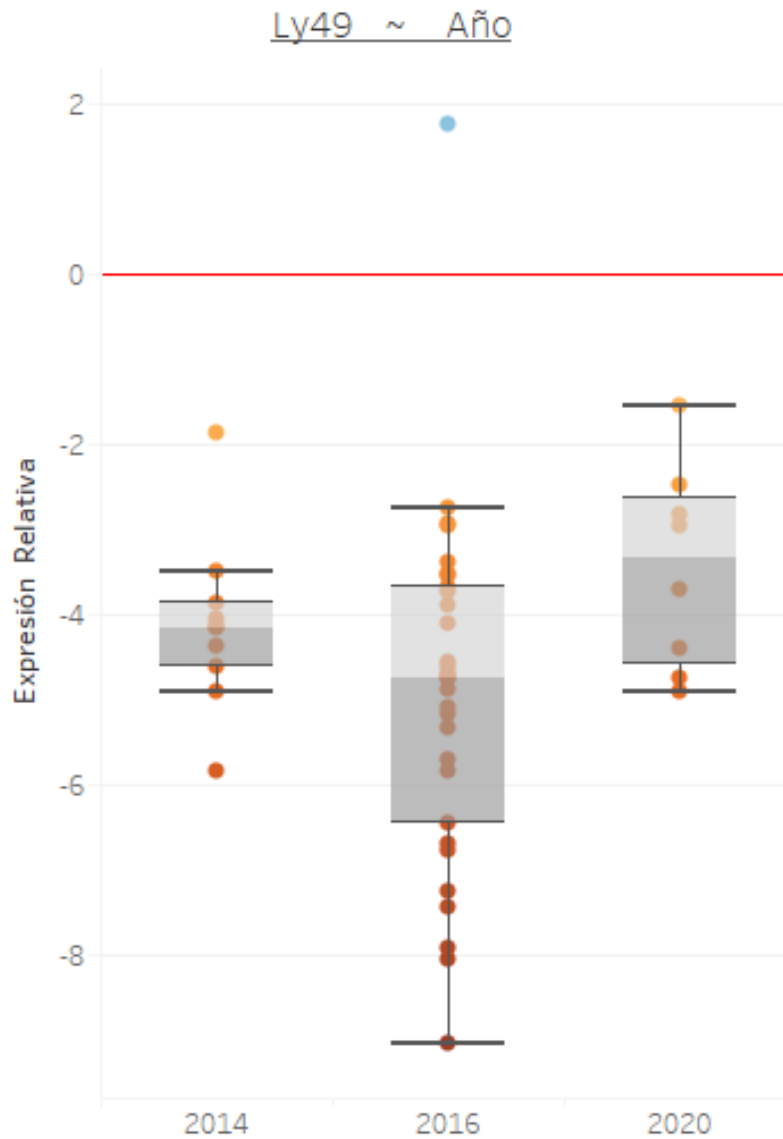


Figura 9. Transcripción relativa de Ly49 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

Perforina

La expresión de Perforina fue subexpresada en prácticamente todos los individuos, con la excepción de dos animales. La transcripción del gen perforina no varió entre los años (GLM, $F_{1, 22} = 0.27$, $p = 0.60$; Fig. 10). Cabe señalar que fueron pocas las muestras analizadas (24 muestras) en comparación con las muestras disponibles para los demás genes.

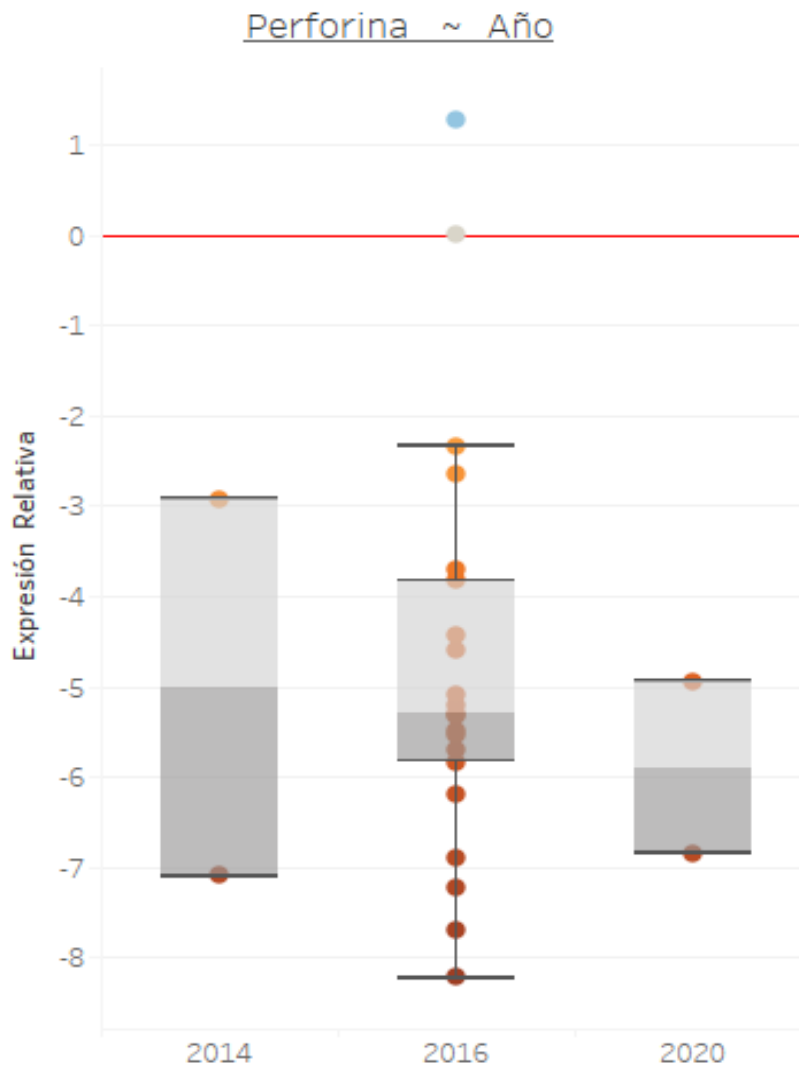


Figura 10. Transcripción relativa de perforina en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

Granzima B

La expresión de granzima B varió entre años (GLM, $X^2 = 1.57$, $gl=41$, $p= 0.01$; Fig. 11) siendo menor (-1.65) para individuos muestreados en el 2016 y mayor (1.84) en el año 2020. La expresión promedio fue 1.6 veces menor que la expresión de los genes de referencia en el 2016, a comparación del 2020, que presentó niveles de expresión por encima de los genes de referencia.

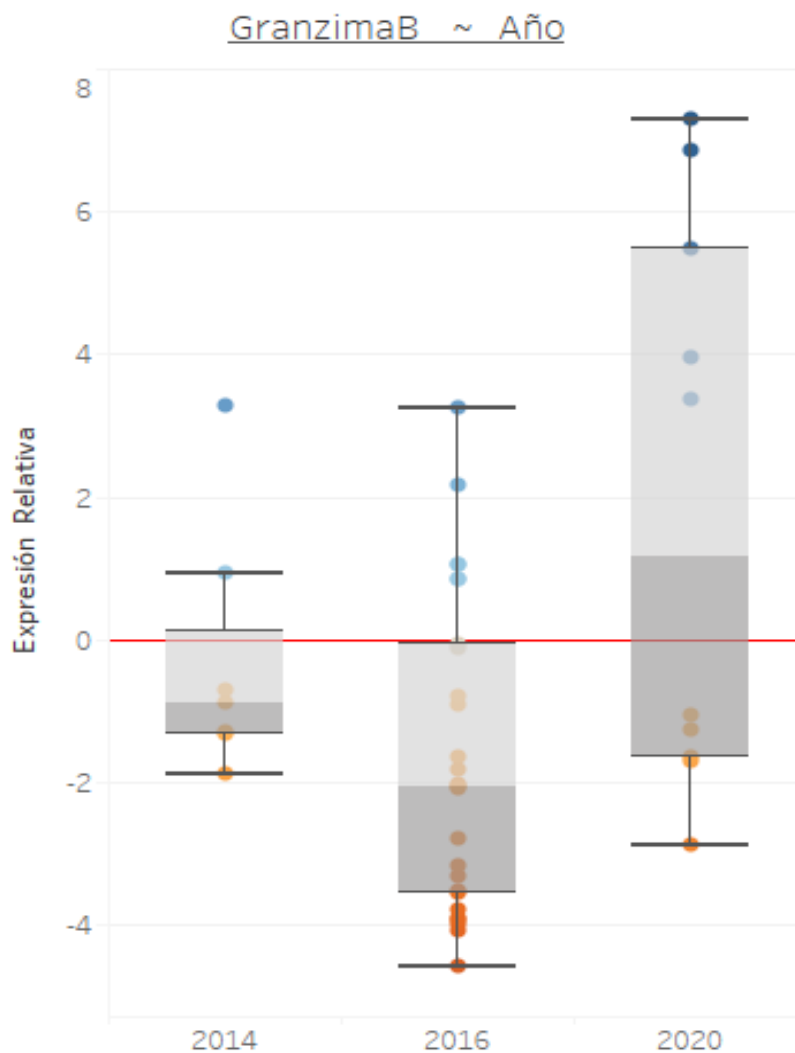


Figura 11. Transcripción relativa de granzima B en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020

STAT-1

La expresión de STAT-1 varió entre años (GLM, $X^2 = 3.63$, $gl = 46$, $p = 0.01$; Fig. 12) con niveles más altos (2.9) en el 2014 en comparación con los años 2016 y 2020, que presentaron 3.5 veces menos expresión.

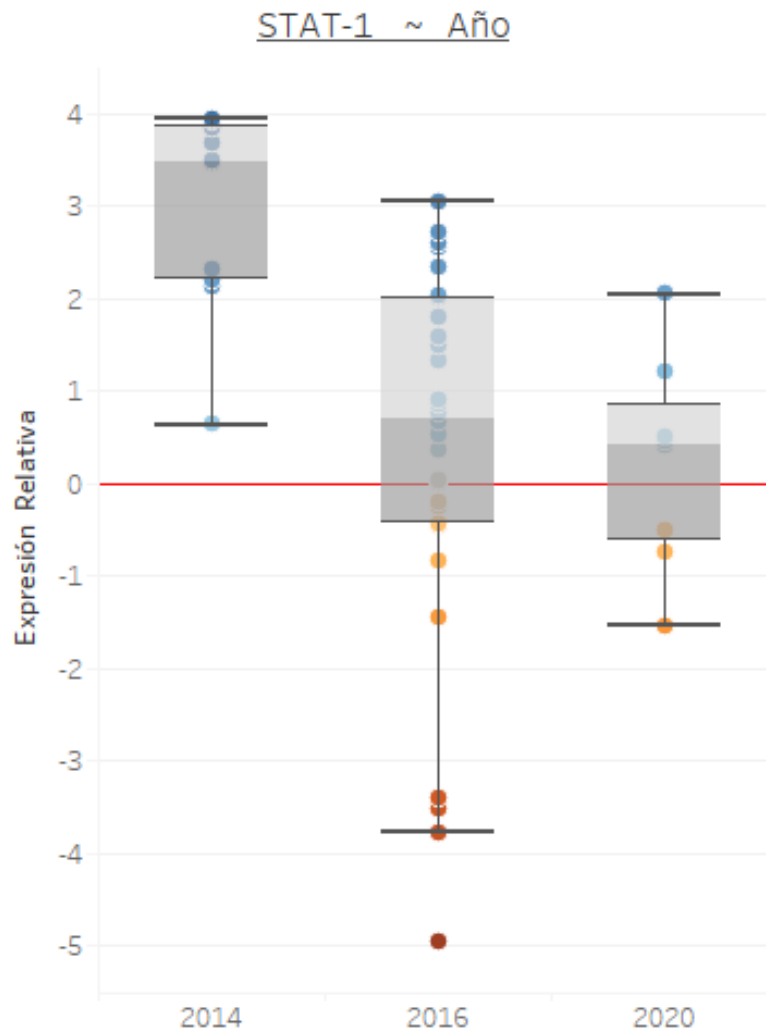


Figura 12. Transcripción relativa de STAT-1 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

EOMES

La expresión epitelial genital de eomes en general fue subexpresada, aunque en el 2020 algunos animales tuvieron una sobreexpresión de este gen. Su transcripción varió entre los años (GLM, $X^2 = 0.97$, $gl = 40$, $p = 0.00$; Fig. 13), siendo hasta 4 veces más alta en el 2020 con respecto al 2016.

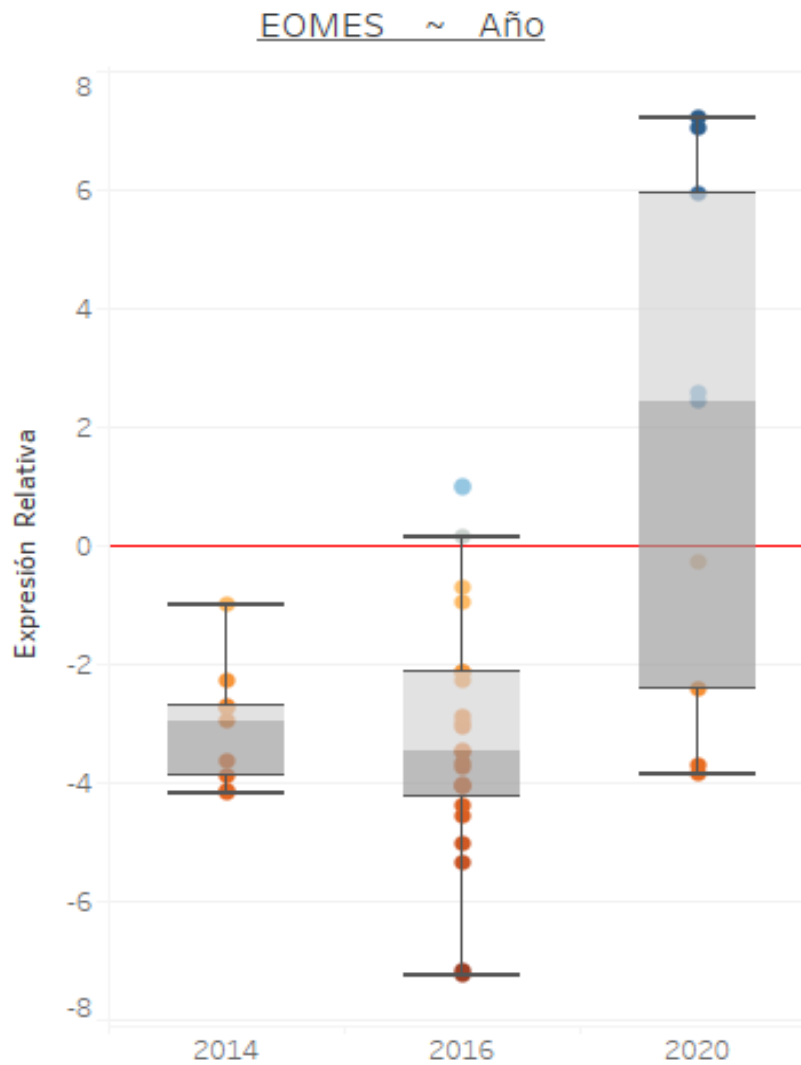


Figura 13. Transcripción relativa de eomes en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

Tbx21

La expresión de *Tbx21* no varió entre los años del estudio (GLM, $X^2 = 0.06$, $gl = 47$, $p = 0.28$; Fig. 14) y en la mayoría de los individuos muestreados se observó subexpresado con respecto a los genes de referencia.

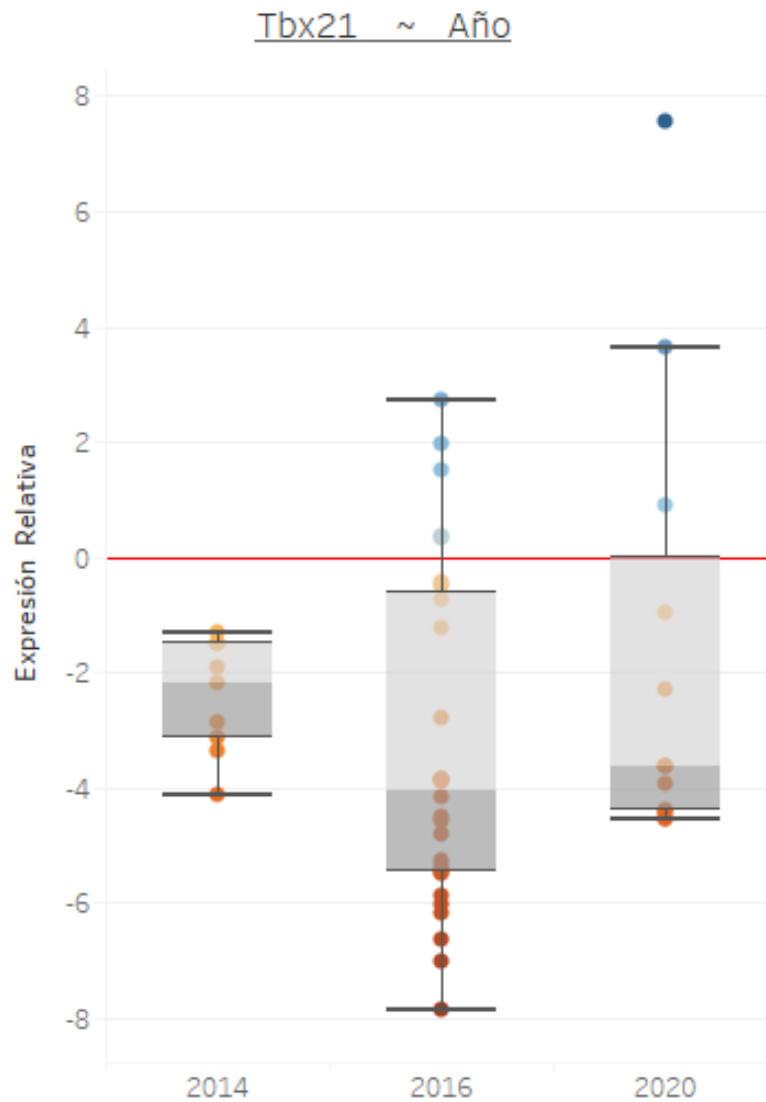


Figura 14. Transcripción relativa de *Tbx21* en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

GATA-3

Los valores de transcripción relativa para GATA-3 no variaron entre años (GLM, $X^2= 2.46$, $gl=50$, $p= 0.19$; Fig. 15).

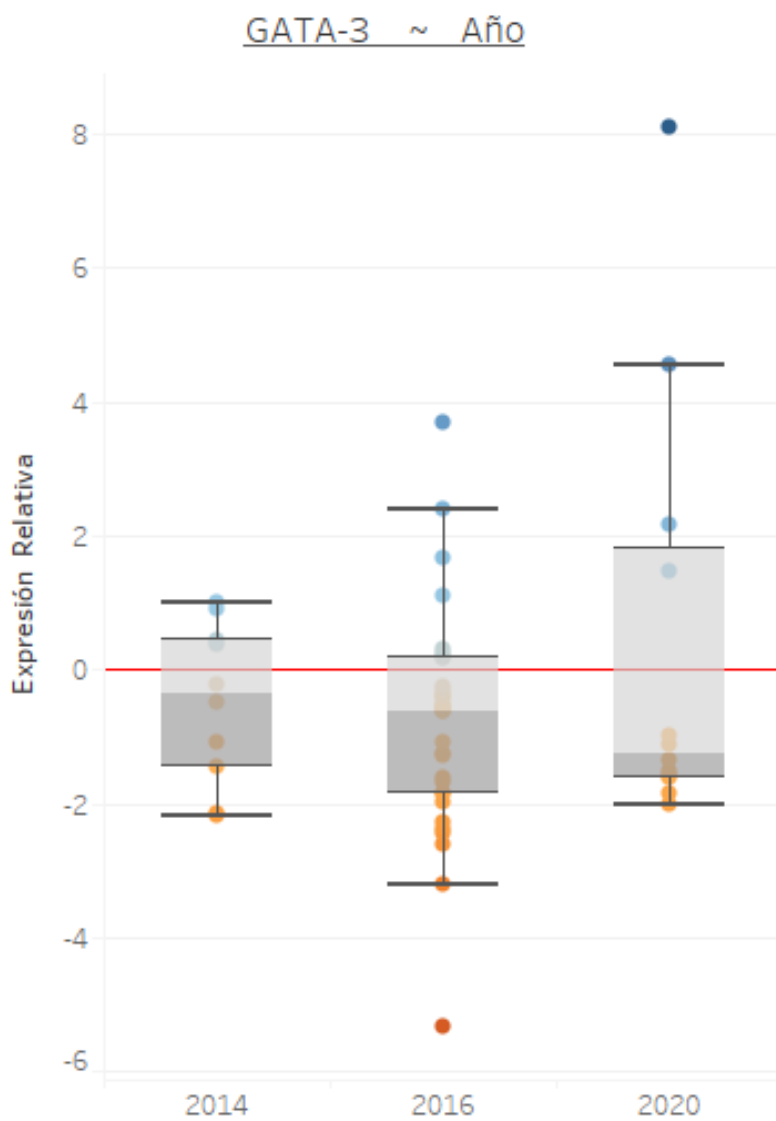


Figura 15. Transcripción relativa de GATA-3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

STAT-6

Los niveles de transcripción de STAT-6 fueron mayores que los genes de referencia con la excepción de unos pocos individuos en el año 2016 y 2020. La expresión relativa de STAT-6 varió entre años, mostrando mayores niveles de expresión en el año 2020 y menor en el 2016 (GLM, $X^2= 2.75$, $gl=33$, $p= 0.00$; Fig. 16).

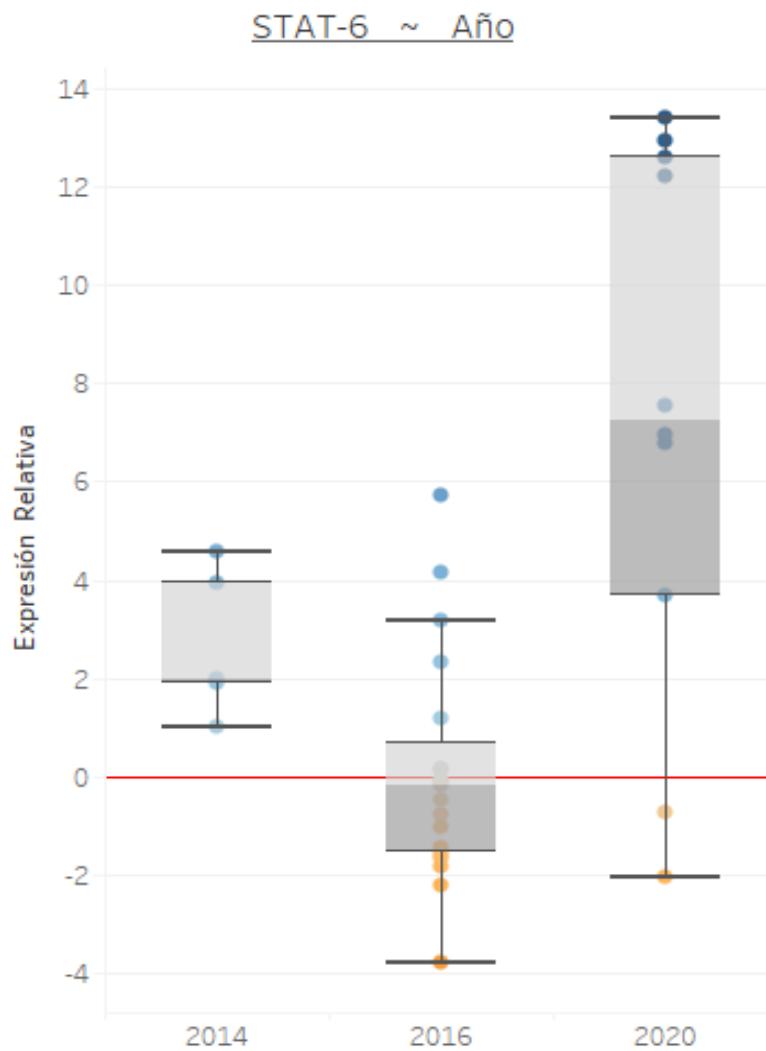


Figura 16. Transcripción relativa de STAT-6 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

FOXP-3

La transcripción relativa de FOXP3 no fue diferente entre los tres años muestreados (GLM, $X^2= 0.02$, $gl= 47$, $p= 0.13$; Fig. 17).

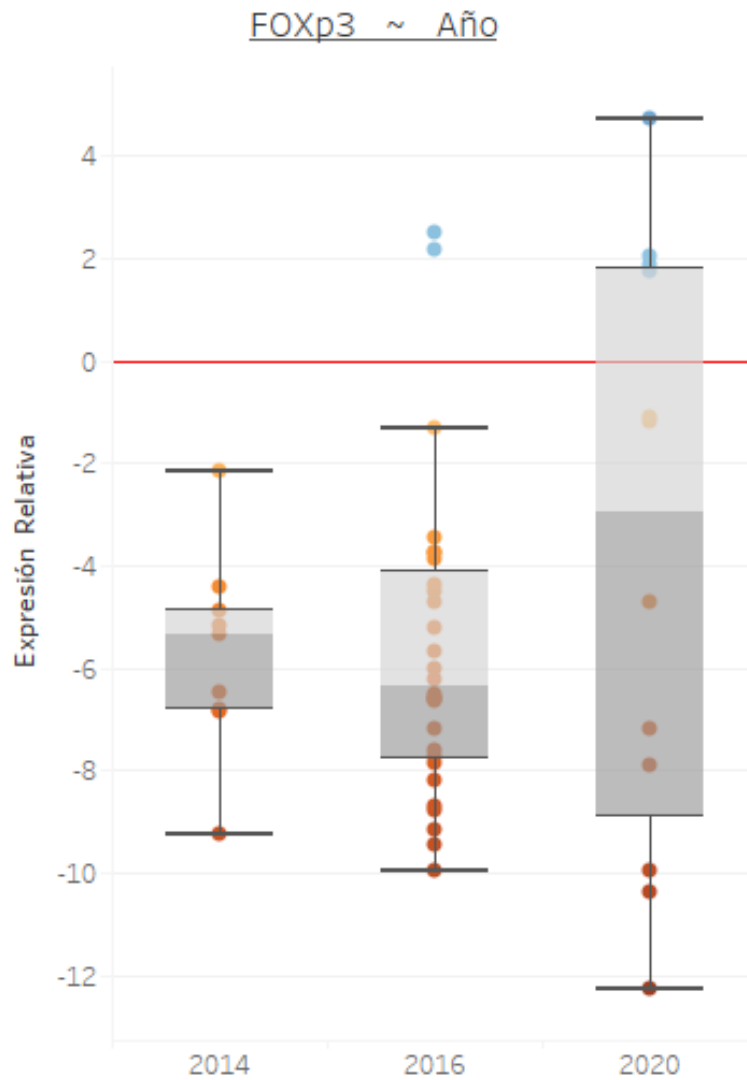


Figura 17. Transcripción relativa de FOXP3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes años, 2014, 2016 y 2020.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre las regiones.

KIR

La expresión relativa de KIR se observó regulada a la baja con respecto a los genes de referencia y no fue diferente entre las regiones muestreadas (GLM, $F_{4, 37} = 1.91$, $p = 0.12$; Fig. 18).

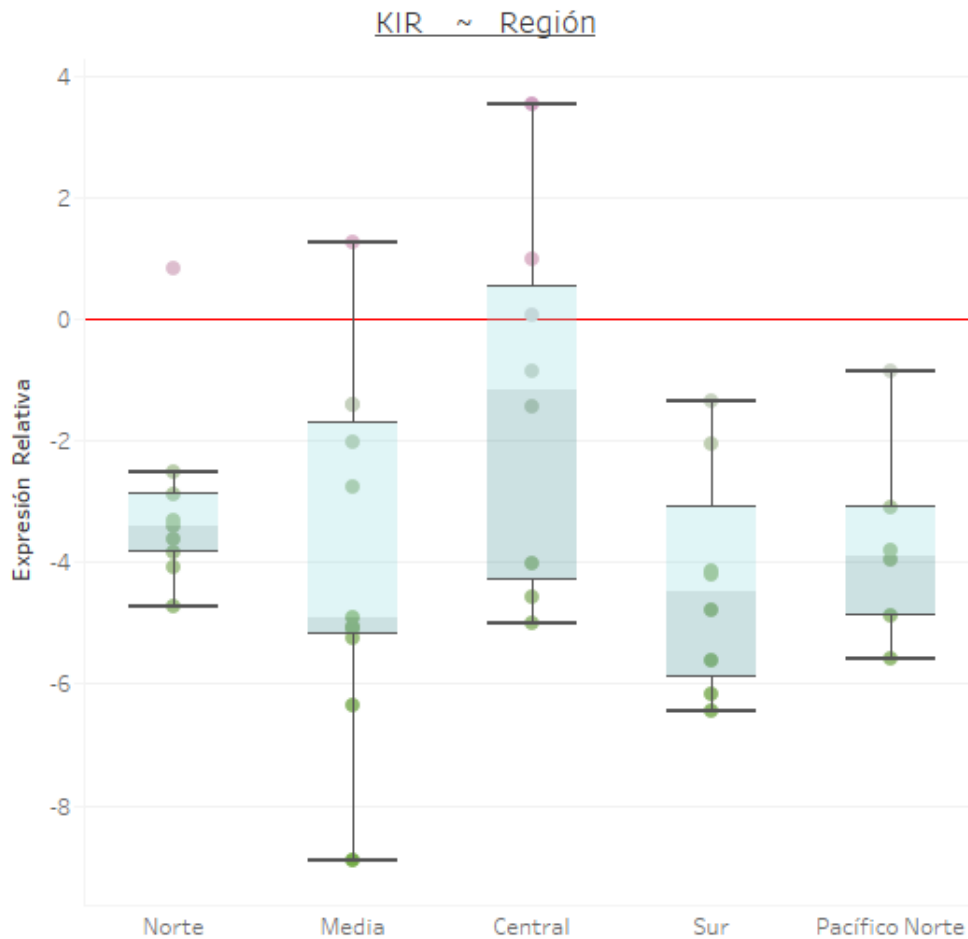


Figura 18. Transcripción relativa de KIR en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Ly49

Ly49 no presenta variación en su expresión entre regiones (GLM, $F_{4, 43} = 0.47$, $p = 0.75$; Fig. 19).

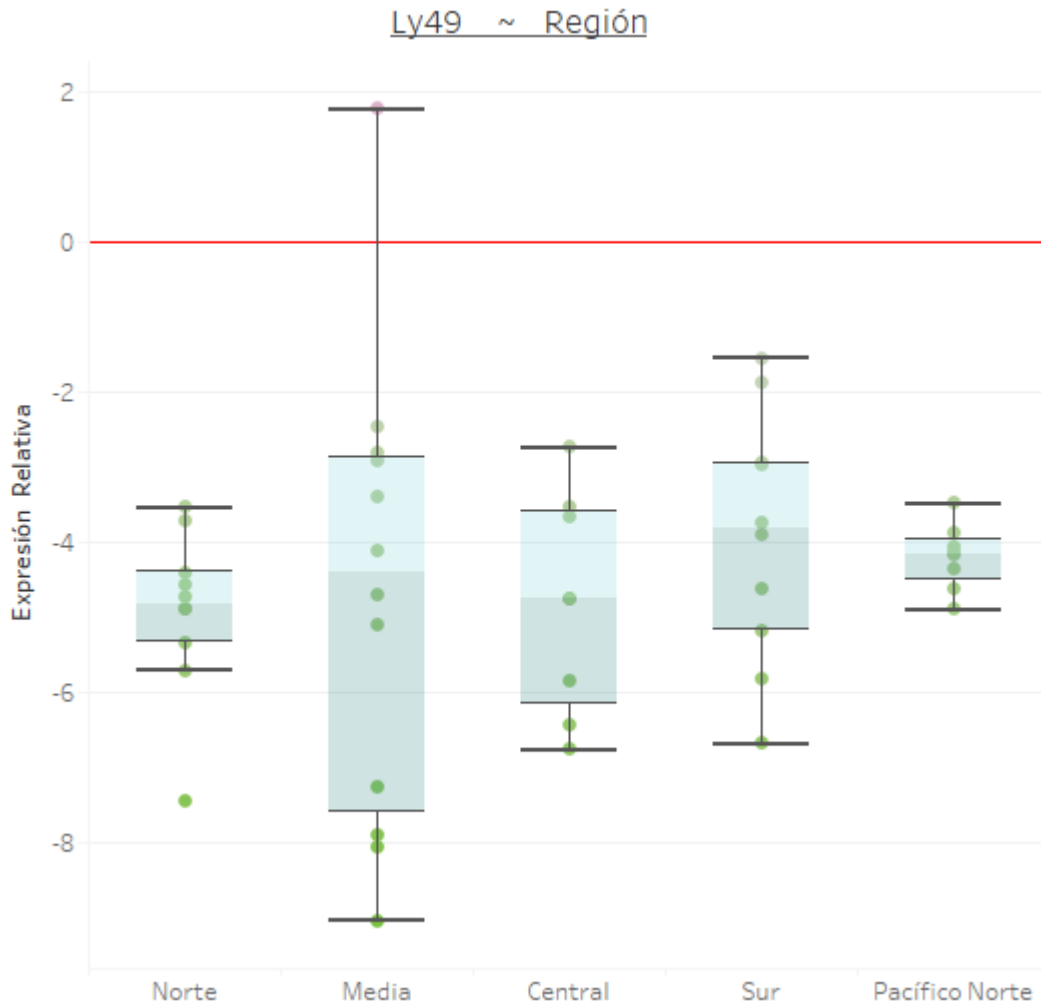


Figura 19. Transcripción relativa de Ly49 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Perforina

La expresión de perforina varió entre regiones (GLM, $F_{4, 19} = 2.96$, $p = 0.04$; Fig. 20) siendo más alta (-1.8) en la región central y menor (-5.8) en la región Sur.

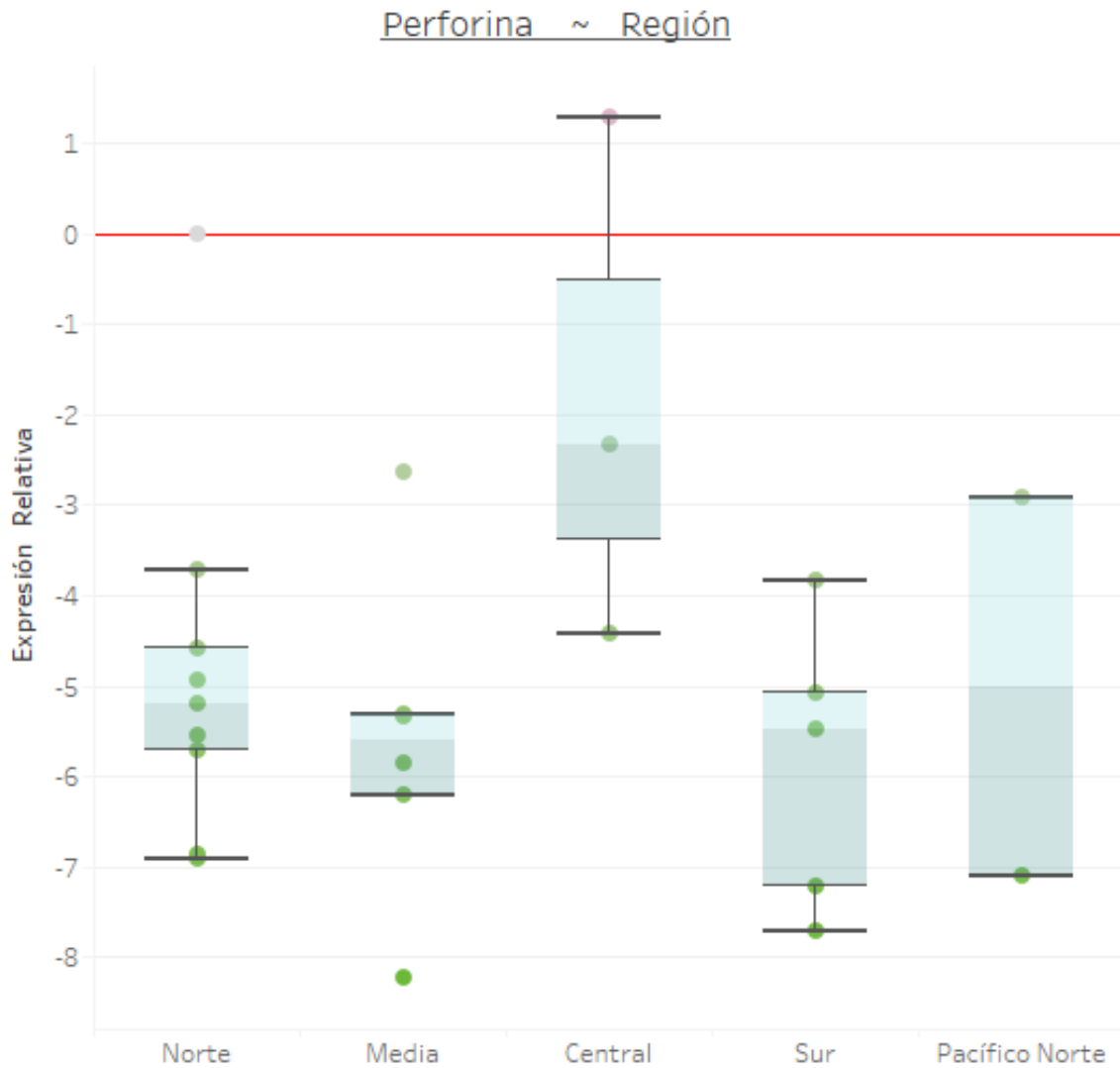


Figura 20. Transcripción relativa de perforina en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Granzima B

Los niveles de expresión relativa de granzima B no variaron entre regiones (GLM, $X^2 = 1.74$, $gl = 38$, $p = 0.94$; Fig. 21). Los individuos presentaron niveles de transcripción bajos, algunos individuos mostrando hasta 4 veces menos que la expresión de los genes de referencia (en promedio, 0.6 veces menos). Sin embargo, algunos individuos presentaron niveles de transcripción muy elevados en el epitelio genital, hasta más de 6 veces los niveles de los genes de referencia.

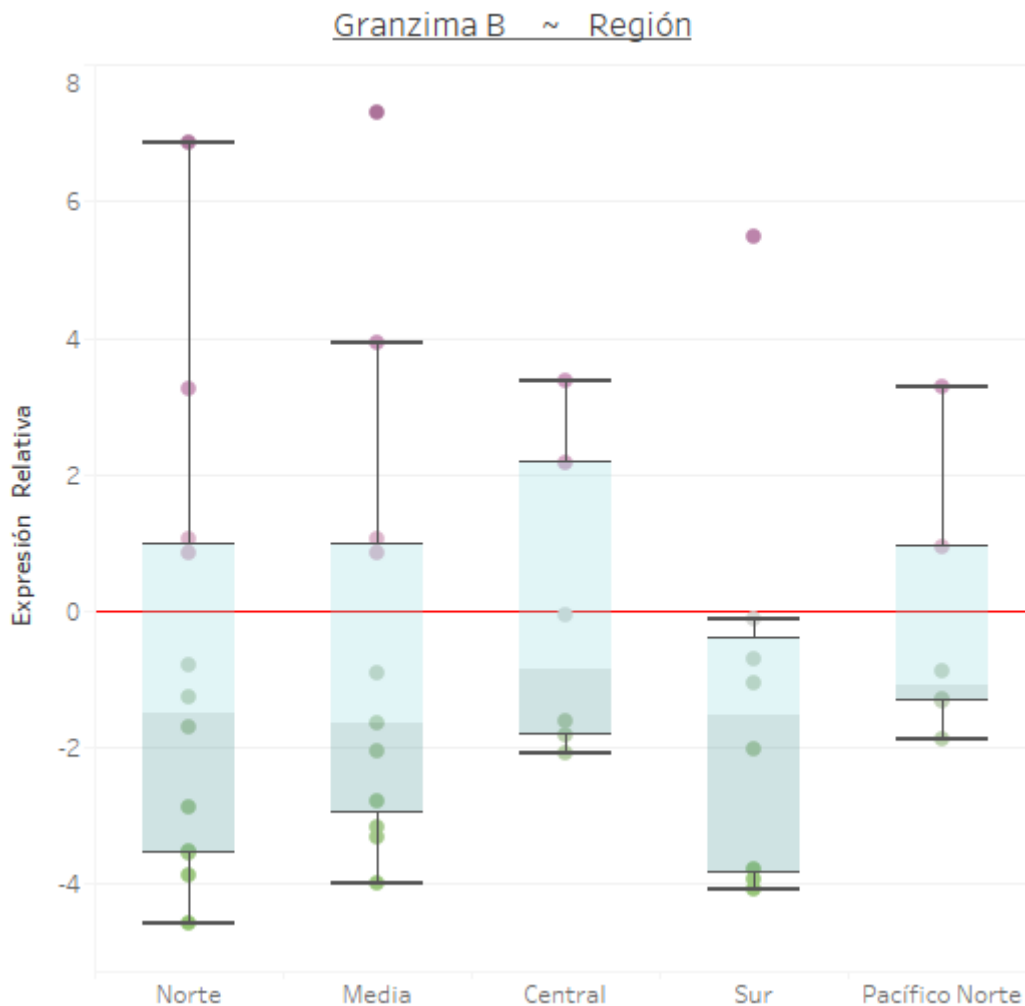


Figura 21. Transcripción relativa de granzima B en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

STAT-1

El perfil de transcripción relativa para STAT-1 varió entre regiones (GLM, $X^2= 2.41$, $gl= 43$, $p= 0.000$; Fig. 22) siendo mayor (3.1) para animales del Pacífico norte y menor (-0.9) para animales de la región media. STAT-1 mayormente se sobreexpresó en las regiones norte, central, sur y Pacífico norte, y se subexpresó en la región media.

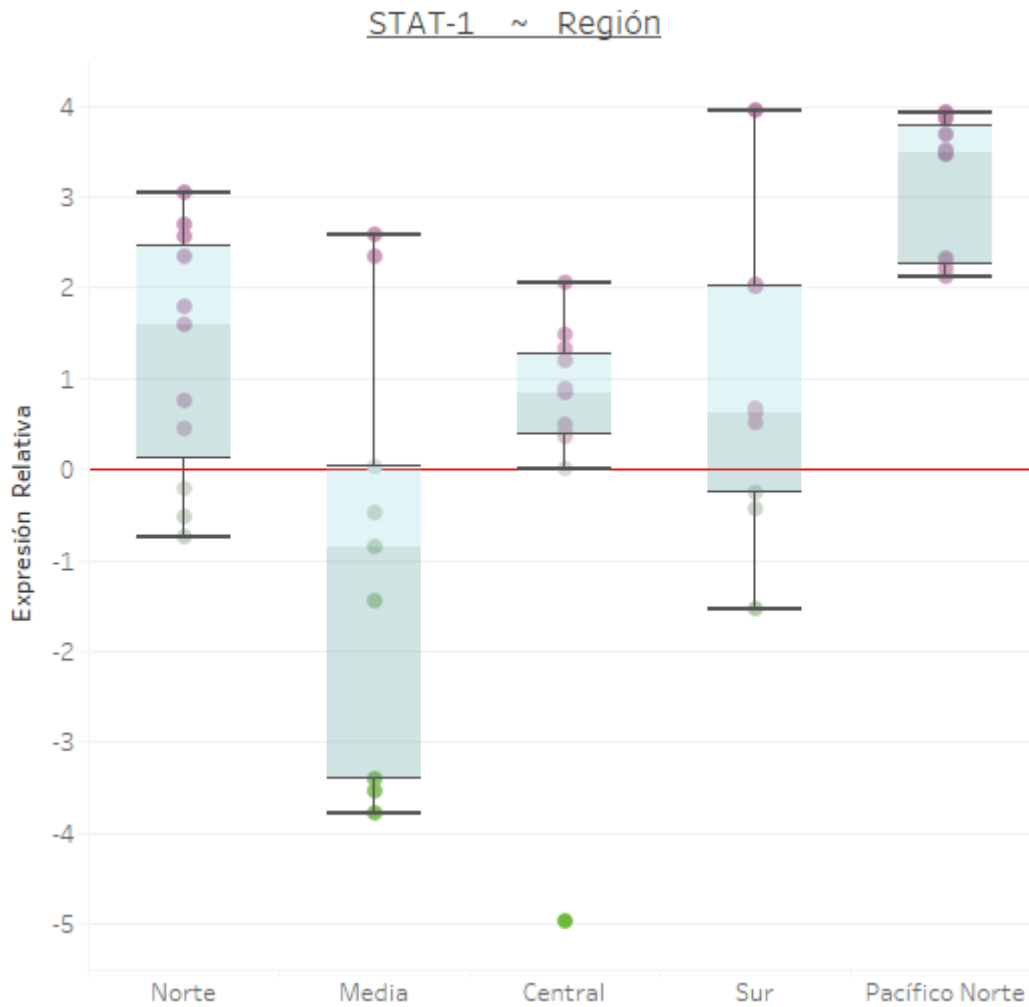


Figura 22. Transcripción relativa de STAT-1 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Eomes

Eomes no varió en sus niveles de transcripción entre regiones, (GLM, $X^2= 1.29$, $gl =37$, $p= 0.68$; Fig. 23)

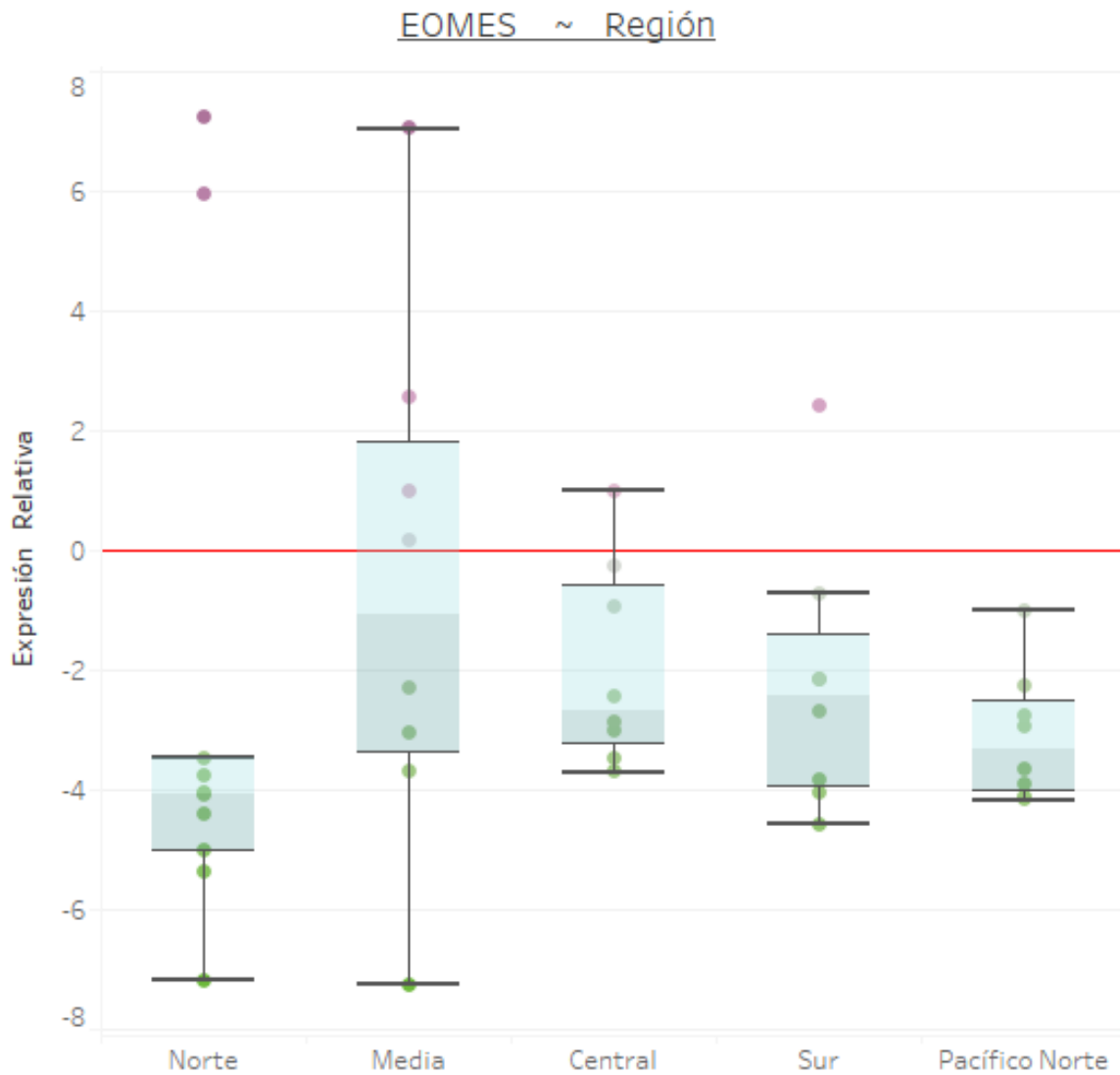


Figura 23. Transcripción relativa de eomes en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Tbx21

La expresión relativa de *Tbx21* no varió entre regiones (GLM, $X^2 = 0.05$, $gl = 44$, $p = 0.20$; Fig. 24).

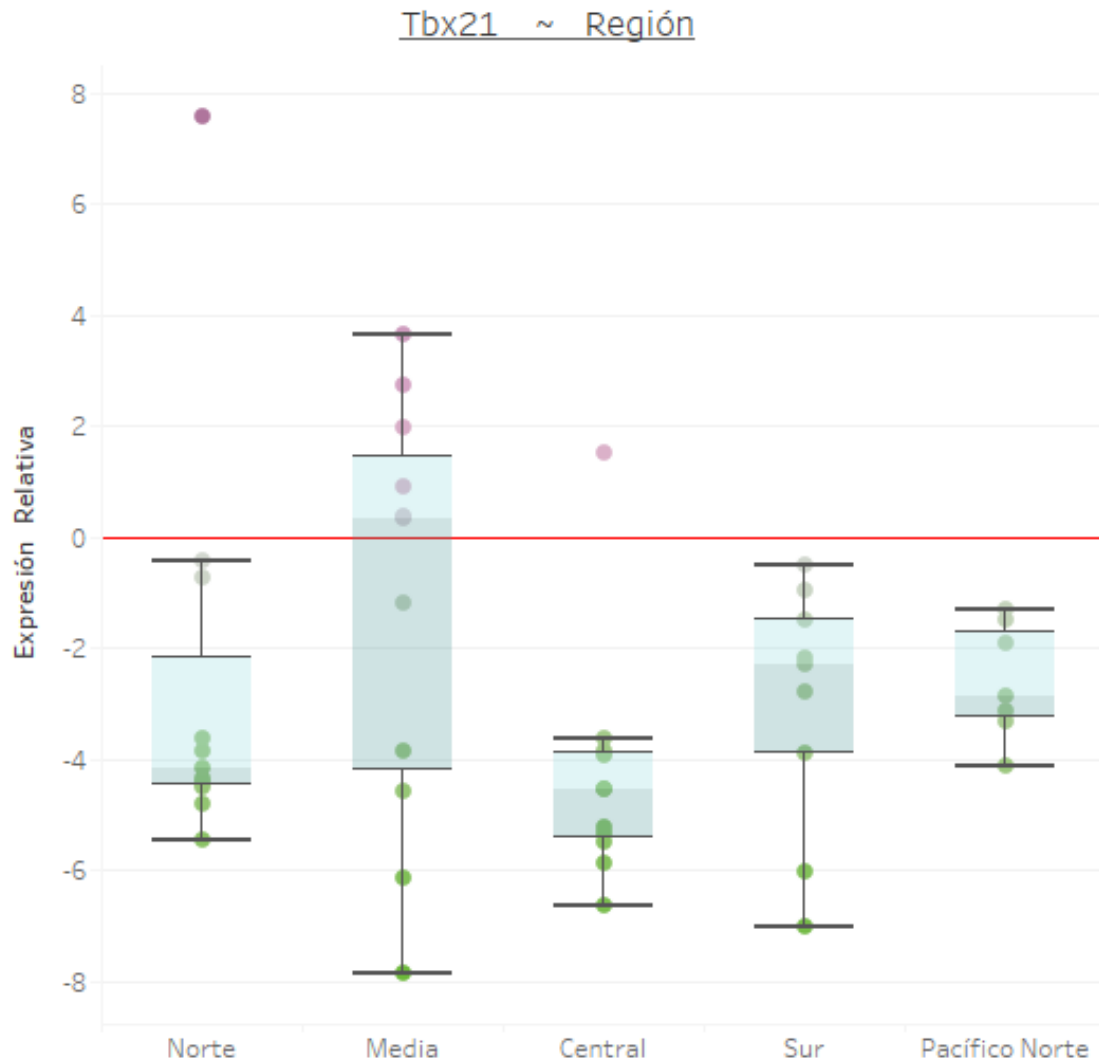


Figura 24. Transcripción relativa de *Tbx21* en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

GATA-3

La transcripción de GATA-3 no fue diferente entre regiones (GLM, $X^2 = 2.44$, $gl = 47$, $p = 0.73$; Fig. 25).

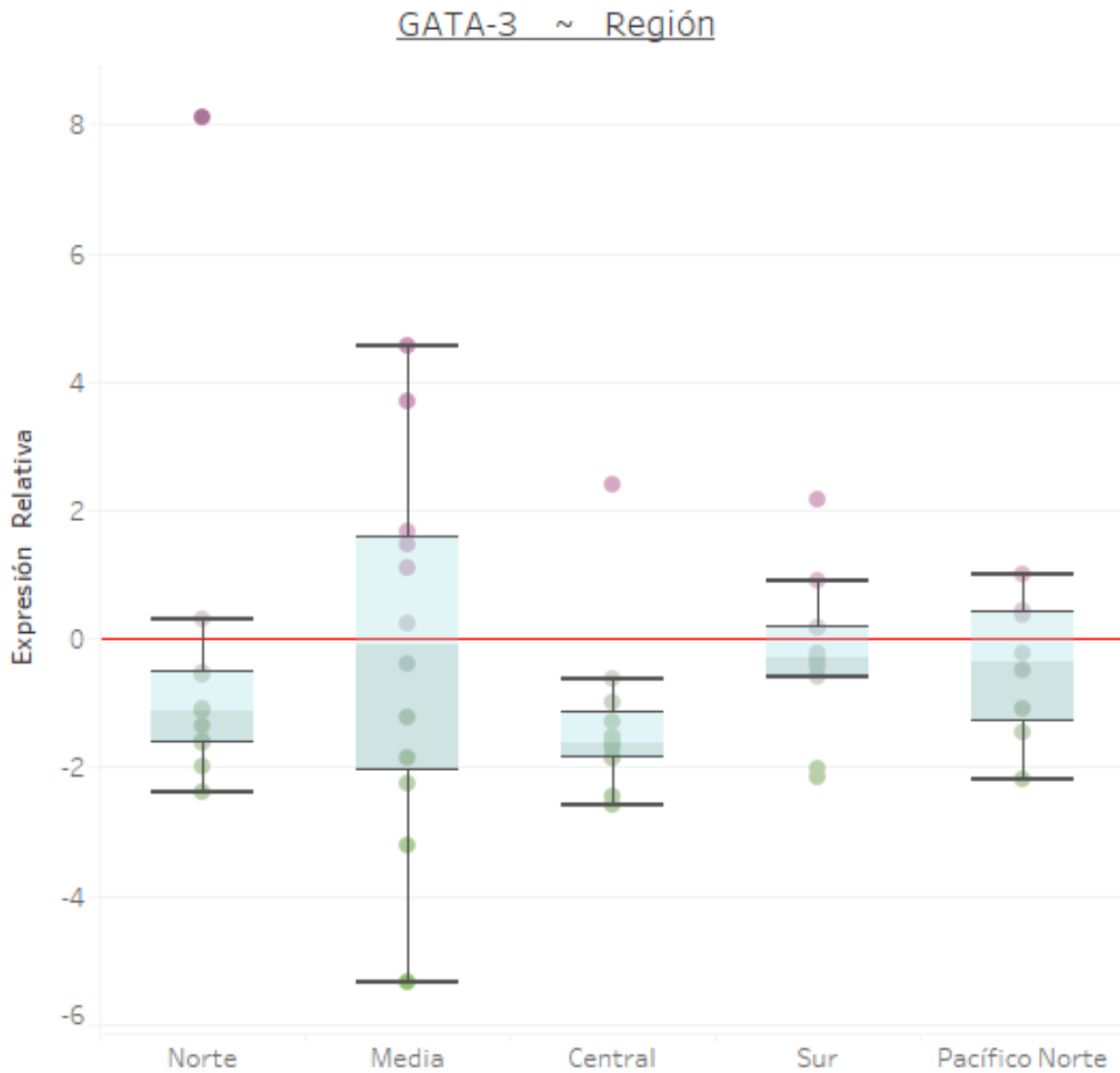


Figura 25. Transcripción relativa de GATA-3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

STAT-6

La expresión de STAT-6 no varió entre regiones (GLM, $X^2 = 3.69$, $gl=30$, $p = 0.63$; Fig. 26). En todas las regiones, a excepción de unos cuantos individuos, se sobreexpresó con respecto a los genes de referencia, en algunos animales hasta 5 veces más.

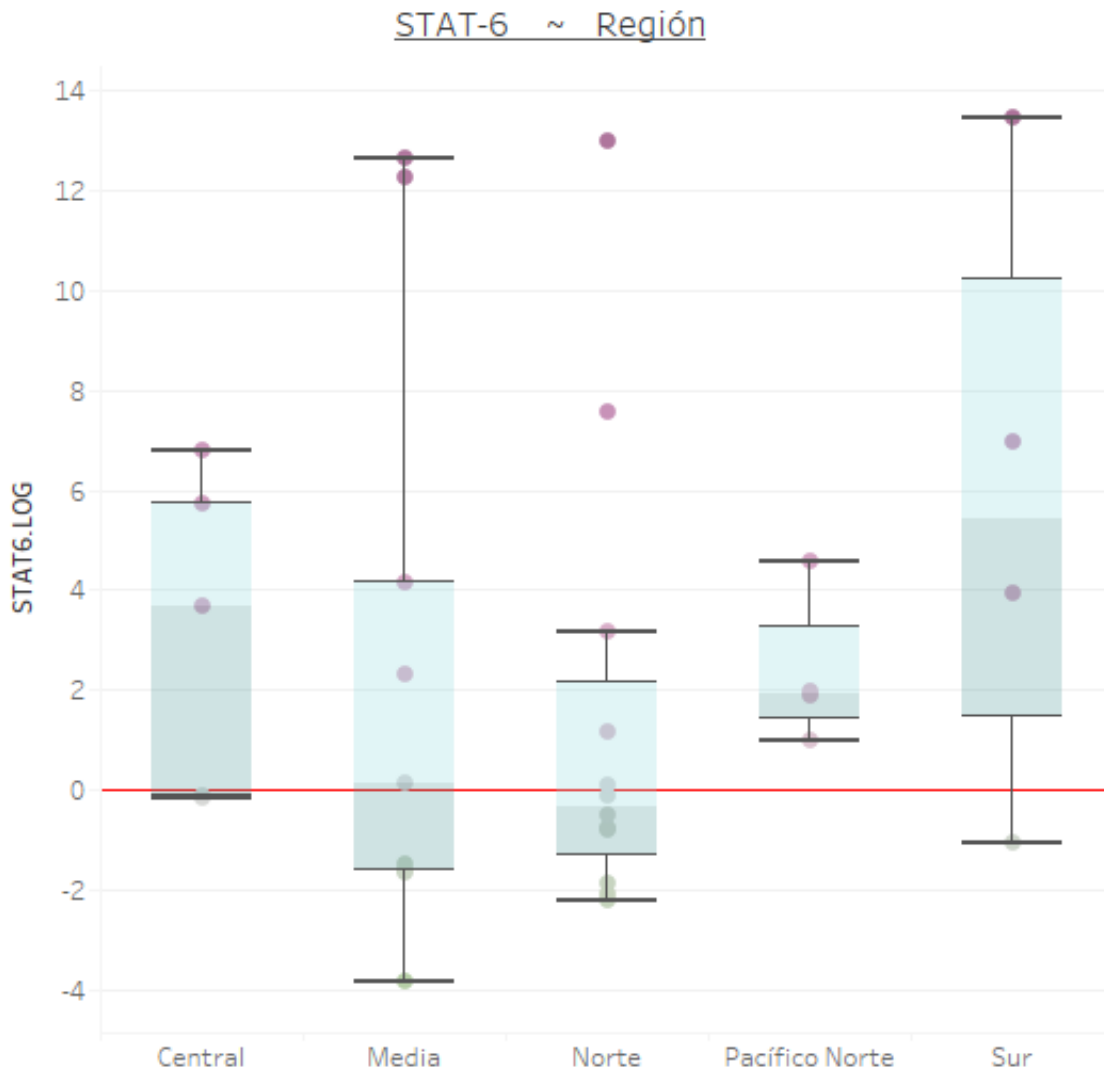


Figura 26. Transcripción relativa de STAT-6 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

FOXp3

El gen FOXp3 no varió sus los niveles de expresión en el tejido genital entre regiones ecológicas (GLM, $X^2 = 0.02$, $gl = 44$, $p = 0.45$; Fig. 27). En la mayoría de los individuos, la expresión fue menor que la de los genes de referencia, hasta más de 5 veces.

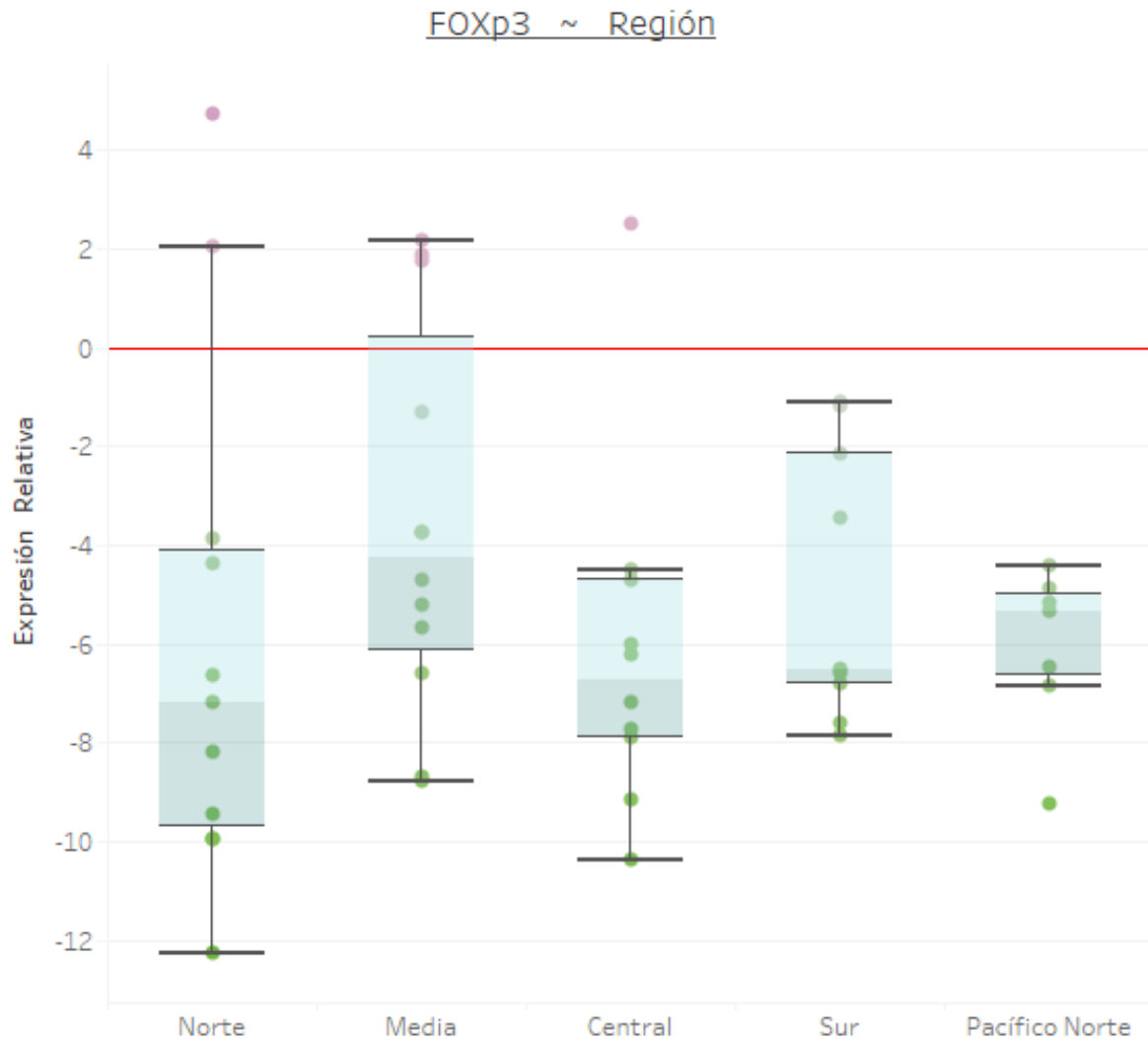


Figura 27. Transcripción relativa de FOXp3 en células epiteliales genitales de hembras de lobo marino de California muestreadas en diferentes regiones del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras a nivel sistémico y a nivel local.

Peñín y *cols.*, (2019) analizaron el perfil transcripcional de los genes que participan en la actividad de las células T citotóxicas, NK y de la actividad inmunomoduladora en linfocitos sanguíneos en CSL. Observaron diferencias regionales en la expresión de genes, resaltando un patrón de expresión que aumenta de norte a sur en genes relacionados con respuestas Th1 y Th2. Dada la diferencia en la regulación de respuestas inmunes sistémicas y mucosales que se ha descrito para el humano y algunos animales de laboratorio (Nazki *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2021), se planteó el objetivo de investigar las diferencias entre los perfiles de expresión sistémico determinados por Peñín y colaboradores y los perfiles de expresión a nivel del epitelio genital para los mismos animales. A continuación, se presenta el perfil transcripcional entre las regiones estudiadas a nivel local (arriba) y a nivel sistémico (abajo).

Ly49

La expresión de Ly49 a nivel y sistémico no varió (GLM, $F_{1,33} = 0.00$, $p = 0.97$; Fig. 28).

La expresión de Ly49 a nivel local estuvo subexpresada con respecto a los genes de referencia hasta 8 veces menos a comparación de la expresión a nivel sistémico.

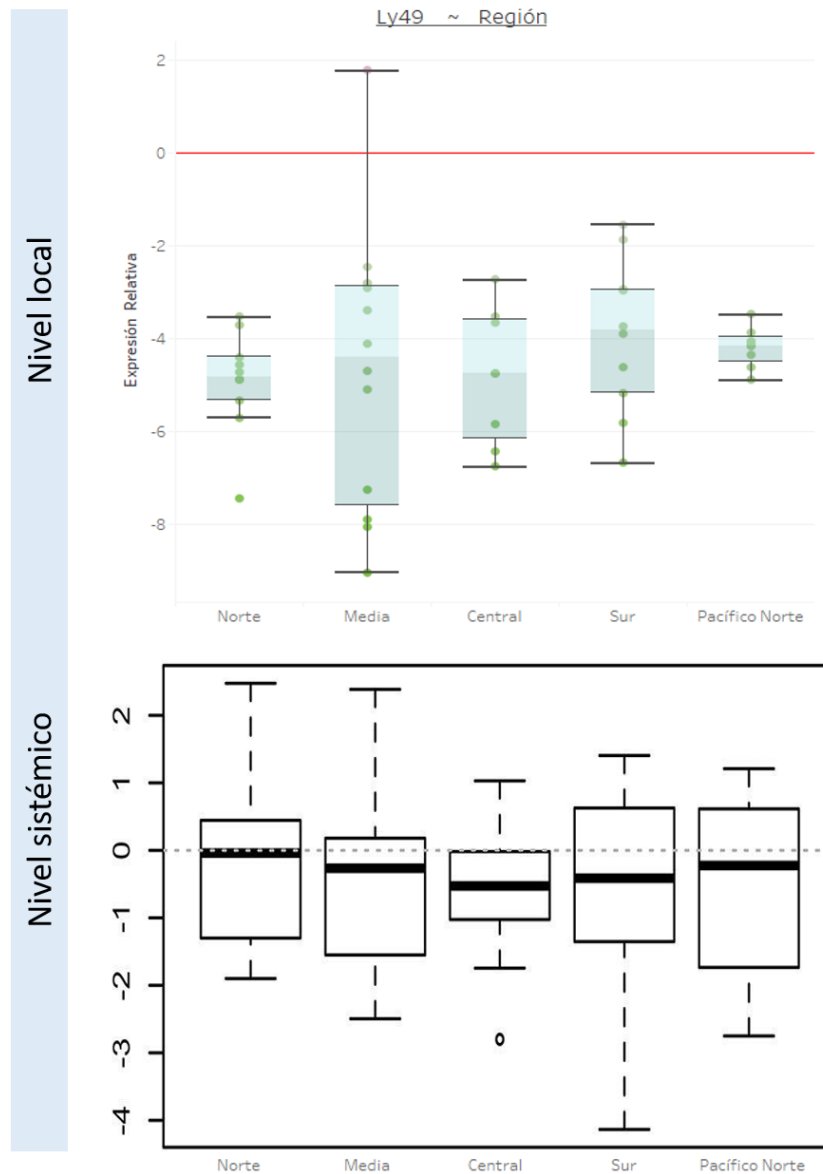


Figura 28. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de Ly49 entre las diferentes regiones.

Perforina

La expresión de perforina a nivel local es diferente de la expresión de perforina a nivel sistémico (GLM, $F_{1,9} = 4.94$, $p = 0.05$; Fig. 29). A nivel local y sistémico estaba subexpresada con respecto a los genes de referencia, sin embargo, a nivel local la expresión fue de hasta 4 veces menos que la expresión a nivel sistémico.

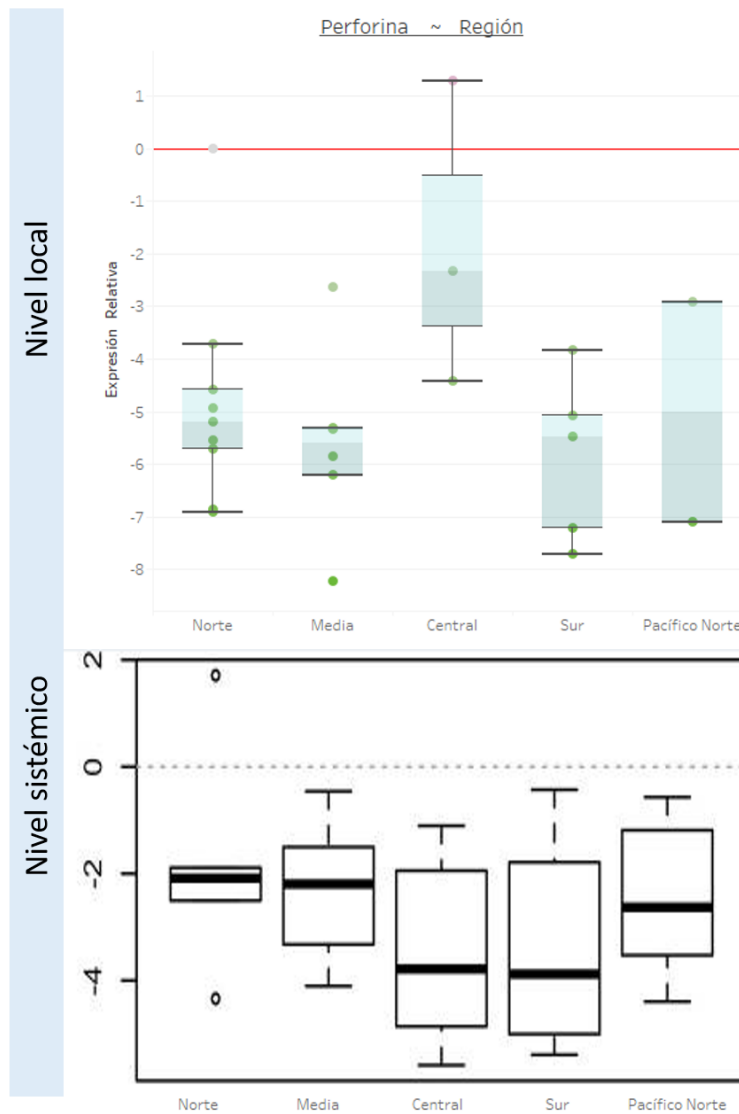


Figura 29. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de perforina entre las diferentes regiones.

Granzima B

La expresión de Granzima B a nivel local no difiere de la expresión a nivel sistémico (GLM, $F_{1,27} = 0.00$, $p = 0.95$; Fig. 30). Sin embargo, granzima B se observó sobreexpresada a nivel sistémico y subexpresada a nivel local con respecto a los genes de referencia. Algunos animales presentaron sobreexpresión de Granzima B a nivel de mucosas, hasta 8 veces más que los genes de referencia.

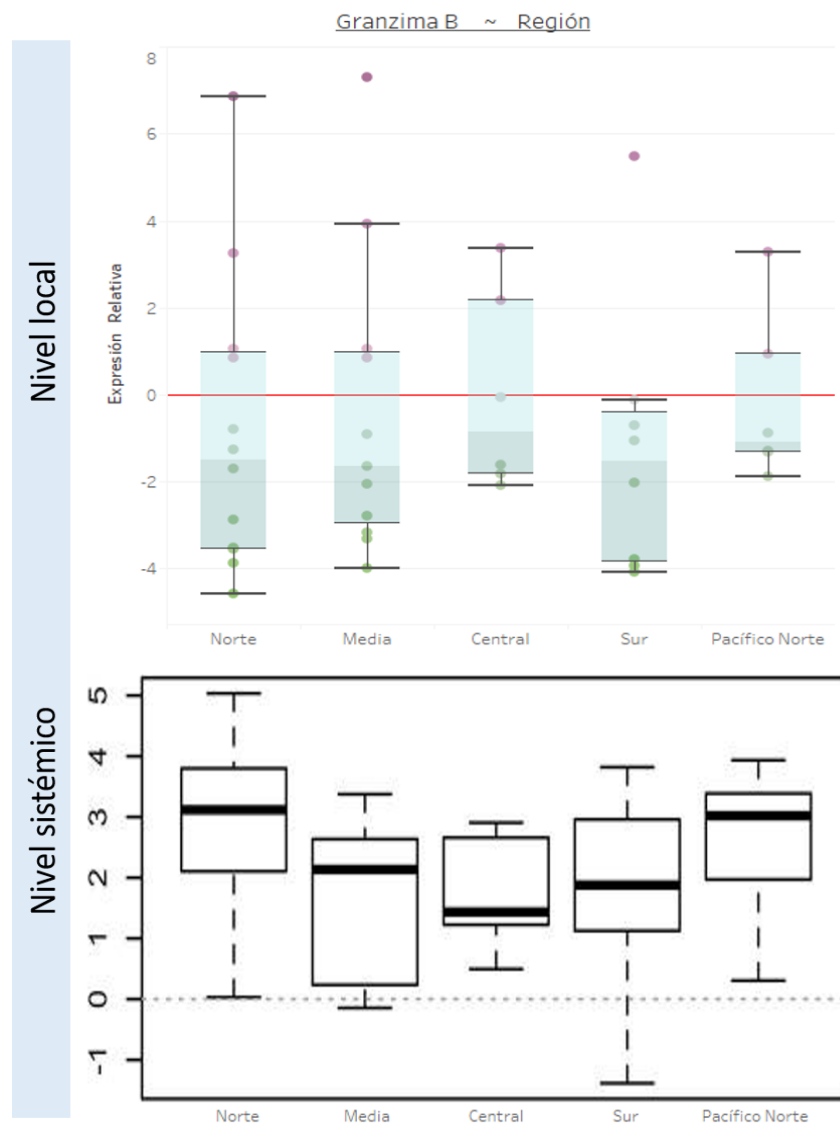


Figura 30. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de granzima B entre las diferentes regiones.

STAT-1

La expresión de STAT-1 a nivel local no varió con respecto a la expresión a nivel sistémico (GLM, $F_{1,33} = 0.42$, $p = 0.51$; Fig. 31). Se sobreexpresó con respecto a los genes de referencia a nivel local y sistémico, a excepción de la región Media, mostrando una misma tendencia entre la expresión de sangre y mucosas.

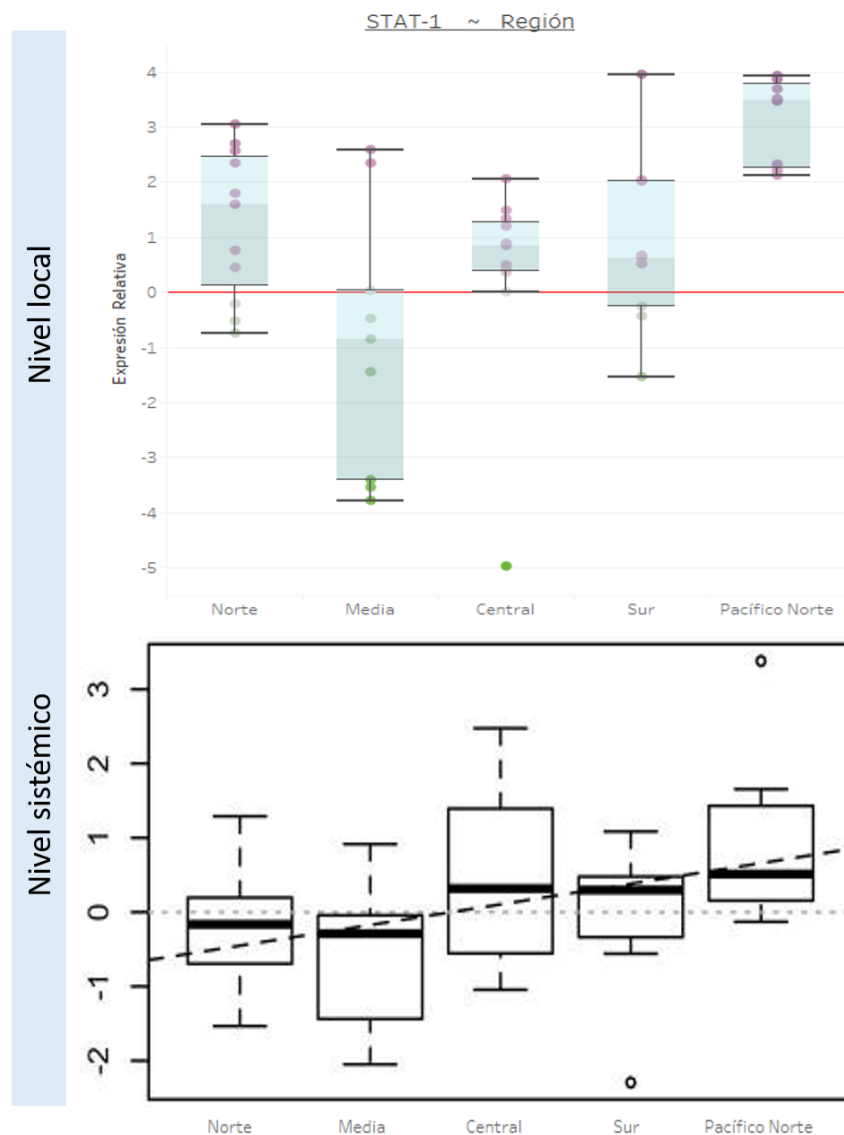


Figura 31. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de STAT-1 entre las diferentes regiones.

Eomes

La expresión de Eomes a nivel local no difiere de la expresión a nivel sistémico (GLM, $F_{1,16} = 0.49$, $p = 0.49$; Fig. 32). Se subexpresó a nivel local con respecto a los genes de referencia en todas las regiones a excepción de 7 animales, a diferencia del nivel sistémico que se sobreexpresó en la mayoría de las regiones a excepción de la región Media y Central.

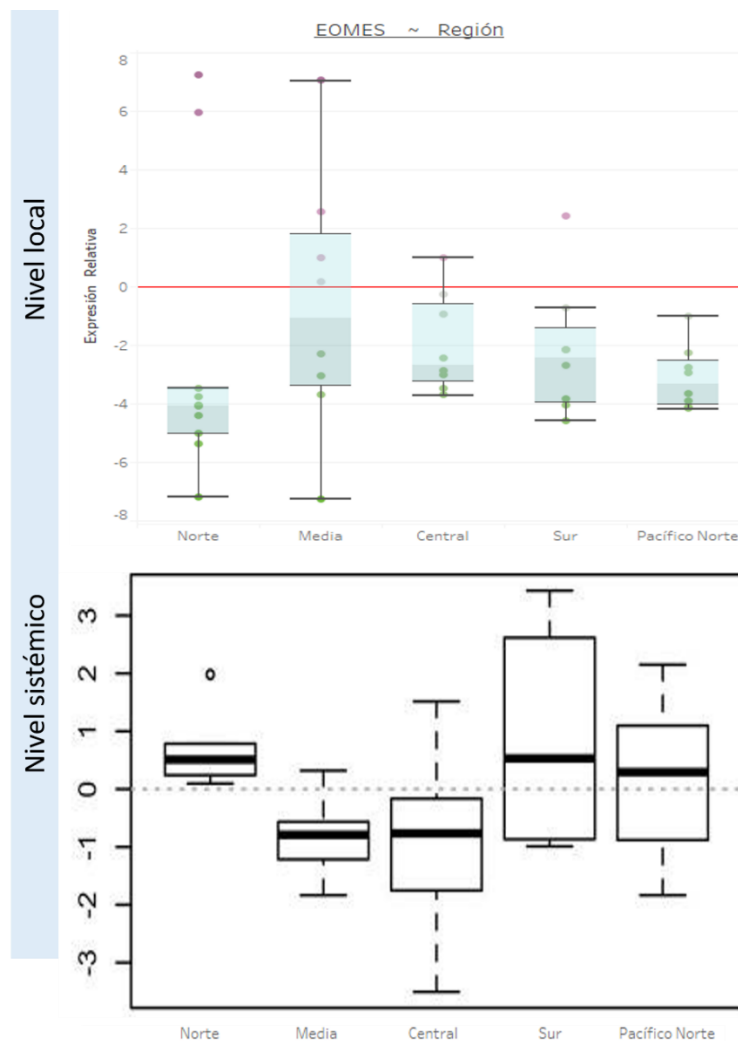


Figura 32. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de eomes entre las diferentes regiones.

Tbx21

La expresión de Tbx21 a nivel local y sistémico no varió (GLM, $F_{1,31} = 0.24$, $p = 0.62$; Fig. 33).

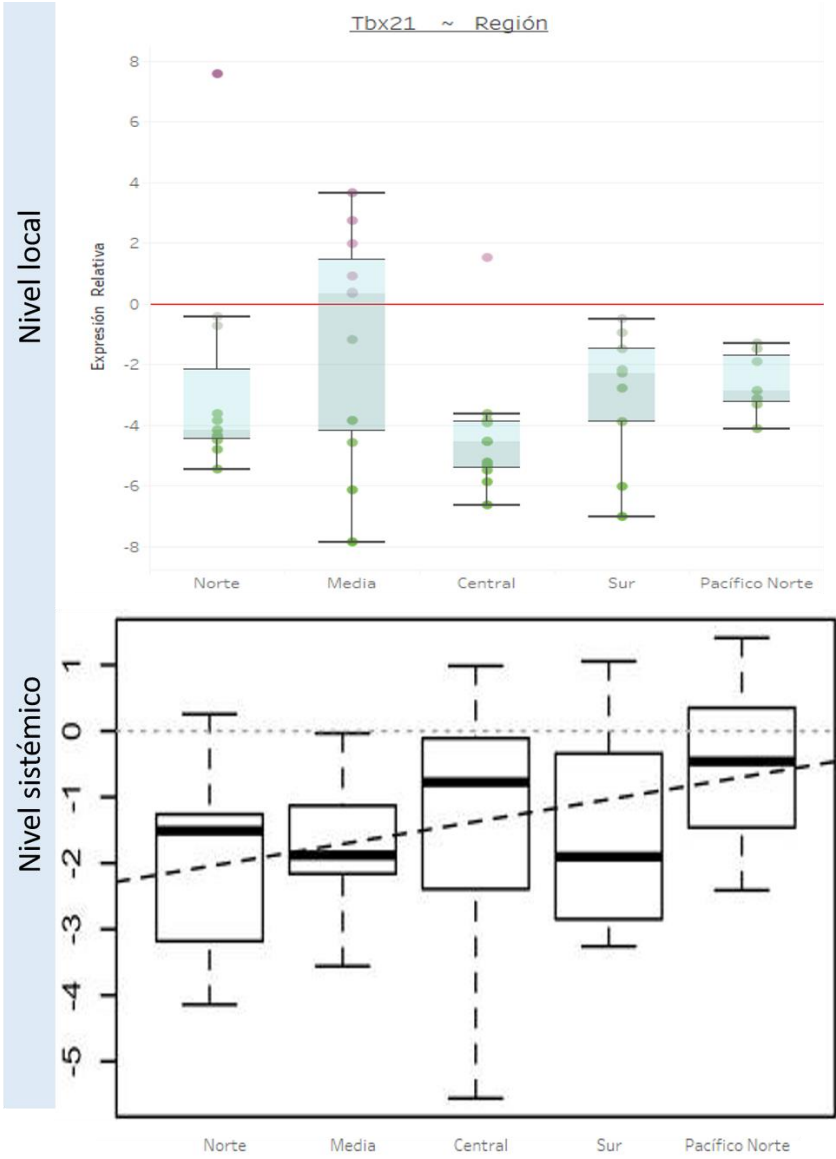


Figura 33. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de Tbx21 entre las diferentes regiones

GATA-3

La expresión de GATA-3 a nivel local no es diferente de la expresión a nivel sistémico (GLM, $F_{1,33} = 0.58, p = 0.44$; Fig. 34).

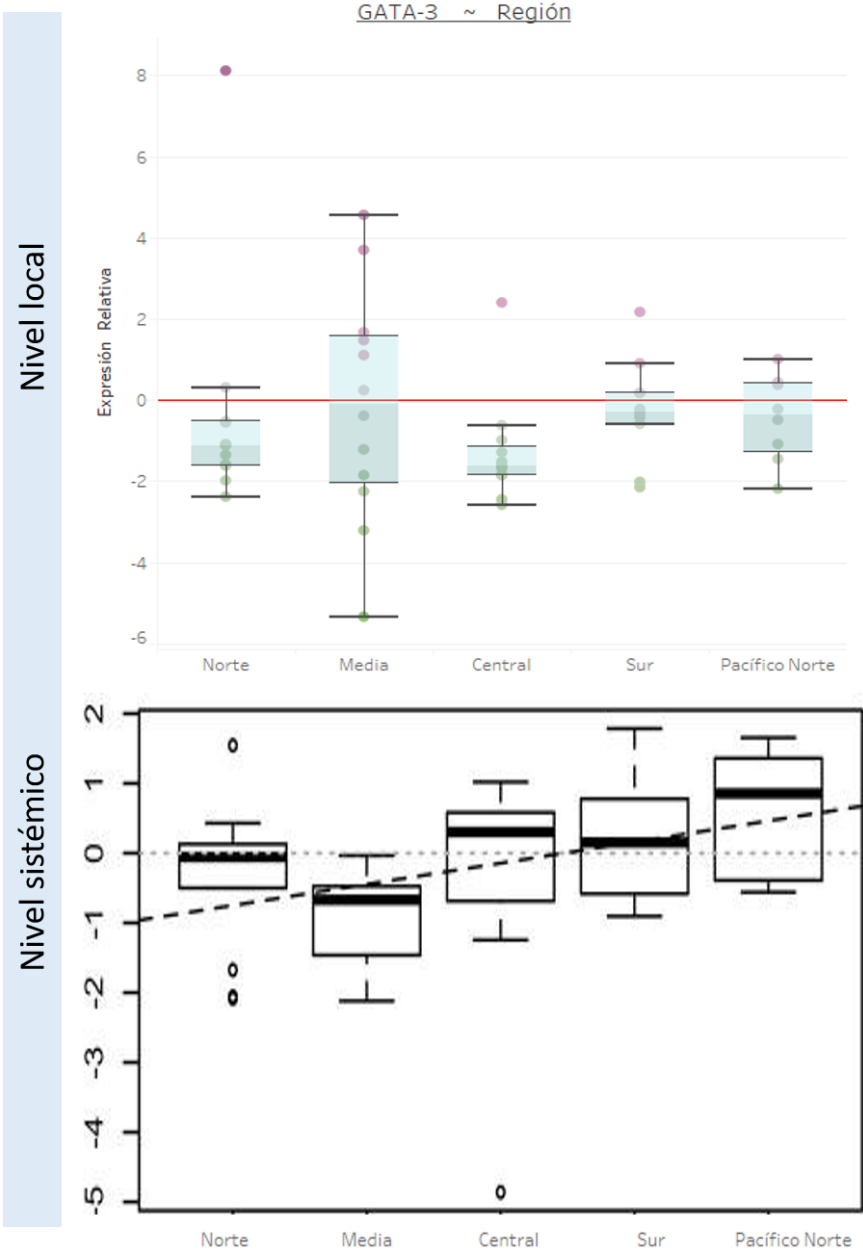


Figura 34. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de GATA-3 entre las diferentes regiones

FOXp3

La expresión de Foxp3 a nivel local y a nivel sistémico no varió (GLM, $F_{1,27} = 0.00$, $p = 0.98$; Figura 35).

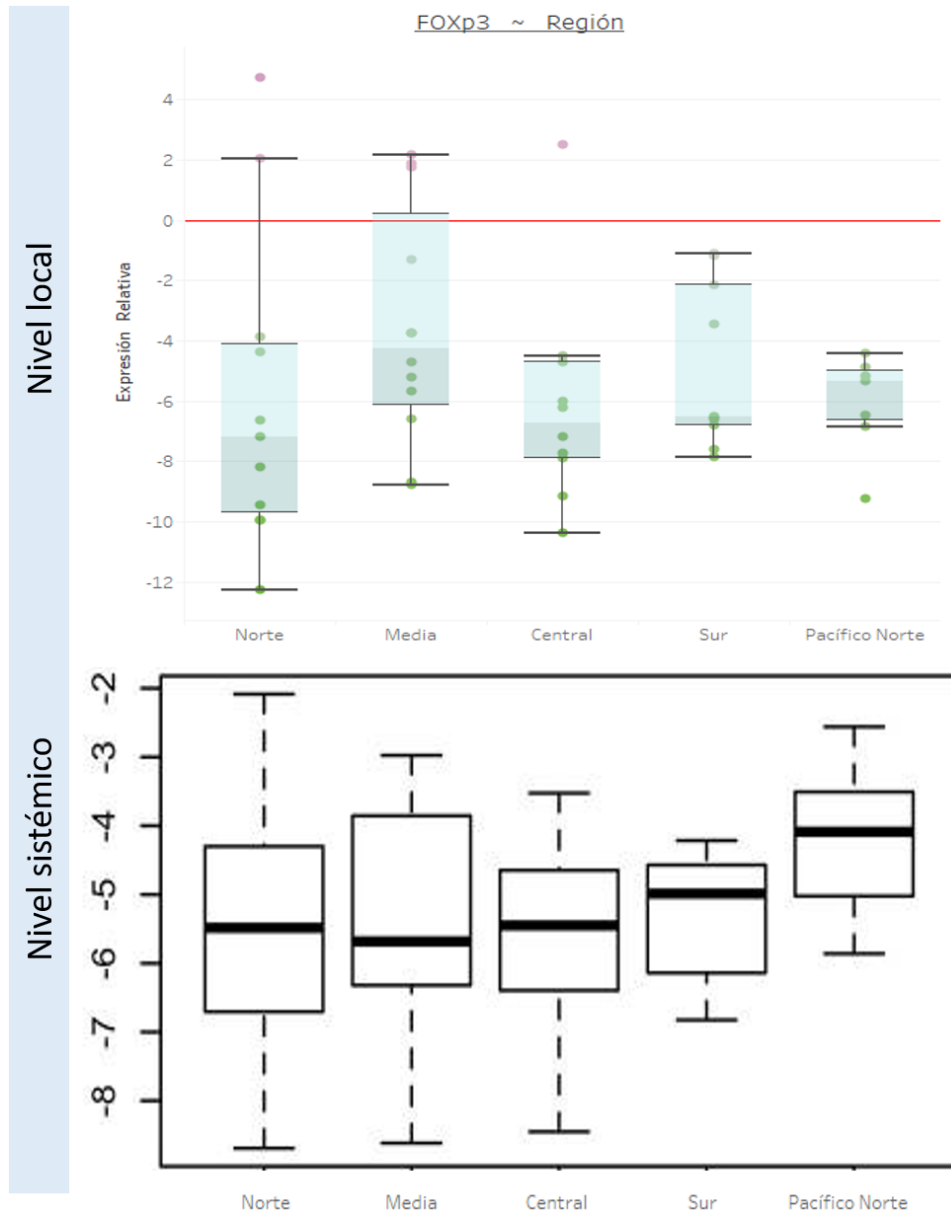


Figura 35. Comparación de los patrones de expresión a nivel local y sistémico de FOXp3 entre las diferentes regiones

Evaluar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función del nivel de displasia celular.

Todas las muestras fueron analizadas en busca de transformación celular según los criterios explicados en la metodología de este estudio.

La expresión de los genes KIR, Ly49, perforina, Granzima B, STAT-1, eomes, Tbx21, GATA-3, FOXP3 y STAT-6 no variaron significativamente de acuerdo al estado citológico del epitelio genital de las hembras adultas (en todos los casos $p > 0.05$, ver Anexo III).

Evaluar el patrón transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función de infección por OthV-1 y papillomavirus ZcPV-1.

Se detectó OthV-1 en el 49% de los individuos muestreados (total de muestras analizadas 53) y ZcPV-1 en el 39% de los individuos (total de muestras analizadas 51). El 26 % de los individuos presentaron infección simultánea por ambos virus, y el 37% de los individuos no presentaron infección por ninguno de los dos virus.

La expresión de los genes KIR, perforina, Granzima B, STAT-1, GATA-3 y FOXP3 no variaron significativamente de acuerdo al estado de infección viral en el epitelio genital de las hembras adultas (en todos los casos $p > 0.05$, ver Anexo III).

Ly49

Los valores de expresión para Ly49 variaron de acuerdo al estatus de infección (GLM, $F_{3,44} = 4.45$, $p=0.00$; Fig. 36), siendo mayor la expresión en los animales que no presentaron infección por ninguno de los virus. La expresión de los individuos con infección por ZcPV-1 fue mayor en comparación con los infectados por OthV-1.

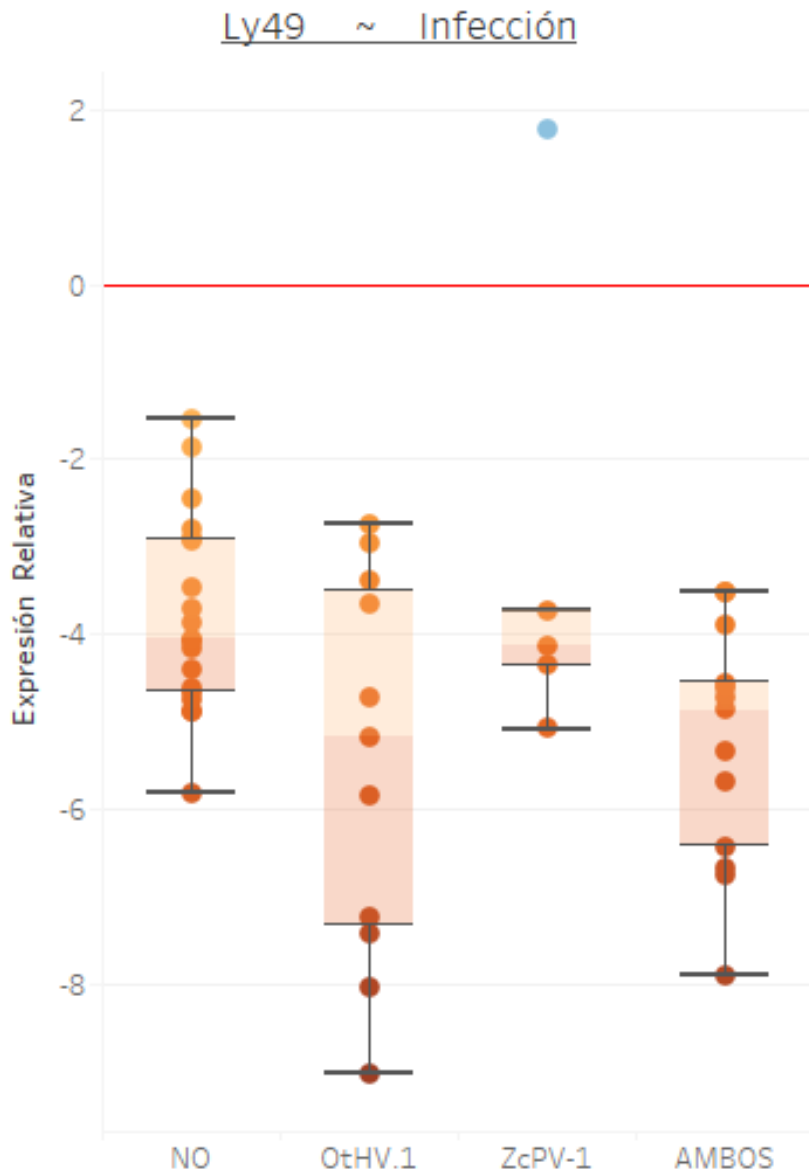


Figura 36. Niveles de transcripción de Ly49 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

Eomes

La expresión de eomes varió de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2 = 1.13$, $gl= 38$, $p= 0.03$; Fig. 37), siendo más alta en el epitelio infectado con ZcPV-1 y más baja cuando había una infección simultánea.

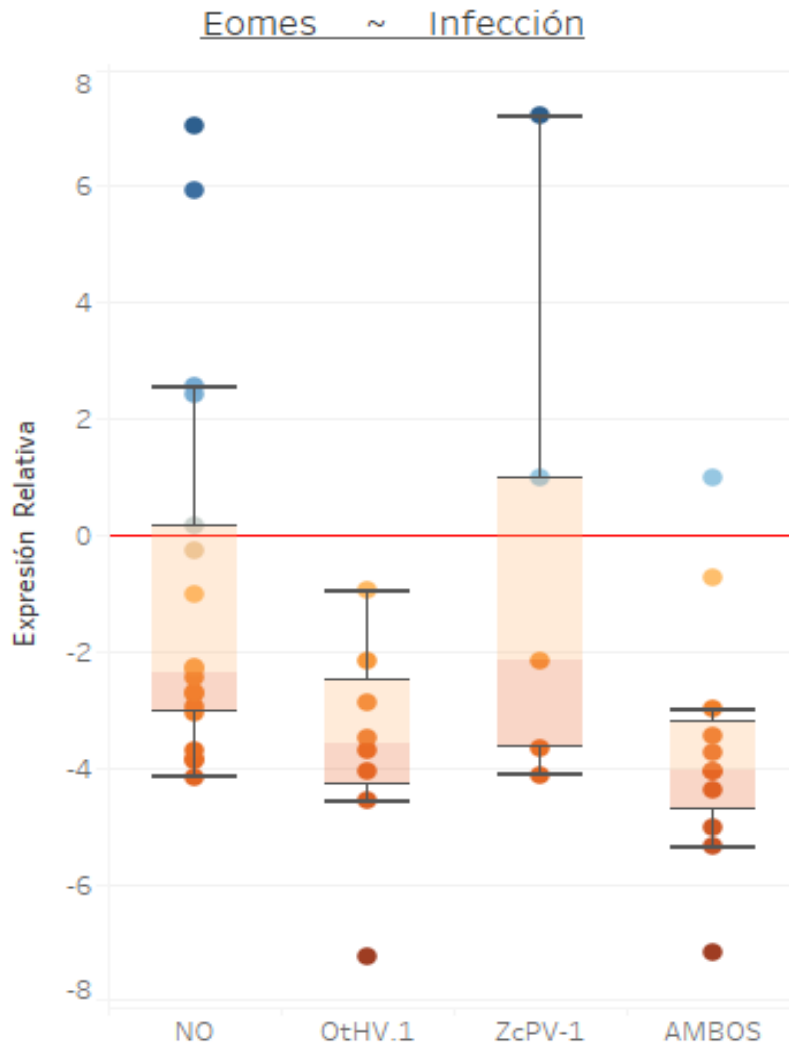


Figura 37. Niveles de transcripción de eomes según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

Tbx21

La expresión de *Tbx21* varió de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2 = 0.05$, $gl = 45$, $p = 0.03$; Fig. 38), siendo la expresión más alta en individuos con infección por ZcPV-1 y la infección más baja en individuos con infección por OtHV-1 e infección simultánea

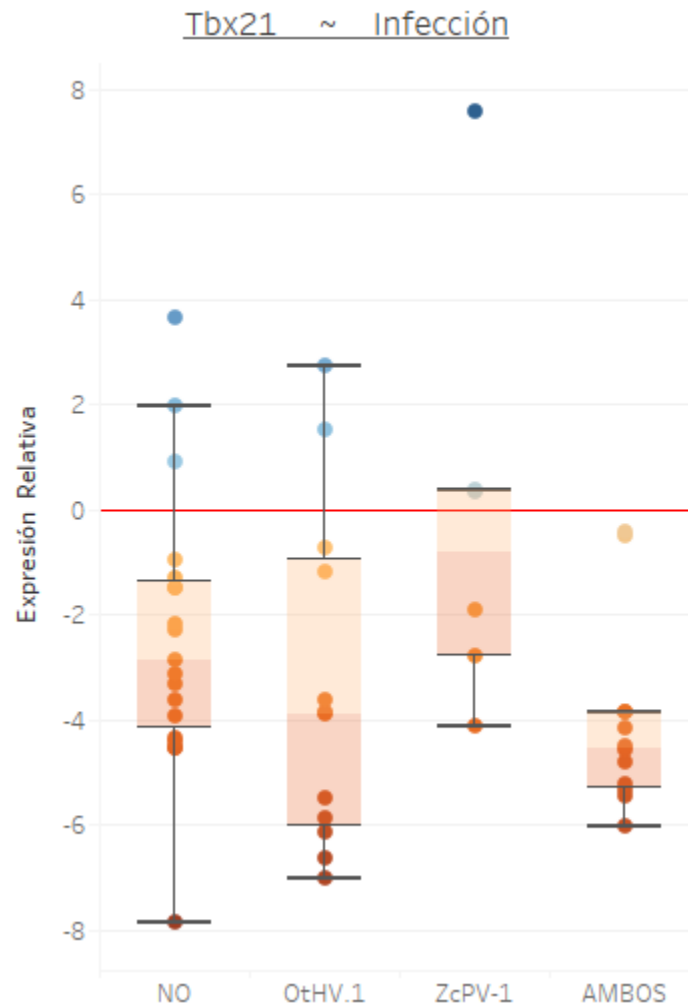


Figura 38. Niveles de transcripción de *Tbx21* según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

STAT-6

La expresión de STAT-6 varió de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2 = 2.90$, $gl = 31$, $p = 0.00$; Fig. 39), siendo más alta en epitelios sin infecciones en comparación a la expresión de epitelios con infección de OtHV-1 y ZcPV-1.

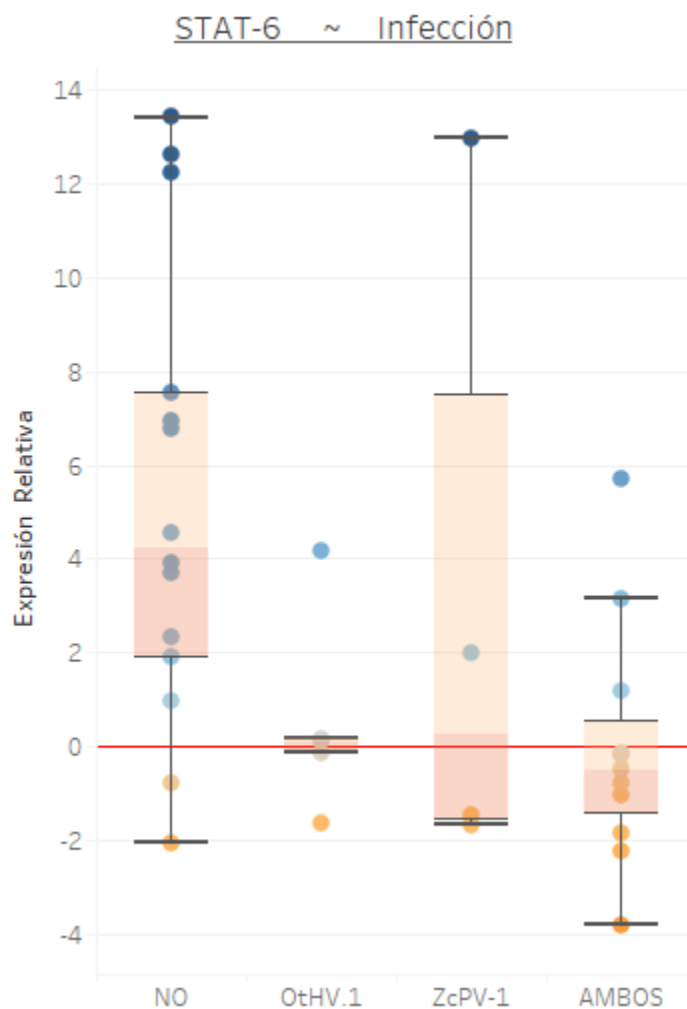


Figura 39. Niveles de transcripción de STAT-6 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

Identificar cambios morfológicos celulares sugestivos a neoplasias intraepiteliales en hembras adultas varadas en las costas de California.

Se revisaron laminillas citológicas del epitelio cervical de 22 hembras adultas varadas en las costas de California E.E.U.U. Dos laminillas (9%) fueron interpretadas, de acuerdo al Sistema Bethesda como células escamosas atípicas (ASC); células atípicas de significado indeterminado (ASC-US) se presentó en dos laminillas (9%); LSIL se interpretó en 3 laminillas (15%); nueve laminillas (40%) fueron negativas a lesiones intraepiteliales debido a la ausencia de cambios morfológicos atípicos y seis (27%) fueron no satisfactorias para su interpretación (Fig. 40). Ningún caso fue interpretado como HSIL ni carcinoma *in situ*. Se obtuvieron reportes de necropsia de 12 (54%) de los animales evaluados para la comparación del diagnóstico citológico con las lesiones observadas a la necropsia.

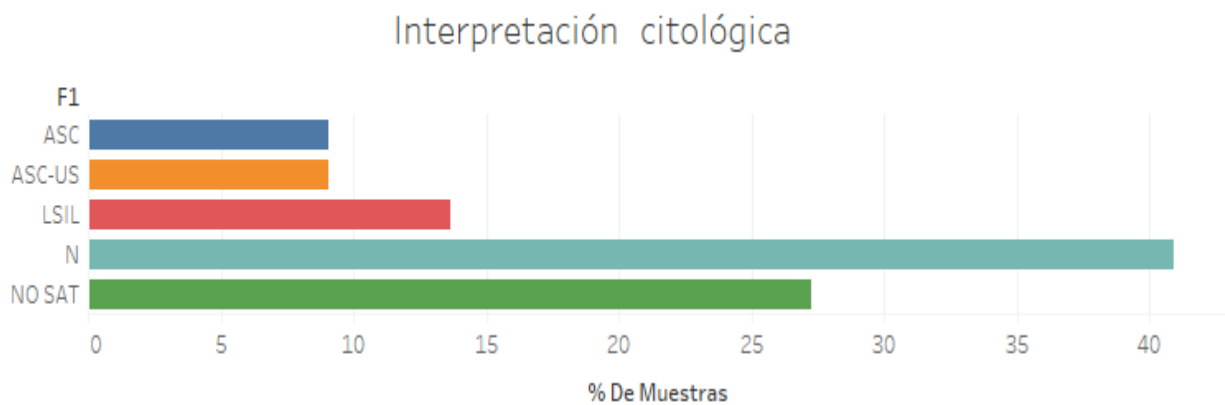


Figura 40. Interpretación citológica de las laminillas analizadas

Durante el análisis de las muestras citológicas se describió la morfológica y los cambios encontrados y de acuerdo a esto se le asignó una categoría diagnóstica de acuerdo al Sistema Bethesda (Cuadro 5).

Cuadro 5. Morfología observada en la citología cervical y su interpretación según el sistema Bethesda. NS= No satisfactoria

ID	Cambios morfológicos observados	Interpretación
CSL-13720	Atipia celular: Hiper cromasia. Pleomorfía nuclear. Queratohialina. Epitelio atrófico. Inflamación +	ASC
CSL-13724	Atipia celular: intermedias binucleadas.	ASC
CSL-13881	Cambios metaplásicos. Metaplasia escamosa inmadura. Disqueratosis. Binucleación. Pleomorfía nuclear. Inflamación +++. Epitelio atrófico.	ASC-US
CSL- 13745	Atipia celular: binucleación, hiper cromasia leve. Pleomorfía nuclear. Anisonucleosis. Epitelio atrófico. Inflamación +	ASC-US
CSL-13729	Atipia celular: Hiper cromasia. Pleomorfía nuclear. Pleomorfía de bordes citoplasmáticos. Relación núcleo/citoplasma anormal. Binucleación en células intermedias. Cromatina granular. Epitelio atrófico. Displasia leve	LSIL
CSL-13737	Atipia celular: Hiper cromasia. Pleomorfía nuclear. Anisonucleosis. Binucleación. Coilocitos. Epitelio atrófico. Displasia leve	LSIL
CSL-14128	Atipia celular: Hiper cromasia. Pleomorfía nuclear. Anisonucleosis. Coilocitos. Inflamación +. Epitelio atrófico. Displasia leve	LSIL
CSL-13731	Cambios metaplasicos. Metaplasia escamosa inmadura. Inflamación +++	NEGATIVO
CSL-13615	Sin cambios morfológicos atípicos. Queratohialina. Epitelio atrófico. Inflamación +	NEGATIVO
CSL-13721	Sin cambios morfológicos atípicos. Queratohialina. Epitelio atrófico. Inflamación ++	NEGATIVO
CSL-728	Sin cambios morfológicos atípicos. Epitelio atrófico.	NEGATIVO
CSL-13749	Sin cambios morfológicos atípicos. Carriorexix. Disqueratosis. Epitelio atrófico Inflamación +++ severa.	NEGATIVO
CSL-14131	Sin cambios morfológicos atípicos. Carriorexix. Epitelio atrófico. Inflamación +++.	NEGATIVO
CSL-13916	Sin cambios morfológicos atípicos. Inflamación +	NEGATIVO
CSL-13725	Sin cambios morfológicos atípicos. Epitelio atrófico. Inflamación +.	NEGATIVO
CSL-14158	Presencia de célula endocervicales unicamente. Hiperplasia de células endocervicales	NS
CSL-14149	Cambios por Carriorexix. Inflamación +++ . Poca celularidad. Epitelio atrófico.	NS
CSL-13723	Mala fijación. Cambios atróficos.	NS
CSL-14039	Poca celularidad. Inflamación +.	NS
CSL-14060	Poca celularidad. Mala fijación.	NS
CSL-14125	Mala fijación. Cambios atróficos. Inflamación+	NS

Se identificaron cinco tipos celulares indicadores de cambios morfológicos de importancia diagnóstica, células metaplásicas, binucleadas, pleomorfas, hiper Cromáticas y coilocitos (Fig. 41).

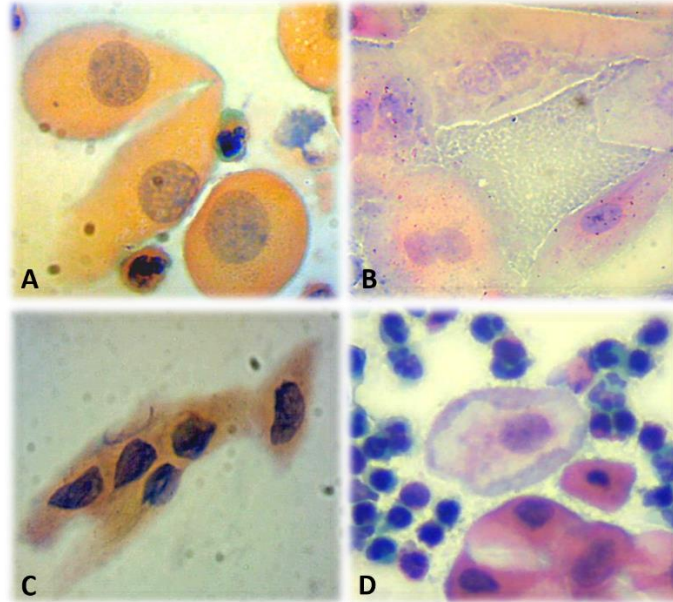


Figura 41. Cambios morfológicos celulares encontrados en el tracto genital de hembras de lobo marino de California. A) Células metaplásicas. B) Células binucleadas. C) Núcleos pleomórficos e hiper Cromáticos. D) Coilocito

Identificar fenotipos celulares característicos de infección por el papiloma virus.

Se observó la presencia de coilocitos en tres de las muestras citológicas, con el número de ID *CSL-13737*, *CSL-13729*, *CSL-14128* (Figuras 42-44).

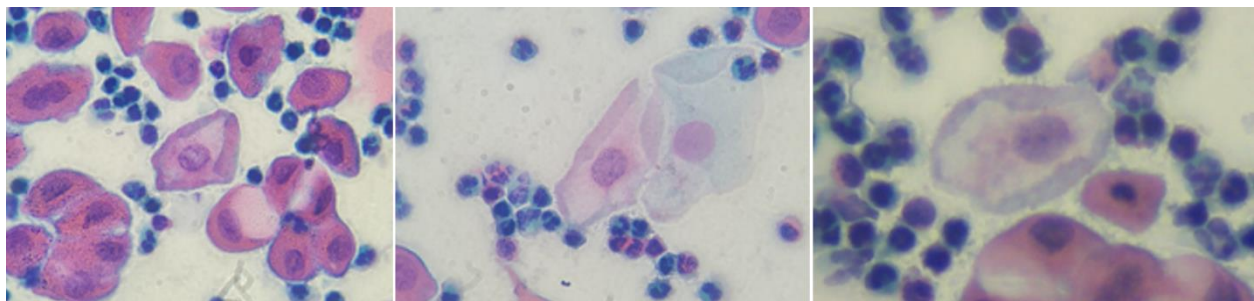


Figura 42. Coilocitos observados en la citología de *CSL-13737*.

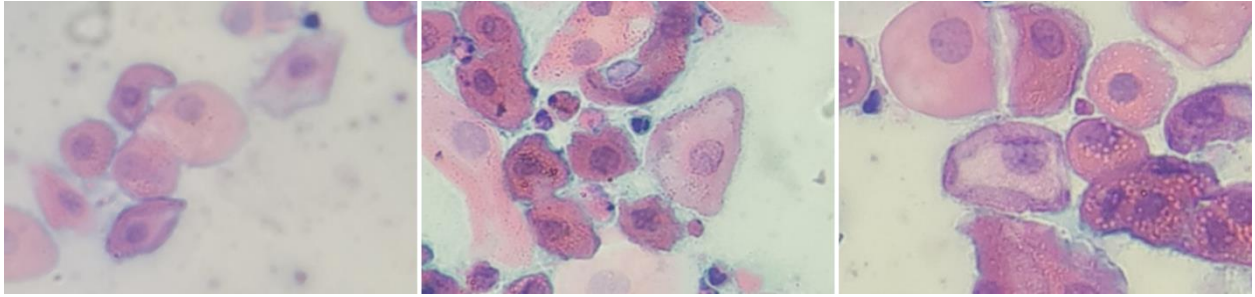


Figura 43. Coilocitos observados en la citología de *CSL-13729*

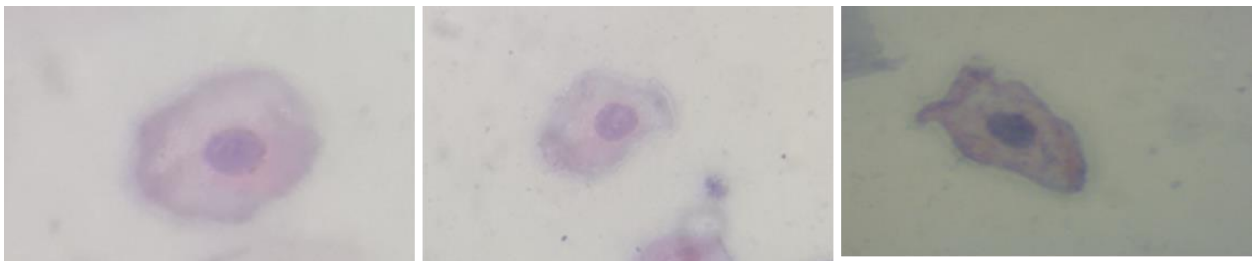


Figura 44. Coilocitos observados en la citología de *CSL-14128*

Debido a que se observó la presencia de coilocitos en las citologías de CSL, se contaron estas células por muestra. El individuo *CSL-13737* tenía 6 coilocitos, *CSL-13729* 10 coilocitos y *CSL-14128* 15 coilocitos.

VIII. DISCUSIÓN

La importancia del conocimiento de los distintos procesos inmunitarios de animales de vida libre, principalmente aquellos que son centinelas del ecosistema, radica en que nos permite estudiar de manera íntegra el estado de salud de los animales y los cambios en el ecosistema, lo que nos refleja el estado actual del entorno ambiental. En este estudio se analizaron las diferencias en los niveles de transcripción relativa de genes expresados por células inmunes que son relevantes para las respuestas antivirales y antitumorales en el epitelio genital de hembras de CSL y se investigó su variación temporal, espacial, y con respecto a la infección por virus oncogénicos. Debido a la poca información detallada del sistema inmunológico en carnívoros acuáticos, los resultados se discuten de acuerdo a la información disponible en humanos y algunos animales de laboratorio.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre los años 2014, 2016 y 2020.

El primer objetivo fue comparar los niveles de transcripción relativa de los 10 genes clave entre los años de muestreo 2014, 2016 y 2020, lo que resulta relevante debido a la variación de las condiciones ambientales que se sabe que tienen impacto en la salud de los individuos (Banuet-Martínez *et al.*, 2017). Se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de genes que participan en la actividad de las células NK y en la citotoxicidad, KIR, granzima B, eomes y STAT-6 de acuerdo a los años de muestreo, mismas que a continuación se discutirán.

La familia de receptores KIR está presente principalmente en las células NK y algunas T CD8⁺, es un receptor involucrado en el reconocimiento de MHC I propio y es importante para la regulación citotóxica (Tu *et al.*, 2017). Por otro lado, la granzima B es una de las proteasas más importantes para ejercer citotoxicidad celular mediante la activación de la ruta de las caspasas y ejercer apoptosis en células infectadas por virus o tumorales (Montserrat Sanz *et al.*, 2013; Della Chiesa *et al.*, 2014). Eomes codifica para el factor de transcripción eomesodermina, se expresa en los linfocitos T CD8⁺ activados, regulando

la diferenciación en fases efectoras y de memoria. Además, regula la expresión de genes que codifican proteínas importantes para respuestas inmunitarias como IFN- γ , granzima B y perforina (Shimizu *et al.*, 2019). Se sabe que la deficiencia de eomesodermina resulta en una falta de diferenciación de las células T CD8⁺, por ende, es visto como un gen regulador clave en la inmunidad mediada por células (Pearce *et al.*, 2003). Las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT), que desempeñan un papel preponderante en las respuestas inmunitarias, también se vieron diferencialmente expresadas. STAT-6 participa en diversos procesos, entre ellos en el desarrollo de células Th2. Las respuestas de tipo Th2 son importantes para el control de parásitos helmintos y ante las reacciones alérgicas. (Kaplan *et al.*, 1996). Además, regula directamente la expresión de GATA-3, principal regulador de la diferenciación a células Th2 (Zheng & Flavell, 1997). Se detectó un patrón en la expresión de estos genes, a excepción de STAT-1, en donde la menor expresión se da en los años 2014 y 2016 a comparación del año 2020, en donde la expresión fue significativamente mayor.

El hecho de que estos genes de relevancia inmune se vean expresados en menor medida en el año 2014 y 2016, lleva a pensar en las variaciones climáticas repentinas, que impactan directamente en la fisiología de la flora y fauna marina (Gibson *et al.*, 2007). Los impactos del cambio climático en ambientes marinos engloban diversas variaciones que incluyen un aumento en la temperatura y el nivel del mar, cambios en la disponibilidad de presas que afectan la distribución, así como cambios en patrones migratorios y susceptibilidad a enfermedades (Learmonth *et al.*, 2006). El aumento de la temperatura superficial del mar (TSM) es una de las variaciones más estudiadas debido a las consecuencias desastrosas que conlleva, por ejemplo, La Oscilación del Sur (ENSO) con la categoría de El Niño y La Oscilación Decadal del Pacífico (PDO) con patrones de oscilaciones frías y cálidas (Bond & Harrison, 2000).

A finales del año 2013, comenzó una anomalía de la TSM (~100 m superiores) en el Golfo de Alaska, la anomalía de TSM más alta antes registrada, llamada "The blob", que fue creciendo por todo el noreste del Océano Pacífico, con una temperatura que excedió hasta 2-3 desviaciones estándar (Bond *et al.*, 2015). Esta ola de calor, tuvo una duración hasta el otoño e invierno del 2015-2016 (Di Lorenzo & Mantua, 2016).

Las anomalías de la TSM se registraron en la entrada del Golfo de California en el verano del 2014, con más de 4.5 °C (Leising *et al.*, 2015). Se presentaron dos periodos de calentamiento frente a las costas de Baja California; el primero surgió en mayo del 2014 hasta abril del 2015, relacionado a vientos débiles y, por ende, disminución de las surgencias que transportan agua fría; y la segunda, de septiembre a diciembre del 2015, ocasionada por el Niño (Robinson, 2016).

Otro fenómeno relevante, la Oscilación Decadal del Pacífico, comenzó a registrar valores positivos desde enero del 2014 hasta junio del 2015, lo cual se atribuye a los cambios cálidos de la TSM que iniciaron en el invierno del 2013 en el Pacífico nororiental, extendiéndose por toda la costa oeste de América del norte hasta Baja California, México (Bond *et al.* 2015).

Estos eventos causaron un descenso de la productividad primaria, el fitoplancton, y como consecuencia un descenso en la abundancia de los huevos de peces pelágicos costeros, por ejemplo, la sardina, la anchoveta y la merluza, que disminuyeron notablemente ocasionando que sus depredadores, los pinnípedos, no tuvieran suficiente alimento o se alimentaran de presas con menor valor nutricional como el pescado rosa y el calamar (Leising *et al.*, 2015). Un estudio observó el cómo las variaciones en la disponibilidad de presas y el cambio de la composición de la dieta de la foca común (*Phoca vitulina L*), se asocia a diferencias en los parámetros hematológicos, principalmente la disminución en el conteo de eritrocitos y leucocitos (Thompson *et al.*, 1997). Por otro lado, otro estudio en crías de lobo marino de California, observó que la condición corporal y los niveles de glucosa en sangre eran más bajos durante eventos de TSM elevada, además, también observaron que la capacidad de responder a desafíos inmunitarios se veía severamente afectada (Banuet-Martínez *et al.*, 2019). Y es que se sabe que el desarrollo, la diferenciación y la función de las células inmunitarias implica un aumento en el metabolismo energético, principalmente de la disponibilidad de glucosa (Jacobs *et al.*, 2008). Por lo que esto implica que, si las condiciones anormales de TSM afectaron negativamente la disponibilidad de recursos para CSL, las hembras muestreadas en los años anómalos, 2014 y 2016, presentarían desafíos nutricionales y energéticos que les impedirían desencadenar procesos inmunológicos, lo que podría

explicar la baja expresión de estos genes relevantes. Además, la gestación y la lactancia de las hembras CSL es un proceso prioritario de acuerdo a la historia de vida del CSL, en la que se demanda una gran cantidad de energía y nutrientes, dejando por debajo la repartición de recursos al sistema inmunológico (Costa, 2007). Aunado a esto, el CSL se vio frente a diversos factores estresantes, entre ellos, la escases de recursos y la lucha por mantener la homeostasis en aguas con temperaturas tan elevadas. Las respuestas al estrés también implican cambios metabólicos y energéticos y, por ende, cambios inmunológicos, endocrinos y conductuales (Tort, 2011). Se sabe que el cortisol estimula la remoción de las reservas de energía para que la glucosa esté disponible en sangre, y suprime otras actividades fisiológicas como los procesos inmunitarios (Seegerstrom, 2007). Según Moberg (2000), cuando el costo biológico del mantenimiento de un organismo se paga con las reservas energéticas, el estrés no tiene impacto en otras funciones biológicas; sin embargo, cuando el costo biológico no se puede pagar con las reservas, los recursos se reasignan y se toma prioridad a otros procesos.

El patrón de expresión de STAT-1 se observó de manera contraria a como se hubiera esperado. La mayor expresión se dio en el 2014 y fue descendiendo para el 2016 y 2020. Esta observación resultó interesante, pues los costos de las respuestas inflamatorias son potencialmente altos. STAT-1 es un gen inducido por IFN- y responsable de promover un microambiente pro inflamatorio ante la presencia de patógenos intracelulares (Abbas *et al.*, 1996). Es importante comentar que, todos los individuos muestreados en el 2014 pertenecen a la región del Pacífico norte, región en donde los niveles de STAT-1 se expresaron más que en otras regiones. El estudio de Peñin y colaboradores (2019) encontraron al medir la expresión de genes clave a nivel sistémico, un patrón de expresión que incrementaba de norte a sur, y se expresaba aún más en el Pacífico norte. Ellos sugirieron que los niveles altos de expresión podían relacionarse a la diferencia en la prevalencia de patógenos entre regiones.

Se sabe que la abundancia de patógenos difiere espacialmente y que esto influye directamente en las inversiones de las defensas inmunitarias del huésped (Schmid-Hempel & Ebert 2003). Una posible hipótesis desde un punto de vista eco-inmunológico es que, si la prevalencia de patógenos difiere entre regiones, es plausible que en donde

exista mayor abundancia de estos, los hospederos inviertan más en sus respuestas inmunitarias. Sin embargo, hacen falta estudios sobre la variación de la prevalencia de patógenos entre regiones, principalmente en el Pacífico norte, y cómo pueden moldearse las respuestas inmunitarias de acuerdo a estos factores.

En resumen, fue posible observar que el patrón de expresión de genes relacionados a respuestas citotóxicas ejercidas por parte de las células NK y linfocitos T CD8⁺, además de los involucrados en respuestas de tipo Th2, difiere entre los años de muestreo, y que puede estar relacionado a factores ambientales, principalmente anomalías climáticas que afectan la abundancia de presas del CSL y afectando la capacidad inmunológica.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras entre las regiones

Existen diferencias oceanográficas y ecológicas a lo largo del Golfo de California y el Pacífico mexicano, por lo que se ha dividido en regiones (norte, media, central, sur y Pacífico norte mexicano) según las características que presentan principalmente de surgencias y disponibilidad de fitoplancton (Szteren & Aurióles, 2011). De acuerdo a las colonias del CSL hay diferencias poblacionales, de estructura genética y de prevalencia a patógenos (Schramm *et al.*, 2009; Avalos-Téllez *et al.*, 2016) por lo que resulta interesante saber si existen diferencias en la actividad de células NK y linfocitos T CD8⁺ en el epitelio genital de hembras de lobo marino.

Al analizar los perfiles transcripcionales de los genes clave de acuerdo a las 5 regiones (norte, media, central, sur y el Pacífico norte) encontramos que la expresión de los genes KIR, Ly49 y granzima B, indicadores de la actividad de células NK y linfocitos T CD8⁺ en procesos citotóxicos no varió entre regiones, únicamente la expresión de perforina fue mayor en la región central con respecto a otras regiones. La perforina participa en actividades citotóxicas de las NK y T CD8⁺, principalmente para la eliminación de células cancerosas e infectadas por patógenos intracelulares. Su función es la de formar poros en la membrana de la célula diana, ayudando a la entrada de granzimas que inducen apoptosis mediante varias vías (Vivier *et al.*, 2008). Nuevamente,

es plausible que la mayor expresión de perforina en el tracto genital está ligada a una diferencia espacial en la prevalencia de patógenos intracelulares (Peñín *et al.*, 2019).

Perforina y granzima B son toxinas que se acumulan en gránulos secretores, listos para ser liberados tras la activación de la célula y en la sinapsis inmunitaria entre el CTL/NK – célula diana (Hoves *et al.*, 2010). Por lo tanto, ambos genes se inducen de manera progresiva y se esperaría una expresión simultánea de acuerdo a los niveles de transcripción; sin embargo, la expresión de granzima B fue mayor en todas las regiones a comparación de los niveles de transcripción de perforina. Ambos genes se regularon a la baja, pero la expresión de perforina se mantuvo muy por debajo de los genes de referencias, hasta por 5 niveles. En cambio, la Granzima B se expresó ligeramente por debajo de los genes de referencia, menos de 2 niveles. Un estudio *in vitro* con células clones de ratón, demostró que existe una expresión diferencial de perforina y diferentes tipos de granzimas en células T CD8⁺, sugiriendo que cada gen se regula diferente y a diferentes tiempos a nivel de una sola célula (Kelso *et al.*, 2002), lo cual podría explicar los niveles de transcripción tan diferentes entre perforina y granzima B. Aunque los niveles de ambos genes no fueron similares, si se observó que el patrón de expresión entre las regiones fue igual.

De los genes que participan en respuestas de tipo Th1, únicamente STAT-1 varió entre las regiones; se observó una mayor expresión en la región del Pacífico norte y una menor expresión en la región media, además de regularse al alza en la mayoría de las regiones, lo que podría indicar una elevada carga de patógenos en la región del Pacífico norte. Los niveles de ARNm para *eomes* y *Tbx21* no varió entre regiones, pero si se observó que los niveles y el patrón de expresión fueron similares entre ambos genes. La función de ambos genes es dirigir el desarrollo, la maduración, la función y la diferenciación de linfocitos T CD8⁺. Las citocinas pro inflamatorias como IFN- γ , IL-12, 15 y 18, promueven la regulación positiva de *Tbx21* y *eomes*, por lo que se correlacionan positivamente (Simonetta *et al.*, 2016). Por otro lado, al comparar los perfiles de expresión entre *Tbx21* y *GATA-3* observamos que también se comportaban de la misma manera. La proteína Tbet regula la función de *GATA-3*, y las citocinas de tipo Th2 estimuladas por *GATA-3* bloquean la diferenciación a Th1, por lo que ambos genes se

regulan entre sí (Jenner *et al.*, 2009). La expresión de GATA-3 y FOXP3 no fue diferente entre regiones.

Se observaron niveles transcripcionales constantes de acuerdo al conjunto de genes relacionados funcionalmente, pero sin diferencias contrastantes intrarregionales, lo que sugiere que cada región está expuesta a desafíos inmunitarios diferentes posiblemente a una diferencia en la prevalencia de patógenos.

Comparar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras a nivel sistémico y a nivel local.

En el perfil transcripcional de linfocitos circulantes de hembras adultas de CSL mostró un patrón de variación regional en donde la expresión incrementó de norte a sur y el Pacífico norte (Peñín *et al.*, 2019). Resulta relevante comparar estos resultados a nivel del epitelio genital y a nivel sistémico. Al analizar los niveles de expresión de todos los genes se observó que los linfocitos circulantes presentaron niveles más altos en comparación con los niveles de expresión del tracto genital, que tuvieron una regulación a la baja, con excepción del gen STAT-1.

La protección de tejidos de barrera contra patógenos resulta fundamental. El tracto genital inferior compuesto por el exocérnix y la vagina, está expuesto al medio ambiente externo, por lo que actúa como una barrera que protege la entrada a patógenos. La zona de transformación es, inmunológicamente, la zona más activa en términos de la presencia de linfocitos, y aumentan aún más en estados de inflamación (Pudney *et al.*, 2005). Existen diversas subpoblaciones de células T fenotípicamente diferentes que están especializadas a diferentes tejidos con el objetivo de montar respuestas inmunitarias rápidas ante infecciones y crecimientos tumorales sin necesidad de migrar (Wira *et al.*, 2005). Por ejemplo, en el tracto urogenital las células T residentes se adaptan a un microambiente único y combaten infecciones potenciales y el cáncer (Parga-Vidal *et al.*, 2022). Estudios basados en humanos y animales de laboratorio han encontrado que las actividades inmunitarias locales y sistémicas son diferentes en cuanto a la intensidad de las respuestas, los efectores involucrados y la duración y regulación de las respuestas (Cerutti *et al.*, 2011). También se sabe que las células residentes de la zona

cervicovaginal en mujeres fenotípicamente diferentes de otros subconjuntos de células, tienen características migratorias y transcripcionales diferentes que involucran respuestas citotóxicas e inflamatorias más especializadas, lo que podría explicar la diferencia en los niveles de expresión entre sangre y los niveles del tracto genital en este estudio. Los niveles de STAT-1, al contrario de los demás genes, se regularon al alza en las regiones norte, central, sur y Pacífico norte, únicamente en la región media tuvo una regulación a la baja. Los niveles de transcripción fueron más elevados en el tracto genital que en la sangre de CSL, lo que sugiere una importante presencia de células T en este tejido y que predomina un perfil hacia las respuestas de tipo Th1 en el tracto genital de los animales muestreados.

A pesar de que se sabe que existen diferencias ecológicas y de prevalencia de patógenos entre regiones, no fue posible detectar un patrón de expresión que agrupara a las regiones, ni que aumentara de norte a sur como los observados a nivel sistémico en el estudio de Peñin y colaboradores (2009) debido posiblemente a las diferencias que existen en la modulación inmunológica a nivel sistémico y local.

Evaluar el perfil transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función del nivel de displasia celular.

Debido a la similitud del carcinoma urogenital del CSL y el cáncer cervicouterino en la mujer, serán discutidos estos hallazgos en relación a los estudios en humanos. Ninguno de los genes analizados presentó diferencias en su expresión de acuerdo a la presencia de displasia leve y la categoría ASC. La expresión de los individuos que no presentaron indicios de transformación oncogénica fue similar a los que si presentaron indicios de transformación epitelial (ASC, LSIL).

Los resultados aquí obtenidos no concuerdan con la hipótesis inicial ya que se esperaba que la expresión de ciertos genes con funciones antitumorales se viera diferencialmente expresada entre individuos sanos sin transformación y aquellos que estuvieran iniciando un proceso neoplásico por la presencia de células atípicas indicativas de displasia leve. Esto debido a que estudios de cáncer cervicouterino en la

mujer, han observado que las diferentes etapas de la progresión del cáncer se caracterizan por presentar cambios en las respuestas inmunitarias locales, algunas de ellas relacionadas con la regresión tumoral. Por ejemplo, Komdeur y colaboradores (2017) observaron que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ se mantienen bajos en tejidos epiteliales normales y presentan un constante aumento en etapas sucesivas de la transformación, llegando a ser significativamente más altos en displasias celulares graves (HSIL) y al continuar la progresión a carcinoma *in situ*, la población celular citotóxica suele decrecer, probablemente por la capacidad del tumor para disminuir su inmunogenicidad y volverse tolerogénico. Además, Patel & Chiplunkar (2009) también relacionaron una mayor cantidad de células T CD4⁺ con la regresión de las lesiones cervicales.

Respecto a las respuestas de tipo Th2, Feng y colaboradores (2013) observaron un cambio de las respuestas de tipo Th1 hacia respuestas tipo Th2 en la progresión del carcinoma, aumentando la gravedad de las lesiones cervicales pues promueven un microambiente inmunosupresor. Por otro lado, la participación de las células Treg en el cáncer también ha sido reportado. Las Treg suprimen las funciones de las células T citotóxicas por lo que contribuyen al desarrollo y la progresión del cáncer. La expresión de la proteína FOXP3 se regula al alza dentro de un microambiente tumoral y se relaciona con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Saleh & Elkord, 2020). Kojima y colaboradores (2013) observaron que las células Treg funcionan como supresores directos de la regresión de las lesiones intraepiteliales.

Un estudio midió la expresión diferencial de diversos genes, incluidos aquellos que son clave en la inmunovigilancia y la inmunosupresión en las diferentes etapas de progresión del carcinoma de células escamosas (CCS), y descubrieron que los genes regulados al alza sólo fueron significativos en etapas HSIL y de CCS y no en etapas de LSIL. También observaron que la cantidad de células T fue significativamente más baja en epitelios normales y LSIL y hubo una mayor infiltración en HSIL, concluyendo que la activación de respuestas antitumorales y la inmunosupresión suceden en las diferentes etapas de progresión del cáncer, siendo la etapa de HSIL un punto de inflexión entre la activación y la inmunosupresión (Wang *et al.*, 2021). Esto respalda los hallazgos

obtenidos en este estudio, debido a que se incluyó sólo una etapa de la progresión del cáncer. Los CSL del golfo de California y del Pacífico mexicano únicamente presentan displasia leve (LSIL) del epitelio genital, considerada la primera etapa en la oncogénesis. Se cree que las diferencias entre el desarrollo de este tipo de cáncer en las poblaciones mexicanas y las de las costas de California es explicado por los niveles de contaminantes organoclorados en la grasa de los animales, pues difieren de 2-3 órdenes de magnitud, siendo más altas en animales de las costas de California.

Sería idóneo la inclusión de etapas avanzadas en la carcinogénesis, desde la normalidad hasta el desarrollo del carcinoma *in situ* y metástasis para obtener un panorama inmunológico integral en la progresión del CUG.

Evaluar el patrón transcripcional de genes clave expresados por células NK, T CD8⁺, T CD4⁺ y T reguladoras en el epitelio genital de hembras adultas en función de infección por OthV-1 y papillomavirus ZcPV-1.

Al analizar la transcripción relativa en función del estado de infección pudimos observar un patrón contrastante entre virus. La expresión de los individuos infectados por papiloma fue similar a la expresión de los no infectados. Por el contrario, los infectados con OthV-1 presentaron expresiones más bajas con respecto a las otras variables. Únicamente cuatro genes fueron diferentes entre las variables respuesta, Ly49, Tbx21, eomes y STAT-6.

Está bien documentado que la familia de los herpesvirus humanos persisten en el tejido de los huéspedes por largos periodos de tiempo, y lo logran gracias a que han desarrollado diversas estrategias de evasión inmune, por ejemplo, pueden limitar la expresión de sus propias proteínas virales mediante procesos epigenéticos, principalmente mediante microARNs (De Pelsmaecker *et al.*, 2018; Cohen, 2020). El OthV-1 es semejante a los gammaherpesvirus que infectan a los humanos, principalmente al virus de Epstein Barr (EBV) por lo que se discutirán los hallazgos a la luz de lo que se sabe sobre este virus. Al igual que otros herpesvirus, el virus de Epstein-

Barr (EBV) es capaz de persistir en individuos inmunocompetentes mediante un control entre la replicación viral y la inmunidad del huésped, es decir, con estrategias inmunomoduladoras e inmunosupresoras que ha logrado adquirir a lo largo de su evolución (Rezaee *et al.*, 2006).

En la infección aguda, EBV produce proteínas líticas que interfieren directamente con factores de transcripción que promueven la expresión de los IFN de tipo I, ya que estos son muy importantes en inducir un estado antiviral. Por ejemplo, BZLF1 se sabe que interactúa con IRF7 (IRF familia reguladora de interferones) e inhibe su actividad transcripcional para prevenir la inducción de un ambiente antiviral (Hahn *et al.*, 2005). Además, BZLF1 también inhibe la transcripción de NF- κ B que juega un papel importante en la regulación de las respuestas innatas y adaptativas debido a que es el factor clave que regula al alza genes implicados en el desarrollo, la maduración y la proliferación de linfocitos (Ressing *et al.*, 2015). Por otro lado, BZLF1 también regula a la baja los receptores de TNF α e IFN γ y la señalización de JAK/STAT de manera que reduce la capacidad de respuesta (Bristol *et al.*, 2010). Otro de los mecanismos de evasión inmune del EBV es la producción de una interleucina viral (vIL-10), homóloga en un 80% a IL-10 de humanos (Liu *et al.*, 1997). El hecho de que el virus produzca vIL-10 se debe a que IL-10 es la citocina inmunosupresora por excelencia e inhibe también la síntesis de TNF α e IFN γ , IL-2 y MHC I. Proteínas virales como BILF1, BILF2 y BNLF2a regulan a la baja la expresión de MHC I en las células infectadas y hay una activación reducida de células T CD8⁺. También han desarrollado mecanismos de evasión para respuestas adaptativas por parte de las células T CD4⁺ y B que involucran el bloqueo de las interacciones entre MHC II y TCR (Ressing *et al.*, 2015).

La evasión inmunitaria por parte de los gammaherpesvirus también se puede dar de manera pasiva, es decir, tienen la capacidad de entrar a un estado de latencia al minimizar la expresión de productos génicos virales lo que reduce la cantidad de antígenos disponibles para el sistema inmunitario. La latencia de los herpesvirus es clave para establecer una infección persistente y exitosa sin que el sistema inmunitario lo elimine. Para lograr esto, el ADN viral se establece en el núcleo de la célula huésped en forma de episomas circulares, y al entrar en mitosis, los herpesvirus expresan proteínas

que hacen que el genoma viral se una a los cromosomas, de tal manera que los episomas se dividen también, sin la producción de virus infecciosos (De Leo *et al.*, 2020). Para mantener la latencia y minimizar la expresión de proteínas virales, los herpesvirus mantienen mecanismos epigenéticos, se asocian con proteínas histonas celulares y mediante metilaciones, los genes líticos son ensamblados en heterocromatina transcripcionalmente represiva. Se sabe que uno de los responsables principales en el mantenimiento de latencia de los herpesvirus es el silenciamiento mediado por Polycomb, un complejo de proteínas capaces de remodelar la cromatina, el cual se ensambla al genoma viral (Dochnal *et al.*, 2021). En gammaherpesvirus humanos se ha observado que la trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) se encuentra enriquecida en promotores de genes líticos en etapas latentes, esta marca epigenética es característica de la heterocromatina facultativa (Dochnal *et al.*, 2021). Al formarse la heterocromatina facultativa, la expresión de genes virales queda silenciada, así como el reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmunológico. La reactivación viral suele suceder entre periodos de tiempo intercalados con latencia, lo que garantiza la transmisión viral entre individuos y la supervivencia por grandes periodos de tiempo. La reactivación es inducida comúnmente ante la inmunosupresión y la pérdida de vigilancia por parte de los linfocitos T (Cohen, 2020). Además, se sabe que la reactivación de los herpesvirus ocurre con mayor frecuencia en personas con edad avanzada, según Rensing y colaboradores (2015) que observaron mayor carga de ADN de EBV en el plasma y orina de personas senescentes.

Los resultados obtenidos permiten inferir que los lobos marinos infectados por OtHV-1 no están activando respuestas antivirales sino, por el contrario, decrementan la expresión de genes implicados en mecanismos antivirales en comparación con los lobos marinos no infectados. La patogenia de los OtHV-1 actualmente no se ha descrito, pero podemos especular que las infecciones por OtHV-1 de los individuos muestreados pueden ser crónicas y que se esté manteniendo un estado de latencia. Si así fuese, las actividades antivirales serían indetectables. Un estudio realizado por Deming y colaboradores (2021) observaron que los CSL con CUG presentaron mayor expresión génica y carga viral de OtHV-1 (mediana = 6,704,760 copias virales/ng de ADN) en contraste con la expresión génica y carga viral que presentaron los CSL con epitelio

cervical normal (mediana = 11,551 copias virales/ng de ADN). Se cree que el CUG es más frecuente en CSL senescentes, lo que podría implicar que, si los herpesvirus se reactivan con más frecuencia en edades avanzadas, el aumento de la carga viral de OtHV-1 tenga una importancia significativa con el desarrollo del CUG, esto sumado a otros factores relevantes como estresores ambientales y las altas concentraciones de compuestos organoclorados.

Extrañamente, la expresión baja de OthV-1 fue similar en individuos con una infección simultánea de ambos virus. Tal parece que la infección por OtHV-1 es necesaria para apagar las respuestas antivirales, lo que implicaría un ambiente ventajoso para la infección por papiloma y haría que el huésped se vuelva más susceptible ante la transformación celular promovida por papilomavirus y OtHV-1. Por otro lado, la variación de expresión de los genes Ly49, Tbx21, EOMES y STAT-6 mostró un patrón en donde papiloma se mantuvo expresado por arriba o igual a la expresión de los no infectados, STAT-6 fue la excepción a dicho patrón.

Eomes y Tbx21 juegan un papel importante en respuestas de tipo Th1 y también en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. STAT-1 regula la transcripción de Tbx21 y este a su vez promueve las respuestas mediadas por T CD8⁺. Las citocinas pro inflamatorias como IFN- γ , IL-12, 15 y 18, promueven la regulación positiva de Tbx21 y eomes (Simonetta *et al.*, 2016). Dado que observamos una mayor expresión en infección por papiloma podríamos pensar que se están ejerciendo mecanismos antivirales mediados por respuestas de tipo de Th1 para la eliminación viral, lo que concuerda con infección en humanos por el VPH, en donde el sistema inmune monta respuestas eficaces y logra eliminarlo del organismo (Zhou *et al.*, 2019). Sin embargo, también observamos que la expresión de Ly49 y eomes se mantuvo a niveles similares de los individuos no infectados y es que se sabe que las oncoproteínas de papilomavirus también puede evadir ciertos mecanismos del sistema inmunitario al bloquear la expresión génica y las vías de señalización, así como la maquinaria de presentación de antígenos en los queratinocitos infectados, lo que podría estar regulando a la baja la expresión de estos genes, incluidos STAT-6 (Zhou *et al.*, 2019).

Se debe tener presente que las respuestas ante patógenos también pueden estar influenciadas por otros factores ambientales, y las diferencias observadas entre las infecciones virales puede reflejar características específicas de la respuesta del huésped y su interacción con los patógenos.

Identificar cambios morfológicos celulares sugestivos a neoplasias intraepiteliales y fenotipos celulares característicos de infección por el papilomavirus en hembras adultas varadas en las costas de California.

Se observaron cambios morfológicos celulares del epitelio genital del CSL indicativos de transformación oncogénica en tres laminillas, las cuales presentaron una interpretación de LSIL, de acuerdo al Sistema Bethesda, que es sugestivo a displasia leve. Cuatro laminillas tuvieron una interpretación de ASC, ASC-US sugestivos a cambios morfológicos neoplásicos (LSIL) pero que cuantitativamente como cualitativamente no pueden ser considerados dentro de una interpretación de displasia. La mayoría de las laminillas analizadas se interpretó como negativo a lesión intraepitelial debido a la escasas o ausencia de cambios que nos indicaran la presencia de una displasia.

La presencia de metaplasia no se tomó en cuenta como un cambio displásico debido a la ausencia de cambios atípicos. La metaplasia escamosa es considerada como un hallazgo no neoplásico, que consiste en el reemplazo fisiológico del epitelio cilíndrico glandular evertido al exocérnix en epitelio escamoso neoformado por células de reserva, subyacentes a las cilíndricas, las cuales se desarrollan hacia células escamosas en un epitelio estratificado que forman al tejido del exocérnix (Jacobson *et al.*, 2000). La eversión del endocérnix hacia el exocérnix se da cuando la pared muscular aumenta de volumen debido a la influencia de las hormonas reproductivas, estrógeno y progesterona elevadas, y se da una expansión del endocérnix hacia abajo, sobre el exocérnix (Botero *et al.*, 2004). De manera natural, el pH ácido de la vagina y el exocérnix promueve la aparición de células de reserva debido a que se destruye la acción amortiguadora del moco que protege a las células cilíndricas glandulares, haciendo que las células de reserva proliferen y se desarrolle un epitelio delgado, comúnmente llamada metaplasia

inmadura, debido a que no se encuentra completamente estratificado, y metaplasia madura cuando se desarrollan los cuatro estratos celulares (Jacobson *et al.*, 2000). Los cambios metaplásicos fisiológicamente normales ocurren por elevación hormonal, generalmente en la pubertad y el embarazo, es por eso que se considera normal la presencia de células metaplásicas en los frotis cervicales en estas etapas (Martínez-Girón, 2017). Sin embargo, se debe tener especial cuidado ya que existen otros cambios metaplásicos atípicos, generalmente asociados con la metaplasia inmadura, provocados por otros factores como la inflamación, los traumatismos y las infecciones (Jacobson *et al.*, 2000).

Se observaron dos casos de metaplasia escamosa inmadura en los frotis cervicales con número de ID *CSL-13881* y *CSL-13731* con interpretación citológica de ASC-US y negativo a lesión, respectivamente. Ambos casos presentaron cambios inflamatorios severos, lo que sugiere que los cambios metaplásicos inmaduros se deban a la inflamación.

Se observó la presencia de coilocitos en muestras que fueron interpretadas como displasia leve (LSIL), los cuales se consideran una lesión patognomónica de la infección por el virus del papiloma, aunque no necesaria, para el diagnóstico de LSIL. Se caracterizan por presentar una cavitación perinuclear además de las características nucleares de LSIL como el agrandamiento nuclear, la cromatina gruesa granular y las membranas nucleares irregulares. La apariencia del halo intracitoplasmático está dada por la presencia de un borde citoplasmático condensado que rodea la cavitación perinuclear (Krause *et al.*, 2022). Está bien documentado la asociación de coilocitos con el carcinoma de células escamosas de cuello uterino. Además de la zona cervicouterina, la presencia de coilocitos también se relaciona con la aparición de lesiones malignas y pre malignas en el área genital externa en hombres y mujeres (Ríos-Yuil *et al.*, 2012).

Se ha observado la presencia de coilocitos en laminillas citológicas de CSL con pre cáncer en el Golfo de California, pero nunca antes ha sido reportado en CSL que habitan las aguas costeras de California E.E.U.U. Resulta interesante el hecho de haber encontrado la presencia de coilocitos debido a la contrariedad entorno a si es o no considerado como factor causante del carcinoma urogenital del CSL, debido a que el

papel de los papilomavirus en el CUG ha sido subvalorado en los lobos marinos de California (Buckles *et al.* 2006). Sin embargo, demostramos la presencia de lesiones celulares características de la infección por papiloma en individuos que presentaron una displasia leve por lo que consideramos que es importante plantearse su participación en el contexto del desarrollo del CUG

Otra interesante observación fue encontrar que el 94% de las laminillas observadas presentaron cambios atróficos, es decir, únicamente se observaron células basales y parabasales en su mayoría, algunas con pocas células intermedias, pero ninguna con células superficiales. Los cambios en el cérvix durante las diversas etapas como la pubertad, el periodo fértil y la menopausia en mujeres, están íntimamente relacionados con la actividad hormonal, las células presentan una maduración progresiva desde la capa basal hasta la más superficial por estímulo estrogénico. Por lo tanto, en ausencia de estímulos, el epitelio del exocérvix suele dejar de madurar, y presenta un aspecto similar en todos los estratos que lo conforman, generalmente células basales y parabasales. Esto sucede porque la fertilidad y el éxito reproductivo en la mayoría de las especies disminuyen con la edad, por lo que la estimulación hormonal que induce el recambio del epitelio en tracto genital disminuye o se agota. La ausencia de células intermedias y superficiales en los epitelios de las CSL muestreadas sugiere que eran animales senescentes, lo que resulta interesante debido a que todas vararon en las costas de California según los reportes de necropsia proporcionados.

El último de los objetivos fue determinar la concordancia diagnóstica entre la interpretación citológica y los hallazgos a la necropsia de individuos con transformación oncogénica. Para lograr esto se analizaron reportes de necropsia de los CSL varados proporcionados por TMMC después de haber realizado las interpretaciones citológicas.

Se obtuvieron los reportes del 54% de los individuos muestreados (11 reportes) debido a que los restantes fueron liberados. De acuerdo a los reportes de necropsia analizados, la intoxicación por ácido domoico fue la principal causa de muerte y eutanasia (81%) de CSL y sólo una hembra presentó lesiones macroscópicas sugestivas a CUG (CSL-14149). Las lesiones encontradas fueron masas nodulares de 6 mm de diámetro en el área cervical, uterina y cuernos uterinos, además de vulva edematosa y

protuberante. Desafortunadamente, la muestra citológica de CSL-14149 no fue satisfactoria para su interpretación debido a que presentó poca celularidad y los cambios observados fueron por cariorexis, mala fijación e inflamación severa.

Los resultados citológicos no arrojaron ninguna muestra que presentara displasia severa, únicamente se observó transformación pre oncogénica, interpretada como LSIL. Dos de las tres muestras LSIL tuvieron reporte de necropsia. Ambos presentaron lesiones urogenitales, aunque las causas de muerte fueron distintas, infección por leptospirosis e intoxicación por ácido domoico, y las lesiones urogenitales consistieron en calcificaciones multifocales del parénquima renal junto con la mucosa hiperémica y edematosa de la vejiga y cérvix moderadamente inflamada, respectivamente. Según Gulland y colaboradores (1996), los hallazgos a la necropsia de hembras con CUG se describen como grandes masas caseosas de color canela, diseminadas por toda la cavidad, y ocasionalmente hidronefrosis e hidrouréter a causa de la compresión por parte de masas tumorales localizadas alrededor de los uréteres. Las lesiones en el tracto reproductivo suelen ser nódulos de color canela y consistencia firme en el epitelio del cérvix y la vagina. Los hallazgos macroscópicos en mujeres con LSIL generalmente no pueden ser observados sin ayuda de técnicas de coloración, debido a que LSIL es la primera etapa de transformación pre oncogénica, es por eso que se utilizan técnicas como la aplicación de ácido acético al 5% para identificar zonas blanquecinas indicativas de metaplasia y displasia, o la aplicación de solución yodoyodurada de lugol al 10% en donde se pueden observar cambios de pigmentación en epitelios que carecen de glucógeno, ya que los epitelios carentes de glucógeno son los metaplasicos atípicos, displásicos y con transformación oncogénica (Kamaté *et al.*, 2008). Dado esto, no se esperaría tener hallazgos macroscópicos sugestivos a CUG en hembras con inicios de transformación pre oncogénica LSIL.

En conclusión, los resultados citológicos no determinan la presencia de carcinoma urogenital en ninguna de las hembras, lo que concuerda con los reportes de necropsia pertenecientes a los individuos. La integración de muestras citológicas pertenecientes a CSL que si presenten carcinoma urogenital sería lo ideal en posibles estudios a futuro.

IX. CONCLUSIONES

Con la realización de este estudio es posible concluir que:

- La marcada diferencia en la expresión de genes asociados a respuestas antivirales y antitumorales en hembras de CSL puede estar asociada a los cambios ambientales observados en los años de muestreo, lo que indicaría que los estresores como el aumento de temperatura y la escasez de alimento afectan en la función de las respuestas inmunitarias citotóxicas y las mediadas por Th1 y Th2. Sería idóneo la integración de parámetros de TSM y nutricionales como variables respuesta para una completa integración.
- Se observaron niveles transcripcionales constantes de acuerdo al conjunto de genes relacionados funcionalmente, pero sin diferencias contrastantes intrarregionales, lo que sugiere que cada región está expuesta a desafíos inmunitarios diferentes posiblemente a una diferencia en la prevalencia de patógenos.
- Los niveles de expresión relativa fueron diferentes en linfocitos circulantes que en linfocitos del tracto genital. Los linfocitos circulantes tienen una mayor expresión de genes que participan en la citotoxicidad que los linfocitos del tracto genital.
- La expresión de genes con actividades antitumorales en CSL con inicios de transformación pre oncogénica no fue diferente a la expresión de genes en CSL sin transformación. Los niveles en categorías LSIL y ASC no determinan cambios en la activación o inmunosupresión de respuestas implicadas en la inmunovigilancia.

Las infecciones por OthV-1 y ZcPV-1 pueden alterar la expresión de genes antivirales principalmente aquellos a cargo de las respuestas citotóxicas y de tipo Th1. La infección simultánea de ambos patógenos pueden alterar la capacidad para enfrentar desafíos inmunitarios y volver al CSL susceptible a la transformación celular.

- Se detectó la presencia de cambios morfológicos sugestivos a displasia cervical leve en tres de las laminillas de animales provenientes de los Estados Unidos que fueron analizadas en esta tesis y se identificó la presencia de coilocitos, lo que sugiere que los CSL presentaban infección por papilomavirus.
- No se observó la presencia de cambios morfológicos celulares que fueran indicativos de displasias graves o de carcinomas, lo que concuerda con los reportes de necropsia de cada uno de los individuos en donde no se reportaron lesiones macroscópicas de carcinomas urogenital.

X. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH. Immunologic Tolerance. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p. 227-230.
- Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F., Greig, D., & Amos, W. (2003). Disease susceptibility in California sea lions. *Nature*, 422(6927), 35-35. <https://doi.org/10.1038/422035a>
- Aguirre Echebarría, P., & Aguirre Urizar, J. M. (2008). Displasia epitelial: Concepto y significación. *Avances en Odontoestomatología*, 24(1), 81-88.
- Akram, N., Imran, M., Noreen, M., Ahmed, F., Atif, M., Fatima, Z., & Bilal Waqar, A. (2017). Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunology*, 30(1), 20-27. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0109>
- AkramNimrah, ImranMuhammad, NoreenMamoona, AhmedFayyaz, AtifMuhammad, FatimaZareen, & WaqarAhmed, B. (2017). Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunology*. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0109>
- Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., & Wilkinson, G. S. (2015). Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140219. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>
- Alonio, L. V., Picconi, M. A., Distéfano, A. L., & Teyssié, A. R. (1997). Mecanismos de oncogénesis viral. *Infectol. microbiol. clin*, 7-18.
- Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Cervix, Vagina & Vulva*. (s. f.). Www.Arppress.Org. Recuperado 9 de marzo de 2022, de <https://www.arppress.org/product-p/4f13.htm>
- Avalos-Téllez, R., Carrillo-Casas, E. M., Atilano-López, D., Godínez-Reyes, C. R., Díaz-Aparicio, E., Ramírez-Delgado, D., Ramírez-Echenique, M. F., Leyva-Leyva, M., Suzán, G., & Suárez-Güemes, F. (2016). Pathogenic leptospira serovars in free-living sea lions in the gulf of california and along the baja california coast of mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(2), 199-208. <https://doi.org/10.7589/2015-06-133>
- Bacardí, K. R., & Castellanos, M. S. R. (2013). Oncogenic viruses. *Revista Cubana de Genética Comunitaria*, 7(2), 4-11.
- Backström, E., Kristensson, K., & Ljunggren, H.-G. (2004). Activation of Natural Killer Cells: Underlying Molecular Mechanisms Revealed. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(1-2), 14-22. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01475.x>
- Bacon, L., Eagle, R. A., Meyer, M., Easom, N., Young, N. T., & Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(2), 1078-1084. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1078>

- Banuet-Martínez, M., Aquino, W. E., Elorriaga-Verplancken, F. R., Flores-Morán, A., García, O. P., Camacho, M., & Acevedo-Whitehouse, K. (2017). Climatic anomaly affects the immune competence of California sea lions. *PLOS ONE*, 12(6), e0179359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179359>
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213-1224.
- Barragán-Vargas, C., Montano-Frías, J., Ávila Rosales, G., Godínez-Reyes, C. R., & Acevedo-Whitehouse, K. (2016). Transformation of the genital epithelial tract occurs early in California sea lion development. *Royal Society Open Science*, 3(3), 150419. <https://doi.org/10.1098/rsos.150419>
- Bergeron, C. (2003). The 2001 Bethesda System. *salud pública de méxico*, 45.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud, 2e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical.* (s.f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1803>
- Bishop, J. M. (1985). Viral oncogenes. *Cell*, 42(1), 23-38. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80098-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80098-2)
- Bollmann, R., Bollmann, M., Henson, D. E., & Bodo, M. (2001). DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda system for the classification of Papanicolaou smears. *Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 93(3), 222-228.
- Bond, N. A., & Harrison, D. E. (2000). The Pacific decadal oscillation, air-sea interaction and central north Pacific winter atmospheric regimes. *Geophysical Research Letters*, 27(5), 731-734. <https://doi.org/10.1029/1999GL010847>
- Bond, N. A., Cronin, M. F., Freeland, H., & Mantua, N. (2015). Causes and impacts of the 2014 warm anomaly in the NE Pacific. *Geophysical Research Letters*, 42(9), 3414-3420. <https://doi.org/10.1002/2015GL063306>
- Botero, S. E., Múnera, A. G., Restrepo, M. L., & Giraldo, M. V. (2004). *Atlas de citología cervicovaginal*. Universidad de Antioquia.
- Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M., & Moretta, A. (2004). Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Molecular Immunology*, 41(6), 569-575. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.004>
- Bowen, L., Aldridge, B. M., DeLong, R., Melin, S., Buckles, E. L., Gulland, F., Lowenstine, L. J., Stott, J. L., & Johnson, M. L. (2005). An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*, 56(11), 846-848. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0757-z>

- Broders, A. C. (1932). Carcinoma *in situ* contrasted with benign penetrating epithelium. *JAMAAP*, 99(20), 1670-1674.
- Brown, R. J., Smith, A. W., John, G. V. M., & DeLONG, R. L. (1980). METASTATIC ADENOCARCINOMA IN TWO CALIFORNIA SEA LIONS, *Zalophus c. Californianus*. *Journal of Wildlife Diseases*, 16(2), 261-266. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.2.261>
- Browning, H. M., Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F. M. D., Hall, A. J., Finlayson, J., Dagleish, M. P., Billington, K. J., Colegrove, K., & Hammond, J. A. (2014). Evidence for a genetic basis of urogenital carcinoma in the wild California sea lion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1796), 20140240. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0240>
- Browning, H. M., Gulland, F. M. D., Hammond, J. A., Colegrove, K. M., & Hall, A. J. (2015). Common cancer in a wild animal: The California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140228. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0228>
- Browning, H. M., Gulland, F. M. D., Hammond, J. A., Colegrove, K. M., & Hall, A. J. (2015). Common cancer in a wild animal: The California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140228. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0228>
- Buckles, E. L., Lowenstine, L. J., DeLong, R. L., Melin, S. R., Vittore, R. K., Wong, H.-N., Ross, G. L., St Leger, J. A., Greig, D. J., Duerr, R. S., Gulland, F. M. D., & Stott, J. L. (2007). Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. *Veterinary Microbiology*, 120(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.002>
- Buckles, E. L., Lowenstine, L. J., Funke, C., Vittore, R. K., Wong, H.-N., St Leger, J. A., Greig, D. J., Duerr, R. S., Gulland, F. M. D., & Stott, J. L. (2006). Otarine Herpesvirus-1, not papillomavirus, is associated with endemic tumours in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Comparative Pathology*, 135(4), 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.06.007>
- Buckley, C. H., Butler, E. B., & Fox, H. (1982). Cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.* 35(1), 1-13.
- Burnet, F. M. (1970). The Concept of Immunological Surveillance. *Immunological Aspects of Neoplasia*, 13, 1-27. <https://doi.org/10.1159/000386035>
- Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *British Medical Journal*, 1(5023), 841-847.
- Capasso, L. L. (2005). Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer*, 113(1), 2-13. <https://doi.org/10.1002/ijc.20610>
- Carcinogens and DNA damage | Biochemical Society Transactions | Portland Press.* (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/46/5/1213/67954/Carcinogens-and-DNA-damage>

- Cardinal, L. H., Díaz, L. B., Vighi, S., & Rueda, N. G. (2008). Anatomía, citología e histología del cuello uterino, la vagina y la vulva normales y patológicos. Ecosistema vaginal. *Tatti LH. Colposcopia y patologías del tracto genital inferior. En la era de la vacunación. Argentina: Ed. Panamericana*, 3-7.
- Casás-Selves, M., & DeGregori, J. (2011). How Cancer Shapes Evolution and How Evolution Shapes Cancer. *Evolution: Education and Outreach*, 4(4), 624-634. <https://doi.org/10.1007/s12052-011-0373-y>
- Caulin, A. F., & Maley, C. C. (2011). Peto's Paradox: Evolution's prescription for cancer prevention. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(4), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.01.002>
- Cerutti, A., Chen, K., & Chorny, A. (2011). Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 273-293. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101317>
- Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O. M., & Chan, W.-Y. (2009). DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 87(4), 335-350. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20163>
- Chow, M. T., Möller, A., & Smyth, M. J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 22(1), 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.004>
- Ciclo celular: Mecanismos de regulación.* (s.f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=58779>
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A., & Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79(12), 2320-2328. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19970615\)79:12<2320::AID-CNCR5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19970615)79:12<2320::AID-CNCR5>3.0.CO;2-P)
- Cohen, J. I. (2020). Herpesvirus latency. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3361-3369.
- Cohen, S. M., & Arnold, L. L. (2011). Chemical Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 120(suppl_1), S76-S92. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq365>
- Colegrove, K. M., Gullanda, F. M. D., Naydan, D. K., & Lowenstine, L. J. (2009). Morfología tumoral y expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, p53 y Ki67 en carcinomas urogenitales de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*). *Veterinary Pathology*, 46(4), 642-655. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0214-C-FL>
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., & Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 14(2), 123-133. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00095-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00095-4)
- Costa, D. P. (2007). A conceptual model of the variation in parental attendance in response to environmental fluctuation: Foraging energetics of lactating sea lions and fur seals. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17(S1), S44-S52. <https://doi.org/10.1002/aqc.917>

- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-511. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072367>
- Díaz, L. D. L., Cala, Ó. L. O., Pinto, C. O. B., Lizcano, Á. I. G., & Cornejo, V. M. M. (2003). El ciclo celular. *MedUNAB*, 6(16), 21-29.
- Davies, M. A., & Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), 5545-5555. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.323>
- De Pelsmaeker, S., Romero, N., Vitale, M., & Favoreel, H. W. (s. f.). Herpesvirus Evasion of Natural Killer Cells. *Journal of Virology*, 92(11), e02105-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02105-17>
- Dębska-Zielkowska, J., Moszkowska, G., Zieliński, M., & Zielińska, H. (2021). KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease. *Cells*, 10(7). <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071777>
- De Leo, A., Calderon, A., & Lieberman, P. M. (2020). Control of Viral Latency by Episome Maintenance Proteins. *Trends in Microbiology*, 28(2), 150-162. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.09.002>
- Della Chiesa, M., Marcenaro, E., Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., & Moretta, A. (2014). Human NK cell response to pathogens. *Seminars in Immunology*, 26(2), 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.001>
- Deming, A. C., Colegrove, K. M., Duignan, P. J., Hall, A. J., Wellehan, J. F. X., & Gulland, F. M. D. (2018). Prevalence of Urogenital Carcinoma in Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from 2005–15. *Journal of Wildlife Diseases*, 54(3), 581-586. <https://doi.org/10.7589/2017-08-208>
- Deming, A. C., Wellehan, J. F. X., Colegrove, K. M., Hall, A., Luff, J., Lowenstine, L., Duignan, P., Cortés-Hinojosa, G., & Gulland, F. M. D. (2021). Unlocking the Role of a Genital Herpesvirus, Otarine Herpesvirus 1, in California Sea Lion Cervical Cancer. *Animals*, 11(2), 491. <https://doi.org/10.3390/ani11020491>
- Di Lorenzo, E., & Mantua, N. (2016). Multi-year persistence of the 2014/15 North Pacific marine heatwave. *Nature Climate Change*, 6(11), 1042-1047. <https://doi.org/10.1038/nclimate3082>
- Díaz, L. D. L., Cala, Ó. L. O., Pinto, C. O. B., Lizcano, Á. I. G., & Cornejo, V. M. M. (2003). El ciclo celular. *MedUNAB*, 6(16), 21-29.
- Disis, M. L. (2010). Immune Regulation of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(29), 4531-4538. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2146>
- Dochnal, S. A., Francois, A. K., & Cliffe, A. R. (2021). De Novo Polycomb Recruitment: Lessons from Latent Herpesviruses. *Viruses*, 13(8), 1470. <https://doi.org/10.3390/v13081470>

- Dujon, A. M., Aktipis, A., Alix-Panabières, C., Amend, S. R., Boddy, A. M., Brown, J. S., Capp, J., DeGregori, J., Ewald, P., Gatenby, R., Gerlinger, M., Giraudeau, M., Hamede, R. K., Hansen, E., Kareva, I., Maley, C. C., Marusyk, A., McGranahan, N., Metzger, M. J., ... Ujvari, B. (2021). Identifying key questions in the ecology and evolution of cancer. *Evolutionary Applications*, 14(4), 877-892. <https://doi.org/10.1111/eva.13190>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836-848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Efron, M., Griner, L., & Benirschke, K. (1977). Nature and Rate of Neoplasia Found in Captive Wild Mammals, Birds, and Reptiles at Necropsy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 185-198. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.185>
- Enríquez, M. G. M., Contreras, L. F., Rodríguez, A. S. S., & Borunda, J. A. (2011). Mecanismos de reparación del ADN. *Biología molecular*, 82.
- Farrell, P. J. (2019). Epstein–Barr Virus and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1), 29-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>
- Feng, P., Moses, A., & Früh, K. (2013). Evasion of adaptive and innate immune response mechanisms by γ -herpesviruses. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.011>
- Formation and Activation of a Cyclin E-cdk2 Complex During the G1 Phase of the Human Cell Cycle.* (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1388288>
- Fotedar, R., & Fotedar, A. (1995). Cell cycle control of DNA replication. En L. Meijer, S. Guidet, & H. Y. L. Tung (Eds.), *Progress in Cell Cycle Research: Volume 1* (pp. 73-89). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1809-9_6
- Fragoso, L. R., Baltasar, E. H., & Esparza, J. A. R. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología aplicada*, 21(2), 60-69.
- Freeman, M. D., & Kohles, S. S. (2012). Plasma levels of polychlorinated biphenyls, non-Hodgkin lymphoma, and causation. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 258981. <https://doi.org/10.1155/2012/258981>
- Gao, C. Y., & Zelenka, P. S. (1997). Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *BioEssays*, 19(4), 307-315. <https://doi.org/10.1002/bies.950190408>
- García-Foncillas, J., Bandrés, E., Catalán, V., García Amigot, F., & Zabalegui, N. (2001). Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. *An. sist. sanit. Navar*, 31-52.
- Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer—ScienceDirect.* (s. f.). Recuperado 24 de febrero de 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323476744000141>

- Gibson, R., Atkinson, R., Gordon, J., Editors, T., In, F., Learmonth, J., MacLeod, C., Santos, M., Pierce, G., Crick, H., & Robinson, R. (2007). Potential Effects Of Climate Change On Marine Mammals. En *An Annual Review* (Vol. 44, pp. 431-464). <https://doi.org/10.1201/9781420006391.ch8>
- Greig, D. J., Gulland, F. M., & Kreuder, C. (2005). A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) strandings along the central California coast: causes and trends, 1991-2000. *Aquatic Mammals*, 31(1), 11.
- Gross, E., Sunwoo, J. B., & Bui, J. D. (2013). Cancer Immunosurveillance and Immunoediting by Natural Killer Cells. *The Cancer Journal*, 19(6), 483-489. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000005>
- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblauch, S., Cado, D., Greenberg, N. R., & Raulet, D. H. (2008). NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity*, 28(4), 571-580. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.016>
- Guise, S. D., Lagacé, A., & Béland, P. (1994). Tumors in St. Lawrence Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Veterinary Pathology*, 31(4), 444-449. <https://doi.org/10.1177/030098589403100406>
- Gulland, F. M. D., Hall, A. J., Ylitalo, G. M., Colegrove, K. M., Norris, T., Duignan, P. J., Halaska, B., Acevedo Whitehouse, K., Lowenstine, L. J., Deming, A. C., & Rowles, T. K. (2020). Persistent Contaminants and Herpesvirus OtHV1 Are Positively Associated With Cancer in Wild California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2020.602565>
- Gulland, F. M., Trupkiewicz, J. G., Spraker, T. R., & Lowenstine, L. J. (1996). Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *Journal of Wildlife Diseases*, 32(2), 250-258. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.2.250>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science*, 246(4930), 629-634. <https://doi.org/10.1126/science.2683079>
- Hilario, E. (2007). Morfología del cérvix uterino. *Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea*.
- Hoves, S., Trapani, J. A., & Voskoboinik, I. (2010). The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(2), 237-243. <https://doi.org/10.1189/jlb.0909608>
- Hulleman, E., & Boonstra*, J. (2001). Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(1), 80-93. <https://doi.org/10.1007/PL00000780>
- Hwang, J. (2016). Las respuestas inmunológicas al cáncer.

- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 95-109. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(01)00038-7)
- Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored | Oncogene*. (s. f.). Recuperado 15 de marzo de 2022, de <https://www.nature.com/articles/onc2009416>
- Imran, A., Qamar, H. Y., Ali, Q., Naeem, H., Riaz, M., Amin, S., Kanwal, N., Ali, F., Sabar, M. F., & Nasir, I. A. (2017). Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iranian Journal of Public Health*, 46(11), 1475-1485.
- Inflammation and immune surveillance in cancer—ScienceDirect*. (s. f.). Recuperado 17 de marzo de 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X11001052>
- Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S. M., DeJong, C. S., Shin, H., Hunter, C. A., Wherry, E. J., Lindsten, T., & Reiner, S. L. (2008). Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8+ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science*, 321(5887), 408-411. <https://doi.org/10.1126/science.1159806>
- Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S. M., DeJong, C. S., Shin, H., Hunter, C. A., Wherry, E. J., Lindsten, T., & Reiner, S. L. (2008). Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8+ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science*, 321(5887), 408-411. <https://doi.org/10.1126/science.1159806>
- Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4476-4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>
- Joseph, B. E., Cornell, L. H., & Migaki, G. (1986). Metastatic squamous cell carcinoma in a beached California sea lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 22(2), 281-283. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.2.281>
- Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E., & Raulet, D. H. (2012). RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(13), 2409-2422. <https://doi.org/10.1084/jem.20120565>
- Kajiwara, N., Kannan, K., Muraoka, M., Watanabe, M., Takahashi, S., Gulland, F., Olsen, H., Blankenship, A. L., Jones, P. D., Tanabe, S., & Giesy, J. P. (2001). Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls, and Butyltin Compounds in Blubber and Livers of Stranded California Sea Lions, Elephant Seals, and Harbor Seals from Coastal California, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(1), 90-99. <https://doi.org/10.1007/s002440010224>
- Kamaté, B., Traoré, C. B., Diallo, D., Sacko, R., Toure, M., Keita, B., Teguede, B., Traore, Y., Diarra, M. H. D., Ouattara, A. T., Traoré, A. C., Mariko, H., Dembele, Y., Togola, B., Tall, K., Sanogo, A., Diané, M., Kaloga, I., Traoré, M., ... Bayo, S. (2008). [Extension of cervix cancer screening

by visual methods to the community health centres in the district of Bamako]. *Le Mali Medical*, 23(4), 29-33.

Kannan, K., Kajiwara, N., Le Boeuf, B. J., & Tanabe, S. (2004). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in California sea lions. *Environmental Pollution*, 131(3), 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.004>

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Viejo, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7556-7561. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7556>

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity*, 4(3), 313-319. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80439-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80439-2)

Kelso, A., Costelloe, E. O., Johnson, B. J., Groves, P., Buttigieg, K., & Fitzpatrick, D. R. (2002). The genes for perforin, granzymes A–C and IFN- γ are differentially expressed in single CD8+ T cells during primary activation. *International Immunology*, 14(6), 605-613. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.6.605>

Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis | Environmental Health Perspectives | Vol. 124, No. 6. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/ehp.1509912>

King, D. P., Hure, M. C., Goldstein, T., Aldridge, B. M., Gulland, F. M. D., Saliki, J. T., Buckles, E. L., Lowenstine, L. J., & Stott, J. L. (2002). Otarine herpesvirus-1: A novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*, 86(1), 131-137. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00497-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00497-7)

Kobets, T., Iatropoulos, M. J., & Williams, G. M. (2019). Mechanisms of DNA-reactive and epigenetic chemical carcinogens: Applications to carcinogenicity testing and risk assessment. *Toxicology Research*, 8(2), 123-145. <https://doi.org/10.1039/c8tx00250a>

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., ... & Roberts, J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257(5077), 1689-1694.

Kojima, S., Kawana, K., Tomio, K., Yamashita, A., Taguchi, A., Miura, S., Adachi, K., Nagamatsu, T., Nagasaka, K., Matsumoto, Y., Arimoto, T., Oda, K., Wada-Hiraike, O., Yano, T., Taketani, Y., Fujii, T., Schust, D. J., & Kozuma, S. (2013). The Prevalence Of Cervical Regulatory T Cells in HPV-Related Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Correlates Inversely with Spontaneous Regression of CIN. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(2), 134-141. <https://doi.org/10.1111/aji.12030>

Komdeur, F. L., Prins, T. M., van de Wall, S., Plat, A., Wisman, G. B. A., Hollema, H., Daemen, T., Church, D. N., de Bruyn, M., & Nijman, H. W. (2017). CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy

- response in cervical cancer. *Oncolmmunology*, 6(9), e1338230. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1338230>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Kotler, B. P., & Brown, J. S. (2020). Ecología de la comunidad del cáncer. *Cancer Control*, 27(1), 1073274820951776. <https://doi.org/10.1177/1073274820951776>
- Krause, K. A., Neelon, D., & Butler, S. L. (2022). Koilocytosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532958/> <https://doi.org/10.1172/JCI136225>
- Kurman, R. J. (2012). The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. *SSBM*.
- Lagunas Cruz, M. del C., Valle Mendiola, A., & Soto Cruz, I. (2015). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), Article 2. <http://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51694>
- Lagunas-Rangel, Francisco A . (2018). Virus y Cáncer. *Ciencia* , 69, 1-6.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, 23, 225-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>
- Lanier, L. L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunology Research*, 3(6), 575-582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Learmonth, J. A., MacLeod, C. D., Vazquez, M. B. S., Pierce, G. J., Crick, H. Q. P., & Robinson, R. A. (2006). Potential effects of climate change on marine mammals. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44, 431-464. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.008>
- Leising, A., Schroeder, I., Bograd, S., Abell, J., Durazo, R., Gaxiola-Castro, G., CICESE, Bjorkstedt, E., Field, J., Sakuma, K., Robertson, R., Goericke, R., Peterson, W., Brodeur, R., Barceló, C., Auth, T., Daly, E., Suryan, R., Gladics, A., & Warzybok, P. (2015). State of the California Current 2014–15: Impacts of the warm-water “Blob”. *CalCOFI Report*, 56, 31-68.
- Lipscomb, T. P., Scott, D. P., Garber, R. L., Krafft, A. E., Tsai, M. M., Lichy, J. H., Taubenberger, J. K., Schulman, F. Y., & Gulland, F. M. (2000). Common metastatic carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*): Evidence of genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Veterinary Pathology*, 37(6), 609-617. <https://doi.org/10.1354/vp.37-6-609>
- Ljunggren, H.-G., & Kärre, K. (1990). In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11, 237-244. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90097-S](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-S)
- Loeb, K. R., & Loeb, L. A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 379-385. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>

- López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Villa-Alvarez, M., & Gonzalez, S. (2015). NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *International Journal of Cancer*, 136(8), 1741-1750. <https://doi.org/10.1002/ijc.28775>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630-641. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>
- Martínez Girón, R. (2017). *Citología ginecológica*. Ediciones Paraninfo, SA.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M. A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., & Fauci, A. S. (2005). Characterization of CD56⁻/CD16⁺ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2886-2891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409872102>
- McAloose, D., & Newton, A. L. (2009). Wildlife cancer: A conservation perspective. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 517-526. <https://doi.org/10.1038/nrc2665>
- Metcalfe, C., Metcalfe, T., Ray, S., Paterson, G., & Koenig, B. (1999). Polychlorinated biphenyls and organochlorine compounds in brain, liver and muscle of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Arctic and St. Lawrence estuary. *Marine Environmental Research*, 47(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00107-X)
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70.
- Monserrat Sanz, J., García Torrijos, C., Díaz Martín, D., & Prieto Martín, A. (2013). Linfocitos natural killer. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1728-1736. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70549-3](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70549-3)
- Moore, P. S., & Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews Cancer*, 10(12), 878-889. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>
- Moreno Fernández, M. E., Rugeles López, M. T., & Montoya Guarín, C. J. (2007). Células NK: Generalidades y papel durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *Iatreia*, 20(1), 47-63.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., & Johansson, C. C. (2010). Chapter 3—Regulatory T Cells in Cancer. En G. F. Vande Woude & G. Klein (Eds.), *Advances in Cancer Research* (Vol. 107, pp. 57-117). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)07003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)07003-X)
- Murchison, E. P., Tovar, C., Hsu, A., Bender, H. S., Kheradpour, P., Rebbeck, C. A., Obendorf, D., Conlan, C., Bahlo, M., Blizzard, C. A., Pyecroft, S., Kreiss, A., Kellis, M., Stark, A., Harkins, T. T., Graves, J. A. M., Woods, G. M., Hannon, G. J., & Papenfuss, A. T. (2010). The Tasmanian Devil Transcriptome Reveals Schwann Cell Origins of a Clonally Transmissible Cancer. *Science*, 327(5961), 84-87. <https://doi.org/10.1126/science.1180616>

- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., & Murphy, T. L. (2000). Signaling and Transcription in T Helper Development. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 451-494. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.451>
- Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2017). The Bethesda system for reporting cervical cytology: a historical perspective. *Acta cytologica*, 61(4-5), 359-372.
- Nelson, B. H. (2008). The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunological Reviews*, 222(1), 101-116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>
- Newman, S. J., & Smith, S. A. (2006). Neoplasia de mamíferos marinos: Una revisión. *Veterinary Pathology*, 43(6), 865-880. <https://doi.org/10.1354/vp.43-6-865>
- Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., & Biron, C. A. (2000). Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ : STAT1 resolves a paradox. *Nature Immunology*, 1(1), 70-76. <https://doi.org/10.1038/76940>
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, 17(6), 471-480. <https://doi.org/10.1002/bies.950170603>
- Nishitani, H., & Lygerou, Z. (2002). Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes to Cells*, 7(6), 523-534.
- OMS. *Cáncer*. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://www.who.int/es/health-topics/cholera/cancer>
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4499-4506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Ouchen, F. S. (2008). TEMA 14: Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. Características. *Eusalud*.
- Owen Judith, A. ; Punt Jenni ; Stranford, Sharon (2014). Kuby, Inmunología. Ciudad México, Mexico: McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.416>
- Parga-Vidal, L., van Aalderen, M. C., Stark, R., & van Gisbergen, K. P. J. M. (2022). Tissue-resident memory T cells in the urogenital tract. *Nature Reviews Nephrology*, 18(4), 209-223. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00525-0>
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 201-214. <https://doi.org/10.1038/nri1570>
- Patel, S., & Chiplunkar, S. (2009). Host immune responses to cervical cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 21(1), 54-59. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32831a9890>
- Pearce, E. L., Mullen, A. C., Martins, G. A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V. P., Banica, M., DiCioccio, C. B., Gross, D. A., Mao, C.-A., Shen, H., Cereb, N., Yang, S. Y., Lindsten, T.,

- Rossant, J., Hunter, C. A., & Reiner, S. L. (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5647), 1041-1043. <https://doi.org/10.1126/science.1090148>
- Pelea, C. L., & González, J. F. (2003). *Citología ginecológica de Papanicolaou a Bethesda*. Editorial Complutense.
- Peñín, I., Levin, M., Acevedo-Whitehouse, K., Jasperse, L., Gebhard, E., Gulland, F. M. D., & De Guise, S. (2018). Effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on California sea lion (*Zalophus californianus*) lymphocyte functions upon in vitro exposure. *Environmental Research*, 167, 708-717. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.08.028>
- Peñín, I., Figueroa-Cabañas, M. E., Rosa, F. G. la, Soto-García, L. A., Álvarez-Martínez, R., Flores-Morán, A., & Acevedo-Whitehouse, K. (2019). Transcriptional Profiles of California Sea Lion Peripheral NK and CD+8 T Cells Reflect Ecological Regionalization and Infection by Oncogenic Viruses. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00413>
- Ponder, B. A. J. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336-341. <https://doi.org/10.1038/35077207>
- Ponder, B. A. J. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336-341. <https://doi.org/10.1038/35077207>
- Pudney, J., Quayle, A. J., & Anderson, D. J. (2005). Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: Mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biology of Reproduction*, 73(6), 1253-1263. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043133>
- Randhawa, N., Gulland, F., Ylitalo, G. M., DeLong, R., & Mazet, J. A. K. (2015). Sentinel California sea lions provide insight into legacy organochlorine exposure trends and their association with cancer and infectious disease. *One Health*, 1, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.08.003>
- Rao, S., Gharib, K., & Han, A. (2019). Cancer Immun surveillance by T Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 342, 149-173. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.08.001>
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews. Immunology*, 3(10), 781-790. <https://doi.org/10.1038/nri1199>
- Ressing, M. E., van Gent, M., Gram, A. M., Hooykaas, M. J. G., Piersma, S. J., & Wiertz, E. J. H. J. (2015). Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. En C. Münz (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2* (Vol. 391, pp. 355-381). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_12
- Ringehan, M., McKeating, J. A., & Protzer, U. (2017). Viral hepatitis and liver cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), 20160274. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0274>
- Ríos-Yuil, J. M., Moreno-López, L. M., & Mercadillo-Pérez, P. (2012). Relación entre la presencia de hallazgos histológicos sugestivos de infección por virus del papiloma humano y el diagnóstico

- de neoplasias pre-malignas y malignas del área genital externa. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 75(3), 155-161.
- Robertson, M. J. (2002a). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(2), 173-183. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.2.173>
- Robinson, C. J. (2016). Evolution of the 2014–2015 sea surface temperature warming in the central west coast of Baja California, Mexico, recorded by remote sensing. *Geophysical Research Letters*, 43(13), 7066-7071. <https://doi.org/10.1002/2016GL069356>
- Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article*. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5696686/>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL
- Rubin, I. C. (1910). The pathological diagnosis of incipient carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Dis Women Child*, 62, 668-676.
- Ruffell, B., DeNardo, D. G., Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2010). Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(1), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.002>
- Salaverry, O. (2013). La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 137-141.
- Saleh, R., & Elkord, E. (2020). FoxP3+ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Letters*, 490, 174-185. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.022>
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2009). Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2076-2082. <https://doi.org/10.1002/eji.200939722>
- Schmid-Hempel, P. (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1513), 357-366. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2265>
- Schramm, Y., Mesnick, S. L., de la Rosa, J., Palacios, D. M., Lowry, M. S., Aurióles-Gamboa, D., Snell, H. M., & Escorza-Treviño, S. (2009). Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, 156(7), 1375-1387. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1178-1>
- Segerstrom, S. C. (2007). Stress, Energy, and Immunity: An Ecological View. *Current Directions in Psychological Science*, 16(6), 326-330. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2007.00522.x>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107-1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>

- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shaughnessy, D. T., & DeMarini, D. M. (2009). Types and consequences of DNA damage. *Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors*, 21-33.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., & Ames, B. N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9697-9701.
- Shimizu, K., Sato, Y., Kawamura, M., Nakazato, H., Watanabe, T., Ohara, O., & Fujii, S. (2019). Eomes transcription factor is required for the development and differentiation of invariant NKT cells. *Communications Biology*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0389-3>
- Silva, E. V. de S., Nascente, E. de P., Miguel, M. P., Alves, C. E. F., & Moura, V. M. B. D. de. (2021). Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: A comprehensive review. *Ciência Animal Brasileira*, 22. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-68544>
- Simonetta, F., Pradier, A., & Roosnek, E. (2016). T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00241>
- Smith, M. T., Guyton, K. Z., Gibbons, C. F., Fritz, J. M., Portier, C. J., Rusyn, I., ... & Straif, K. (2016). Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, 124(6), 713-721.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y. T., Street, S. E. A., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 755-760. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.755>
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., & Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 287(16), 2114-2119.
- Strioga, M., Schijns, V., Powell, D. J., Pasukoniene, V., Dobrovolskiene, N., & Michalek, J. (2013). Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immunity*, 19(1), 98-111. <https://doi.org/10.1177/1753425912449549>
- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1137-1146. <https://doi.org/10.1172/JCI31405>
- Szteren, D., & Auriolles-Gamboa, D. (2011). Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 37(3), 349-368.
- Ta, B., & E, A. (2017). HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British journal of cancer*, 117(4). <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.220>
- Taufert Cardona, Y., & Marin Morales, M. A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95-110.

- Teh, B. T., & Fearon, E. R. (2020). Genetic and epigenetic alterations in cancer. In *Abeloff's clinical oncology* (pp. 209-224). Elsevier.
- Temin, H. M. (1960). The control of cellular morphology in embryonic cells infected with Rous sarcoma virus in vitro. *Virology*, *10*(2), 182-197. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90038-6)
- Teng, M. W. L., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(4), 988-993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>
- The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (Zalophus californianus)*—*ScienceDirect*. (s. f.). Recuperado 10 de marzo de 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X04003017>
- The Search for Infectious Causes of Human Cancers: Where and Why (Nobel Lecture)*—Zur Hausen—2009—*Angewandte Chemie International Edition*—*Wiley Online Library*. (s. f.). Recuperado 24 de febrero de 2022, de https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200901917?casa_token=2CU184T_E7wAA AAA:uDX14ly5nPQnojQipRJCuq5Dg0jWDhnNcYHpdFx1q8nPFDzF0w0xl4d4n2QdMj9yJwmbrczCB_tncMD
- Thompson, P. M., Tollit, D. J., Corpe, H. M., Reid, R. J., & Ross, H. M. (1997). Changes in haematological parameters in relation to prey switching in a wild population of harbour seals. *Functional Ecology*, *11*(6), 743-750. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1997.00148.x>
- Toft, G. (2014). Persistent organochlorine pollutants and human reproductive health. *Danish Medical Journal*, *61*(11), B4967.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, *35*(12), 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Tu, M. M., Rahim, M. M. A., Sayed, C., Mahmoud, A. B., & Makrigiannis, A. P. (2017). Immunosurveillance and Immunoediting of Breast Cancer via Class I MHC Receptors. *Cancer Immunology Research*, *5*(11), 1016-1028. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0056>
- Types and Consequences of DNA Damage*—*Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors*—*Wiley Online Library*. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527626588.ch2>
- Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage* | *PNAS*. (s. f.). Recuperado 23 de febrero de 2022, de <https://www.pnas.org/content/86/24/9697.short>
- Valent, P., Bonnet, D., Wöhrer, S., Andreeff, M., Copland, M., Chomienne, C., & Eaves, C. (2013). Heterogeneity of Neoplastic Stem Cells: Theoretical, Functional, and Clinical Implications. *Cancer Research*, *73*(3), 1037-1045. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3678>
- Velez MM. (2012) *Identification of Accurate Sampling Techniques to Detect OtHV-1 in California sea Lions*. dissertation/master's thesis. San Francisco, CA: San Francisco State University.

- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503-510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503-510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., & Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *European Journal of Immunology*, 34(1), 81-90. <https://doi.org/10.1002/eji.200324432>
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., & Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12-19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- Wang, Y., He, M., Zhang, G., Cao, K., Yang, M., Zhang, H., & Liu, H. (2021). The immune landscape during the tumorigenesis of cervical cancer. *Cancer Medicine*, 10(7), 2380-2395. <https://doi.org/10.1002/cam4.3833>
- West, J., Hasnain, Z., Macklin, P., & Newton, P. K. (2016). An Evolutionary Model of Tumor Cell Kinetics and the Emergence of Molecular Heterogeneity Driving Gompertzian Growth. *SIAM Review*, 58(4), 716-736. <https://doi.org/10.1137/15M1044825>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews. Immunology*, 15(8), 486-499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- Wildlife cancer: A conservation perspective | Nature Reviews Cancer*. (s. f.). Recuperado 9 de marzo de 2022, de <https://www.nature.com/articles/nrc2665>
- Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A., & Shen, L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. *Immunological Reviews*, 206(1), 306-335. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x>
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2), 85-101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>
- Woo, S.-R., Corrales, L., & Gajewski, T. F. (2015). Innate Immune Recognition of Cancer. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 445-474. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112043>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF- β and immune cells: An important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 31(6), 220-227.
- Ylitalo, G. M., Stein, J. E., Hom, T., Johnson, L. L., Tilbury, K. L., Hall, A. J., Rowles, T., Greig, D., Lowenstine, L. J., & Gulland, F. M. D. (2005). The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Pollution Bulletin*, 50(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.08.005>

- Zamai, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L., & Vitale, M. (2007). NK Cells and Cancer. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4011-4016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4011>
- Zheng, W. P., & Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89(4), 587-596.
- Zhou, C., Tuong, Z. K., & Frazer, I. H. (2019). Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00682>
- Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A. J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., Guo, L., Yagi, R., Yamane, H., Punkosdy, G., Feigenbaum, L., Zhao, K., & Paul, W. E. (2012). The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity*, 37(4), 660-673. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.007>

XI. ANEXO I

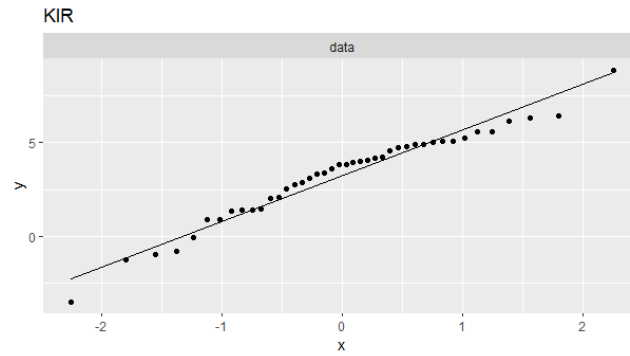


Figura 45. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de KIR.

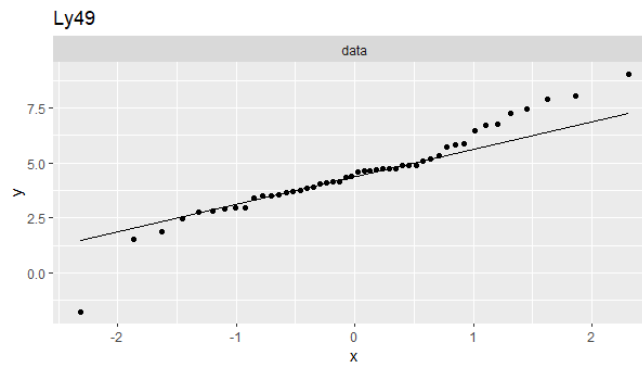


Figura 46. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de Ly49.

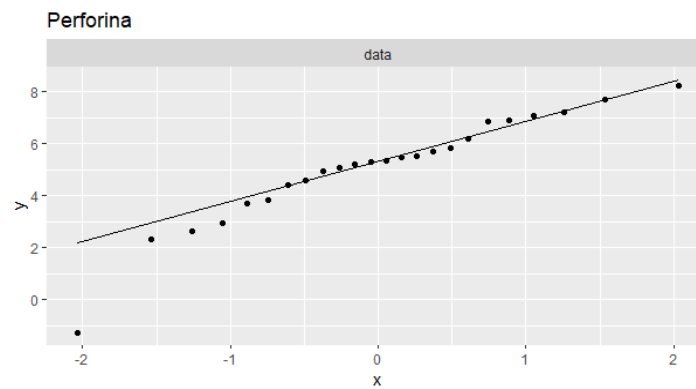


Figura 47. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de perforina.

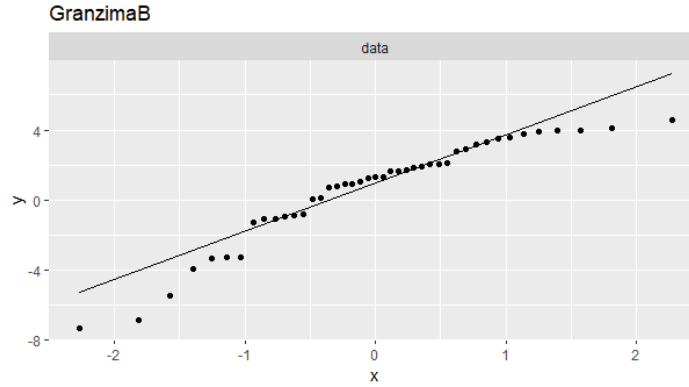


Figura 48. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de Granzima B.

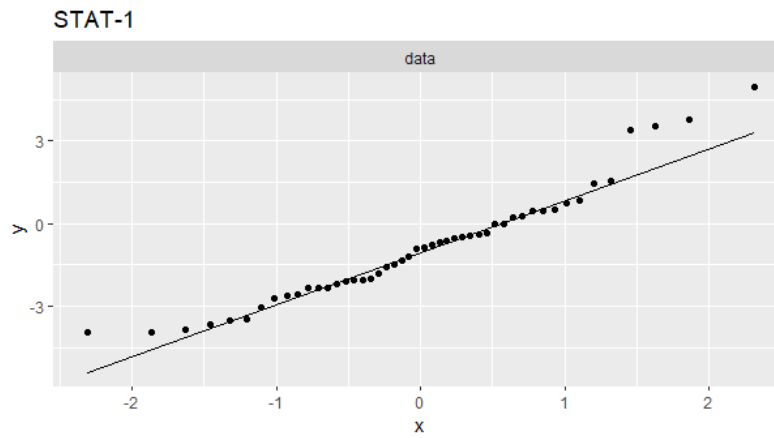


Figura 49. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de STAT-1.

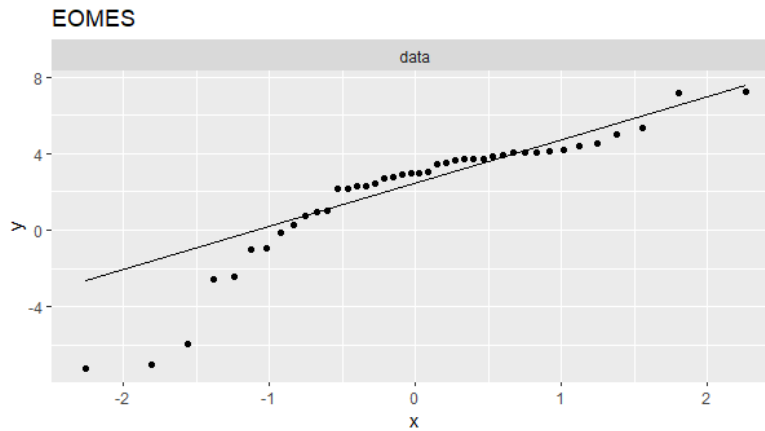


Figura 50. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de eomes

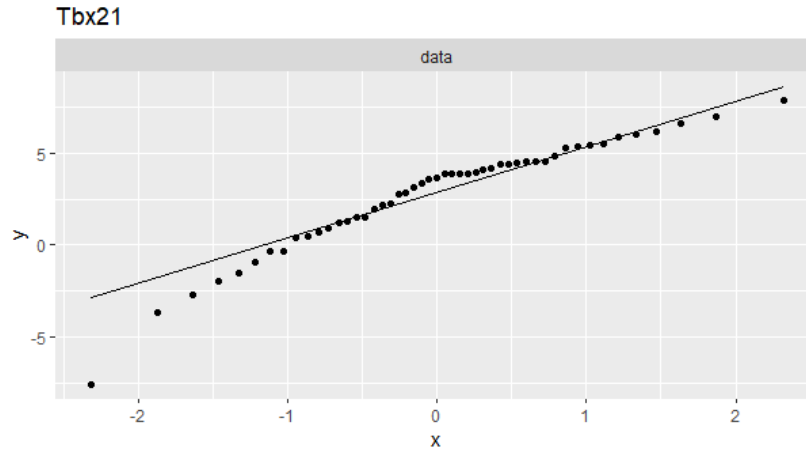


Figura 51. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de Tbx21.

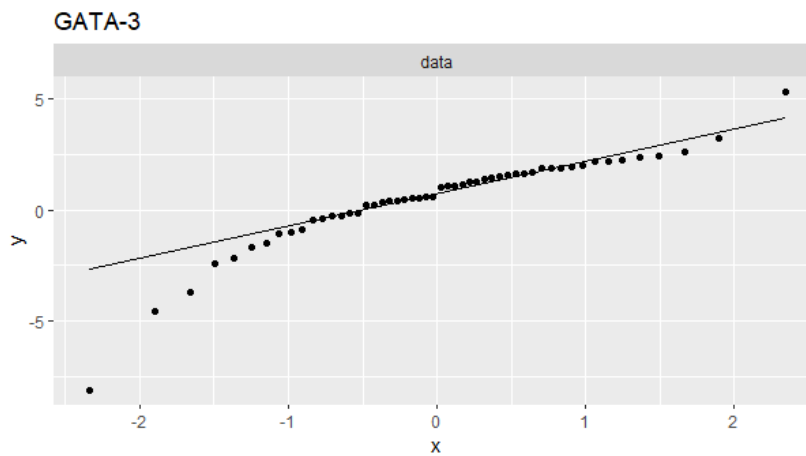


Figura 52. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de GATA-3.

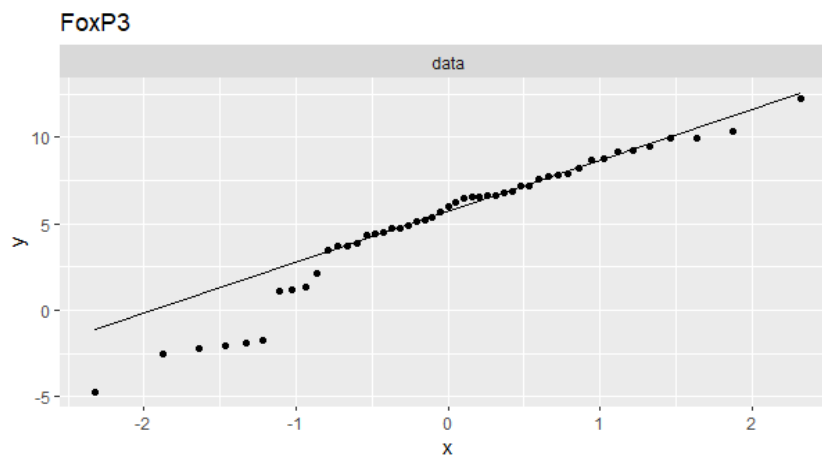


Figura 53. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de FOXp3.

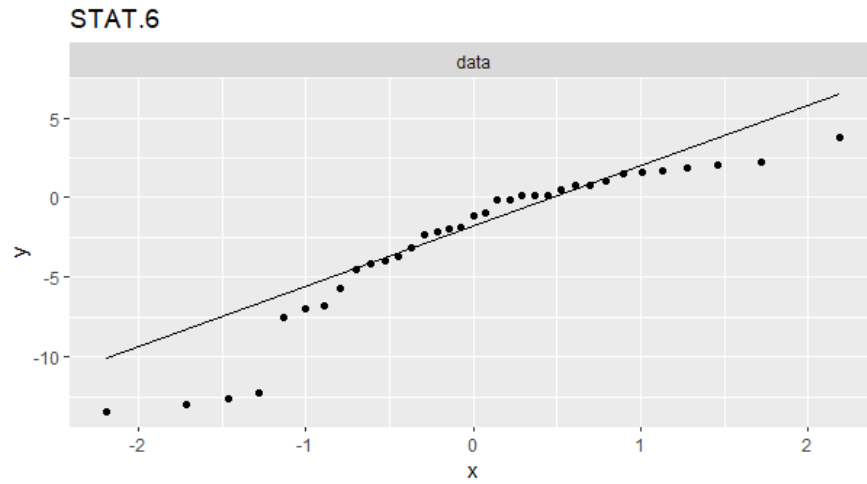


Figura 54. Q-Q plot para la visualización de la distribución de los datos de STAT-6.

XII. ANEXO II

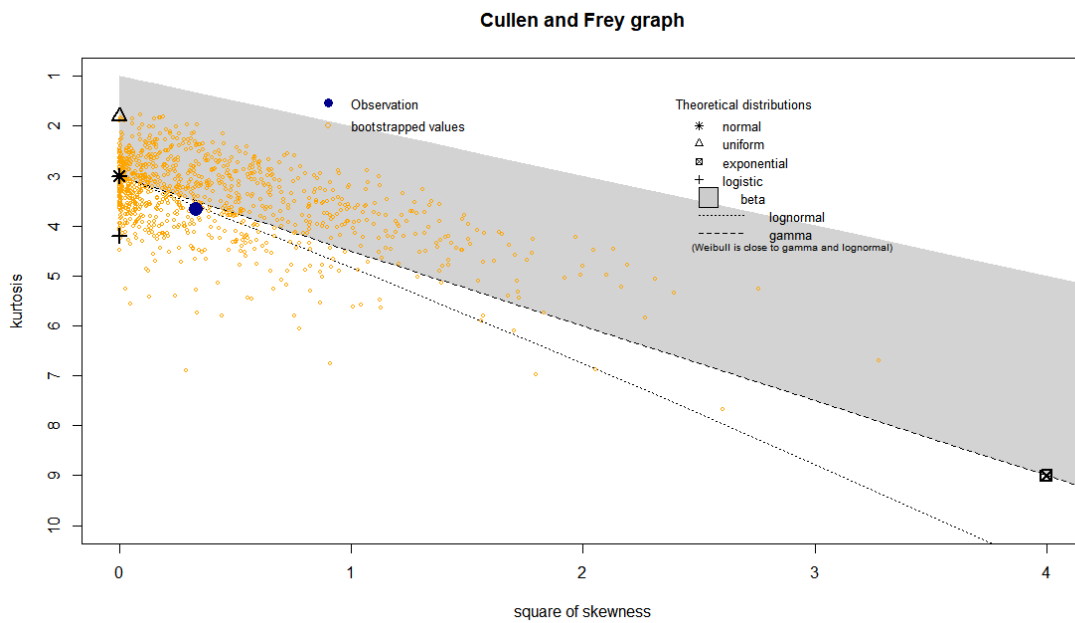


Figura 55. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de KIR.

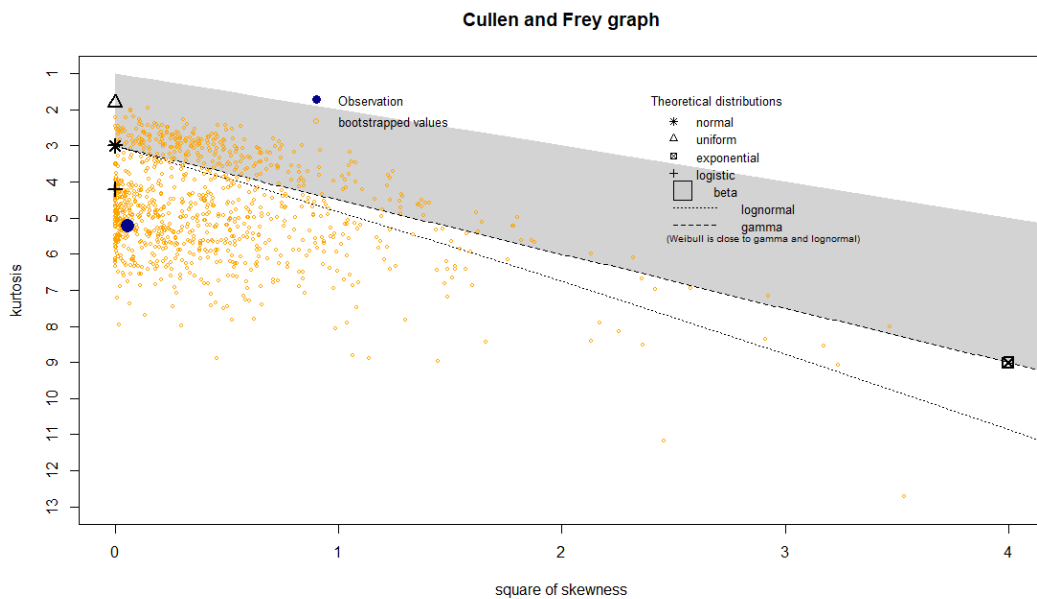


Figura 56. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de Ly49

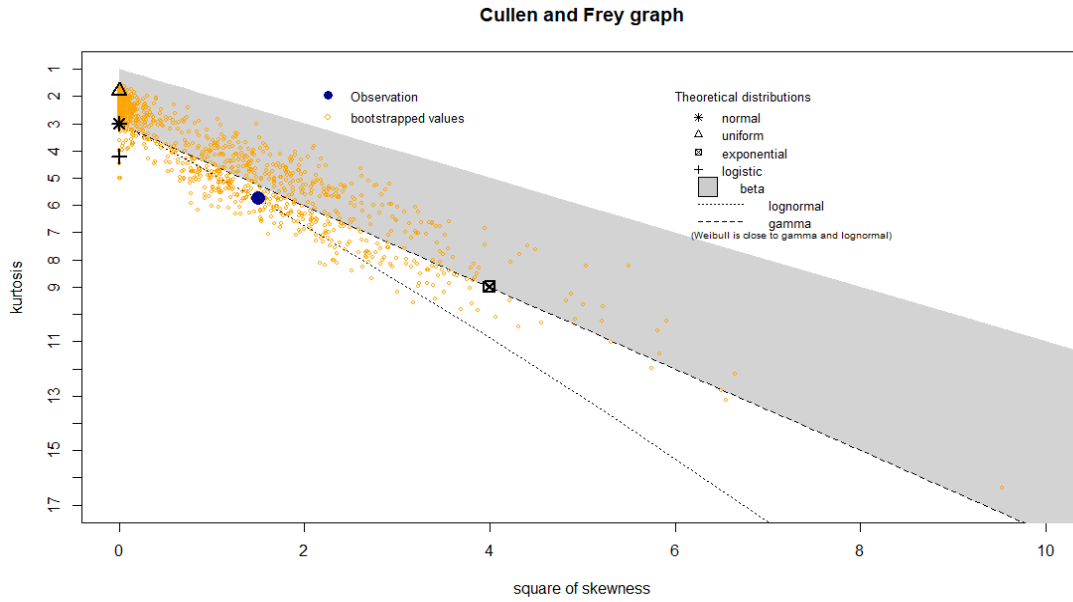


Figura 57. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de perforina.

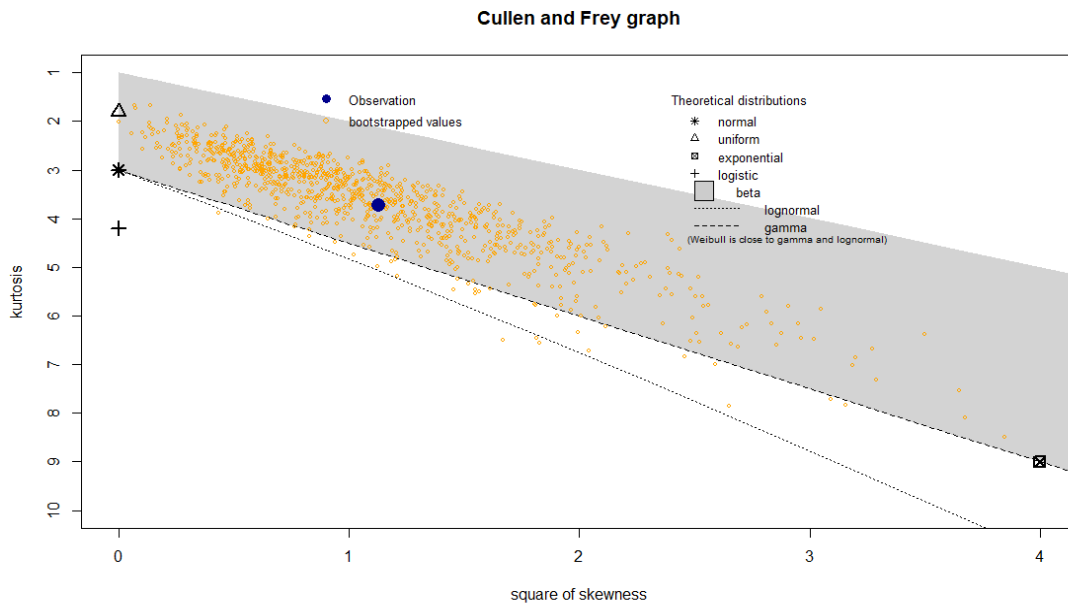


Figura 58. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de granzima B.

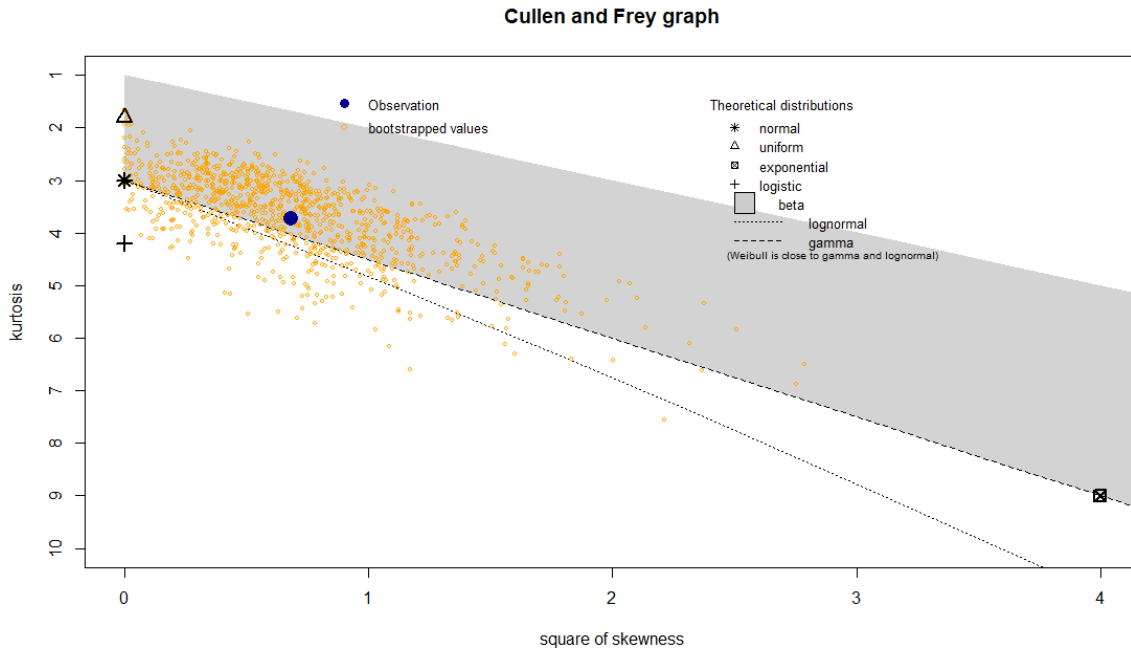


Figura 59. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de STAT-1.

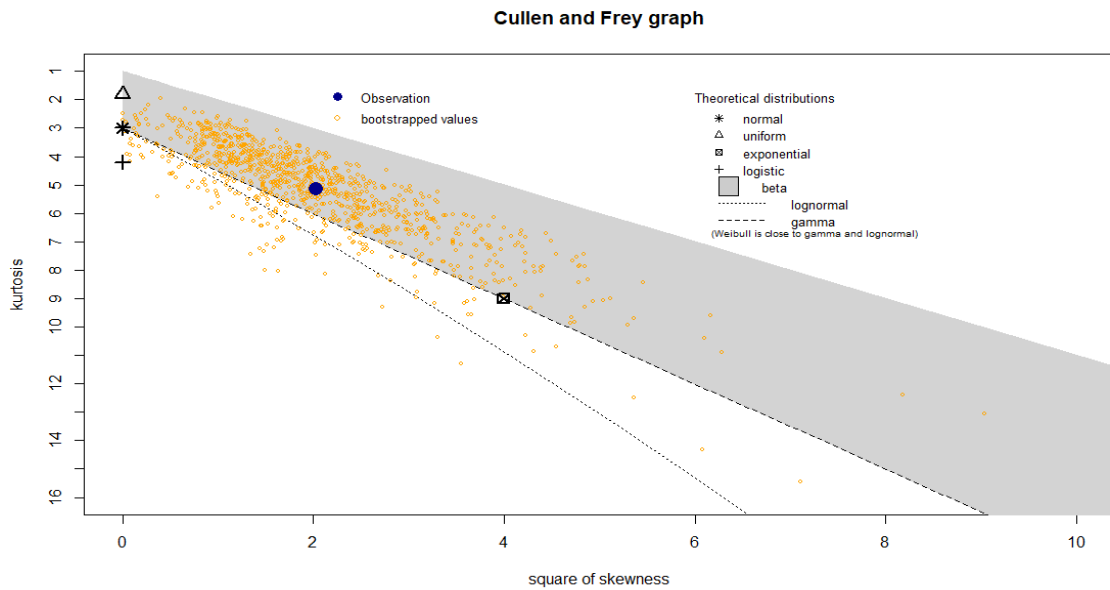


Figura 60. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de eomes.

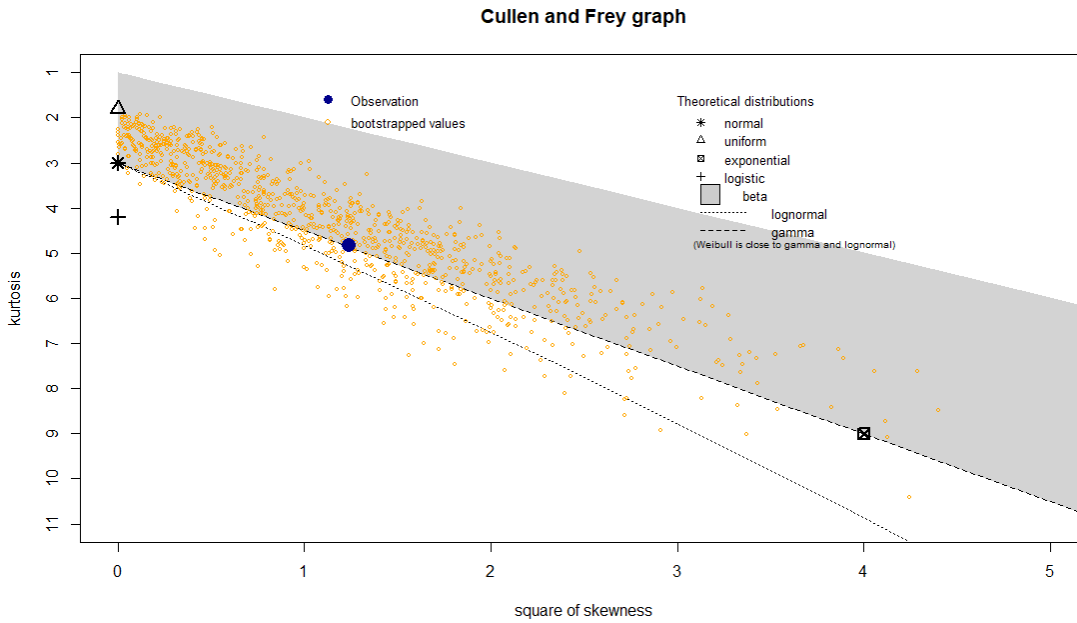


Figura 61. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de Tbx21

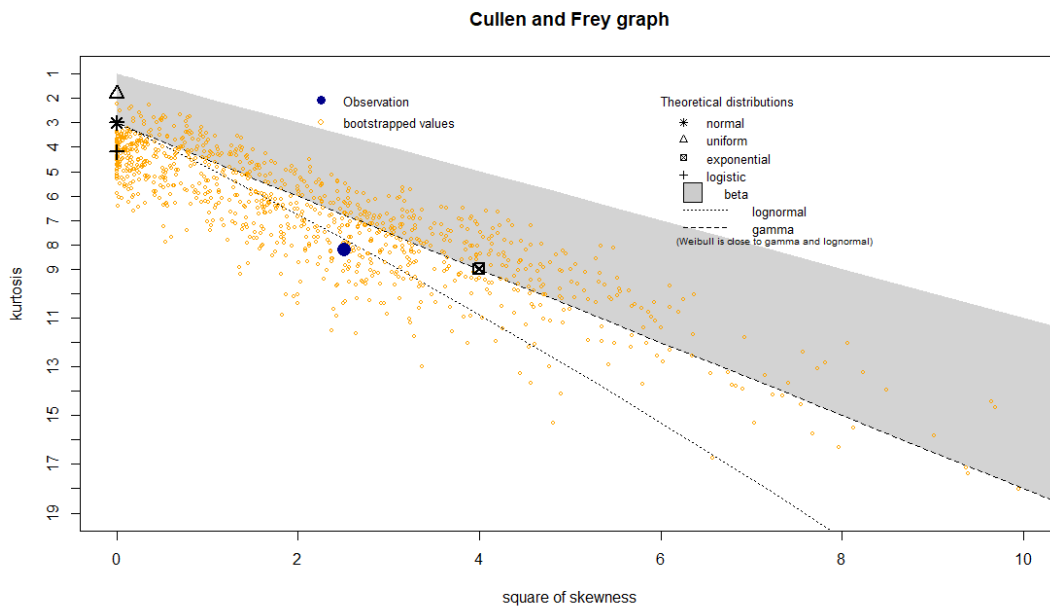


Figura 62. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de GATA-3

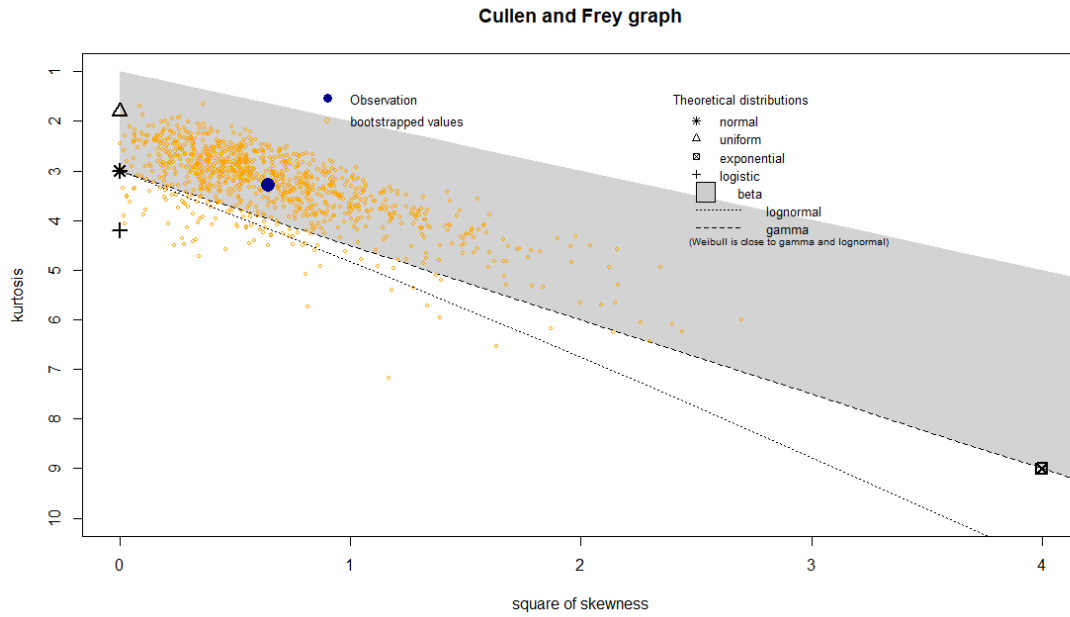


Figura 63. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de FOXp3.

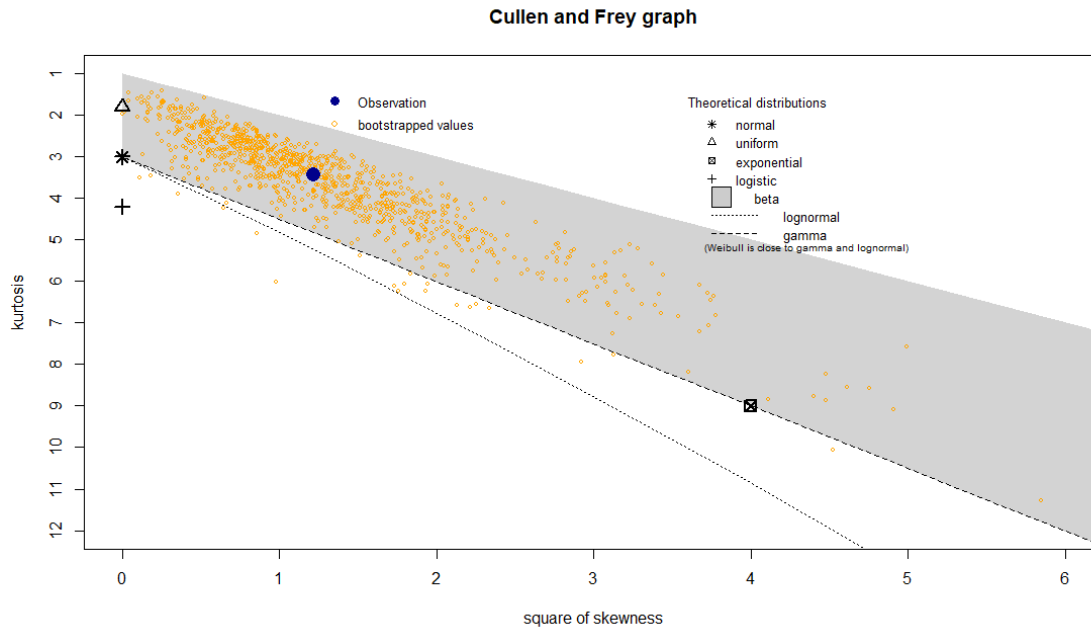


Figura 64. Gráfico de Cullen & Frey para la visualización del mejor ajuste de los datos de STAT-6.

XIII. ANEXO III

KIR

La expresión de KIR no varió entre el estado citológico (GLM, $F_{2,33} = 0.59$, $p = 0.55$; Fig. 65).

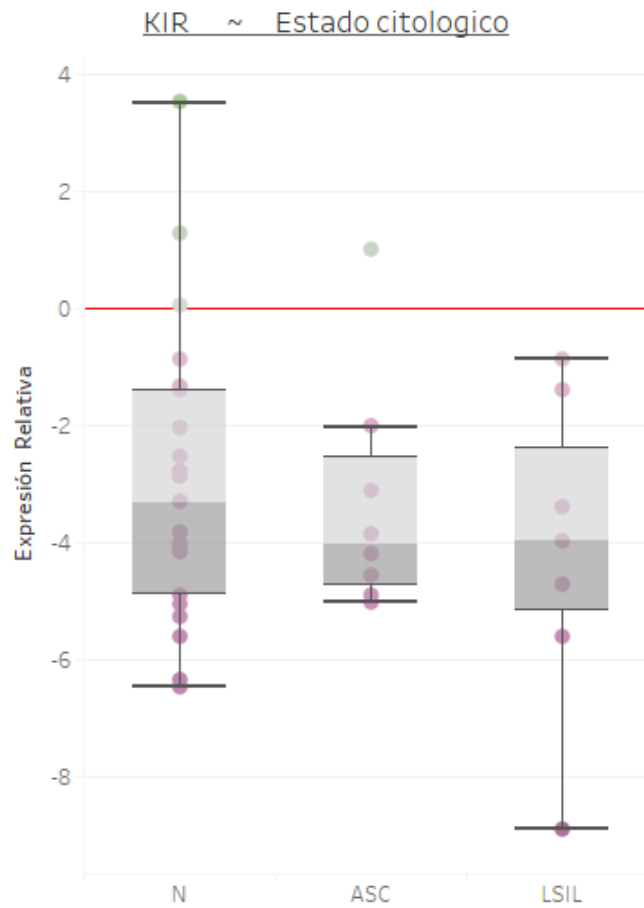


Figura 65. Niveles de expresión de KIR de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

Ly49

La expresión no varió de forma detectable entre el estado citológico (GLM, $F_{2,38} = 0.2$, $p = 0.75$; Fig. 66).

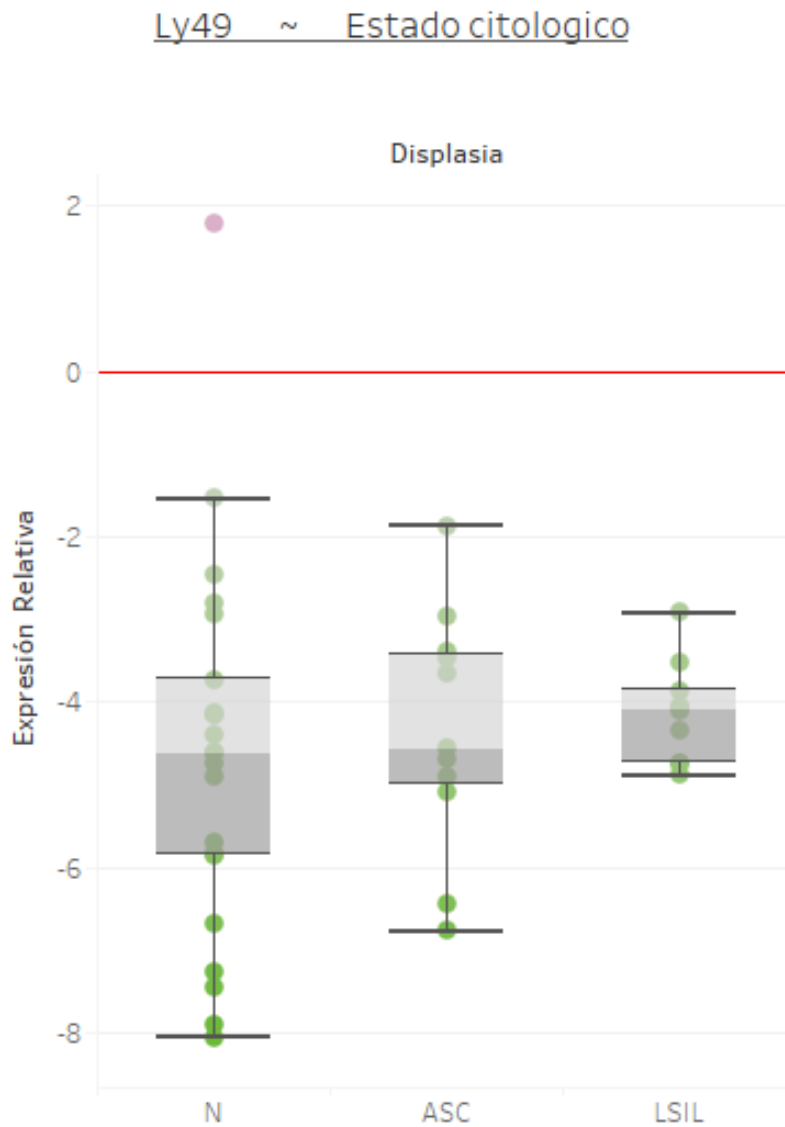


Figura 66. Niveles de expresión de Ly49 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

Perforina

La expresión de perforina no varió entre los estados citológicos (GLM, $F_{2,17} = 1.08$, $p = 0.36$; Figura 67).

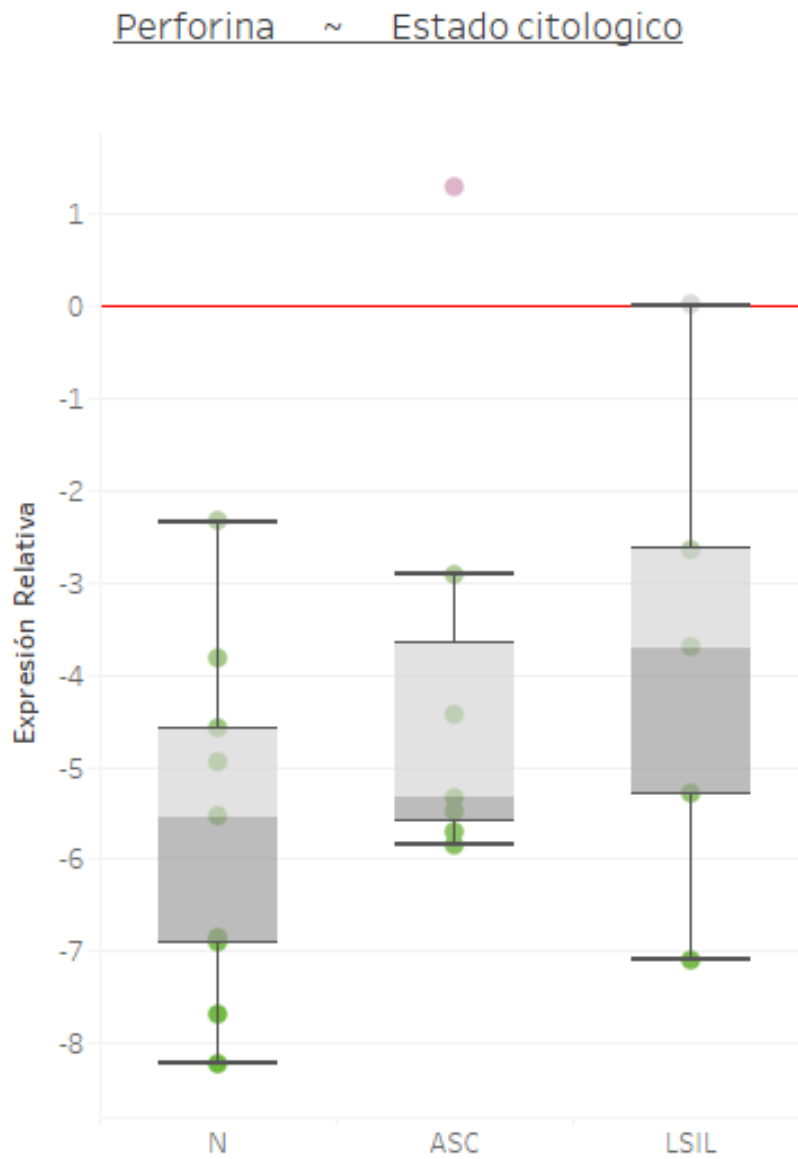


Figura 67. Niveles de expresión de perforina de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

Granzima B

La expresión de Granzima B no fue diferente entre los estados citológicos (GLM, $\chi^2 = 1.70$, $gl = 36$, $p = 0.90$; Fig. 68).

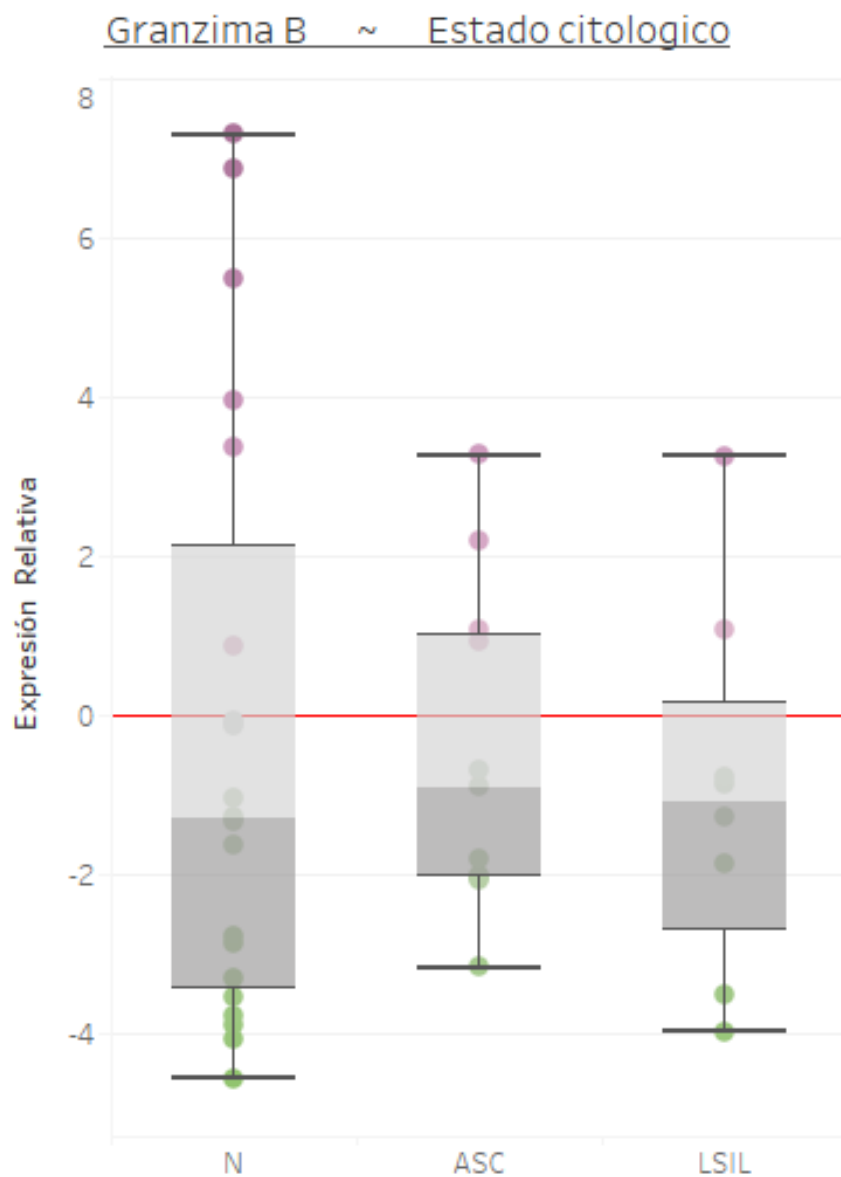


Figura 68. Niveles de expresión de granzima B de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

STAT-1

La transcripción de STAT-1 no varió entre los estados citológicos (GLM, $X^2 = 3.78$, $gl = 37$, $p = 0.95$; Fig. 69).

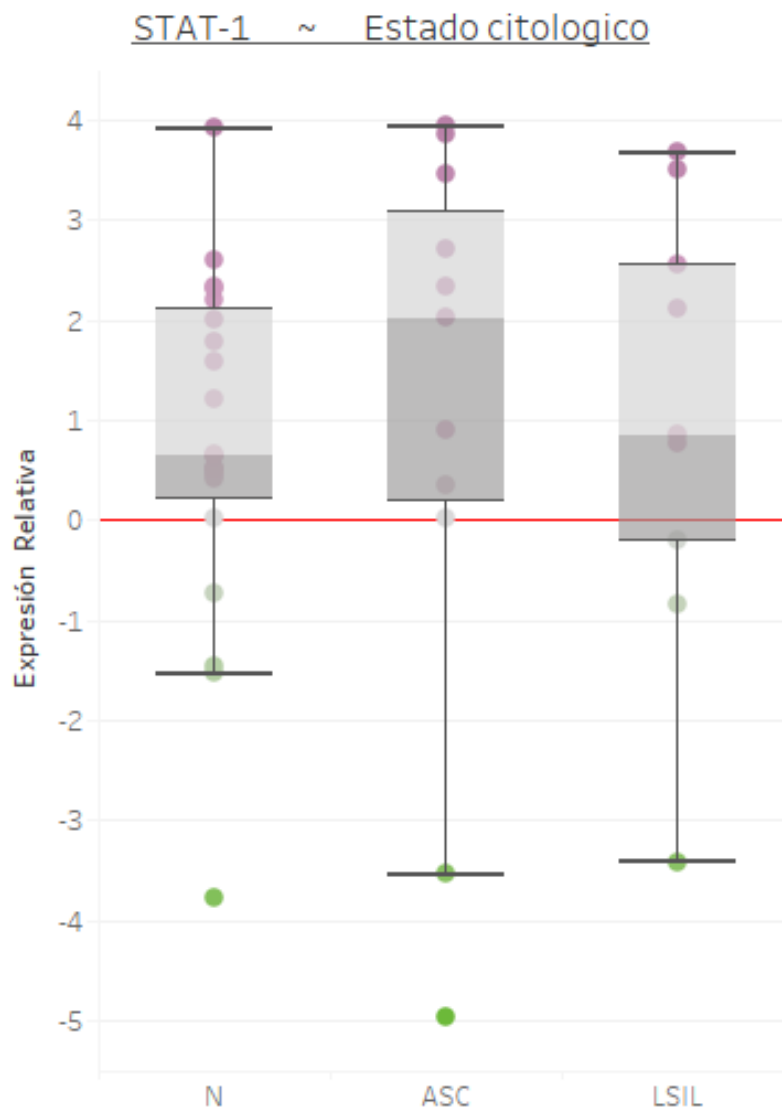


Figura 69. Niveles de expresión de STAT-1 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

Eomes

Los valores de transcripción relativa para el gen *eomes* no variaron de acuerdo al estatus citológico (GLM, $X^2 = 0.10$, $gl = 34$, $p = 0.13$; Fig. 70).

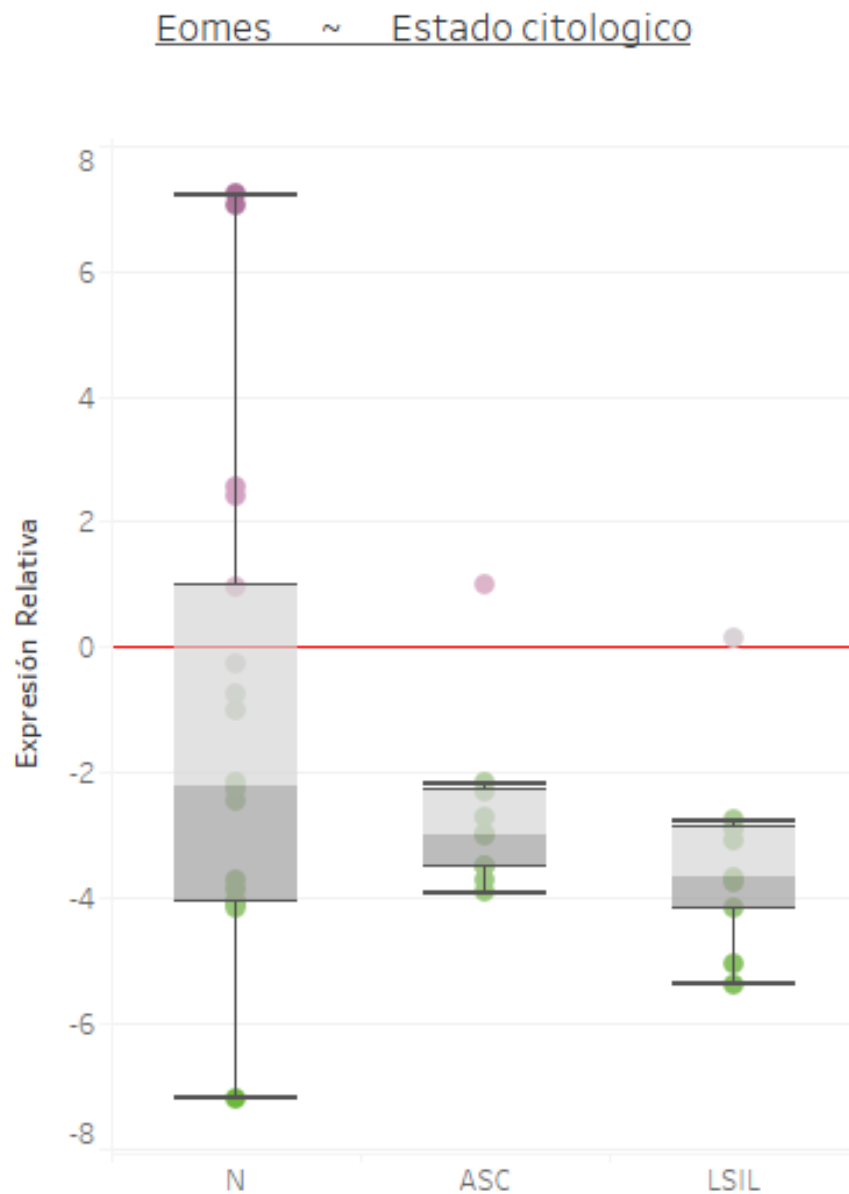


Figura 70. Niveles de expresión de *eomes* de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

Tbx21

Los valores de expresión de Tbx21 no varió entre los estados citológicos (GLM, $\chi^2 = 0.05$, $gl = 38$, $p = 0.10$; Fig. 71).

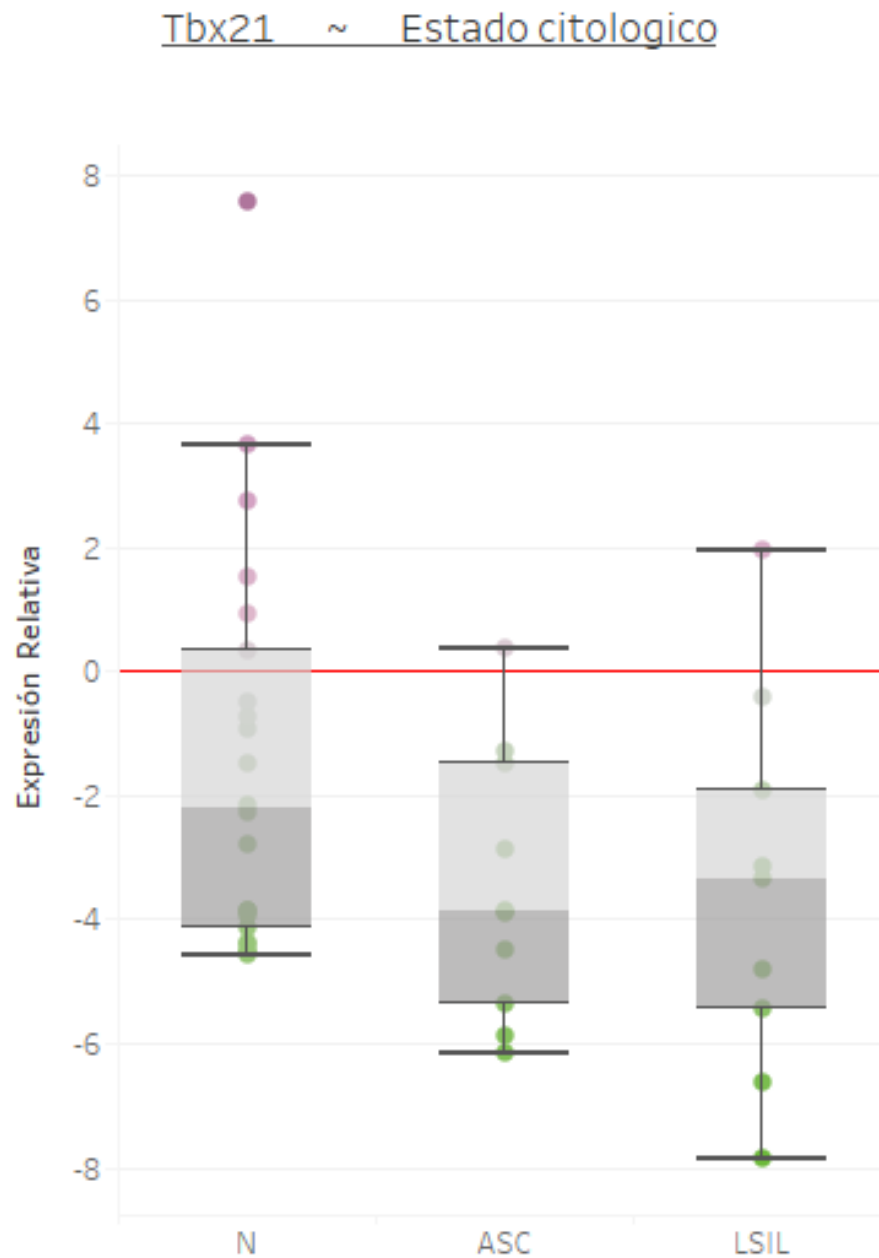


Figura 71. Niveles de expresión de Tbx21 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

GATA-3

La expresión de GATA-3 tampoco fue diferentes entre los estados citológicos (GLM, $X^2= 2.28$, $gl= 41$, $p= 0.16$; Fig. 72).

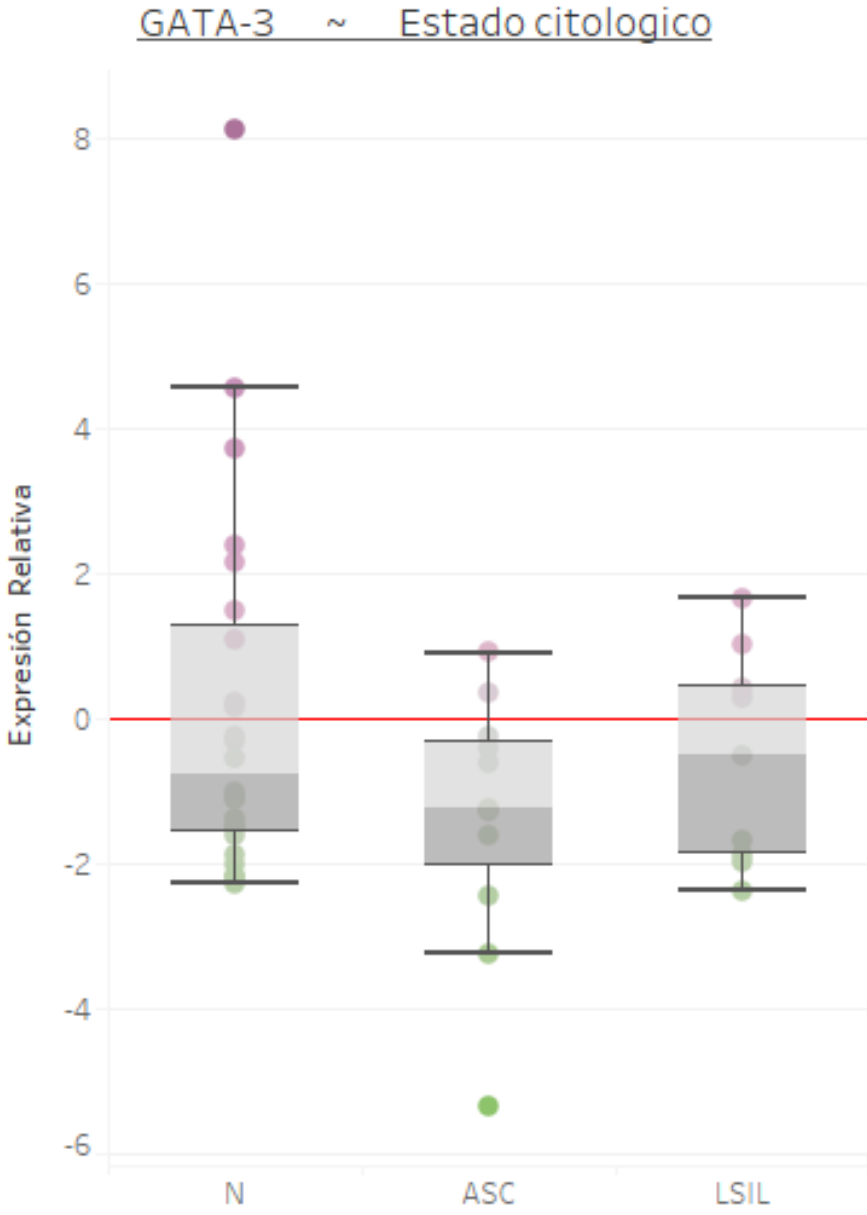


Figura 72. Niveles de expresión de GATA-3 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

STAT-6

La expresión de STAT-6 no varió entre el estado citológico (GLM, $X^2= 3.12$, $gl= 27$, $p= 0.20$; Fig. 73).

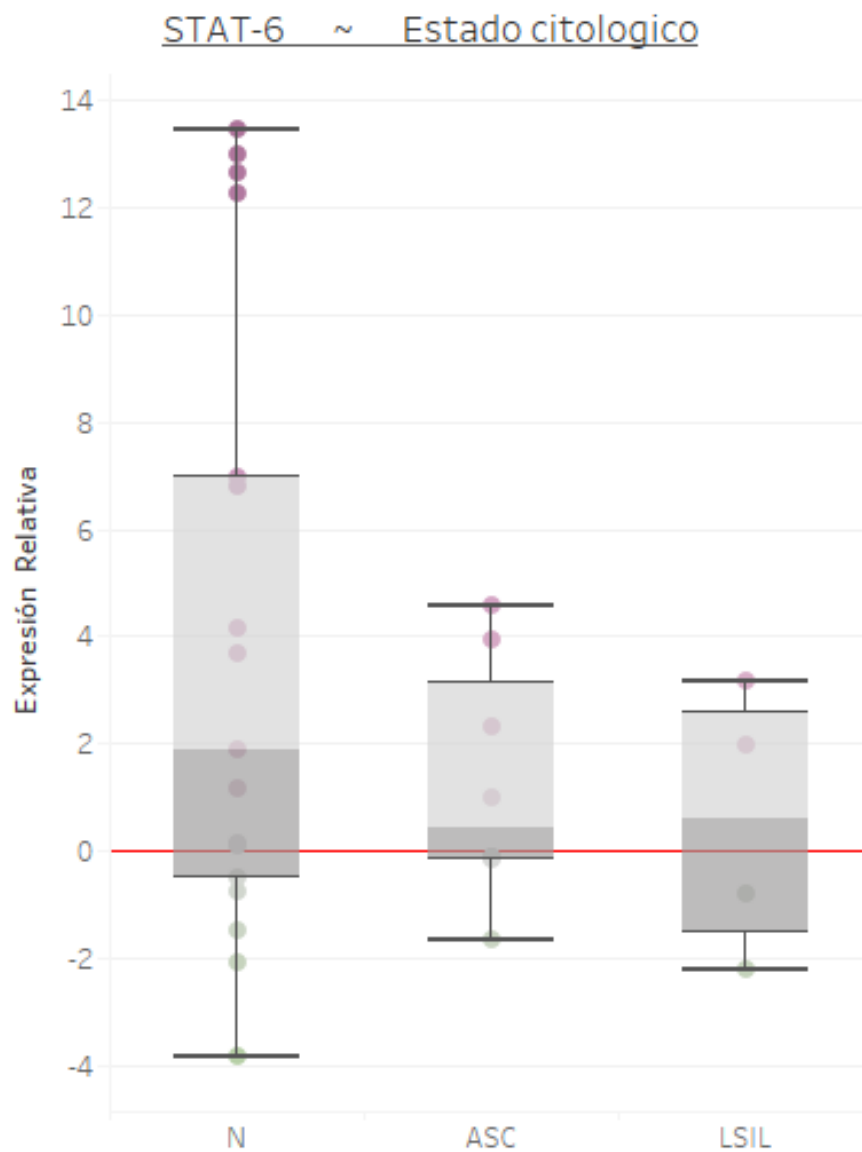


Figura 73. Niveles de expresión de STAT-6 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

FOXp3

Los valores de expresión de FOXp3 no varió entre los estados citológicos (GLM, $X^2=0.00$, $gl=39$, $p=0.26$; Fig. 74).

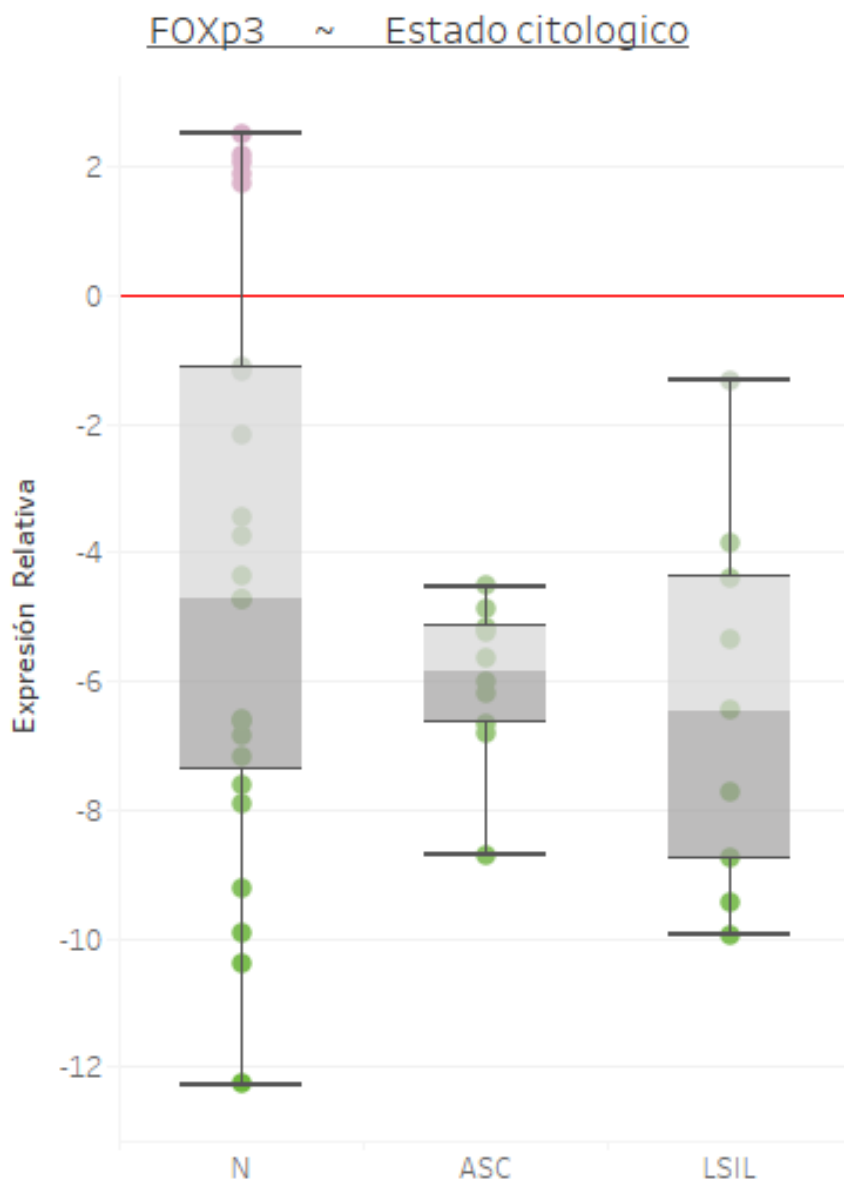


Figura 74. Niveles de expresión de FOXp3 de acuerdo al estado citológico (LSIL, ASC, N).

KIR

La expresión relativa de KIR no varió de acuerdo a la presencia o ausencia de infección viral (GLM, $F_{3,38} = 2.09$, $p = 0.11$; Fig. 75).

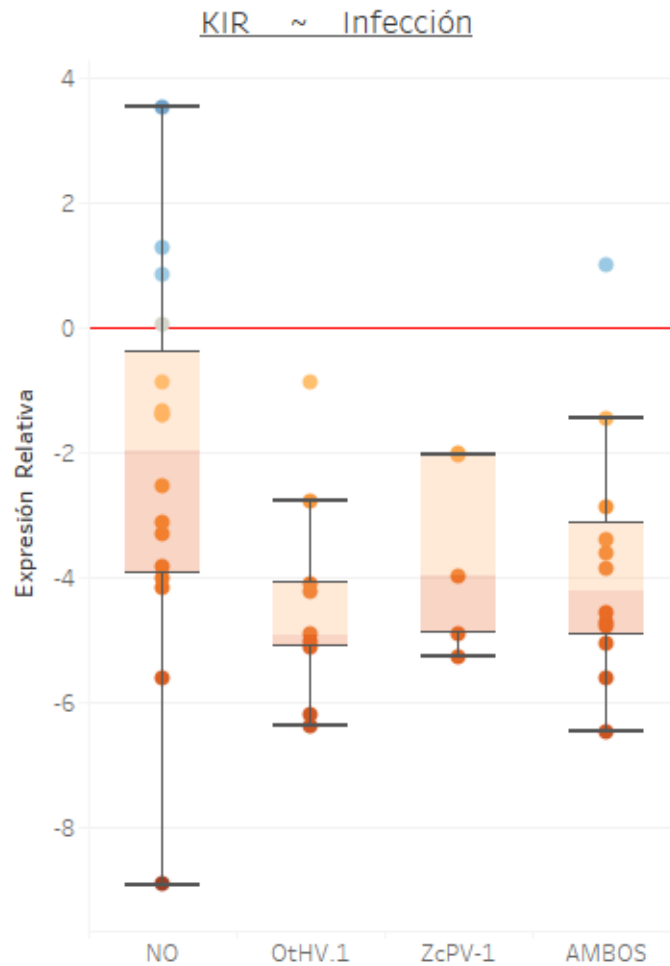


Figura 75. Niveles de transcripción de KIR según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

Perforina

La expresión relativa de perforina no varió de acuerdo al estatus de infección (GLM, $F_{3,,20} = 0.02$, $p = 0.99$; Fig. 76).

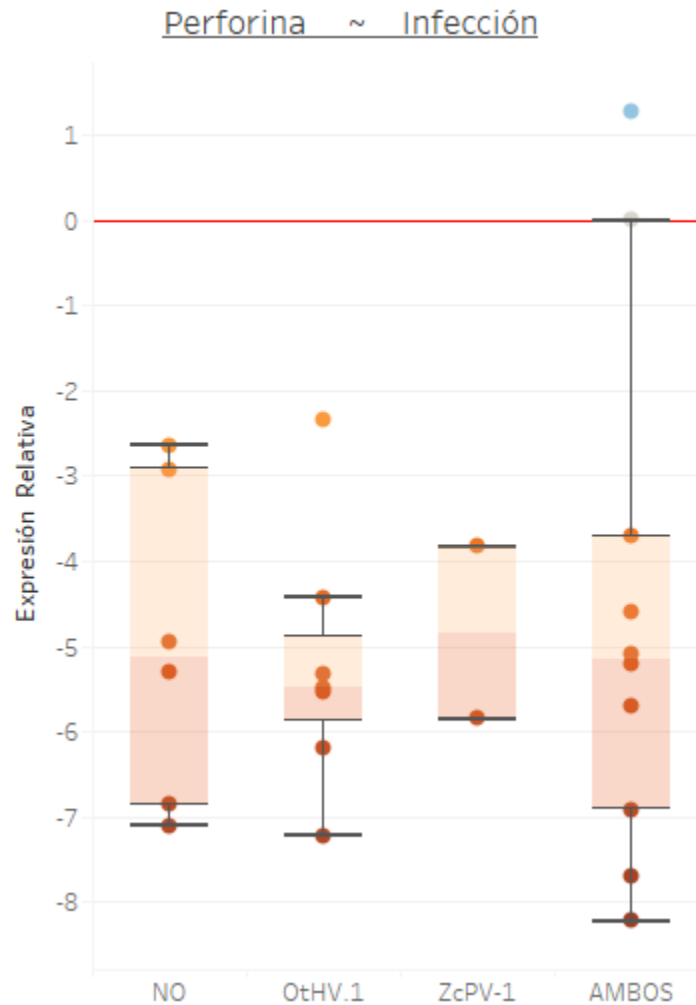


Figura 76. Niveles de transcripción de perforina según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

Granzima B

Los niveles de expresión de granzima B no variaron de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2 = 1.58$, $gl = 39$, $p = 0.11$; Fig. 77).

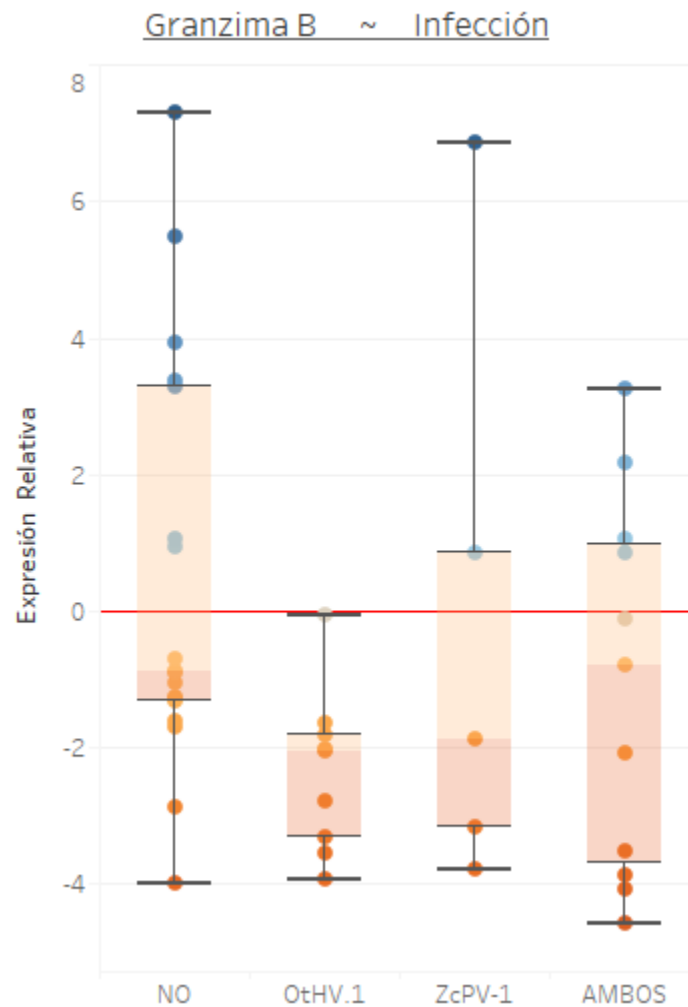


Figura 77. Niveles de transcripción de granzima B según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

GATA-3

La expresión relativa de GATA-3 no varió de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2=2.41$, $gl=48$, $p=0.43$; Fig. 79).

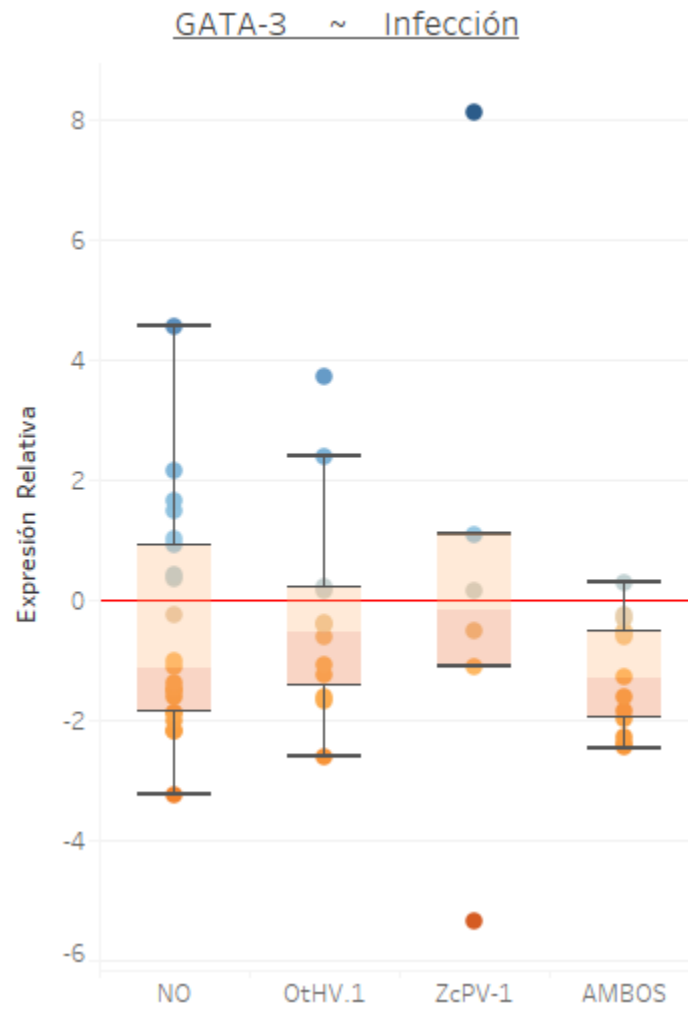


Figura 79. Niveles de transcripción de GATA-3 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos, respectivamente.

FOXp3

Los niveles de expresión relativa de FOXp3 no variaron de acuerdo al estatus de infección (GLM, $X^2 = 0.02$, $gl= 45$, $p= 0.60$; Fig. 80).

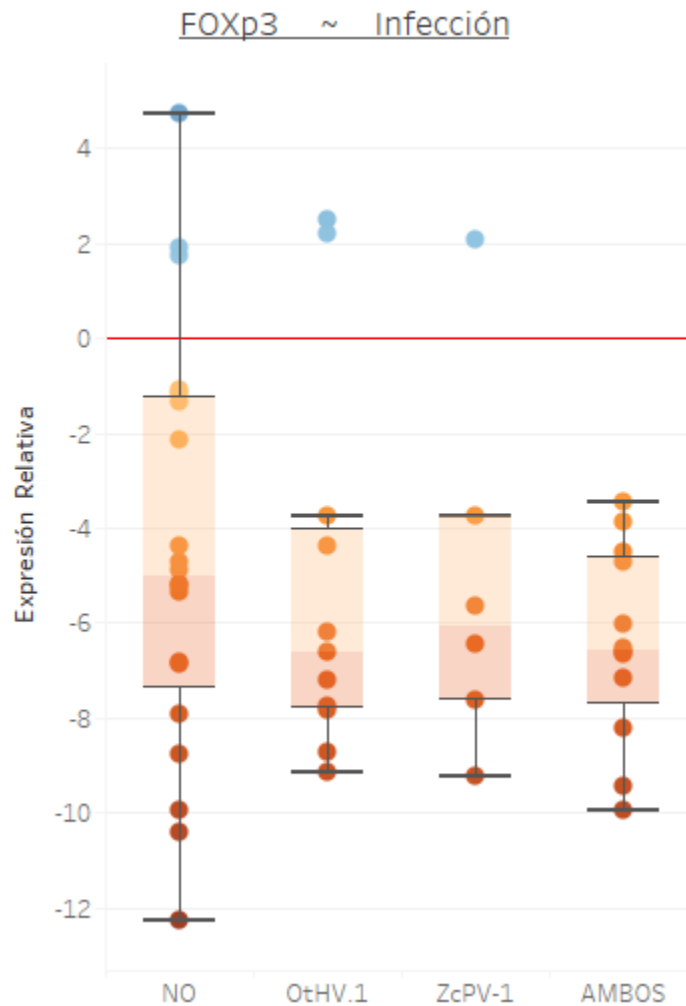


Figura 80. Niveles de transcripción de FOXp-3 según la ausencia de infección (No), la infección por OtHV-1, la infección por ZcPV-1 y la infección por ambos virus oncogénicos,