



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GÉNÉTICA SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS DE LOBO MARINO DE CALIFORNIA, *Zalophus californianus*, DURANTE SU REHABILITACIÓN CLÍNICA

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Anai Del Llano Gilio

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Presidente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Secretario

Firma

Dr. Rolando Tenoch Bárcenas

Vocal

Firma

M. en C. María de Jesús Guerrero Carrillo

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2013
México

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte en poblaciones silvestres. La eficacia biológica de las especies está relacionada con su variabilidad genética, ya que una baja heterocigocidad puede disminuir la resistencia a patógenos y, por ende, impactar sobre la supervivencia. En este sentido resulta importante realizar estudios sobre los efectos que la variabilidad genética tiene sobre la viabilidad de poblaciones silvestres. Utilizar especies centinelas como modelos no tradicionales para comprender el papel que juega la variabilidad genética en el éxito de la supervivencia de la especie es clave para desarrollar estrategias de conservación y extrapolar los hallazgos a otras especies. Recientemente se dio a conocer que la carga parasitaria de *Uncinaria*, un nematodo hematófago virulento de crías de lobo marino de California y de lobo marino de Nueva Zelanda, era mayor en animales genéticamente menos variables, pero la ocurrencia de anemia en animales infectados era explicado por una ventaja de heterosis en un solo microsatélite (Hg4.2). En esta tesis se utilizó al lobo marino de California, *Zalophus californianus*, para investigar la relevancia de la heterocigocidad general y la heterosis puntal en diversos procesos patológicos. Se utilizaron datos de lobos marinos varados en las costas de California, EEUUA, entre 1994 y 2005, y se construyeron modelos lineales generalizados para ver si el sexo, edad, heterocigocidad general y heterocigocidad en un solo marcador, el microsatélite Hg4.2, explicaban la variación en parámetros sanguíneos para nueve causas de varamiento: leptospirosis, ácido domóico, parasitosis helmíntica gastrointestinal, carcinoma urogenital, infección bacteriana severa, malnutrición, neumonía bacteriana-parasitaria, septicemia y trauma. Se encontró que los parámetros sanguíneos varían entre causas de varamiento, pero la heterocigocidad, edad y sexo explicaron significativamente la variación de algunos parámetros sanguíneos para cada causa de varamiento. La heterocigocidad en el microsatélite Hg4.2 explicó significativamente la variación en la concentración de plaquetas de individuos afectados por parasitosis helmíntica gastrointestinal, lo que apoya las hipótesis planteadas sobre la desventaja de una menor diversidad genética sobre la eficacia biológica. El conocimiento sobre las enfermedades a las que están sometidas las especies silvestres y su relación con la variabilidad genética individual es importante de tomar en cuenta para poder generar nuevas estrategias de conservación y manejo de animales, particularmente de aquellas que se encuentran en rehabilitación.

SUMMARY

Infectious diseases are one of the most important causes of death in natural populations. Fitness is related to genetic variability of species, as low levels of heterocigosity can decrease resistance to pathogens, and thus, impact survival. In this sense, it is important to conduct studies on the effects that genetic variability has on the viability and persistence of natural populations. Using sentinel species as non-traditional models to understand the role that genetic variability plays in terms of species survival is key to developing conservation strategies and to extrapolate findings to other species. Recently, it was shown that the load of *Uncinaria* sp., a virulent haematophagous nematode that affects California sea lion and New Zealand sea lion pups, was higher in animals with lower genetic variability, but anaemia subsequent to infection was explained by heterosis at a single microsatellite (Hg4.2). Here I investigated the relevance of general and punctual heterozygote advantage in California sea lions, *Zalophus californianus*, afflicted with diverse pathologies. I used data from stranded California seals found in the coasts of California (USA) between 1994 and 2005, and built generalized linear models to determine whether sex, age, general heterozygosity or punctual heterozygosity at microsatellite Hg4.2 explain variation in blood parameters for animals belonging to one of nine well defined causes of stranding: leptospirosis, domoic acid intoxication, gastrointestinal parasites, urogenital carcinoma, systemic bacterial infection, malnutrition, pneumonia, septicaemia and trauma. I found that blood parameters varied between animals across the different stranding categories, but heterozygosity, age and sex explained variation of blood parameters within each stranding cause. In particular, heterozygosity at microsatellite Hg4.2 explained variation in platelet concentrations of animals afflicted by gastrointestinal parasites, a finding that supports the hypothesis that lower heterozygosity is disadvantageous for an individual's fitness. Knowledge on diseases that affect wildlife and their relationship with levels of genetic variability are important for conservation and management strategies, particularly for those undergoing rehabilitation and release.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi familia

A mi padre Ramón Del Llano quien siempre estuvo orgulloso de mi y que antes de partir se quedo con las ganas de ver este trabajo.

A mi madre Ma. Carmen Gilio que desde pequeña me enseñó a dar más de mi misma y que espera con ansias esta tesis.

A mi hermano Luis Ángel Del Llano Gilio a quien quiero mucho y con quien quiero compartir este logro de mi vida así como él lo hizo conmigo.

A mi segundo papá Raúl Pineda que al igual que mi mamá esperaba con ansias este día y con quien me gusta compartir a mi familia.

A mi abuelita Esperanza Medina quien siempre ha estado a mi lado y siempre me ofrece una sonrisa.

A mi primita Valeria Gilio que espero lea esta tesis y le den ganas de estudiar biología.

A mi tía Conchita Gilio que siempre me ha escuchado y apoyado, y a quien nunca le importo cuanto tardara en terminar esta tesis, lo único que quería es que disfrutara el hacerlo.

A mi compañera de vida Maya, que aunque muchos no entiendan nuestra relación es alguien a quien tengo muchas cosas que agradecerle y a quien le debo parte de mi felicidad.

A mi pareja Pepe Betito quien aunque llevo no hace mucho a mi vida, me ha enseñado a apreciar el presente y quien me apoyo para escribir esta tesis.

Por último también se la dedico a Karina, que sin ella nada de esto podría haber sido posible.

Infinitas Gracias

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera agradecerle a Karina, quien me abrió las puertas a su laboratorio, me permitió trabajar en esta tesis y me dio oportunidades que nunca hubiera podido imaginar. Gracias por ser mi mentora y guiarme por este camino de la investigación. Tal vez no lo sepas pero, gracias a las practica de campo que me llevaste, a la estancia que pude hacer en el Marine Mammal Center, los congresos a los que nos impulsaste a ir y a la primer Escuela de Mastozoología Marina en México que tuve el honor de asistir, me dejaron enseñanzas que jamás voy a poder olvidar y que gracias a ellas mi futuro lo tengo más claro. Gracias por esas largas platicas en donde escuchabas mis temores y mis dolores del corazón, has sido gran apoyo para mi vida académica y personal. Siempre estaré agradecida por las oportunidades que me has brindado y espero poder ofrecerle lo mismo a futuras generaciones, porque me enseñaste que compartir los conocimientos que tenemos es de lo mejor que le podemos ofrecer a nuestro país. También le agradezco a Fausto por resolver mis dudas y porque lo considero una gran persona quien siempre está dispuesto a ayudar a los demás.

Tengo tanto que agradecerle a mi papá, primero la oportunidad de por fin dedicarle un trabajo mío, su apoyo incondicional y moral al realizar este trabajo del cual estaba muy orgulloso aunque no lo pudo ver terminado. Te doy las gracias porque mientras estuviste vivo supiste amarme, escucharme, motivarme, cultivarme y enseñarme la importancia de la educación y la transmisión de conocimientos. También te agradezco porque con tu muerte aunque me dejaste un dolor horrible en mi corazón también me diste la oportunidad de crecer, ser fuerte y me hiciste saber que aun sigues cuidándome y apoyándome.

Mamá una vez me dijiste que lo único que nos podían dar como padres era nuestra educación y que con eso nosotros nos podíamos abrir camino en la vida, pues quiero decirte que hiciste muy buen trabajo y que no te preocupes porque sé que mi camino apenas

comienza. Gracias por el apoyo que siempre me has dado como madre y amiga, te agradezco por la formación que me diste y por apoyar mis decisiones. Te amo

A mi hermano le doy las gracias por ser el hermano grande que me cuida, un amigo incondicional y también un ser humano de quien aprendo constantemente. Espero algún día este orgulloso de mí como yo lo estoy de él.

Raúl, gracias por ser parte de mi familia y aceptarnos como somos. Agradezco tu llegada a nuestras vidas, porque nos has llenado de felicidad y amor. Pero lo más importante es porque cuando perdí un padre, se que contigo aun me queda otro.

A mi abuelita, tía y prima les quiero dar las gracias por siempre estar conmigo cuando más las necesito, por el apoyo incondicional que me han brindado y por ser muy pacientes con la elaboración de mi tesis.

A Pepe Betito por haber llegado a mi vida en el momento adecuado. Por ayudarme a enfrentar la vida con una sonrisa y por tomar mi mano en el camino. También por haberme dado una familia perruna, por estar siempre orgulloso de mí, y porque ahora eres mi apoyo más grande. Te AMO

También les doy las gracias a mi otra familia (Lety, Rubén, Bárbara, Daniela, Pollo, Genaro, Karen, Isadora, Paco, Jazmin, Yola, Pepe; Mari y Nahui) a quienes conozco desde que tengo memoria y con quienes he compartido mi crecimiento personal y profesional.

A todos en el laboratorio Ale, Moni, Yara, Eunice, Chuy, Wendy, Jorge, Luis y Adriana con quien compartí varias comidas y risas. A Ceci por siempre apoyarme y Camila por ser mis cucharitas y tener esas largas platicas en donde siempre terminaba de buen humor y con otras perspectivas. A Fabiola porque su estancia en el laboratorio no la voy a olvidar al igual que el súper. A Blanca quien después de ser una compañera de laboratorio se hizo mi amiga y a quien le debo parte de mi salud mental.

Contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 2. ANTECEDENTES | 11 |
| 2.1 La heterocigocidad y sus correlaciones con aspectos de la eficacia biológica Darwiniana (<i>fitness</i>) | 11 |
| 2.2 El lobo marino de California | 17 |
| 2.2.1 El efecto de la heterocigocidad en las infecciones por <i>Uncinaria</i> | 20 |
| 2.2.2 Enfermedades comunes en el lobo marino de California | 23 |
| 2.3 Aspectos básicos de inmunología | 28 |
| 2.4 Mecanismos de coagulación y parámetros sanguíneos de mamíferos | 30 |
| 2.5 Parámetros sanguíneos en lobo marino de California | 35 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 37 |
| 4. HIPÓTESIS | 38 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 38 |
| 5.1 Objetivos Específicos | 39 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 39 |
| 6.1 Área de estudio | 39 |
| 6.2 Revisión de datos y compilación de parámetros sanguíneos | 42 |
| 6.3 Análisis estadístico | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 7. RESULTADOS | 44 |
| 7.1 Variación de parámetros sanguíneos por condición clínica | 44 |
| 7.2 Efecto de la heterocigocidad general y la heterocigocidad puntual sobre los parámetros sanguíneos | 57 |
| 8. DISCUSIÓN | 66 |
| 9. CONCLUSIONES | 71 |
| 10. REFERENCIAS | 72 |
| 11. ANEXO | 91 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1 Comparación entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas | 27 |
| Cuadro 2.2 Rangos normales de hematología de <i>Zalophus californianus</i> de vida libre y en cautiverio que se encuentran sanos y buena condición física | 34 |
| Cuadro 7.1 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por leptospirosis | 55 |
| Cuadro 7.2 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por ácido domóico | 56 |
| Cuadro 7.3 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por parasitosis helmíntica gastrointestinal | 57 |
| Cuadro 7.4 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por carcinoma urogenital | 58 |
| Cuadro 7.5 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por infección bacteriana severa | 59 |
| Cuadro 7.6 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por malnutrición | 60 |
| Cuadro 7.7 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por neumonía bacteriana-parasitaria | 61 |
| Cuadro 7.8 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por septicemia | 62 |
| Cuadro 7.9 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por trauma | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 Pedigree de un gorrión macho | 14 |
| Figura 2.2 Estimación individual del nivel de endogamia con IR | 16 |
| Figura 2.3 Mapa de distribución de <i>Zalophus californianus</i> | 18 |
| Figura 2.4 Dimorfismo sexual entre macho y hembra de <i>Zalophus californianus</i> | 20 |
| Figura 2.5 Ciclo de vida de <i>Uncinaria</i> spp en lobo marino de Nueva Zelanda | 22 |
| Figura 2.6 Características de <i>Uncinaria</i> | 23 |
| Figura 2.7 Necropsias de lobo marino de California adulto mostrando evidencia macroscópica de cáncer urogenital | 25 |
| Figura 2.8 Trauma y malnutrición en el lobo marino de California | 26 |
| Figura 2.9 Gusanos en tejido pulmonar de lobo marino de California | 27 |
| Figura 2.10 Origen hematopoyético de las células sanguíneas | 29 |
| Figura 6.1 Distribución geográfica del área de Rescate mamíferos marinos por parte del Marine Mammal Center | 39 |
| Figura 6.2 Localización de las Islas del Canal, EEUA | 40 |
| Figura 7.1 Promedio de plaquetas circulantes por categorías de enfermedad | 43 |
| Figura 7.2 Promedio de hematocrito circulante por categorías de enfermedad | 44 |
| Figura 7.3 Promedio de hemoglobina circulante por categorías de enfermedad | 45 |
| Figura 7.4 Promedio de volumen corpuscular medio circulante por categorías de enfermedad | 46 |
| Figura 7.5 Promedio de hemoglobina corpuscular media circulante por categorías de enfermedad. | 47 |

Figura 7.6 Promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media circulante por categorías de enfermedad 48

Figura 7.7 Promedio de eritrocitos circulantes por categorías de enfermedad 49

Figura 7.8 Promedio de leucocitos totales circulantes por categorías de enfermedad 50

Figura 7.9 Promedio de monocitos circulantes por categorías de enfermedad 51

Figura 7.10 Promedio de eosinófilos circulantes por categorías de enfermedad 52

Figura 7.11 Promedio de linfocitos circulantes por categorías de enfermedad 53

Figura 7.12 Promedio de neutrófilos segmentados circulantes por categorías de enfermedad 54

Figura 7.13 Promedio de neutrófilos en banda circulantes por categorías de enfermedad 55

ÍNDICE FIGURAS ANEXO

| | |
|---|-----|
| Figura 1 Variación temporal en el promedio de Eritrocitos registrado por edades | 83 |
| Figura 2 Variación temporal en el promedio de Hemoglobina registrado por edades | 84 |
| Figura 3 Variación temporal en el promedio de hematocrito registrado por edades | 85 |
| Figura 4 Variación temporal en el promedio de volumen corpuscular medio por edades | 86 |
| Figura 5 Variación temporal en el promedio de hemoglobina corpuscular media (HCM) por edades | 87 |
| Figura 6 Variación temporal en el promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) por edades | 88 |
| Figura 7 Variación temporal en el promedio de plaquetas registrado por edades | 89 |
| Figura 8 Variación temporal en el promedio de leucocitos registrado por edades | 90 |
| Figura 9 Variación temporal en el promedio de neutrófilos segmentados registrados por edades | 91 |
| Figura 10 Variación temporal en el promedio de neutrófilos en banda registrados por edades | 92 |
| Figura 11 Variación temporal en el promedio de linfocitos registrado por edades | 93 |
| Figura 12 Variación temporal en el promedio de eosinófilos registrado por edades | 94 |
| Figura 13 Variación temporal en el promedio de monocitos registrado por edades | 95 |
| Figura 14 Promedio de eritrocitos durante los años de varamiento 1994-2005 | 96 |
| Figura 15 Promedio de hemoglobina durante los años de varamiento 1994-2005 | 97 |
| Figura 16 Promedio de hematocrito durante los años de varamiento 1994-2005 | 98 |
| Figura 17 Promedio de volumen corpuscular medio durante los años de varamiento 1994-2005 | 99 |
| Figura 18 Promedio de hemoglobina corpuscular media durante los años de varamiento 1994-2005 | 100 |
| Figura 19 Promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media durante los años de varamiento 1994-2005 | 101 |
| Figura 20 Promedio de plaquetas durante los años de varamiento 1994-2005 | 102 |
| Figura 21 Promedio de leucocitos durante los años de varamiento 1994-2005 | 103 |
| Figura 22 Promedio de neutrófilos segmentados durante los años de varamiento 1994-2005 | 104 |
| Figura 23 Promedio de neutrófilos en banda durante los años de varamiento 1994-2005 | 105 |
| Figura 24 Promedio de eosinófilos durante los años de varamiento 1994-2005 | 106 |
| Figura 26 Promedio de linfocitos durante los años de varamiento 1994-2005 | 107 |
| Figura 27 Promedio de monocitos durante los años de varamiento 1994-2005 | 108 |
| Figura 28 Promedio de eritrocitos de machos y hembras de lobo marino de California | 109 |
| Figura 29 Promedio de hemoglobina de machos y hembras de lobo marino de California | 110 |
| Figura 30 Promedio de hematocrito de machos y hembras de lobo marino de California | 111 |
| Figura 31 Promedio de volumen corpuscular medio de machos y hembras de lobo marino de | 112 |

| | |
|---|-----|
| California | |
| Figura 32 Promedio de hemoglobina corpuscular media de machos y hembras de lobo marino de California | 113 |
| Figura 33 Promedio de plaquetas de machos y hembras de lobo marino de California | 114 |
| Figura 34 Promedio de leucocitos de machos y hembras de lobo marino de California | 115 |
| Figura 35 Promedio de neutrófilos segmentados de machos y hembras de lobo marino de California | 116 |
| Figura 36 Promedio de neutrófilos en banda de machos y hembras de lobo marino de California | 117 |
| Figura 37 Promedio de linfocitos de machos y hembras de lobo marino de California | 118 |
| Figura 38 Promedio de eosinófilos de machos y hembras de lobo marino de California | 119 |
| Figura 39 Promedio de monocitos de machos y hembras de lobo marino de California | 120 |
| Figura 40 Causas de varamiento de lobo marino de California por año | 121 |
| Figura 41 Causas de varamiento de lobo marino de California por año | 122 |

1. Introducción

Durante las últimas décadas se ha demostrado que los patógenos pueden representar una amenaza seria para las poblaciones silvestres, particularmente para aquellas amenazadas o en peligro de extinción, ya que puede causar repentinos e inesperados descensos en la riqueza de poblaciones locales (Smith *et al*, 2009). En términos generales, es difícil determinar el estado de salud de la mayoría de las poblaciones silvestres, el funcionamiento de su sistema inmune y las enfermedades infecciosas a las que tienen mayor susceptibilidad (Mancia *et al*, 2012). Incrementar nuestro conocimiento sobre los factores intrínsecos que determinan la susceptibilidad o resistencia a los patógenos puede ser de gran utilidad para apoyar acciones de conservación y manejo de poblaciones silvestres (Acevedo-Whitehouse, 2004). Sin embargo, la mayor parte de la información con la que se cuenta es de especies domesticas, protegidas o en peligro de extinción. Es, por tanto, necesario abordar investigaciones en especies silvestres no tradicionales para las que se cuenta con datos ecológicos, poblacionales y epidemiológicos extensos, y así poder extrapolar los resultados a otras especies.

En este sentido, el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) es un modelo silvestre ideal para entender procesos patológicos, variaciones intrínsecas en su resistencia a ellos y su potencial impacto poblacional. Este mamífero pinnípedo, que pertenece a la familia Otariidae, reside durante todo el año en las costas de California y Oregon, EEUUA, y a lo largo de la Península de Baja California, México. Su distribución geográfica, ecología de forrajeo, reproducción, cuidado parental y sistema social han evolucionado bajo la influencia de surgencias y convecciones oceánicas estacionales asociadas a la corriente de California (Melin, 2002). Aunque el lobo marino de California no es una especie amenazada (Auriolles y Trillmich, 2008), se sabe que existen neoplasias, toxinas, bacterias, virus y parásitos que afectan la morbilidad y mortalidad de sus poblaciones silvestres

(Miller *et al*, 2001). Estas enfermedades provocan varamientos¹ a lo largo de toda la costa de California. Dentro de las enfermedades que causan varamientos en el lobo marino de California se encuentra la uncinariasis, provocada por el nematodo hematófago *Uncinaria* spp. (Lyons *et al*, 2001), que infecta a varias especies de otáridos y que puede provocar alta mortalidad en crías de algunas especies. El impacto poblacional que puede tener la uncinariasis en las poblaciones de otáridos quedó en evidencia desde 1997 en la Isla de San Miguel, California, EEUUA donde a partir de necropsias practicadas a crías de lobo fino del Norte *Callorhinus ursinus* y de lobo marino de California se observó una prevalencia de *Uncinaria* spp. del 96 % y del 100 % respectivamente (Lyons *et al*, 1997). Otro estudio más reciente realizado en la misma isla, reportó que el 100% de las crías de lobo marino que murieron durante los primeros meses de vida presentaba ejemplares adultos de *Uncinaria* spp. en el intestino (Lyons *et al*, 2005). La mortalidad asociada a estas infecciones es alta en el lobo marino de California reportada entre el 50 y el 70% (Lyons *et al*, 2001).

Otros agentes patógenos que afectan a las poblaciones de lobo marino de California son la bacteria espiroqueta *Leptospira* spp. que causa leptospirosis, una enfermedad zoonótica que desde 1970 ha incrementado la tasa de abortos, daño en riñón y varamientos en masa (Vedros *et al*, 1971). El cáncer urogenital también es una enfermedad que se observa frecuentemente en lobos marinos varados, (Gulland *et al*, 1996) desde 1974 se tiene reporte de neoplasia y ha incrementado desde entonces. Varios factores son los que se creen que están asociados al desarrollo de la enfermedad como contaminantes (Ylitalo *et al*, 2005), gammaherpesvirus otarino OtHV-1 (Buckles *et al.*, 2006) y estreptococos beta-hemolíticos (Johnson *et al.*, 2006). Otro causante de enfermedad no infecciosa es el ácido domóico que frecuentemente causa intoxicación en el lobo marino (Greig *et al*, 2005). Ésta condición es causada por una neurotoxina que es producida por florecimientos de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, ésta neurotoxina provoca necrosis en el hipocampo y puede llegar a ser una enfermedad crónica o aguda (Thomas *et al*, 2009). Los síntomas clínicos son muy

¹ Evento caracterizado por la aparición de un mamífero marino vivo o muerto en la playa o flotando cerca de la orilla de la costa, en el que, de estar vivo, el animal es incapaz de realizar actividades normales (Wilkinson, 1991).

característicos ya que el daño es neurológico, por ejemplo se observa ataxia, convulsiones y respuesta aletargada a estímulos (F. Gulland, 2000). Por último, otra causa por la que los animales varan comúnmente es el trauma relacionado con enmallamientos por redes de pesca (Moore *et al.*, 2009), colisiones con botes, heridas de bala y ataques de tiburón (Greig *et al.*, 2005).

La resistencia o susceptibilidad a patógenos es influenciada por varios factores, algunos de ellos intrínsecos, como la genética, la edad, la condición nutricional, y otros extrínsecos, como la estación del año, el clima y la disponibilidad de alimento. La resistencia a patógenos también está influida por factores genéticos en varias etapas de la iniciación y expresión de la respuesta inmune, incluyendo el manejo y presentación de antígenos, la producción de anticuerpos, linfocinas y la interacción de linfocitos (Chapel *et al.*, 1999).

En el lobo marino de California se han explorado aspectos de la regulación genética a enfermedades infecciosas, demostrando que sí interfiere con aspectos de salud (e.g. Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Específicamente en relación a las uncinariasis en el lobo marino, recientemente se demostró que los niveles de heterocigocidad general, medido como Relación Interna o IR (Internal Relatedness por sus siglas en inglés) es significativo para explicar la carga parasitaria pero, que la heterocigocidad puntual en un microsatélite (Hg4.2) influye sobre el desarrollo de anemia debido a la patogenia por *Uncinaria* spp (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2006). Un estudio independiente realizado en otra especie de pinnípedo otárido que también es hospedero de *Uncinaria*, el lobo marino de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*), encontró evidencia que apoya esta predicción (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2009), y que sugiere que los efectos genéticos están relacionados con procesos de coagulación y/o trombocitopoyesis (Ruiz, 2001).

En el presente estudio se examinaron parámetros sanguíneos generales y asociados a los procesos de coagulación en el lobo marino de California para I) determinar los valores de referencia en animales clínicamente sanos y en animales afectados por patologías específicas, y II) comprobar si la heterocigocidad confiere una ventaja en términos de coagulación en los procesos infecciosos.

2. Antecedentes

2.1 La heterocigocidad y sus correlaciones con aspectos de la eficacia biológica Darwiniana (*fitness*)

Los organismos que son diploides tienen dos copias de cada gen, llamados alelos, uno proveniente de la madre y el segundo del padre. Para un gen o locus dado, si un individuo tiene dos alelos o versiones diferentes entonces es heterocigoto y si tiene dos alelos iguales es homocigoto (Snustad y Simmons, 2011). La endogamia, resultado de apareamiento entre dos individuos emparentados, incrementa el nivel de homocigocidad en las crías, generalmente con resultados negativos (Snustad y Simmons, 2011). La teoría de evolución por selección natural predice que los organismos con mayor diversidad genética producirán mayor número de prole que organismos con menor diversidad genética, ya que estos estarán menos adaptados para la supervivencia. Al aparearse dos individuos emparentados, su descendencia será menos viable porque tendrán menor éxito reproductivo o serán de menor tamaño en comparación con el resto de la población (mencionado en Slate *et al*, 2004). Debido a la frecuencia de alelos recesivos, la descendencia de apareamientos endogámicos frecuentemente tiene fenotipos letales a temprana edad, o son afectados por enfermedades específicas con origen genético (Charlesworth y Willis, 2009).

La variabilidad genética es necesaria para que los organismos puedan adaptarse a ambientes cambiantes. Como se mencionó anteriormente, la endogamia incrementa las probabilidades de que un individuo sea homocigoto para alelos recesivos deletéreos en loci que exhiben sobredominancia (revisado en Slate *et al*, 2004). Por ejemplo, en humanos la diversidad de los genes que agrupan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) que son encargados de la presentación antigénica del sistema inmune (Chapel *et al*, 1999), están relacionados con la eficacia biológica (Lie *et al.*, 2009). Lo anterior nos sirve para ejemplificar que el hecho de ser homocigoto u heterocigoto para determinados genes puede tener consecuencias para la salud, que al final repercute sobre el éxito de

supervivencia. Aún se desconoce cómo es que la endogamia afecta a las poblaciones silvestres y cómo puede variar entre éstas, también se conoce cómo es que la endogamia afectará a futuras generaciones o si depende de condiciones ambientales, ni con qué magnitud puede influir sobre los cambios demográficos (Keller y Waller, 2002), es por eso importante que se sigan haciendo estudios sobre los efectos que causa la endogamia en poblaciones silvestres.

Coltman *et al* (1999) propusieron que la susceptibilidad a enfermedades infecciosas de poblaciones silvestres podía estar relacionada con la heterocigocidad y la eficacia biológica. Esta hipótesis se ha confirmado empíricamente en estudios que registraron asociaciones entre diversidad genética (heterocigocidad) y supervivencia o resistencia a enfermedades o infecciones, siendo mayor en individuos heterocigotos que en individuos homocigotos (ver e.g. en MacDougall-Shackleton *et al*, 2005; Rudan *et al*, 2003; Ross-Gillespie *et al*, 2007; Spielman *et al*, 2004; Acevedo-Whitehouse *et al*, 2003, 2006 y 2009; Keller y Waller, 2002; Castinello *et al*, 2001). Dicha asociación se explica porque la endogamia compromete la habilidad de controlar las infecciones y se cree que el hecho de ser más heterocigoto confiere una mayor resistencia a patógenos (Coltman *et al*, 1999).

En poblaciones domesticas o de laboratorio en donde se tiene conocimiento del pedigree de los individuos es fácil estimar los grados de endogamia. El coeficiente de endogamia de un organismo se conoce como f y es calculado como la probabilidad de que dos genes homólogos sean idénticos por descendencia (Hartl y Clark, 1989). Aunque se cree que la endogamia en poblaciones silvestres es generalmente evitada y, que cuando llega a ocurrir los alelos que son mutaciones deletéreas recesivas se exponen a la selección reduciendo así su porcentaje dentro de la población (Leberg y Firmin, 2008) . Sin embargo se ha demostrado que en poblaciones silvestres la endogamia no siempre puede ser evitada (Keller y Waller, 2002). En la figura 2.1 se ejemplifica como se observaría un pedigree en poblaciones silvestres, en donde el grado de endogamia está relacionado con la cantidad de ascendencia que es compartida por los padres.

En poblaciones silvestres en donde no se cuenta con un árbol genealógico para conocer la información familiar de los individuos, es necesario realizar estudios basados en marcadores genéticos neutrales² para dar a conocer la herencia de polimorfismos, el grado de depresión endogámica, y la variación genética cuantitativa (revisado en Pemberton, 2008). El uso de los marcadores genéticos neutrales ha ayudado a conocer el grado de endogamia sin la necesidad de conocer el pedigree de los individuos (Pemberton, 2008). En particular, los microsatélites son marcadores genéticos neutrales muy utilizados ya que son abundantes en el genoma y permiten inferir qué tan emparentados o relacionados están los individuos dentro de una población. Además, proporcionan información de cada locus, son codominantes, tienen alto polimorfismo y al ser fragmentos cortos de ADN, es posible su análisis en muestras degradadas (mencionado en Pemberton, 2008). Los microsatélites se han utilizado para estimar variabilidad genética, ascendencia, niveles de endogamia y para rastrear alelos en una población. También han permitido inferir el grado de endogamia en poblaciones silvestres y evaluar cómo es que afecta la susceptibilidad a enfermedades y la supervivencia del individuo (e.g. Hawley *et al*, 2005; MacDougall *et al*, 2005, Da Silva *et al*, 2008; Acevedo-Whitehouse *et al*, 2003). De manera general, los microsatélites han ayudado a demostrar que una menor diversidad genética puede incrementar la probabilidad de enfermedades y la susceptibilidad a infecciones (Rijks *et al*, 2008).

² Regiones no codificantes de ADN.

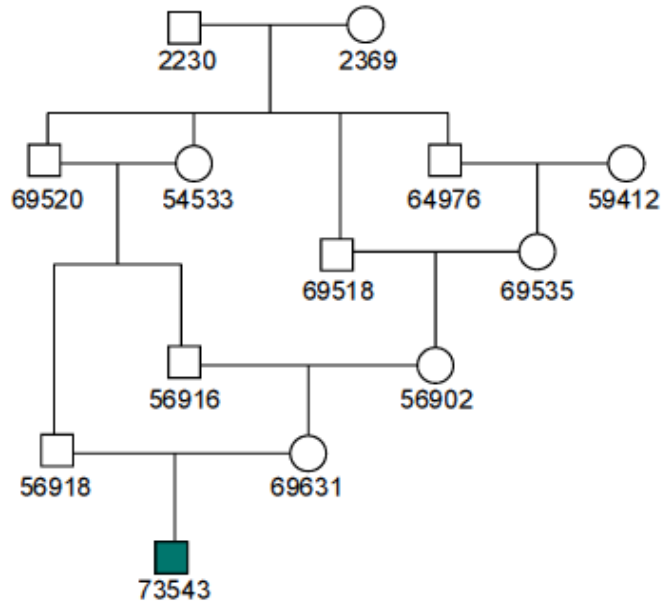


Figura 2.1 Pedigree de un gorrión macho (*Melospiza melodia*) de color verde y con número 73543 que nació en la isla de Mandarte en 1992. Los machos están representados por cuadrados y las hembras por círculos, cada número representa a un individuo (Tomado de Keller y Waller, 2002).

Para conocer el nivel de endogamia a partir de microsatélites se utilizan estimadores indirectos como d^2 que es la medida de la distancia interna específica de cada individuo, y que intenta calcular la endogamia más distante (Coulson *et al.*, 1998) ya que está basada en las diferencias mutacionales a largo plazo. Éste parámetro es calculado como la diferencia al cuadrado de la longitud entre los alelos en un locus dado, promediándolo a lo largo de los microsatélites (Goldstein *et al.*, 1995). El segundo estimador del índice de endogamia es la heterocigocidad estandarizada (SH por sus siglas en inglés), en donde la heterocigocidad en cada locus es ponderada por el promedio de heterocigocidad de todos los loci (Coltman *et al.*, 1999). Otro estimador de endogamia es el de relación interna (IR por sus siglas en inglés) que está basado en medir la cantidad de genotipos parentales dentro de un individuo y, el compartir alelos raros tiene más peso que los que comparten alelos comunes (Amos *et al.*, 2001). Este estimador se ha utilizado para medir si la heterocigocidad tiene efectos sobre el éxito reproductivo, la sobrevivencia y el potencial para recuperarse de alguna enfermedad (ver ejemplos en: Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Amos *et al.*, 2001; Valsecchi *et al.*, 2004).

En poblaciones silvestres se ha utilizado alguno o varios de los estimadores para investigar la relación entre rasgos relacionados con la eficacia biológica y la diversidad genética individual. Para esto se utiliza el índice de correlación entre heterocigocidad y eficacia biológica (HFC, por sus siglas en inglés). Las HFCs estiman la relación que existe entre la variabilidad genética y medidas individuales de vida-historia, junto con rasgos fisiológicos y morfológicos (revisado en Chapman *et al*, 2009).

Varios estudios sobre patógenos en poblaciones de fauna silvestre han demostrado que la infección por estos puede causar la muerte de crías (e.g. Lyons, 1963 y Lyons *et al*, 1997) pero, al mismo tiempo se ha demostrado que la baja variabilidad genética puede influenciar la respuesta a patógenos (e.g. Rijks *et al*, 2008; Acevedo-Whitehouse *et al*, 2006). En este sentido, entender cómo es que se regula la resistencia a patógenos es importante para tomar decisiones de conservación. Tener menor variabilidad genética parece estar directamente relacionado con una mayor susceptibilidad a infecciones por parásitos y a ocurrencia de cáncer asociado a infecciones por gammaherpesvirus en el lobo marino de California (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2003) (Figura 2.2). Ya que la información poblacional, ecológica, filogenética, conductual, epidemiológica y reproductiva son ampliamente conocidos para el lobo marino de California, eso lo hace ideal como modelo de estudio sobre HFC ya que existirá un margen de error menor. (Chapman *et al*, 2009).

El uso de microsatélites para medir índices de endogamia ha sido cuestionado en fechas recientes ya que generalmente se utilizan de 7 a 20 microsatélites, y a partir de ellos se pretende inferir sobre lo que ocurre en todo el genoma (Coulson *et al*, 1998). En ese sentido, se ha propuesto que las HFC reportadas pueden ser explicadas por efectos puntuales de uno o más marcadores que se encuentran en desequilibrio ligado a algún gen bajo selección en lugar de deberse a un efecto de heterocigocidad general como se esperaría para la depresión endogámica (Balloux *et al*, 2004).

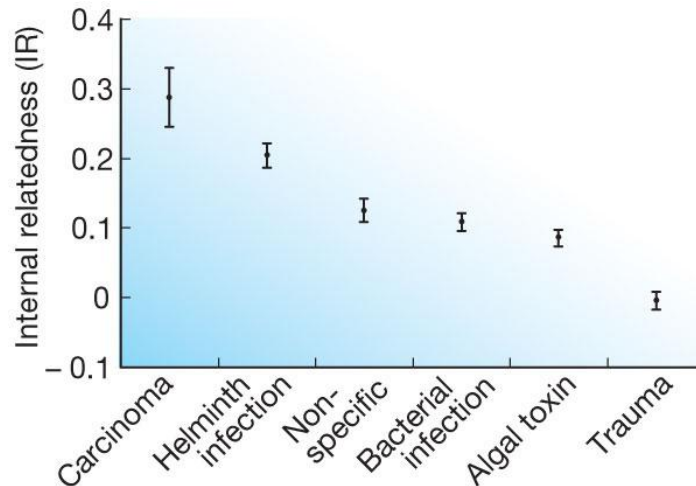


Figura 2.2 Estimación individual del nivel de endogamia con IR (Internal Relatedness, por sus siglas en inglés) de acuerdo a diferentes causas de varamiento para lobo marino de California rehabilitados en el Marine Mammal Center (Tomada de Acevedo-Whitehouse *et al*, 2003).

Un estudio realizado en el lobo marino de California observó que mientras la heterocigocidad general (calculada a partir de 13 microsatélites) explicaba la carga de *Uncinaria spp.*, el desarrollo de anemia subsecuente a la infección era explicada por un efecto puntual en el marcador Hg4.2 (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2006). En el lobo marino de Nueva Zelanda se observó que un efecto semejante, donde la heterocigocidad general (medida con 22 microsatélites) explicaba la carga parasitaria de *Uncinaria* pero, la cantidad de plaquetas circulantes en los individuos infectados eran explicados por la heterocigocidad en un solo microsatélite (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2009). Otros ejemplos concordantes son el estudio realizado con bivalvos donde solo algunos de los loci utilizados explicaban variaciones en el crecimiento (David *et al*, 1995), y un estudio realizado con *Drosophila melanogaster*, donde alelos específicos y no la endogamia explicaban la baja resistencia a toxinas y patógenos (Spielman *et al*, 2004).

2.2 El lobo marino de California

El lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* es el pinnípedo de mayor abundancia y de distribución más amplia (SEDP, 2001). La especie se distribuye a lo largo de la costa oeste del Océano Pacífico de Norte América, desde el sureste de Columbia Británica en Canadá hasta Baja California en México, así como en las Islas Galápagos, el mar de Cortés y el golfo de Alaska (Aurioles y Trillmich, 2008). La población de lobo marino de California en Estados Unidos y en México es de aproximadamente de 355,000 individuos (Figura 2.3). Dentro de la categoría de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) el lobo marino de California se clasifica como *de menor preocupación*.

Su reproducción ocurre en islas cercanas a la costa de California y Baja California, incluyendo las Islas del Canal (San Miguel, San Nicolás y San Clemente, California EEUU), Isla Guadalupe, Isla San Benito e Isla Cedros en el Pacífico Mexicano, y en islas del Golfo de California (Los Islotes, San Pedro Mártir, San Esteban, Ángel de la Guarda, Granito y Roca Blanca); de las cuales la Isla de San Nicolás y San Miguel son las que tienen las colonias reproductivas más grandes (Allen *et al*, 2011). El hábitat terrestre del lobo marino de California típicamente se conforma por playas rocosas y arenosas en islas costeras y de la línea costera continental.





El lobo marino de California es altamente sociable; los animales viven en colonias y regularmente descansan en grupo cuando están en tierra y en el agua. El promedio de vida de los lobos marinos de California es entre 15 y 30 años. La mortalidad de las crías puede ser de 10 a 15% durante el primer mes; debido al abandono, enfermedades infecciosas o por trauma resultante de la competencia entre machos dominantes. Una vez que las crías nacen, las hembras proveen cuidado parental, crianza y protección (SEDP, 2001). Los lobos marinos son altamente polígamos, esto quiere decir que se pueden aparear hasta con 14 hembras durante la temporada de apareamiento (Riedman, 1990).



Zalophus californianus

range type

-  native (resident)
-  native (breeding)
-  native (non breeding)
-  reintroduced
-  introduced
-  origin uncertain
-  possibly extinct
-  extinct

-  national boundaries
-  subnational boundaries
-  lakes, rivers, canals
-  salt pans, intermittent rivers

data source:
IUCN (International Union for Conservation of Nature)


NE DD
LC >
NT VU EN CR EW EX

azimuthal equal area central point: 0°, 0°

map created 09/30/2008

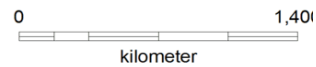


Figura 2.3 Mapa de distribución de *Zalophus californianus* (Tomado de Auriolos y Trillmich, 2008)

Durante los meses no reproductivos la mayoría de los lobos marinos adultos machos migran hacia el norte, aquellos que se reproducen en el sureste de California migran hacia Puget Sound, Washington y Colombia Británica, EEUUA. En contraste, la mayoría de las hembras permanecen en el territorio de apareamiento. La filopatría de hembras es muy marcada y tienden a aparearse incluso en la misma sección de la playa año tras año (SEDP, 2001), lo cual incrementa las posibilidades de que ocurran apareamientos consanguíneos (Acevedo- Whitehouse *et al*, 2003).

Después de la copula, el periodo de gestación dura entre 11 y 11.5 meses, con implantación retardada, y se gesta por lo general una cría por hembra al año. Veintiún días después del parto la hembra se vuelve a aparear. Al nacer las crías miden aproximadamente 75 cm y pesan entre 6 y 9 kg (Auriolles y Trillmich, 2008), nacen con los ojos abiertos, con pelaje y a los 30 minutos de haber nacido ya son capaces de moverse para reconocer su territorio. La lactancia dura de ocho a 12 meses, y durante los primeros cuatro meses la leche materna es alta en contenido energético, con un 32-44 % de grasa, 9 % de proteína y 0.6 % de lactosa (SEDP, 2001).

Las grandes agregaciones de hembras resultan en intensa competencia reproductiva para los machos, lo que los lleva a presentar un dimorfismo sexual muy marcado y poligamia que puede ser desde moderada hasta muy alta (Riedman, 1990). Los machos alcanzan una longitud de 2.4 m y su peso oscila entre 297 kg y 450 kg. En contraste, las hembras llegan a medir hasta 2 m y pesan alrededor de 110 kg (Auriolles y Trillmich, 2008). El peso promedio de las crías neonatas es de 9 kg y miden hasta 80 cm (Allen *et al*, 2011). Tienen un cuerpo en forma de torpedo con pelo corto de color café oscuro a café claro. A partir de los cinco años los machos desarrollan la cresta sagital (Figura 2.4). El macho durante la temporada de apareamiento permanece en tierra cuidando su territorio para lograr tener la mayor cantidad de hembras y así aparearse con ellas (Allen *et al*, 2011).



Figura 2.4 Dimorfismo sexual entre macho y hembra de *Zalophus californianus*. A) Hembra adulta de lobo marino de California, B) Macho adulto de lobo marino de California (Fotografía incluíd con permiso de Luis Soto).

2.2.1 El efecto de la heterocigocidad en las infecciones por *Uncinaria*

Uno de los agentes infecciosos que comúnmente causan enfermedades en las poblaciones de lobos marinos de California es el nematodo hematófago *Uncinaria* spp. *Uncinaria* pertenece a la familia Ancylostomatidae, que abarca nematodos parásitos de una amplia gama de mamíferos, incluyendo al humano (Loukas *et al*, 2005). El número de especies de *Uncinaria* que puede infectar a los pinnípedos es incierto (Lyons y DeLong, 2005), pero aún no se ha reportado en fócidos más que en un caso en particular. *Uncinaria lucasi* fue encontrado por primera vez en el lobo fino del Norte, *Callorhinus ursinus* en 1901, aunque no fue descrito (Stiles, 1901). Se sabe que la forma adulta de *Uncinaria* spp. se encuentra comúnmente en crías de varias especies de otáridos. Hasta la fecha, se ha encontrado evidencia de infección en especies de pinnípedos otáridos como el lobo marino de Nueva Zelanda, *Phocarctos hookeri* (Castinel *et al*, 2007), el lobo marino de California (Lyons *et*

al, 1997, 2001), el lobo fino del Norte (Lyons 1963), el lobo marino de Steller, *Eumetopias jubatus* (Hughes et al. 2004) el lobo marino de Sudamérica, *Otaria flavescens*, y el lobo fino de Juan Fernández, *Arctocephalus philippii* (Beron-Vera et al. 2004). Aunque dichas infecciones son cosmopolitas, no se tiene mucho conocimiento sobre la interacción *Uncinaria*-hospedero, las complejas respuestas inmunes que generan y, cómo es que la respuesta inmune tiene un efecto protector para el hospedero o influye en la supervivencia del parásito (Loukas et al 2005).

La infección por especies de *Uncinaria* inicia a través del contacto del hospedero con el suelo contaminado por larvas (Hotez et al, 2004). El ciclo de vida de *Uncinaria* spp. en otáridos empieza cuando los parásitos adultos de vida libre en tercer estadio (L₃) que infectan el intestino de las crías de lobo marino se reproducen sexualmente y, producen huevos que son eliminados en las heces, mismos que eclosionan en la playa que es suelo húmedo (sustrato que necesitan para continuar su ciclo de vida). Ahí se desarrollan hasta convertirse en larvas filariformes infectantes, que penetran por vía cutánea el cuerpo de los hospederos, sin importar su edad. En el hospedero las larvas migran hacia el tejido adiposo abdominal ventral, donde permanecen sin causar daño aparente. Sin embargo, si los hospederos infectados son hembras gestantes, las uncinarias en su estadio L₃ son pasadas a las crías durante la lactancia (Figura 2.5). Esto es porque las larvas son transportadas hacia la glándula mamaria cuando la grasa de los tejidos es reubicada en preparación para el periodo de lactancia (Lyons 1963). La etapa L₃ de *Uncinaria* ha sido encontrada en la leche materna del lobo marino de California (Lyons et al, 2005), por lo que es altamente probable que esta sea la forma de transmisión a las crías.

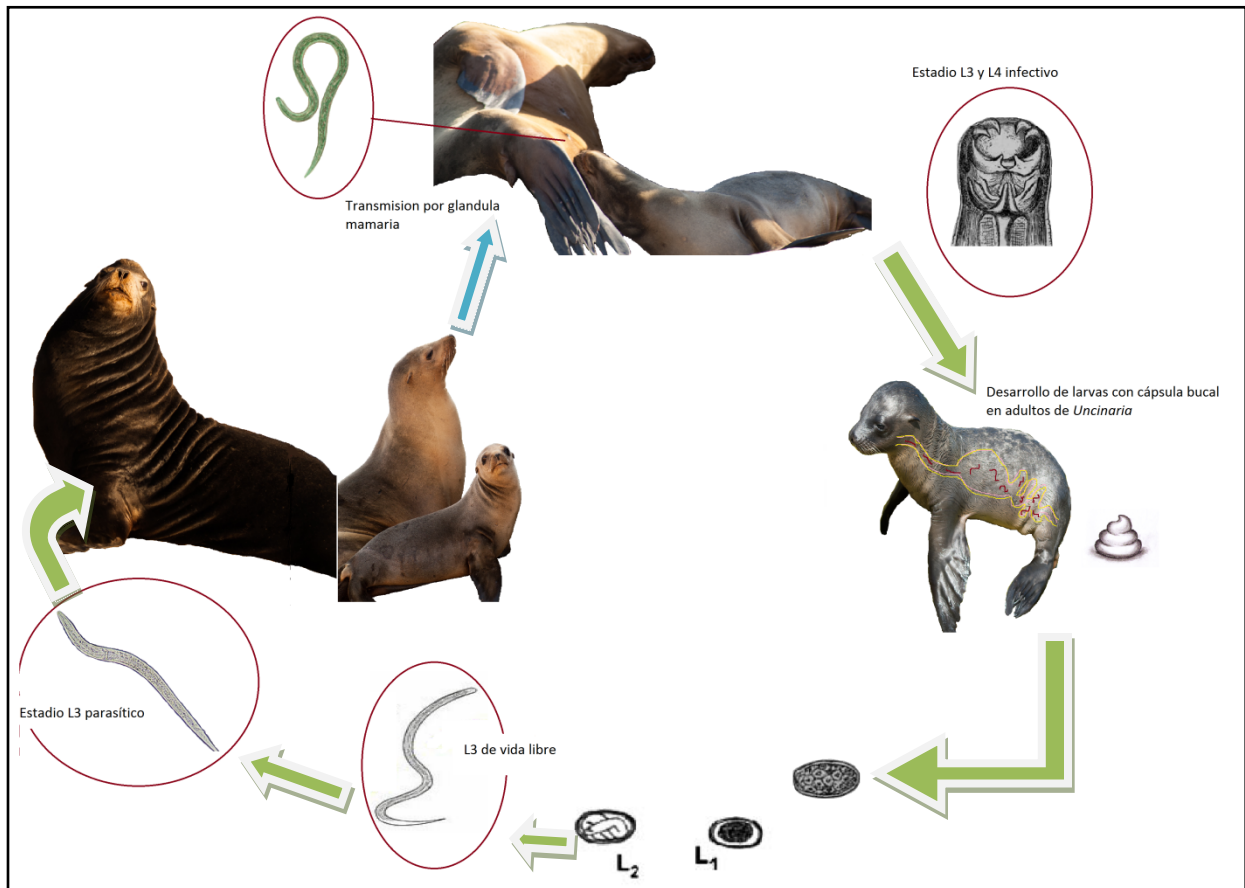


Figura 2.5 Ciclo de vida de *Uncinaria* spp en lobo marino de Nueva Zelanda (*Phocartos hookeri*) (Modificado de Castinel *et al*, 2007b, fotos con permiso de Luis Soto)

Las larvas de *Uncinaria* spp, que ya presentan cápsula bucal desarrollada (Figura 2.6), se adhieren a la mucosa del intestino delgado donde maduran hasta su forma adulta. En el intestino delgado el parásito macera la mucosa de las vellosidades intestinales y rompe los capilares, alimentándose principalmente de sangre y fragmentos de tejido (Loukas y Prociw, 2001). Este mecanismo es uno de los principales responsables de las hemorragias gastrointestinales y anemia ferropriva que se observan en humanos y otros mamíferos (Harrison *et al*, 2002), en este caso el principal causante de muertes en crías. También puede ser causante de peritonitis, pleuritis, poliartritis, hepatitis y neumonía hematógena (Spraker *et al*, 2007). La manera de determinar si un animal está infectado por parásitos es por medio de la evidencia en las necropsias de enteritis hemorrágica, úlceras gástricas o

peritonitis. Se puede presentar sangre en las heces, vómito, anorexia, conteo alto de eosinófilos y anemia.

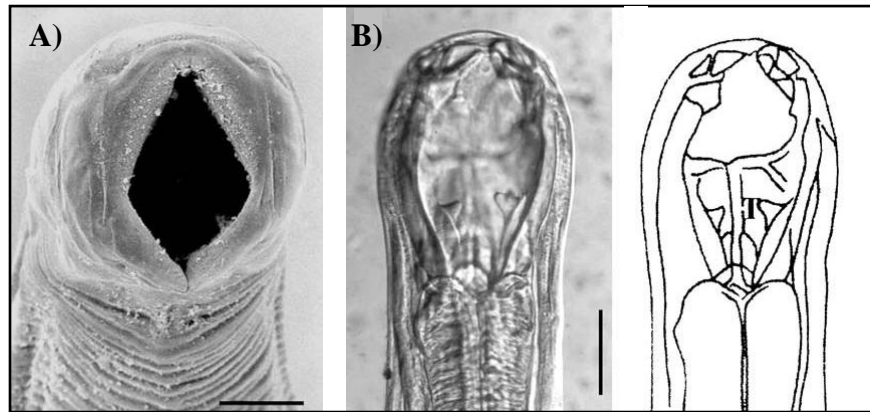


Figura 2.6 Características de *Uncinaria*. **A)** Microscopía electrónica de barrido del extremo anterior de una hembra adulta de *Uncinaria* recuperada en cría de lobo marino de Nueva Zelanda, *Phocarcetos hookeri* (escala 80µm); **B)** Microfotografía y dibujo de la capsula bucal de una *Uncinaria* spp. macho (escala de 40µm). (Tomado de Castinel *et al*, 2006)

Los altos niveles de infección por *Uncinaria* spp. y grados variables de mortalidad que se reportan en los lobos marinos de California (Lyons *et al.* 2001, 2005) podrían ser explicados por factores inmunológicos y fisiológicos del hospedero, fenotipos que a su vez son influenciados por su genética y estado nutricional (Pullan *et al*, 2009; Acevedo-Whitehouse *et al*, 2006).

2.2.2 Enfermedades comunes en el lobo marino de California

Existen otros agentes infecciosos que también causan enfermedades comunes en el lobo marino de California. Entre ellos está el morbillivirus, herpesvirus, *Klebsiella pneumoniae*, adenovirus y *Leptospira* spp (Higgins, 2000). De éstos, la leptospira, bacteria espiroqueta causante de leptospirosis, causa brotes epizooticos periódicos en la especie (Mackereth *et al*, 2005). Esta enfermedad fue detectada en el lobo marino de California en su distribución

en las costas de California desde 1970, cuando los varamientos incrementaron cuatro veces a comparación a otros años y los animales varados mostraban síntomas de dolor abdominal y sed (Vedros *et al*, 1971). El agente etiológico encontrado fue *Leptospira* spp. (Vedros *et al*, 1971). La patología que ocasiona es renal (nefrosis, nefritis intersticial y, hemorragias) y hepática (hiperplasia en las células de Kupffer) (Vedros *et al*, 1971; Zuerner *et al.*, 2009). La leptospirosis es una enfermedad crónica y puede llegar a causar la muerte dependiendo de la severidad de la infección. La manera de diagnosticarla es por medio de la observación de síntomas de depresión, fiebre, anorexia, movimiento involuntario del musculo y vomito. En los parámetros sanguíneos se puede observar altos niveles de leucocitos (leucocitosis), nitrógeno ureico en la sangre y globulina. Se puede confirmar el diagnostico en la necropsia cuando el animal presenta riñones inflamados, con perdida en la diferenciación de la medula y cortezas además de estar endurecidos.

Otro proceso patológico que afecta comúnmente al lobo marino de California es la intoxicación por ácido domóico. Aunque no es un proceso infeccioso, esta condición anormal es provocada por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* que producen ácido domoico, una neurotoxina (mencionado en (Silvagni *et al*, 2005) que se cree ocurre en respuesta a estrés cuando hay limitación de micronutrientes, macronutrientes y disminución en la producción de ácido silícico (Anderson *et al*, 2006). La toxina daña las funciones celulares y puede conducir a muerte neuronal al provocar la despolarización de la célula e incrementar el calcio intracelular (Goldstein *et al*, 2009), lo que provoca muerte neuronal y hemorragias (Silvagni *et al*, 2005). El hipocampo en mamíferos está asociado con el aprendizaje, la memoria y la navegación espacial; y el cual es una de las regiones en donde predomina el daño por ácido domóico (Thomas *et al*, 2009). Algunos de los síntomas clínicos que se pueden observar a causa de la intoxicación por ácido domóico son: ataxia, convulsiones, movimiento involuntario de la cabeza y muerte temprana de las crías (Golstein *et al*, 2009) debido a que el ácido domóico atraviesa la placenta. Cuando se dan los florecimientos de diatomeas en el mar, la cantidad de ácido domóico que se libera llega a ser dañino para las poblaciones de mamíferos marinos y en especial la del lobo marino de California que se alimenta de presas intoxicadas como de sardinas (*Sardinops sagax*) y

anchoas (*Engraulis mordax*) (Mencionado en Goldstein *et al.*, 2009 por Scholin *et al.*, 2000). El daño más significativo se ha visto en adultos de lobo marino y no en crías o subadultos, se cree que podría ser por la exposición repetitiva que tienen al ácido domóico, una vez que han sido expuestos a la toxicidad incrementa la susceptibilidad y por último que los efectos progresivos de haber sufrido ataxia explique la atrofia del hipocampo (Montie *et al.*, 2012). Goldstein *et al.* (2008) proponen que los adultos presentan más daño cerebral porque la enfermedad necesita tiempo para progresar y es por eso que no se hace una asociación entre los varamientos y la locación de los florecimientos del alga. Es diagnosticado cuando se observa descoordinación de las partes de cuerpo, movimiento involuntario, movimientos de cabeza, temores musculares, convulsiones y letargo entre convulsiones, depresión y comezón anormal, aunque pueden tener buena condición corporal y química sanguínea dentro de los parámetros normales (O'Hara y O'Shea, 2001).

Los casos de neoplasia en lobo marino de California (Figura 2.7) fueron reportados por primera vez en 1974 (Mawdesley-Thomas, 1974). Desde entonces, se observaron casos de cáncer con posible origen urogenital en animales varados (Gulland *et al.*, 1996). El gammaherpesvirus otarino OtHV-1 se ha asociado con casos de cáncer urogenital (Buckles *et al.*, 2007). Su transmisión es posiblemente sexual, siendo común en animales sexualmente maduros (Buckles *et al.*, 2007). Aunado a la infección por virus también se ha visto que las infecciones por bacterias como *Streptococcus* beta-hemolíticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer urogenital ya que pueden servir como cofactores en el desarrollo del tumor al reducir la inmunidad y la inducción de la inflamación de la zona (Johnson *et al.*, 2006). Se diagnostica cuando se observa anorexia, distensión abdominal, cuando las aletas traseras están inflamadas y a veces puede ser tan agresivo que se observan penes y vulvas prolapsadas.

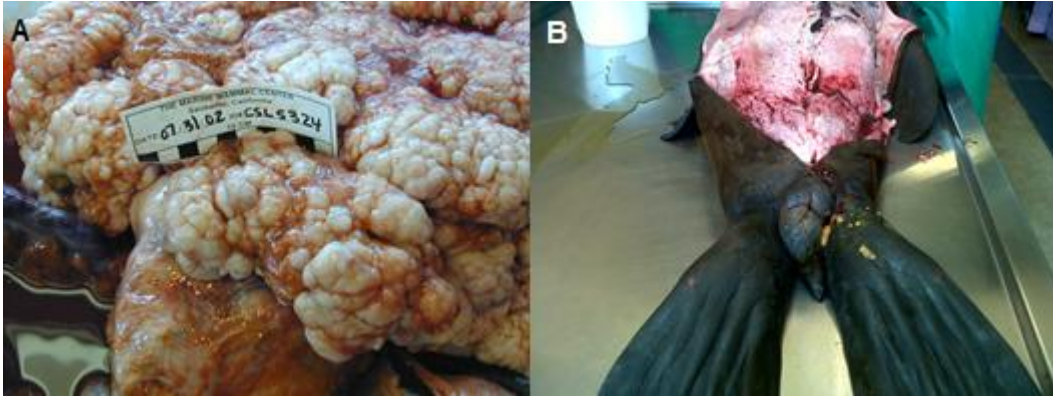


Figura 2.7 Necropsias de lobo marino de California adulto mostrando evidencia macroscópica de cáncer urogenital **A)** Carcinoma avanzado en tejido genital, **B)** Vagina prolapsada por carcinoma urogenital
(Fotografías tomadas del Marine Mammal Center)

Algunas causas de varamiento de lobos marinos son la malnutrición y trauma (Figura 2.8). La malnutrición ocurre cuando el animal es incapaz de alimentarse y se debilita. Los traumas pueden ser causados por coaliciones con botes, mordidas por depredadores, balazos y enmallamientos con redes de pesca (Greig *et al.*, 2005). Estas causas de varamiento son poco comunes pero si llegan a ser de importancia ya que los lobos marinos suelen pescar en donde hay redes.

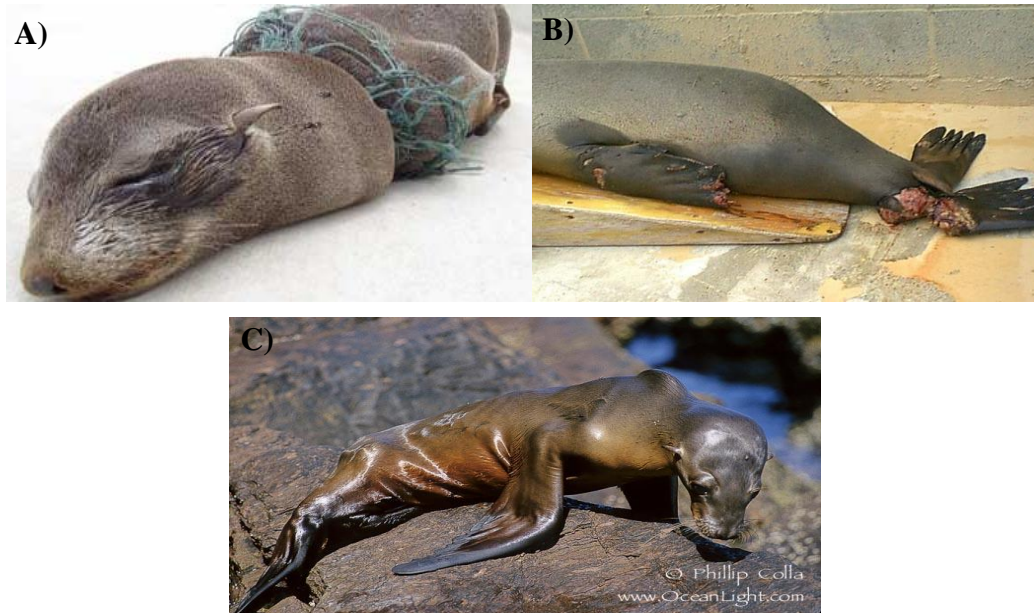


Figura 2.8 Trauma y malnutrición en el lobo marino de California. A) Enredamiento con red de pesca, B) Laceración de aletas caudales y C) Cría de lobo marino en estado de desnutrición.

La neumonía (Figura 2.9) es otra de las condiciones que afectan al lobo marino de California desde hace tiempo y es comúnmente causada por infecciones simultáneas por bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y el nematodo *Parafilaroides decorus* (Fleischman y Squire, 1970; Morales y Helmboldt, 1971; Castinel *et al.*, 2007). Se puede diagnosticar por la presencia de leucocitosis, flemas, moco, tos, respiración ruidosa y ruidos anormales húmedos en la respiración.

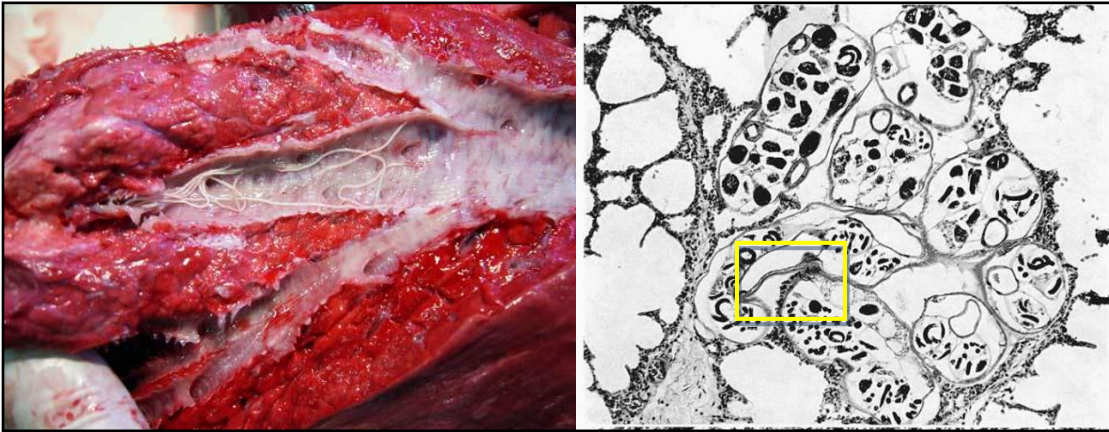


Figura 2.9 A) Gusanos en tejido pulmonar de lobo marino de California (tomado del Marine Mammal Center) y B) *Parafilaroides decorus* adulto en alveolo de lobo marino de California con mínima respuesta inflamatoria (Tomado de Fleischman y Squire, 1970)

2.3 Aspectos básicos de inmunología

El sistema inmune es un mecanismo de defensa que sirve para proteger a los animales de microorganismos patógenos y cáncer. Los antígenos son fragmentos de proteínas, generalmente derivados de patógenos, que provocan varias respuestas inmunes, mismas que se pueden dividir en innatas y adaptativas (Cuadro 2.1), y a su vez las adaptativas en dependientes del timo e independientes del timo (Chapel *et al*, 1999). La inmunidad innata es aquella con la que nacemos y no es específica ya que son barreras mecánicas (piel, sudor, lagrimas, acidez estomacal y membranas mucosas), fagocíticas como sustancias antibacteriales (lisosomas y granulocitos) e inflamatoria. La inmunidad adaptativa tiene características únicas, especificidad antigénica, memoria inmunitaria, diversidad y reconocimiento de lo propio y lo extraño (Virella y Goust, 1997), sus principales agentes son los linfocitos y los anticuerpos que éstos producen. Los dos sistemas inmunitarios no son independientes de sí, trabajan juntos para producir una respuesta combinada más eficaz. Las respuestas dependientes requieren de la participación de los linfocitos T para ayudar a la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B y los independientes del timo son

aquellos en los que se producen anticuerpos estimulando directamente a los linfocitos B (Chapel *et al*, 1999).

El sistema adaptativo produce señales y componentes que elevan la eficacia de las reacciones del sistema innato. Además tiene la capacidad de generar diferentes moléculas de reconocimiento, lo que hace posible identificar millones de estructuras únicas de antígenos (Goldsby *et al*, 2007).

Cuadro 2.1 Comparación entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Tomado de Goldsby et al. 2007).

| Atributo | Inmunidad Innata | Inmunidad Adaptativa |
|--|---|--|
| Tiempo de reacción | Minutos a horas | Días |
| Especificidad | Específica para moléculas y patrones moleculares de los patógenos | Altamente específica, reconoce detalles de la estructura microbiana o no microbiana con alta especificidad |
| Diversidad | Número limitado de receptores codificados por la línea germinal | Altamente diversa |
| Respuesta de memoria | Ninguna | Memoria persistente, la respuesta a una infección posterior es más rápida y de mayor magnitud |
| Reconocimiento entre lo propio y lo extraño | Perfecta | Muy buena, aunque pueden existir fallos |
| Principales tipos celulares | Fagocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos), células NK | Linfocitos T y B, células presentadoras de antígeno |
| Componentes solubles de sangre o líquidos tisulares | Muchos péptidos y proteínas antimicrobianos | Anticuerpos |

2.4 Mecanismos de coagulación y parámetros sanguíneos de mamíferos

Todas las células sanguíneas maduras (glóbulos rojos y blancos) funcionales provienen de células madre hematopoyéticas que son pluripotenciales. Estas se desarrollan en la médula ósea y cuando la demanda aumenta tienen la capacidad de autorenovarse y proliferar (Goldsby *et al*, 2007). La formación de células sanguíneas maduras es un proceso de estado estable ya que se producen células maduras al mismo ritmo al que se pierden. La célula madre pluripotencial tiene dos vías para diferenciarse, una da lugar a una célula progenitora linfóide y otra a una célula progenitora mieloide. Las progenitoras linfoides originan linfocitos B, T y asesinos naturales (NK, por sus siglas en inglés), las mieloides se diferencian en progenitoras de glóbulos rojos que son los eritrocitos y diversas células leucocitarias como neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, además de células generadoras de plaquetas llamadas megacariocitos (Figura 2.10).

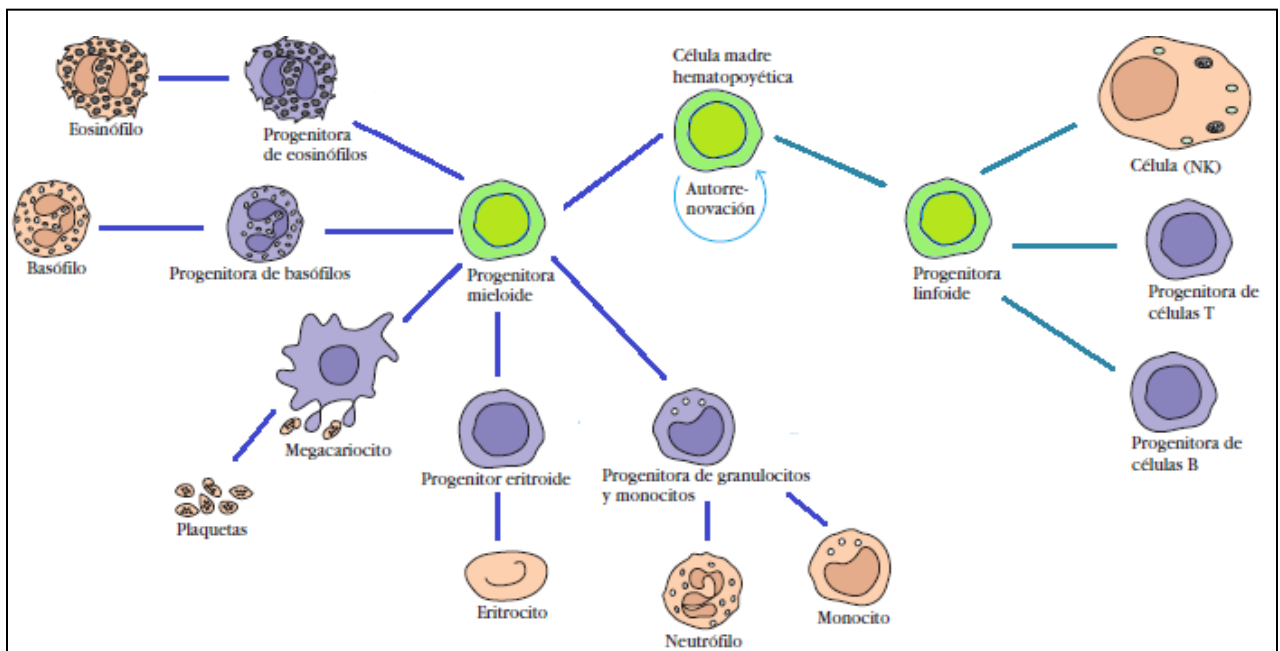


Figura 2.10 Origen hematopoyético de las células sanguíneas (Modificado de Goldsby *et al*, 2007).

La eritropoyesis es la producción de eritrocitos y se lleva a cabo en la médula ósea, cuando éstos maduran se vuelven altamente deformables para ser lo suficientemente flexibles y así avanzar a través de las paredes de los vasos sanguíneos e ingresar a la sangre circulante (Goldsby *et al*, 2006). Cuando hay un aumento de la demanda de eritrocitos, la producción se incrementa primero al permitir que las formas inmaduras entren a los capilares sanguíneos y adelantando las etapas de maduración para acelerar la eritropoyesis (Kerr, 2002). La producción y destrucción de eritrocitos generalmente se encuentra en balance por lo que el número de eritrocitos es constante. La hormona responsable de la regulación de eritrocitos es la eritropoyetina y el principal sitio de producción es en el riñón. Esta hormona puede afectar a su regulación al incrementar la tasa de diferenciación de células madres en precursoras de glóbulos rojos, reducir el tiempo de tránsito afuera de la médula ósea y reducir las etapas del desarrollo de glóbulos rojos (Kerr, 2002).

Cuando un vaso sanguíneo es dañado, la pérdida excesiva de sangre a través de la herida es prevenida por procesos como la vasoconstricción, agregación de plaquetas y la coagulación de la sangre (Pocock y Richards, 1999) y se le conoce como hemostasis. La coagulación de la sangre consiste en la creación de una malla con hebras de fibrina que se unen a los componentes de la sangre para formar un coágulo. El tapón de plaquetas es estabilizado por la fibrina y cuando el número de plaquetas está lo suficientemente reducido o están deterioradas funcionalmente, los eritrocitos se filtran a través de las paredes capilares (Searcy, 1995). Cuando la naturaleza o la extensión de la infección son graves se pueden activar procesos sistémicos inflamatorios que corresponden a la respuesta de la fase aguda, que funciona como productor de mediadores inflamatorios y para el reclutamiento de más células inflamatorias al sitio de infección (King *et al*, 2001). La disminución de las capacidades de coagulación e inflamación causada por acción de agentes infecciosos podría contribuir a la mortalidad y morbilidad en poblaciones (Esmon, 2004).

El reclutamiento de células involucra la quimiotaxis que incrementa la infiltración de células inmunes hacia el endotelio vascular, y la expresión celular de moléculas inmunes. Estos factores, junto con un incremento en la circulación sanguínea y un incremento en la

permeabilidad vascular, llevan a la acumulación de leucocitos, inmunoglobulinas y otras proteínas de sangre en el tejido infectado (King *et al*, 2001).

La importancia de los estudios sanguíneos se debe a la información que se puede obtener sobre la salud del animal, por ejemplo los conteos o morfología de células rojas nos puede indicar si existe una pérdida de sangre crónica, si el animal ha estado expuesto a patógenos o toxinas, si tiene alguna enfermedad localizada en algún órgano o si solo existe una condición que puede ser mediada por el sistema inmune (Walker *et al*, 2008). En cambio los conteos o morfología de células blancas, también conocidas como leucocitos nos puede decir si existe inflamación, leucemia o si está presente alguna condición hereditaria (Walker *et al*, 2008). Estas células que tienen funciones inmunes, difieren morfológicamente y en su origen, que puede ser linfoide o mieloide. Algunos leucocitos son, conocidos como granulocitos debido a sus gránulos citoplasmáticos, conformados por enzimas hidrolíticas que forman parte esencial del sistema inmune innato. Por otro lado, los leucocitos no granulocitos, en especial los linfocitos, forman parte del sistema inmune adaptativo o adquirido. A continuación se describe cada uno de los componentes de los parámetros sanguíneos:

Plaquetas: Se originan de los megacariocitos que se encuentran localizados principalmente en la medula ósea, no contienen núcleo y durante su etapa inactiva tienen una morfología discoidea, la que se volverá irregular una vez activadas (Cüce y Aktan, 2012). Las plaquetas tienen tres tipos de gránulos, los alfa gránulos, gránulos densos y lisosomas. Cada plaqueta contiene cerca de 50-80 alfa gránulos y éstos incluyen moléculas inflamatorias, citoquinas, moléculas para activar células, proteínas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión e integrinas (Walker, 2008). Los gránulos densos son importantes para la homeostasis ya que se fusionan con la membrana plasmática y expelen su contenido al ambiente causando la agregación de otras plaquetas y vasoconstricción local (Cüce y Aktan, 2012). Una vez que se activa la adhesión plaquetaria seguida de la activación de plaquetas, puede iniciar la coagulación intravascular y mas adelante el consumo de éstas (Searcy, 1995).

Hematocrito: Es una medida de la fracción del volumen de la sangre que está ocupado por eritrocitos y se mide en porcentaje o fracciones decimales (Kerr, 2002).

Hemoglobina: Es una heteroproteína en los glóbulos rojos que se encarga del transporte de oxígeno. Los niveles de hemoglobina pueden reflejar anemia, desnutrición, deficiencias de hierro, sobre hidratación, deshidratación y eritrocitosis (Kerr, 2002).

VCM: (Volumen corpuscular medio) es una medida del tamaño de los glóbulos rojos y es obtenido por dividir el porcentaje de hematocrito entre el recuento total de glóbulos rojos. Animales jóvenes tienden a tener glóbulos rojos más pequeños que los adultos, pero los neonatos tienen glóbulos rojos del tamaño de un adulto (Kerr, 2002).

HCM: (Hemoglobina corpuscular media) es una medida de la masa de la hemoglobina contenida en un glóbulo rojo. Ésta varía con el tamaño celular y de acuerdo con las especies, por lo que no se utiliza a menudo como indicador de salud (Kerr, 2002).

CHCM: (Concentración de hemoglobina corpuscular media) es una medida de la concentración de hemoglobina en los glóbulos rojos y se obtiene dividiendo la concentración total de hemoglobina entre la concentración de eritrocitos (Kerr, 2002).

Eritrocitos: Los eritrocitos son todos los glóbulos rojos y su función principal es la de transportar O₂ y CO₂. La producción de los eritrocitos se lleva a cabo en la medula ósea (Kerr, 2002).

Leucocitos totales: Son mononucleares, agrupa a todos los glóbulos blancos y a sus precursores. El número circulante de leucocitos en la sangre refleja el balance que existe entre la demanda y el abastecimiento de dichas células. Se dividen en dos categorías, los granulocitos que incluyen a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos; la segunda categoría abarca a los linfocitos y monocitos (Kerr, 2002). Los leucocitos reaccionan de manera

diferente a distintos agentes patógenos y por eso es importante tomar en cuenta el número absoluto del tipo de células leucocitarias circulantes (Kerr, 2002).

Monocitos: Considerados como leucocitos en tránsito para convertirse en macrófagos una vez que penetraron los tejidos, tienen funciones fagocíticas de microorganismos, células y partículas inertes (Virella y Goust, 1997).

Eosinófilos: El funcionamiento de los eosinófilos aún no está completamente entendido en mamíferos pero se sabe que la acumulación de éstos en tejidos ocurre en respuesta a estímulos quimiotácticos generados como respuesta a infecciones por parásitos y reacciones alérgicas (Virella y Goust, 1997). La mayoría de los eosinófilos se encuentra en el intestino, glándula mamaria, útero, timo y médula ósea, en el tracto gastrointestinal se encuentra la población más grande de eosinófilos (Kita, 2011). Los eosinófilos son reclutados en sitios de inflamación, en donde producen citoquinas y mediadores lipídicos que liberan proteínas granulares tóxicas que ayudan a regular respuestas inmunes, aunque pueden provocar daño tisular (Kita, 2011).

Linfocitos: Existen dos tipos de linfocitos, los B y T y las NK. Los linfocitos B maduran en la médula ósea de huesos largos, y contienen inmunoglobulinas en sus membranas que funcionan como receptores a antígenos. Los linfocitos T se llaman así porque maduran en el timo y son responsables de la regulación de la respuesta inmune y en la producción de citotoxicidad, especificidad, memoria y linfocinas. Tienen una vida promedio mayor que los linfocitos B y están involucrados en la memoria inmunológica, solo reconocen antígenos unidos a proteínas de membrana (receptores de MHC tipo II) que son expresadas solo por tipos celulares que se especializan en la presentación de antígenos (Virella y Goust, 1997). Las células NK poseen actividad citotóxica contra células tumorales e infectadas por algunos virus y carecen de receptores específicos de antígeno, corresponden a la inmunidad innata (Goldsby *et al*, 2007). Los linfocitos de la mayoría de los mamíferos marinos residen en nódulos linfáticos, timo, bazo y médula ósea, solo pocos circulan en la sangre en condiciones de salud. Varían en tamaño y en sus características de tinción.

Neutrófilos: Los neutrófilos inmaduros son conocidos como neutrófilos en banda y cuando han alcanzado la madurez se les denomina neutrófilos segmentados. Su función principal es la fagocitosis de partículas extrañas (generalmente bacterias, hongos y algunos parásitos) y por tanto son importantes en condiciones de infección e inflamación (Kerr, 2002), especialmente se encuentran en infecciones bacteriales (Virella y Goust, 1997). Son leucocitos polimorfo-nucleares y son la mayor subpoblación de leucocitos sanguíneos.

2.5 Parámetros sanguíneos en lobo marino de California

Se tiene un estimado de los parámetros sanguíneos que son normales para lobo marino de California y se presenta en el cuadro 2.2, los parámetros que se salen de este rango podrían estar explicando diferentes enfermedades a las que podrían estar sometidos los animales y que se encuentran como causas de varamiento en este trabajo. A continuación se describen las posibles causas por las cuales los parámetros sanguíneos pueden salirse de los valores normales.

El tamaño de los eritrocitos y la concentración de hemoglobina son mayores en los mamíferos marinos en comparación con los mamíferos terrestres. El conteo de eritrocitos es más alto en crías que en los adultos porque aprenden a bucear (Bossart *et al*, 2001).

La anemia es un decremento en la concentración de eritrocitos y hematocrito, además los conteos de hemoglobina y eritrocitos están debajo de los rangos de referencia. La anemia puede ocurrir por pérdida de sangre, un incremento en la destrucción de eritrocitos o un decremento en su producción (Bossart *et al*, 2001). La anemia normocítica que se presenta cuando se tienen eritrocitos del tamaño normal pero se tiene un número bajo de ellos puede indicar una enfermedad renal crónica que es común en los lobos marinos de California (Bossart *et al*, 2001).

Los eosinófilos se acumulan en el tejido en respuesta a infección por parásitos ya que tienen efectos parasiticidas y bactericidas (Bossart *et al*, 2001).

En animales con procesos de inflamación y enfermedades infecciosas es común observar valores de neutrófilos altos. De igual manera se pueden observar niveles altos de monocitos (monocitosis) cuando tienen enfermedades crónicas inflamatorias y pueden estar relacionadas con neumonías (Bossart *et al*, 2001).

Los niveles normales de hematocrito junto con bajos niveles de proteína total en suero pueden significar que existe una enfermedad grave en el hígado o que hay pérdida de proteína gastrointestinal (Bossart *et al*, 2001). En cambio cuando se observan niveles altos de hematocrito junto con altos niveles de proteína total en suero puede ser por la existencia de una deshidratación (Bossart *et al*, 2001). Los niveles bajos de hematocrito junto con altos niveles de proteína total en suero pueden significar la existencia de una enfermedad crónica asociada con anemia, pero si existen niveles normales de proteína total de suero puede significar que existe pérdida de sangre crónica y si los niveles de proteína total de suero son bajos entonces puede ser por un decremento en la producción de eritrocitos o pérdida de sangre aguda (Bossart *et al*, 2001).

Cuadro 2.2 Rangos normales de hematología de *Zalophus californianus* de vida libre y en cautiverio que se encuentran sanos y buena condición física. (Modificado de Bossart *et al*, 2001)

| Parámetros | Lobos varados destetados | Lobos adultos en cautiverio |
|--|---------------------------------|------------------------------------|
| Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) | 208 - 720 | 158 – 355 |
| Hematocrito (%) | 34 - 50 | 38 – 59 |
| Hemoglobina (g/dl) | 12 - 18 | 13 - 22 |
| Volumen corpuscular medio (fl) | 94 - 115 | 97 – 116 |
| Hemoglobina corpuscular media (pg) | 33 - 41 | 33 – 42 |
| CHCM (g/dl) | 31 - 39 | 34 – 37 |
| Eritrocitos ($10^6/\text{mm}^3$) | 2.9 – 4.0 | 3.7 – 5.3 |
| Leucocitos totales (μl) | 9780 - 22800 | 3400 – 11380 |
| Monocitos | 0 - 1600 | 45 – 830 |
| Eosinófilos | 0 - 1470 | 0 - 630 |
| Linfocitos | 1180 - 8380 | 370 – 3190 |
| Neutrófilos segmentados | 5140 - 16680 | 3400 – 11380 |
| Neutrófilos en banda | 0 - 680 | 0 -10 |

3. Justificación

La variabilidad genética individual afecta la eficacia biológica de poblaciones que se ven afectadas por patógenos. La manera en la que se ha visto esta relación es por medio de estudios con microsatélites, en donde se utilizaban de 10-25 microsatélites para medir el grado de endogamia. Nuevos enfoques tratan de explicar si la relación significativa que se observa entre coeficiente de endogamia y aspectos de la eficacia biológica son causados por sobre dominancia asociativa o por la ventaja de heterocigocidad general. Este trabajo de tesis examina si la heterocigocidad general (como indicador de endogamia) o la

heterocigocidad en el microsatélite Hg4.2, identificado en estudios previos, muestran señales de influir sobre parámetros sanguíneos del lobo marino de California. El conocer el impacto que tiene la endogamia en poblaciones silvestres en relación con su estado de salud, puede contribuir a los planes de manejo de de especies silvestres.

4. Hipótesis

Se plantearon las siguientes hipótesis:

H1: Los parámetros sanguíneos variarán según la condición clínica y la edad del lobo marino de California.

H2: La heterocigocidad general determinará la variación en los parámetros sanguíneos de los lobos marinos de California de acuerdo a cada condición clínica.

H3: La heterosis puntual en el microsatélite Hg4.2 determinará la variación en los parámetros sanguíneos relacionados con la coagulación en los lobos marinos de California de acuerdo a cada condición clínica.

5. Objetivo general

Describir la variación en los parámetros sanguíneos para cada condición clínica del lobo marino de California y determinar la contribución de la heterocigocidad genética puntual y general para cada parámetro relacionado con la coagulación.

5.1 Objetivos Específicos

Describir los parámetros sanguíneos asociados con los procesos de coagulación en lobo marino de California para cada condición clínica.

Explorar si existe una relación entre los niveles de heterocigocidad general y la heterosis puntual en el microsatélite Hg4.2 y los parámetros sanguíneos relacionados con la coagulación.

6. Material y Métodos

6.1 Área de estudio

Los datos clínicos de los lobos marinos de California utilizados en esta tesis fueron tomados de los archivos médicos del Marine Mammal Center (Sausalito, California, EEUUA), un hospital veterinario de investigación no lucrativo, dedicado al rescate y rehabilitación de mamíferos marinos enfermos o heridos. Es la única organización autorizada por el *National Marine Mammal Fisheries Service* para rescatar y proveer cuidado veterinario a los mamíferos marinos que se encuentran enfermos dentro de 600 millas de la costa Californiana (Figura 6.1). Al año rescatan alrededor de 600 mamíferos

marinos, de los cuales el 50-55 % son rehabilitados y regresados a su hábitat (F. Gulland, comm. pers.). A todos los mamíferos marinos que son ingresados en el Marine Mammal Center se le toma un historial clínico, y todos los datos que son recompilados durante su periodo de rehabilitación o muerte suelen ser utilizados para investigaciones científicas.



Figura 6.1 Distribución geográfica del área de Rescate mamíferos marinos por parte del Marine Mammal Center (Tomado de The Marine Mammal Center, www.marinemammalcenter.org)

Los lobos marinos de California que se rehabilitan en el Marine Mammal Center, y que son el sujeto de estudio en este proyecto, provienen principalmente de las Islas San Miguel y San Nicolás en donde se encuentran las colonias más grandes de lobo marino de California. En menor proporción provienen de las colonias localizadas en las islas de Santa

Bárbara y San Clemente que forman parte del Parque Nacional Islas del Canal (Figura 6.2) y de las islas del Pacífico Mexicano y el Golfo de California (Acevedo-Whitehouse *et al*, en prep.). La isla de San Miguel es la sexta isla más grande de las ocho que forman a las Islas del Canal, con una superficie de 37.74 km² y en ella se encuentra la colonia reproductiva más grande compuesta por cerca del 45 % de la población total de lobo marino de California (Allen *et al*, 2011). En la isla el lobo marino comparte su hábitat con otras especies de mamífero marino, como la foca común (*Phoca vitulina*), la nutria marina (*Enhydra lutris*), el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), y el lobo fino del Norte (*Callorhinus ursinus*). El Marine Mammal Center tiene centros de operación a lo largo de la costa de California.



Figura 6.2 Localización de las Islas del Canal, EE.UU.A, el círculo rojo enmarca la Isla de San Miguel que es en donde se encuentra la colonia reproductiva más grande y el círculo azul muestra la localización de la Isla de San Nicolás (Tomado de National Park Service).

6.2 Revisión de datos y compilación de parámetros sanguíneos

Durante dos estancias en el Marine Mammal Center realizadas durante agosto y septiembre del 2012, se revisaron los expedientes clínicos de 1344 lobos marinos de California que habían varado y fueron admitidos a rehabilitación en el Marine Mammal Center entre 1994 y 2005. De esta base de datos, para 838 se contaba con información genética y estos fueron los individuos incluidos en este estudio.

Para cada lobo marino se registró el sexo, edad, fecha de varamiento, fecha de liberación o muerte, ubicación de la captura, y se le asignó a una de las nueve causas específicas de varamiento o de muerte con base en los datos clínicos y patológicos.

Para el análisis de parámetros sanguíneos se compilaron datos sobre hematocrito (HCT), hemoglobina (HGB), plaquetas, eritrocitos, monocitos, eosinófilos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos en banda (NB), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

6.3 Análisis estadístico

Se determinaron la distribución y medidas de tendencia central de cada uno de los parámetros sanguíneos revisados. Se determinó la normalidad de los datos mediante pruebas de Tukey y se transformaron las variables que no presentaban una distribución normal. La edad de los individuos se catalogó de manera semicuantitativa como cría, añero, subadulto y adulto. Se analizaron gráficamente y estadísticamente (ANOVA de una vía) las variaciones de los parámetros por año de muestreo (ver Anexo I) y por categoría de enfermedad.

Se construyeron modelos lineales generalizados (GLM, por sus siglas en inglés) para cada condición clínica causante del varamiento (leptospirosis, ácido domóico, parasitosis helmíntica gastrointestinal, carcinoma urogenital, infección bacteriana severa, malnutrición, neumonía bacteriana-parasitaria, septicemia y trauma), en donde se analizó la contribución de la heterocigocidad multiloci (IR), la heterocigocidad en Hg4.2, el sexo y la categoría de edad sobre el nivel circulante de plaquetas, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media, eritrocitos, leucocitos totales, monocitos, eosinófilos, linfocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda. Los parámetros sanguíneos de hemoglobina corpuscular media, neutrófilos segmentados, monocitos, eosinófilos, leucocitos y linfocitos fueron transformados logarítmicamente. Los neutrófilos en banda y concentración de hemoglobina corpuscular media tampoco tuvieron una distribución normal y fueron transformados mediante una transformación logarítmica del valor +1 ya que contenían cero.

Debido a que este análisis requirió de la realización de pruebas múltiples, se utilizó la prueba de Hochberg determinar nuevos valores p de acuerdo al número de pruebas realizadas y así evitar errores tipo I (Hochberg Y, 1988; Huang y Hsu, 2007).

7. Resultados

7.1 Variación de parámetros sanguíneos por condición clínica

Las plaquetas circulantes no variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 749} = 0.829$, $p = 0.577$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de plaquetas de los machos no variaron significativamente (ANOVA, $F_{8, 414} = 1.149$, $p = 0.329$), lo mismo fue encontrado para las plaquetas circulantes de las hembras (ANOVA, $F_{8, 326} = 1.225$, $p = 0.284$; Figura 7.1)

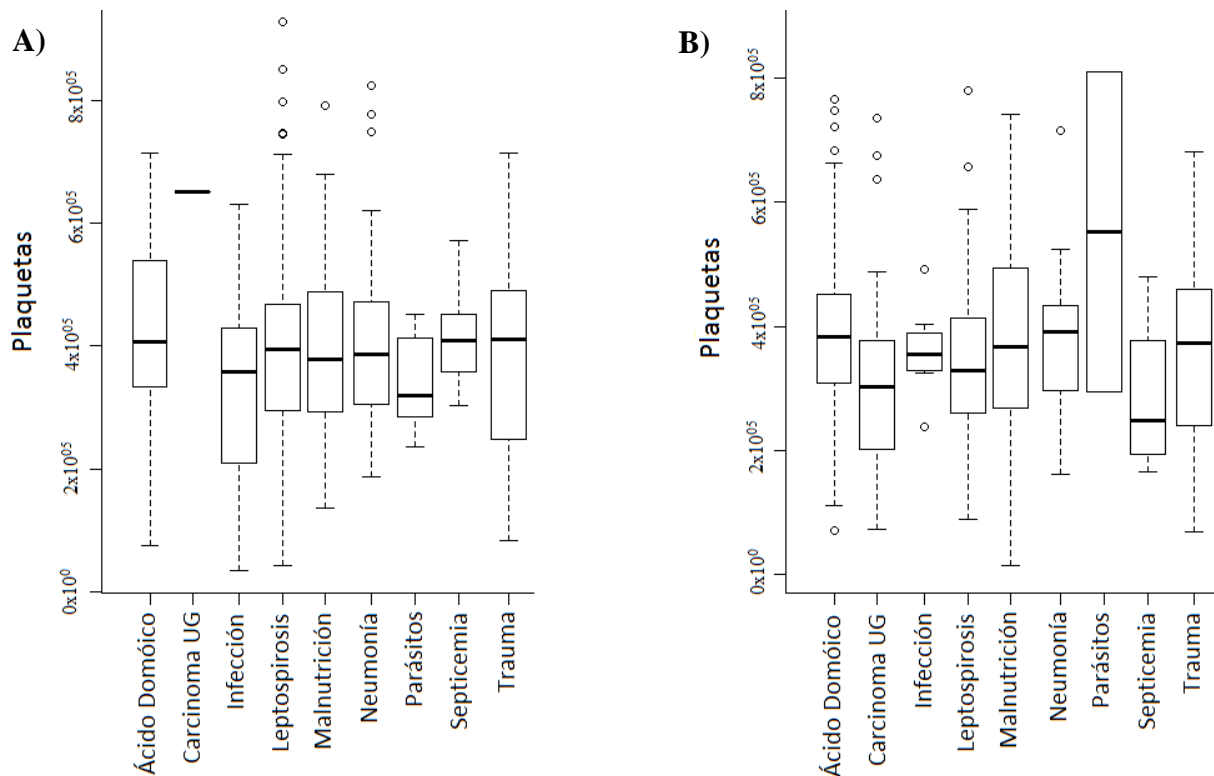


Figura 7.1 Promedio de plaquetas circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

El hematocrito circulante vario significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 770} = 16.71$, $p = < 2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de hematocrito para los dos sexos variaron significativamente entre clases de enfermedad, machos (ANOVA, $F_{8, 425} = 5.909$ $p = 3.47 \times 10^{-07}$) y hembras (ANOVA, $F_{8, 336} = 14.09$, $p = < 2 \times 10^{-16}$; figura 7.2)

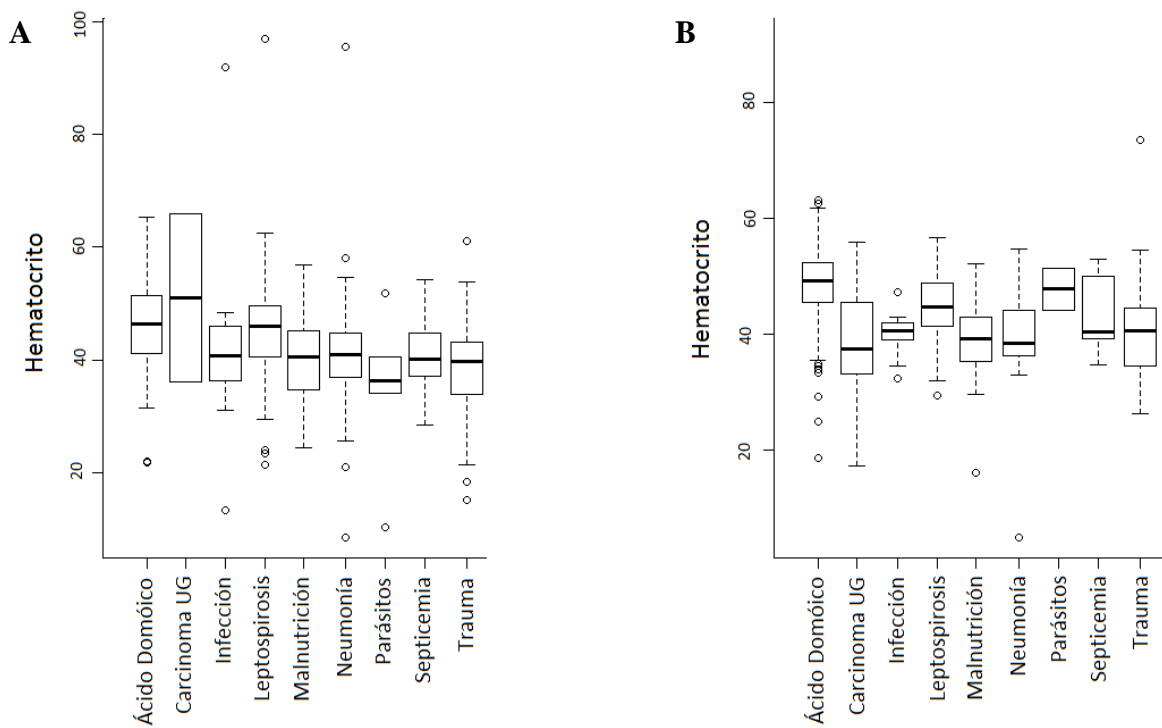


Figura 7.2 Promedio de hematocrito circulante por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

El promedio de hemoglobina circulante vario significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 770} = 21.58$, $p = < 2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que tanto para machos (ANOVA, $F_{8, 425} = 6.009$ $p = 2.53 \times 10^{-07}$), y hembras (ANOVA, $F_{8, 336} = 15.78$, $p = < 2 \times 10^{-16}$); los valores de hemoglobina variaron significativamente entre clases de enfermedad (figura 7.3)

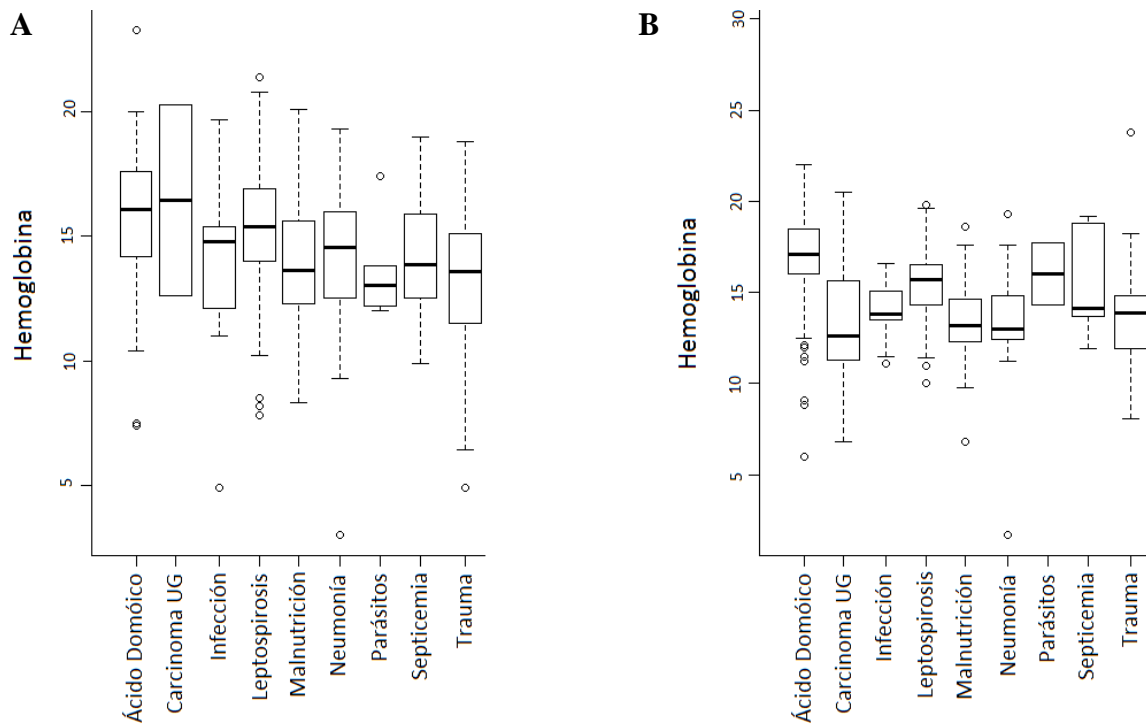


Figura 7.3 Promedio de hemoglobina circulante por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

El volumen corpuscular medio circulante vario significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 766} = 6.781$, $p = 1.28 \times 10^{-08}$). Se observó que se mantenía el mismo patrón para machos (ANOVA, $F_{8, 423} = 2.789$ $p = 0.005$) y hembras (ANOVA, $F_{8, 334} = 5.2$, $p = 3.88 \times 10^{-06}$; figura 7.4), ya que los valores del volumen corpuscular medio variaron significativamente entre clases de enfermedad

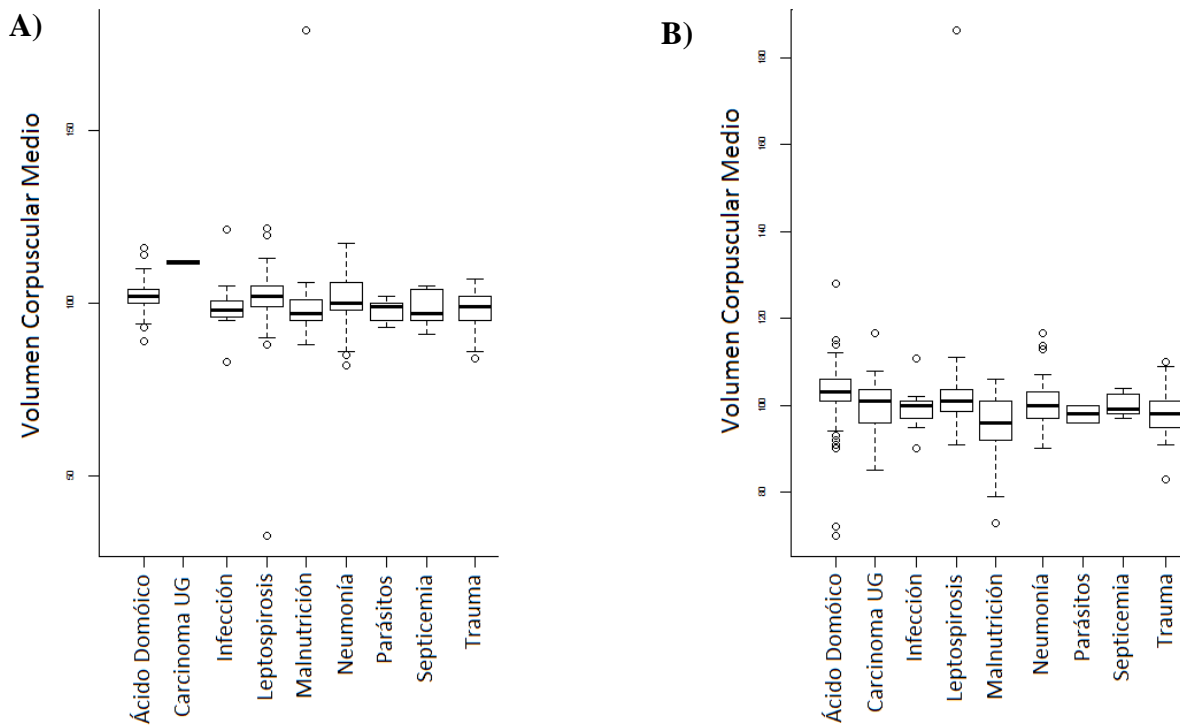


Figura 7.4 Promedio de volumen corpuscular medio circulante por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

La hemoglobina corpuscular media circulante vario significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 768} = 7.424$, $p = 1.48 \times 10^{-09}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de hemoglobina corpuscular media de los machos no variaron significativamente (ANOVA, $F_{8, 423} = 1.862$ $p = 0.064$), y que solamente los niveles de hemoglobina corpuscular media de las hembras si variaron significativamente entre clases de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 336} = 6.74$, $p = 3.35 \times 10^{-08}$; Figura 7.5)

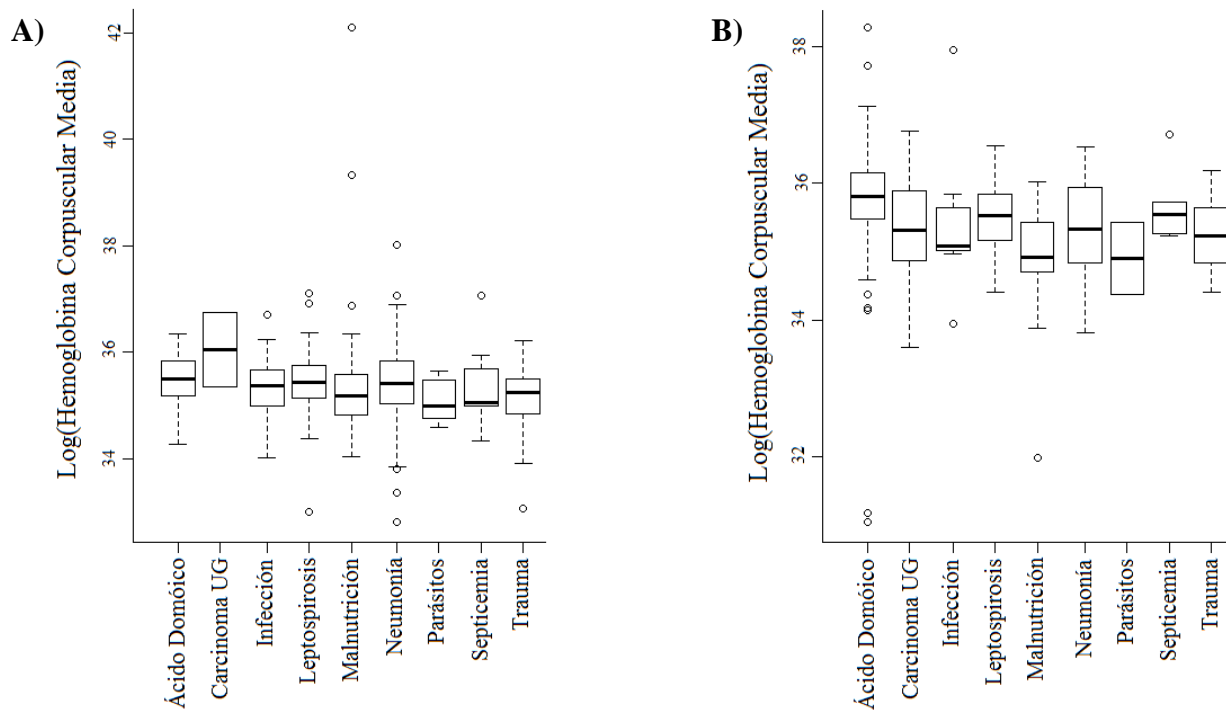


Figura 7.5 Promedio de hemoglobina corpuscular media circulante por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

La concentración de hemoglobina corpuscular media circulante no varió significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 765} = 0.568$, $p = 0.805$). Al analizar el mismo patrón entre machos y hembras, se observó que tampoco variaron los valores de hemoglobina corpuscular media entre clases de enfermedad para machos (ANOVA, $F_{8, 421} = 2.445$, $p = 0.013$) y hembras (ANOVA, $F_{8, 335} = 1.45$, $p = 0.175$; figura 7.6).

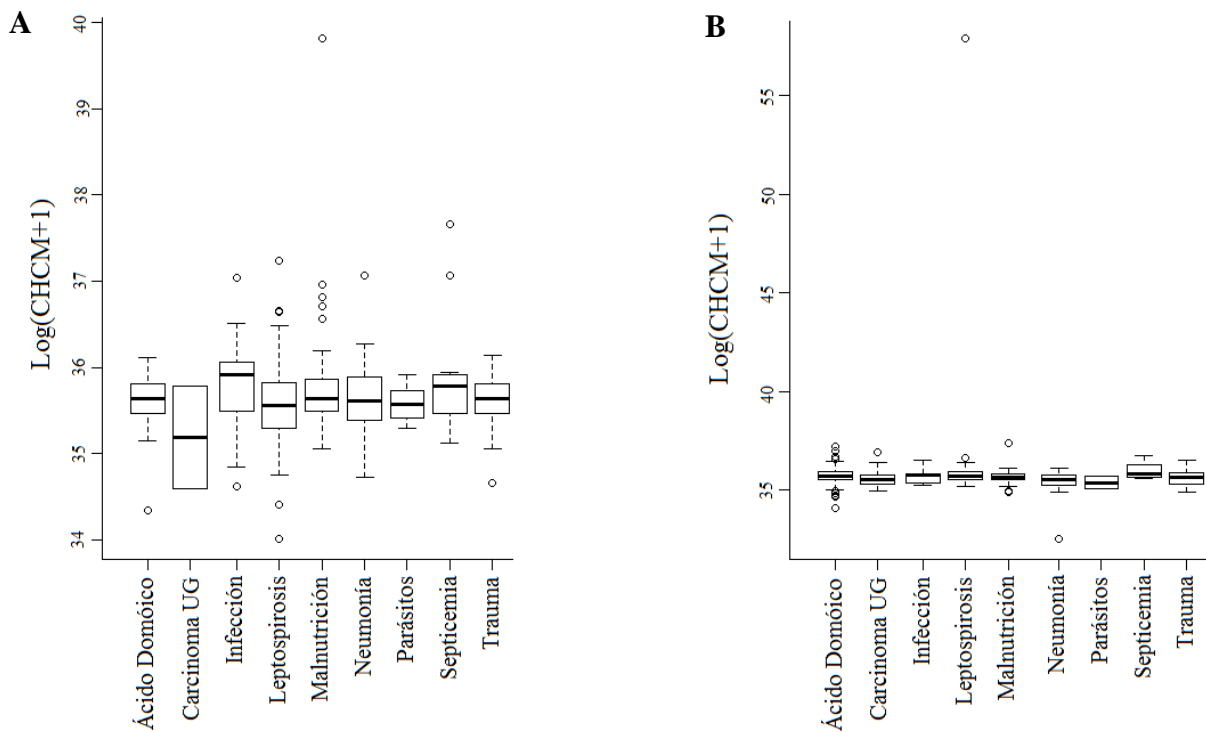


Figura 7.6 Promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media circulante por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

Los eritrocitos circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 770} = 14.99$, $p = < 2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que si se mantuvo para machos (ANOVA, $F_{8, 425} = 5.048$, $p = 5.24 \times 10^{-6}$) y hembras (ANOVA, $F_{8, 336} = 10.22$, $p = 8.42 \times 10^{-13}$; figura 7.7), ya que para ambos sexos los valores de eritrocitos variaron significativamente entre clases de enfermedad.

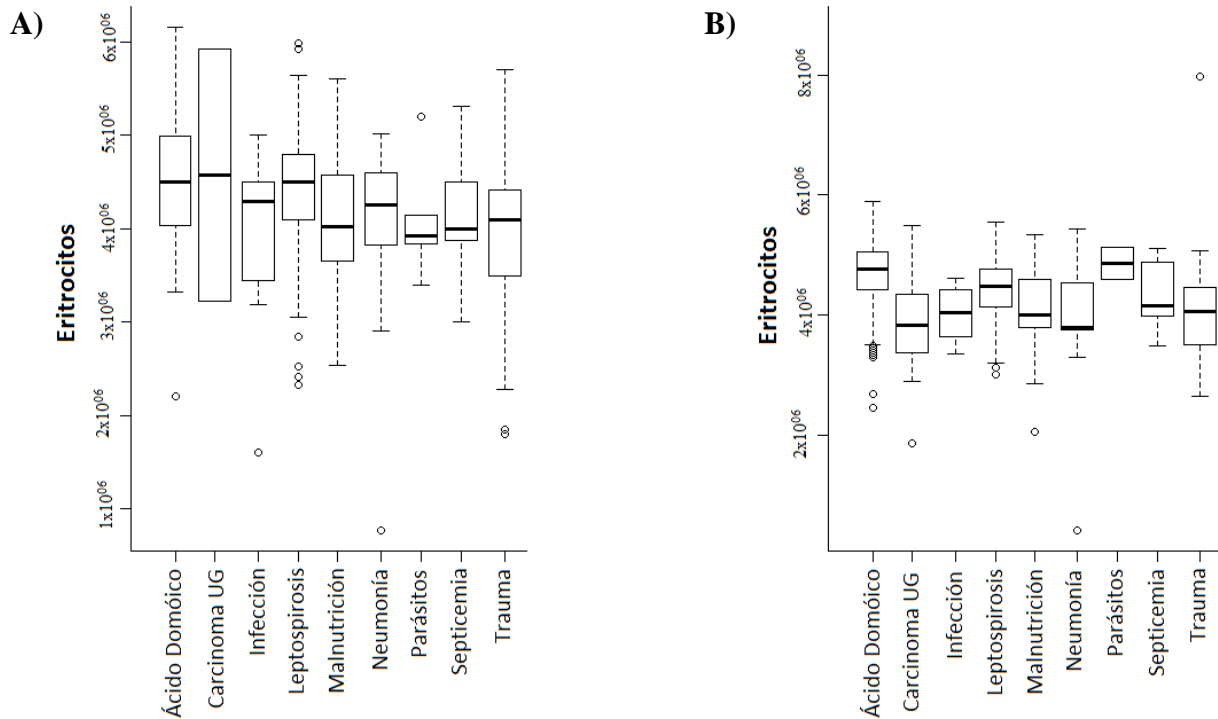


Figura 7.7 Promedio de eritrocitos circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

Los leucocitos totales circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 770} = 12.41$, $p = < 2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que solamente los valores de leucocitos de los machos variaron significativamente (ANOVA, $F_{8, 425} = 7.353$, $p = 3.56 \times 10^{-9}$), mientras que los leucocitos de las hembras no variaron entre clases de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 336} = 1.235$, $p = 0.277$; Figura 7.8)

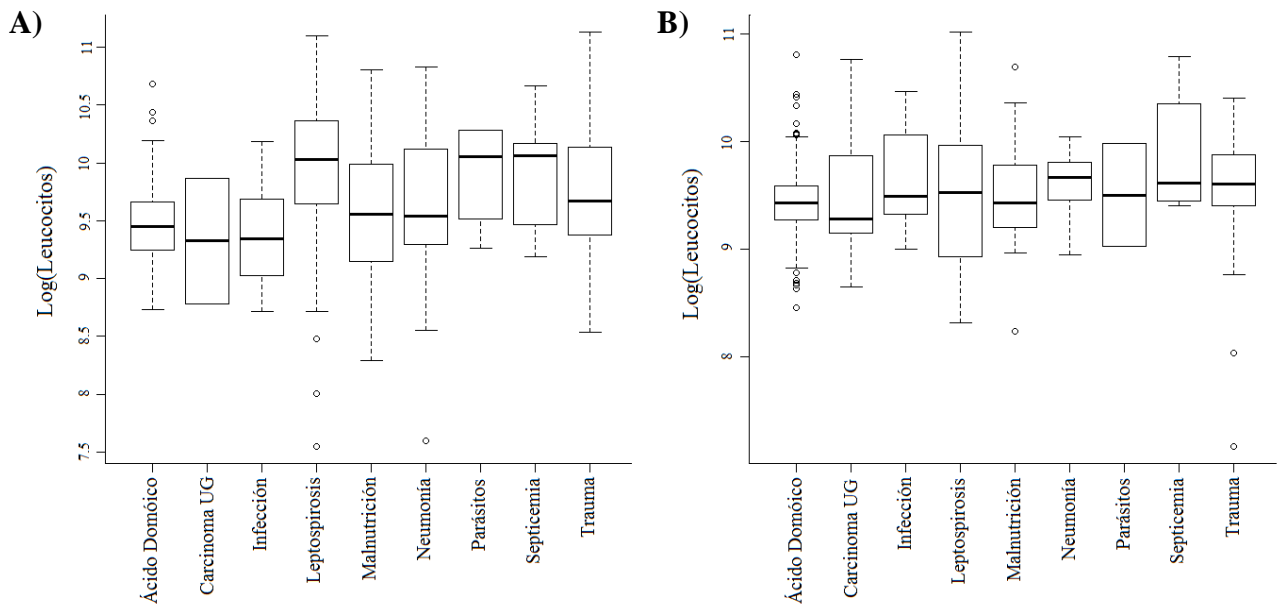


Figura 7.8 Promedio de leucocitos totales circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California.

Los monocitos circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 655} = 4.361$, $p = 3.82 \times 10^{-5}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de monocitos de los machos no variaron significativamente (ANOVA, $F_{8, 355} = 1.935$, $p = 0.053$), y tampoco los valores de monocitos de las hembras variaron entre clases de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 291} = 1.551$, $p = 0.139$; Figura 7.9)

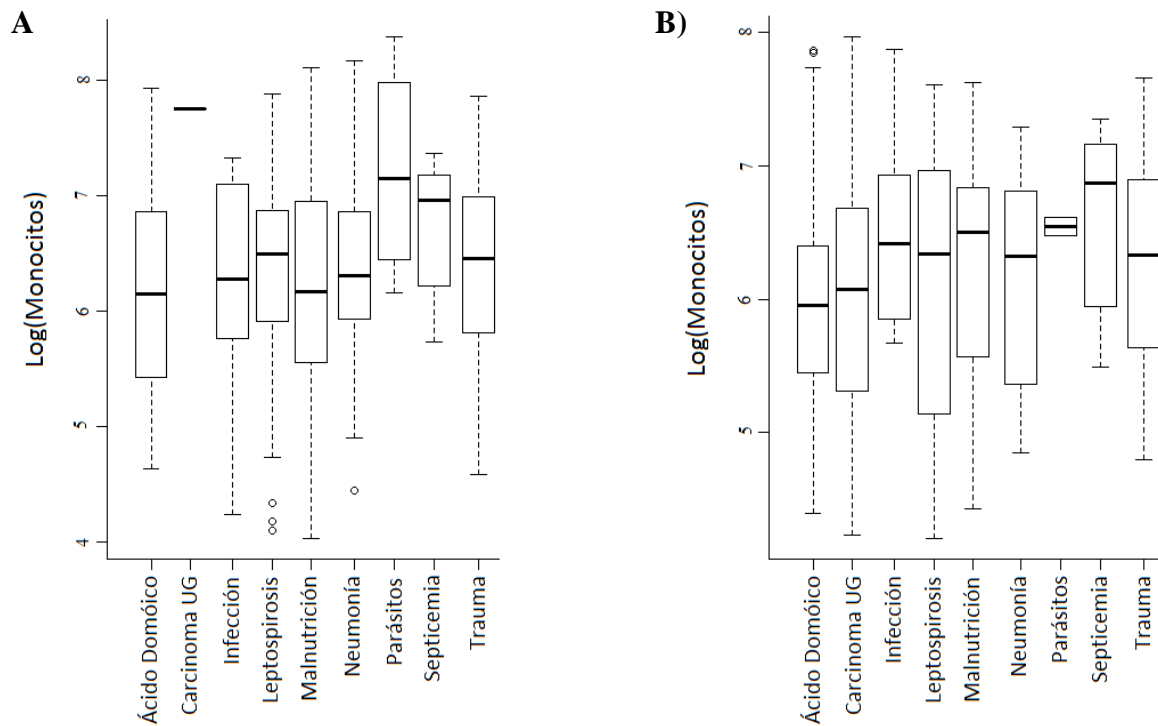


Figura 7.9 Promedio de monocitos circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

Los eosinófilos circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 568} = 15.62$, $p = <2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de eosinófilos de los machos (ANOVA, $F_{8, 287} = 7.475$, $p = 4.66 \times 10^{-9}$) y las hembras (ANOVA, $F_{8, 272} = 6.863$, $p = 3.2 \times 10^{-8}$; Figura 7.10) variaron significativamente entre clases de enfermedad.

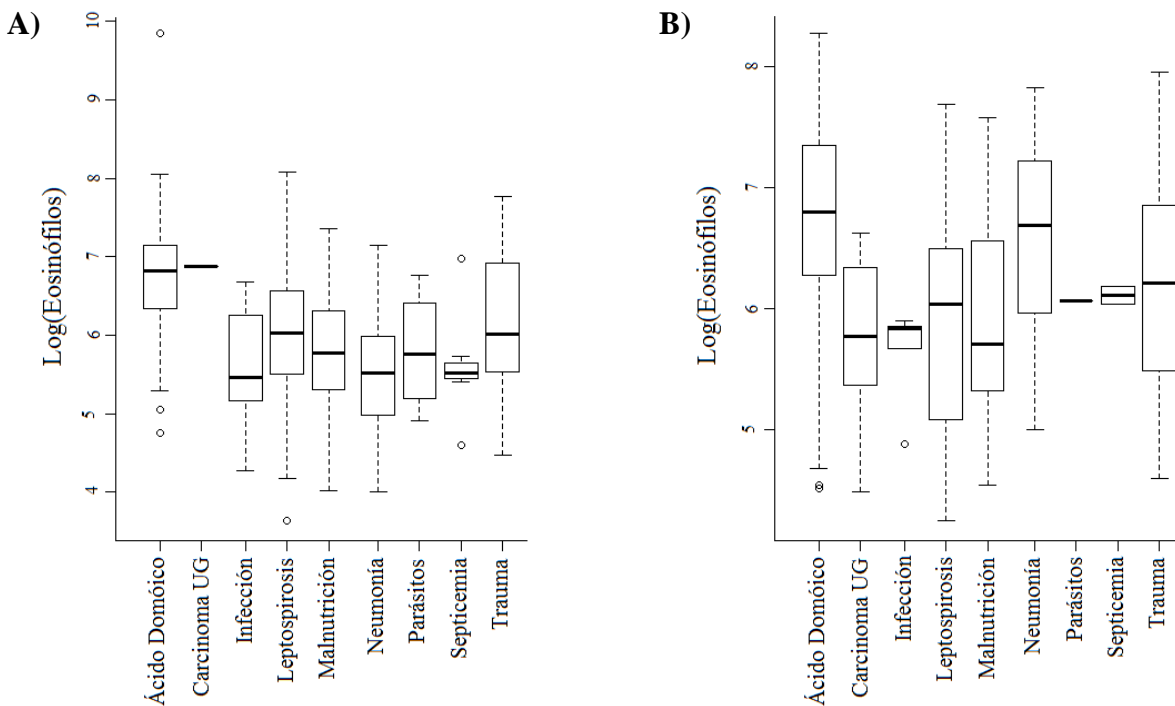


Figura 7.10 Promedio de eosinófilos circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

Los linfocitos circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 756} = 5.929$, $p = 2.19 \times 10^{-07}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de linfocitos de los machos (ANOVA, $F_{8, 417} = 3.429$, $p = 0.000$) y las hembras (ANOVA, $F_{8, 330} = 3.69$, $p = 0.000$; Figura 7.11) variaron significativamente entre clases de enfermedad.

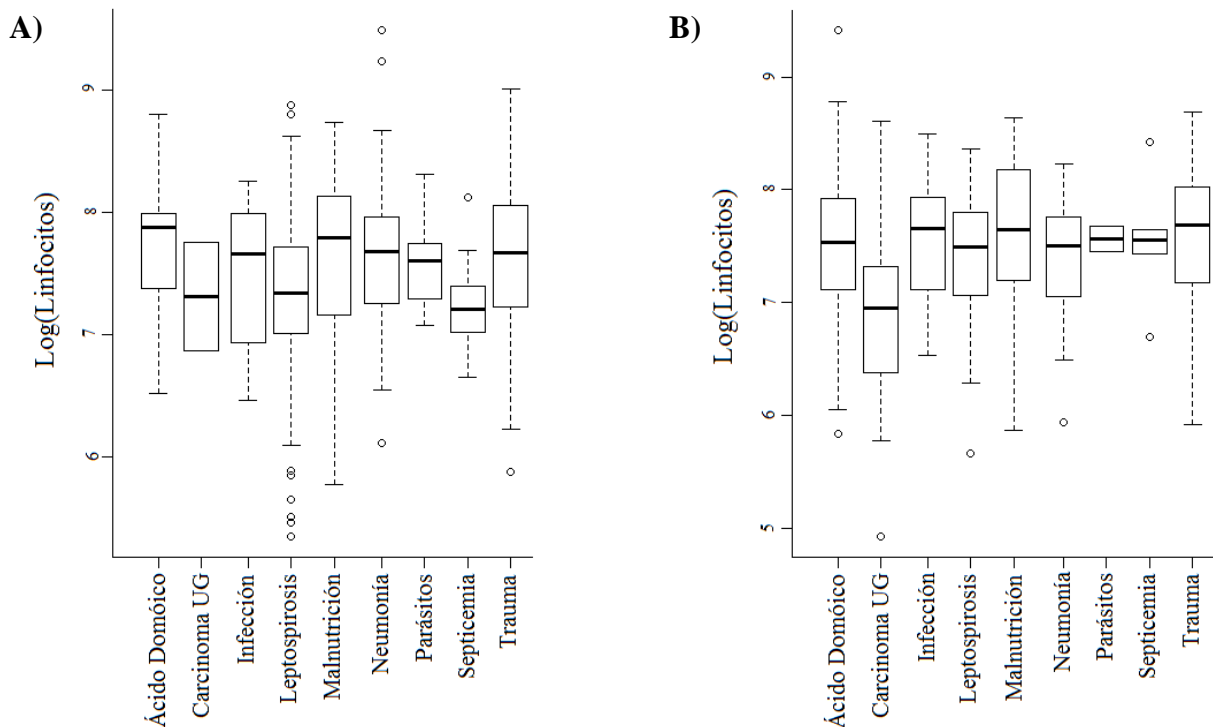


Figura 7.11 Promedio de linfocitos circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

Los neutrófilos segmentados circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 761} = 5.625$, $p = <2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que solamente los valores de neutrófilos segmentados de los machos variaron significativamente (ANOVA, $F_{8, 419} = 8.64$, $p = 6.26 \times 10^{-11}$), mientras que los neutrófilos segmentados de las hembras no variaron entre clases de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 333} = 1.098$, $p = 0.364$; Figura 7.12).

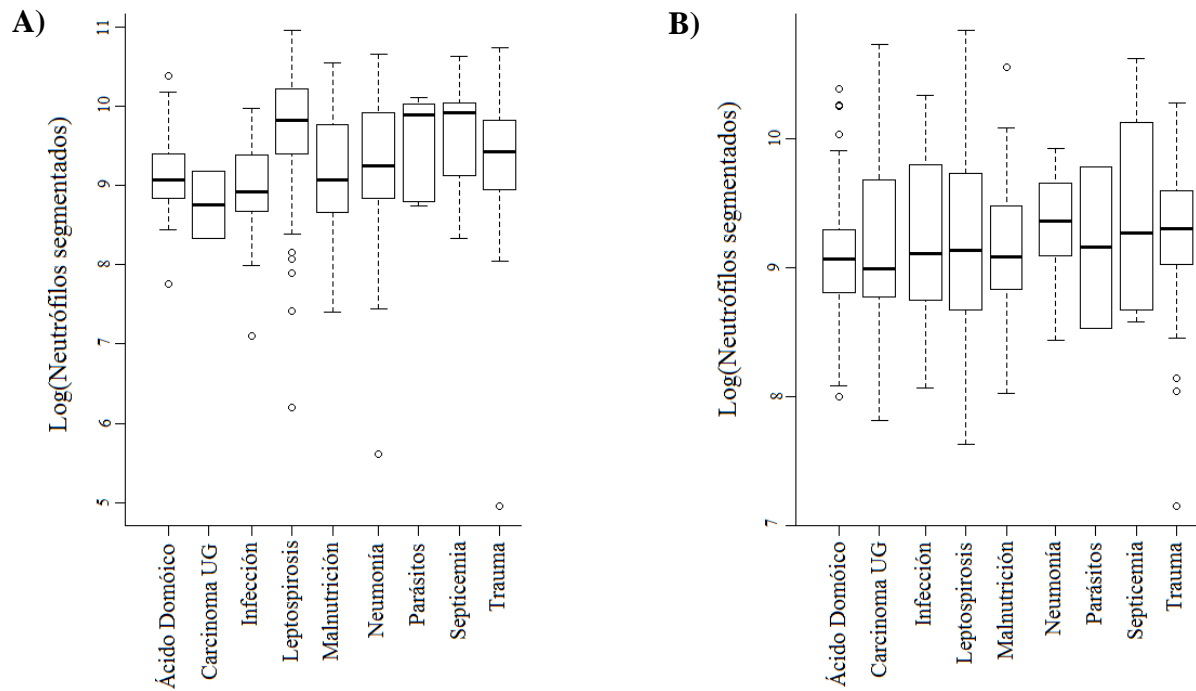


Figura 7.12 Promedio de neutrófilos segmentados circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

Los neutrófilos en banda circulantes variaron significativamente entre categorías de enfermedad (ANOVA, $F_{8, 515} = 15.79$, $p = <2 \times 10^{-16}$). Al analizar si este patrón se mantenía entre machos y hembras, se observó que los valores de neutrófilos en banda de los machos (ANOVA, $F_{8, 303} = 4.259$, $p = 7.25 \times 10^{-5}$) y de las hembras (ANOVA, $F_{8, 203} = 9.128$, $p = 1.06 \times 10^{-10}$; Figura 7.13) si variaron significativamente entre clases de enfermedad.

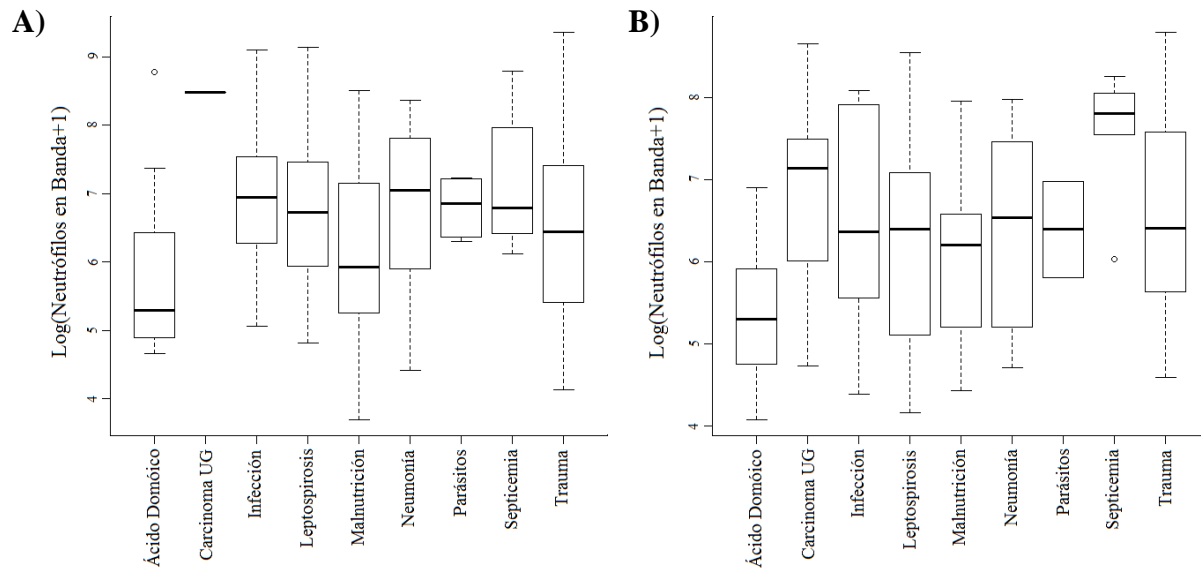


Figura 7.13 Promedio de neutrófilos en banda circulantes por categorías de enfermedad. A) Machos y B) Hembras de lobo marino de California

7.2 Efecto de la heterocigocidad general y la heterocigocidad puntual sobre los parámetros sanguíneos

Al analizar cada causa de varamiento con modelos multivariados, se vio que para leptospirosis los valores de neutrófilos segmentados, concentración de hemoglobina corpuscular media y leucocitos variaban significativamente entre sexos. La interacción entre heterocigocidad multilocus (IR), edad y sexo también explican significativamente los valores de CHCM (cuadro 7.1).

Cuadro 7.1 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por leptospirosis. El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=leptospirosis). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | Gl | <i>p</i> |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------|-----------------------------|
| Plaquetas | Heterocigocidad Hg4.2 | 4.270 | 212 | 0.040 |
| | IR | 4.091 | 212 | 0.044 |
| Hemoglobina | Heterocigocidad Hg4.2 : IR :Sexo | 5.055 | 216 | 0.025 |
| VCM | Edad | 6.422 | 215 | 0.012 |
| CHCM | Edad | 7.208 | 214 | 0.007 |
| | Sexo | 8.030 | 214 | 0.005 |
| | Edad : Sexo | 6.215 | 214 | 0.013 |
| | IR : Edad : Sexo | 8.205 | 214 | 0.004 |
| Leucocitos | Sexo | 15.870 | 216 | 9.48x10⁻⁵ |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : IR : Sexo | 5.354 | 216 | 0.021 |
| Monocitos | Sexo | 5.248 | 181 | 0.023 |
| Neutrófilos segmentados | Sexo | 15.316 | 215 | 0.000 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad | 4.045 | 215 | 0.045 |
| Neutrófilos en banda | Sexo | 4.767 | 168 | 0.030 |

Los animales que vararon a causa de intoxicación por ácido domóico mostraron que el factor más importante para explicar la variación de algunos parámetros sanguíneos fue la edad. La hemoglobina corpuscular media de los animales con esta condición clínica dependió de la interacción entre la edad y el sexo de los lobos marinos, su heterocigocidad en el microsatélite Hg 4.2, su heterocigocidad multilocus (IR) y su edad de manera independiente (cuadro7.2).

Cuadro 7.2 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por ácido domóico. El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=ácido domóico). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | Gl | <i>p</i> |
|--------------------------------|---|---------------|------------|-------------------------------|
| Plaquetas | Edad | 5.652 | 227 | 0.018 |
| Hematocrito | Edad | 37.419 | 232 | 4.389x10⁻⁹ |
| Hemoglobina | Edad | 41.183 | 232 | 8.583x10⁻¹⁰ |
| VCM | Edad | 40.486 | 231 | 1.167x10⁻⁹ |
| | Edad : Sexo | 6.967 | 231 | 0.008 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 4.011 | 231 | 0.046 |
| HCM | Edad | 47.520 | 232 | 5.84x10⁻¹¹ |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad | 3.974 | 232 | 0.047 |
| | Edad : Sexo | 6.864 | 232 | 0.009 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 8.656 | 232 | 0.003 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Sexo | 4.150 | 232 | 0.042 |
| CHCM | Edad | 8.080 | 231 | 0.004 |
| Eritrocitos | Edad | 19.988 | 232 | 1.256x10⁻⁵ |
| Eosinófilos | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 7.026 | 214 | 0.008 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad : Sexo | 4.908 | 214 | 0.027 |
| Linfocitos | Edad | 10.495 | 231 | 0.001 |
| Neutrófilos segmentados | IR | 4.060 | 232 | 0.045 |

En contraste, para los lobos marinos que vararon a consecuencia de infecciones parasitarias gastrointestinales, la heterocigocidad en el microsatélite Hg 4.2 únicamente explicaba las variaciones en los valores de plaquetas. De igual manera, la interacción entre la heterocigocidad en Hg4.2 y la edad explicaban las variaciones en los parámetros de hemoglobina para esa condición (cuadro 7.3).

Cuadro 7.3 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por parasitosis helmíntica gastrointestinal El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=parasitosis helmíntica gastrointestinal). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | Gl | <i>p</i> |
|--------------------|------------------------------|----------------|----------|--------------|
| Plaquetas | Heterocigocidad Hg4.2 | 104.842 | 7 | 0.009 |
| Hemoglobina | Heterocigocidad Hg4.2 | 646.926 | 7 | 0.001 |
| | Edad | 887.714 | 7 | 0.001 |
| | Sexo | 22.6015 | 7 | 0.041 |
| Eritrocitos | Edad | 20.6118 | 7 | 0.045 |

Para carcinoma urogenital como causa de varamiento en los modelos lineales generalizados se encontró que los factores heterocigocidad multilocus junto con edad explican los valores de hematocrito, eritrocitos y concentración de hemoglobina corpuscular media. Heterocigocidad en el microsatélite Hg4.2 resulto ser un factor significativo para determinar los parámetros de eosinófilos (cuadro 7.4).

Cuadro 7.4 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por carcinoma urogenital. El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=carcinoma UG). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variables | F | Gl | <i>p</i> |
|-------------------------|-------------------------------|---------------|-----------|--------------|
| Plaquetas | Sexo | 6.811 | 23 | 0.018 |
| Hematocrito | IR : Edad | 10.127 | 24 | 0.005 |
| | IR : Sexo | 5.043 | 24 | 0.038 |
| Hemoglobina | IR : Edad | 5.394 | 24 | 0.032 |
| VCM | Sexo | 5.881 | 24 | 0.026 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 7.128 | 24 | 0.016 |
| HCM | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 4.880 | 24 | 0.041 |
| CHCM | IR : Edad | 12.207 | 24 | 0.002 |
| Eritrocitos | IR : Sexo | 4.973 | 24 | 0.039 |
| | IR : Edad | 10.906 | 24 | 0.004 |
| Leucocitos | IR : Sexo | 7.975 | 24 | 0.011 |
| Monocitos | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 4.930 | 18 | 0.046 |
| Eosinófilos | Heterocigocidad Hg 4.2 | 40.678 | 14 | 0.000 |
| Neutrófilos segmentados | IR : Sexo | 5.725 | 24 | 0.028 |
| Neutrófilos en banda | IR : Edad | 5.376 | 17 | 0.040 |

En el cuadro 7.5 se puede observar que la heterocigocidad en el microsatélite Hg 4.2, la edad y la heterocigocidad multilocus explican los valores de linfocitos por separado. Encontramos que los linfocitos pueden ser explicados significativamente por los parámetros de heterocigocidad Hg4.2, multilocus, sexo y edad.

Cuadro 7.5 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por infección bacteriana severa. El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=infección bacteriana severa). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variables | F | GI | <i>p</i> |
|-------------------|--|---------------|-----------|-----------------|
| HCM | Edad | 5.752 | 23 | 0.040 |
| Leucocitos | Heterocigocidad Hg 4.2 | 7.905 | 23 | 0.020 |
| Linfocitos | Heterocigocidad Hg4.2 | 28.060 | 22 | 0.000 |
| | Edad | 17.815 | 22 | 0.002 |
| | IR | 8.865 | 22 | 0.017 |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : IR | 28.115 | 22 | 0.000 |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : Sexo | 9.110 | 22 | 0.016 |
| | Edad : Sexo | 7.365 | 22 | 0.026 |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : IR : Sexo | 18.971 | 22 | 0.002 |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : IR : Edad | 33.050 | 22 | 0.000 |
| | Heterocigocidad Hg4.2 : Edad : Sexo | 10.084 | 22 | 0.013 |
| | IR : Edad : Sexo | 9.232 | 22 | 0.016 |

Para los animales varados por malnutrición solamente la edad influía sobre los parámetros sanguíneos (cuadro 7.6).

Cuadro 7.6 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por malnutrición El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=malnutrición). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | GI | <i>p</i> |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------|-----------|------------------------------|
| Plaquetas | Edad | 5.3920 | 84 | 0.023 |
| Hematocrito | Edad | 12.167 | 85 | 0.000 |
| | IR : Sexo | 4.472 | 85 | 0.038 |
| Hemoglobina | Edad | 21.384 | 85 | 1.672x10⁻⁵ |
| VCM | IR : Sexo | 6.344 | 85 | 0.014 |
| HCM | Edad | 9.065 | 85 | 0.003 |
| Eritrocitos | Edad | 6.401 | 85 | 0.013 |
| | IR | 4.495 | 85 | 0.037 |
| | Heterocigidad Hg 4.2 : IR | 4.165 | 85 | 0.045 |
| Leucocitos | Edad | 22.179 | 85 | 1.219x10⁻⁵ |
| | Edad : Sexo | 5.274 | 85 | 0.024 |
| | Heterocigidad Hg 4.2 : Edad : Sexo | 5.693 | 85 | 0.019 |
| Neutrófilos segmentados | Edad | 17.289 | 84 | 9.078x10⁻⁵ |
| | Heterocigidad Hg4.2 : Edad : Sexo | 5.059 | 84 | 0.027 |

Neumonía parasitaria-bacteriana como causa de varamiento encontró que la edad era un factor significativo para explicar los valores de hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media. También se encontró que el factor heterocigidad en el microsatélite Hg4.2 junto con sexo era importante para los valores de eosinófilos. Heterocigidad en Hg4.2 y heterocigidad multilocus junto con el sexo explican los valores de eosinófilos significativamente. También se encontró que la

heterocigocidad multilocus y la edad afectan significativamente los valores de linfocitos (cuadro 7.7).

Cuadro 7.7 Modelo generalizado lineal para parámetros sanguíneos en animales varados por neumonía bacteriana-parasitaria. El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=neumonía). El cuadro muestra el consensado de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variables | F | Gl | <i>p</i> |
|----------------------|---|---------------|-----------|-------------------------------|
| Hematocrito | IR | 5.294 | 55 | 0.026 |
| | Edad | 14.595 | 55 | 0.000 |
| Hemoglobina | Edad | 14.970 | 55 | 0.000 |
| VCM | Edad | 28.833 | 53 | 4.163x10⁻⁶ |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 4.483 | 53 | 0.040 |
| HCM | Edad | 26.950 | 54 | 6.834x10⁻⁶ |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 6.491 | 54 | 0.014 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Sexo | 4.092 | 54 | 0.049 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad : Sexo | 5.269 | 54 | 0.027 |
| CHCM | IR | 4.346 | 54 | 0.043 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 8.671 | 54 | 0.005 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 5.532 | 54 | 0.023 |
| Leucocitos | IR : Edad | 10.523 | 55 | 0.002 |
| | Edad : Sexo | 4.117 | 55 | 0.049 |
| Eosinófilos | Sexo | 35.621 | 35 | 7.764x10⁻⁰⁶ |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR | 6.714 | 35 | 0.017 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Sexo | 21.917 | 35 | 0.000 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad | 5.806 | 35 | 0.025 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Sexo | 14.529 | 35 | 0.001 |
| Neutrófilos en banda | IR : Edad : Sexo | 6.113 | 41 | 0.020 |

Para los lobos marinos varados que presentaron septicemia, ninguno de los factores que se probaron en el modelo fueron significativos para explicar la variación de los parámetros sanguíneos (cuadro 7.8).

Cuadro 7.8 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por septicemia El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=septicemia). El cuadro muestra el consensado de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | GI | <i>p</i> |
|--------------------|-------------|--------|----|----------|
| Plaquetas | Sexo | 11.714 | 16 | 0.018 |
| | IR : Edad | 7.226 | 16 | 0.043 |
| | Edad : Sexo | 12.943 | 16 | 0.015 |
| Hemoglobina | IR : Sexo | 6.874 | 18 | 0.039 |

En el caso de trauma como causa de varamiento, se encontró que la heterocigocidad en el microsatélite Hg 4.2 en interacción con la heterocigocidad multilocus y la edad explicaron significativamente los valores de hematocrito, hemoglobina y eritrocitos. Para los valores de volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media únicamente la edad fue relevante. Por último, la edad en interacción con el sexo explicaron los valores de leucocitos (cuadro 7.9).

Cuadro 7.9 Modelo generalizado linear para parámetros sanguíneos en animales varados por trauma

El modelo que se corrió fue, para cada parámetro sanguíneo, (PARAMETRO~Heterocigocidad.Hg4.2*IR*Sexo*Edad, data=trauma). El cuadro muestra el consenso de variables que fueron significativas para cada parámetro sanguíneo. En negritas se muestran los valores de *p* que mantuvieron su significancia después de una prueba de Hochberg.

| | Variable | F | Gl | <i>p</i> |
|-------------------------|---|---------------|------------|------------------------------|
| Hematocrito | Edad | 5.068 | 109 | 0.026 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 12.166 | 109 | 0.000 |
| Hemoglobina | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad : Sexo | 4.349 | 109 | 0.039 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 11.977 | 109 | 0.000 |
| VCM | Edad | 19.113 | 109 | 3.179x10⁻⁵ |
| HCM | Edad | 13.911 | 109 | 0.000 |
| Eritrocitos | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 12.982 | 109 | 0.000 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad : Sexo | 4.020 | 109 | 0.047 |
| Leucocitos | Edad : Sexo | 10.754 | 109 | 0.001 |
| Monocitos | IR : Edad | 7.425 | 92 | 0.007 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Sexo | 5.140 | 92 | 0.026 |
| Eosinófilos | Sexo : Edad : IR | 4.562 | 77 | 0.036 |
| Neutrófilos segmentados | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad | 5.059 | 108 | 0.027 |
| Neutrófilos en banda | IR | 4.946 | 81 | 0.029 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : Edad | 4.124 | 81 | 0.046 |
| | Heterocigocidad Hg 4.2 : IR : Edad | 4.501 | 81 | 0.037 |

8. Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, se observó que la mayoría de los parámetros sanguíneos variaron de acuerdo a la causa de varamiento. Solo dos de los parámetros sanguíneos que se midieron (plaquetas y concentración de hemoglobina corpuscular media) no fueron explicados por la causa de varamiento. Esto puede deberse a que las plaquetas no están relacionadas directamente con respuestas inmunes ni procesos patológicos derivados de la mayoría de las causas de varamiento, en cambio los demás parámetros sanguíneos participan en la respuesta inmune contra los agentes etiológicos de la mayoría de las causas de varamiento, como leptospirosis, ácido domóico, infección bacteriana, neumonía bacteriana y septicemia. En estas condiciones de salud, la hemoglobina, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, eritrocitos, linfocitos y el hematocrito son indicadores de infecciones, inflamación, parásitos, bacterias, neumonías y enfermedades crónicas inflamatorias (Bossart *et al*, 2001 y Kerr MG, 2002). Los valores altos de eosinófilos suelen relacionarse con infecciones parasitarias y reacciones alérgicas, heridas, presencia de células cancerígenas y algunas veces también con el embarazo ya que en la placenta se encuentran muchos eosinófilos (Kerr MG, 2002). Los monocitos son las células más grandes de los glóbulos blancos y su función es la de fagocitar, cuando existe una gran concentración de estas células puede ser indicador de enfermedades crónicas o condiciones inflamatorias crónicas (Kerr MG, 2002) como lo podría ser la infección por neumonía, leptospirosis, cáncer y parásitos (Colegrove *et al*, 2009).

Los valores circulantes de eritrocitos mostraron la mayor variación para los animales subadultos. Esto probablemente se deba a que durante esta etapa de su vida varan por varias causas, y muchas de ellas cursan con pérdida de sangre, como ocurre en los casos de trauma y la leptospirosis. En contraste, fueron las crías donde la hemoglobina tuvo valores más bajos, posiblemente porque una de las principales causas de varamiento para este grupo de edad fue la malnutrición, que cursa comúnmente con anemia. Los valores de VCM también fueron menores en las crías que en los animales añeros, subadultos y adultos, esto es normal y refleja la etapa de desarrollo (Kerr MG, 2002).

En el caso de eosinófilos, las crías presentaron valores que no variaron significativamente durante los seis años de muestras que se incluyeron en la tesis. Se ve una tendencia a una mayor dispersión de los datos para las crías de 2005, año en el cual varios presentaron valores de eosinófilos que excedían el promedio general. Este año fueron comunes los casos de neumonía parasitaria en las crías varadas, condición que se espera cursa con eosinofilia (Virella, 1998). Este fenómeno es el que pudiera explicar los valores altos de eosinófilos observados para añeros y adultos donde las causas de varamiento comunes pueden cursar con eosinofilia.

La diferencia en los valores promedio de leucocitos, neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados entre machos subadultos y hembras de lobo marino de California podría ser explicada por que al entrar en edad reproductiva e invertir en caracteres sexuales secundarios, es más probable que desvíen recursos energéticos hacia éstos y no hacia parámetros inmunes, resultado en una mayor probabilidad de infecciones, evidenciadas aquí como leucocitosis y neutrofilia. (Gerber *et al*, 1977; Shaya *et al*, 1981; Suzuki y Tomasi, 1979). De manera general, los machos presentaron una mayor concentración de leucocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados y monocitos pero, mientras que las hembras tuvieron una concentración de eosinófilos y linfocitos considerablemente mayor a la de los machos.

Las causas de varamiento fluctuaron por año, esto es por que en cada año ocurren patrones climáticos diferentes, como los “años Niño”, en donde las condiciones de temperatura del agua son significativamente mayores (Wang *et al*, 1999) y suelen ocurrir más frecuentemente florecimientos de diatomeas (Anderson *et al*, 1998), como la responsable de los brotes de ácido domóico que causan mortalidades en mamíferos marinos (Bates, 2000; Gulland, 2000; Torres de la Riva *et al*, 2009). Cuando se grafican las causas de varamiento por año es importante mencionar que de 1994 a 1999 se contó con comparativamente poca información en comparación de los años 2000 a 2005. Para los años del 2000 a 2005 se registraron brotes de intoxicación por ácido domóico muy intensos

y frecuentes, que pudieron ser causados por los florecimientos de *Pseudonitzschia australis* en años de condiciones ambientales atípicas (NOAA, 2013).

Parece ser que para los animales que vararon a causa de leptospirosis el factor que más influye sobre los valores circulantes de neutrófilos segmentados, leucocitos y la concentración de hemoglobina corpuscular media fue el sexo. Factor que influye en la inmunidad innata y adaptativa, ya que la respuesta que tienen las hembras y machos a infecciones virales, parasitarias y bacterianas difieren (Pennell *et al*, 2012). Se conoce que el embarazo es una etapa en la que las respuestas inmunes a infecciones y enfermedades inflamatorias reaccionan de diferente manera por la producción de estrógeno (Kovats, 2012) y que también están propensas a presentar peores resultados en infecciones virales en donde la patogénesis esté relacionada con reacciones inmunes-inflamatorias ya que la producción de interleucinas disminuye (Torcia *et al*, 2012). Aun sin la influencia de hormonas sexuales se ha visto que las respuestas a estresores son diferentes en machos y hembras ya que la expresión genética es diferente (Penaloza *et al*, 2009). De igual manera se conoce que en humanos la segregación prolongada de productos inflamatorios y regulatorios de la respuesta inmune pueden causar reacciones inmunitarias exageradas que desemboquen en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Ramsey *et al*, 2012).

Por ejemplo, los machos tienen valores de neutrófilos segmentados y leucocitos más altos que los de las hembras lo que se podría deber a que los machos sufren muchos traumas durante las peleas por territorio, permitiendo así la entrada a diversos patógenos. Además de que las hormonas sexuales como la testosterona incrementan la producción de interleucinas que inhiben la producción de linfocitos T y macrófagos (Torcia *et al*, 2012). En contraste, los valores de concentración de hemoglobina corpuscular media (HCM) fueron explicados por las interacciones entre heterocigocidad multilocus (IR), edad y sexo, al igual que el sexo como factor único. Esto podría explicarse por que las causas de varamiento ocurren de manera un tanto preferencial entre sexos y edades, y en estas, la ventaja de la heterocigocidad multilocus parece determinar los valores de HCM. Esto es interesante ya que no se había reportado una ventaja de heterosis sobre dicho parámetro biológico en poblaciones silvestres. Sin embargo, existen reportes de heterosis (alelo VHL)

sobre la hemoglobina en humanos en donde les confiere un grado de protección contra desarrollar anemia, ya que cuando ocurre una demanda en la eritropoyesis los heterocigotos son capaces de completar la cascada de coagulación (Miasnikova *et al*, 2011).

En el caso de los animales que vararon debido a septicemia ningún factor explicó la variación en los valores sanguíneos. Esto podría ser explicado porque cuando hay sepsis las respuestas inmunes no están balanceadas y ocurre apoptosis de las células inmunes e hiperinflamación, lo que descontrola al sistema inmune (Anas *et al*, 2010), potencialmente eliminando cualquier relación posible con la heterocigocidad.

Las inmunodeficiencias están genéticamente relacionadas y el hecho de ser endogámico puede aumentar las posibilidades de que estas ocurran (Hartl y Clark, 1989). Sin embargo, también pueden ocurrir inmunodeficiencias causadas por condiciones externas como infecciones virales, estresores, desnutrición, neoplasias e infecciones parasitarias (King *et al*, 2001). En este trabajo se encontraron evidencias de animales con altos niveles de pérdida de heterocigocidad, que reflejan valores putativos de endogamia alta. Es posible que en estos animales, los parámetros sanguíneos encontrados reflejaran una inhabilidad de lidiar con la infección o condición clínica presente, pero debido a que reciben tratamiento médico, no sea posible determinar de manera significativa esta relación general. Los lobos marinos de California que fueron varados y rehabilitados en el Marine Mammal Center tiene niveles de endogamia y se vio que para algunas enfermedades este es un factor determinante del grado de infección (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2006) o el tiempo de rehabilitación (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2003). En este trabajo se encontró que el ser endogámico está relacionado significativamente con los valores de linfocitos, hematocrito y concentración de hemoglobina corpuscular media para las condiciones de infección bacteriana severa, carcinoma urogenital, neumonía y trauma pero no para las demás condiciones. Además el hecho de ser homocigoto en el microsatélite Hg4.2 explicó significativamente la variación en los valores de linfocitos, eosinófilos, hemoglobina, y plaquetas para las condiciones clínicas de infección bacteriana severa, carcinoma urogenital y parasitosis helmíntica. Estos resultados nos reflejan la importancia que tiene la

endogamia en poblaciones silvestres en término de su resistencia a condiciones de enfermedad (ver ejemplos en Valsecchi *et al*, 2004; Lyons *et al*, 2009; Rijks *et al*, 2008; McDougall-Shackleton *et al*, 2005 y Cassinello *et al*, 2001), y resalta que la heterosis puntual en un microsatélite presumiblemente ligado a un gen de relevancia funcional para los parámetros medidos, puede influir también sobre el comportamiento de estos (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2005 y 2006; Smith *et al*, 2012).

Acevedo-Whitehouse y colaboradores (2003) propusieron que el ser endogámico alarga el tiempo de rehabilitación y que en los animales que varan por infección helmíntica la heterocigocidad parece ser un factor importante para determinar la intensidad de la condición clínica. En el estudio realizado con crías de lobo marino de California (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2006) y crías de lobo marino de Nueva Zelanda (Acevedo-Whitehouse *et al*, 2009) se mostró que el hecho de ser homocigoto o no para el microsatélite Hg4.2 y el microsatélite ZcCgDh3.6 respectivamente, hacía que las crías tuvieran una predisposición a anemia y trombocitopenia, sugiriendo una potencial liga con un gen relacionado con la trombopoiesis o coagulación. Los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron que para los lobos marinos que vararon a causa de infección por parásitos la heterocigocidad en el microsatélite Hg4.2 fue un factor determinante para los valores de plaquetas, lo que concuerda con lo estudiado anteriormente. Es posible que el microsatélite Hg4.2 pudiera estar asociado con un gen que esté involucrado en la acción que tiene la trombina para la activación de las plaquetas. Sin embargo, haber encontrado una asociación semejante con respecto a otros parámetros sanguíneos sugiere que el gen al cual esté asociado el microsatélite pudiera tener una función más amplia, o que estos parámetros covarían debido al tipo de condición clínica en los que se observó la relación.

9. Conclusiones

Este trabajo aporta información que apoya las teorías planteadas sobre la desventaja de una menor diversidad genética sobre la eficacia biológica.

La endogamia o el nivel de heterocigocidad multilocus influyen sobre los parámetros sanguíneos pero de una manera que depende de la enfermedad que afecta al animal.

El sexo es significativo para explicar algunos parámetros sanguíneos de acuerdo a la condición clínica, esto podría estar implicado por la diferencia hormonal como se ha visto en previos estudios.

El haber encontrado una relación entre heterocigocidad en el microsatélite Hg4.2 y los valores de plaquetas y hemoglobina implica que el microsatélite podría estar ligado a una región genética funcional relevante a la trombopoiesis o coagulación.

El conocimiento sobre las enfermedades a las que están sometidos los mamíferos marinos y su relación con la variabilidad genética individual es importante de tomar en cuenta para poder generar nuevas estrategias de conservación y manejo de animales que están en rehabilitación.

10.Referencias

- Acevedo-Whitehouse K, F Gulland, D Greig y W Amos. (2003a) Inbreeding: Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422:353
- Acevedo-Whitehouse, K., H de la Cueva, FMD Gulland, D Aurióles-Gamboa, F Arellano-Carbajal y F Suarez-Güemes. (2003b). Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *Journal of wildlife diseases*, 39(1), 145–51.
- Acevedo-Whitehouse KA. (2004) Influence of inbreeding on disease susceptibility in natural populations. PhD Thesis. Wolfson College and Department of Zoology. University of Cambridge. 203 pp
- Acevedo-Whitehouse, K., J Vicente, U Höfle, JG Fernández de Mera, W Amos y C Cortázar. (2005) Genetic Resistance to Bovine Tuberculosis in Wild Boars. *Molecular Ecology* 14:3209-17
- Acevedo-Whitehouse K, L Petetti, P Duignan y A Castinel. (2009) Hookworm infection, anaemia and genetic variability of the New Zealand sea lion. *Proceedings of the Royal Society B*. 276: 3523-3529
- Acevedo-Whitehouse K, TR Spraker, E Lyons, SR Melin, F Gulland, RL DeLong y W Amos. (2006). Contrasting effects of heterozygosity on survival and hookworm resistance in California sea lion pups. *Molecular Ecology*. 15: 1973–1982
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 287–96.

- Ahamed J, HH Versteeg, M Kerver, VM. Chen, BM Mueller, PJ Hogg y W Ruf. (2006) Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. University of New South Wales, Australia. 103 (38) 13932-13937.
- Allen SG, J Mortenson y S Webb. (2011) Field Guide to Marine Mammals of the Pacific Coast, Baja, California, Oregon, Washington, British Columbia. California Natural History Guides University of California Press. 403-412pp
- Amos W, J Worthington Wilmer, K Fullard, TM Burg, JP Croxall, D Bloch y T Coulson. (2001) The Influence of Parental Relatedness on Reproductive Success. *Proc. Royal Society of London B.* 268:2021-2027.
- Anas AA, WJ Wiersinga, AF de Vos, y T van der Poll. (2010). Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *The Netherlands journal of medicine*, 68(4), 147–52.
- Anderson C., M Brzezinski, L Washburn, y R Kudela. (2006). Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Marine Ecology Progress Series*, 327, 119–133.
- Aurioles D y F Trillmich. (2008) *Zalophus californianus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 June 2012.
- Balloux F, W Amos, y T Coulson. (2004). Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Molecular ecology*, 13(10)
- Bates SS, DL Garrison y RA Horner. (1998) Bloom Dynamics and Physiology of Domoic-Acid-Producing *Pseudo-nitzschia* Species. Editores Anderson DM, AD Cembella y

- GM Hallegraeff En *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp267-292.
- Bates SS. (2000) Domoic-Acid-Producing Diatoms: Another Genus Added!. *Journal of Phycology*. 36(6):978-983.
- Beron-Vera B, EA Crespo, JA Raga y SN Pedraza. (2004) *Uncinaria hamiltoni* (Nematoda: Ancylostomatidae) in South American sea lions, *Otaria flavescens*, from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology*. 90: 860-863
- Bossart GD, TH Reidarson, LA Dierauf y DA Duffield. (2001) Clinical Pathology en Dierauf LA y FMD Gulland (2001) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Segunda Edicion. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC.Pp 383-430.
- Boyd AR, P Shivshankar, S Jiang, MT Berton y CJ Orihuela. (2013) Age-Related Defects in TLR2 Signaling Diminish the Cytokine Response by Alveolar Macrophages During Murine Pneumococcal Pneumonia. *Exp Genetrol*. 47(7):507-518
- Buckles EL, LJ Lowenstine, C Funke, RK Vittore, HN Wong, JA St Leger, DJ Greig, RS Duerr, FMD Gulland y JL Stott. (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.
- Buckles, EL, LJ Lowenstine, RL DeLong, SR Melin, RK Vittore, HN Wong y JL Stott. (2007). Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. *Veterinary microbiology*, 120(1-2)

- Castinel A, PJ Duignan, EW Pomroy, ET Lyons, SA Nadler, MD Dailey, IS Wilkinson y BL Chilvers (2005). First report and characterization of adult *Uncinaria* spp. in New Zealand Sea Lion (*Phocarctos hookeri*) pups from the Auckland Islands, New Zealand. *Parasitol Research*. 98: 304-309
- Castinel A, PJ Duignan, EW Pomroy, N López-Villalobos, NJ Gibbs, BL Chilvers y IS Wilkinson. (2007a) Neonatal mortality in New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*) at Sandy Bay, Enderby Island, Auckland Islands from 1998 to 2005. *Journal of Wildlife Diseases*. 43(3) 461-474
- Castinel A, PJ Duignan, ET Lyons, WE Pomroy, N Gibbs, N López-Villalobos, BL Chilvers y IS Wilkinson. (2007b). Epidemiology of hookworm (*Uncinaria* spp.) infection in New Zealand (Hooker's) sea lion (*Phocarctos hookeri*) pups on Enderby Island, Auckland Islands (New Zealand) during the breeding seasons from 1999/2000 to 2004/2005. *Parasitol Research*. 101: 53-62
- Castinello J, M Gomendio y ERS Roldan. (2001) Relationship Between Coefficient of Inbreeding and Parasite Burden in Endangered Gazelles. *Conservation Biology*. 15(4):1171-1174
- Chapman JR, S Nakagawa, DW Coltman, J Slates y BC Sheldon. (2009) A Quantitative Review of Heterozygosity-Fitness Correlations in Animal Populations. *Molecular Ecology* 18:2746-2765.
- Chapel H, M Haeney, S Misbah y N Snowden. (1999) Essentials of Clinical Immunology. Basic Components: Structure and Function. Blackwell Science 1-29. Pp 363.
- Charlesworth D y JH Willis. (2009) The Genetics of Inbreeding Depression. *Nature Reviews/Genetics* 10:783-796

- Colagross-Schouten AM, JAK Mazet, FMD Gulland, MA Miller y S Hietala. (2002) Diagnosis and Seroprevalence of Leptospirosis in California Sea Lions From Coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*. 38(1): 7-17
- Colegrove KM, FMD Gulland, K Harr, DK Naydan y LJ Lowenstine. (2009). Pathological Features of Amyloidosis in Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) *Journal of Comparative Pathology*. 140(2-3): 105-112.
- Coltman DW, JG Pilkington, JA Smith y JM Pemperton. (1999). Parasite-Mediated Selection Against Inbreed Soay Sheep in a Free-Living, Island Population. *Evolution*. 53(4):1259-1267.
- Coulson TN, JM Pemberton, SD Albon, M Beaumont, TC Marshall, J Slate, FE Guinness y TH Clutton-Brock. (1998). Microsatellites Reveal Heterosis in Red Deer. *Biological Sciences, The Royal Society*. 265(1395):489-495.
- Cüce G. y TM Aktan, en Moschandreu TE. (2012) Blood Cell-An Overview of Studies in Hematology. InTech Croatia pp360
- David P, B Delay, P Berthou y P Jarne. (1995) Alternative Models for Autozygote-Associated Heterosis in the Marine Bivalve. *Genetics Society of America*. 139:1719-1726
- Da Silva A, JM Gaillard, NG Yoccoz, AJM Hewison, M Galan, T Coulson, D Allainé, L Vial, D Delorme, G Van Laere, F Klein y G Luikart. (2008) Heterozygosity-Fitness Correlations Revealed by Neutral and Candidate Gene Markers in Roe Deer From a Long-Term Study. *Evolution* 63(2):403-417

- De Souza Brito F y P Tricoci (2013) Novel Anti-platelet Agents: Focus on Thrombin Receptor Antagonists. *Journal Cardiovascular Translational Research*. 6(3):415-424
- Dierauf LA y FMD Gulland. (2001) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Segunda Edición. CRC Press. Boca Raton, New York, Washington D.C. pp 1063.
- Esmon ChT. (2004). Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. University Of Oklahoma. 25(10).
- Falconer D. (1989). Introduction to Quantitative Genetics, Longman: New York. Mencionado en Slate J, P David, KG Dodds, BA Veenvliet, BC Glass, TE Broad y JC McEwan (2004). Understanding the Relationship Between the Inbreeding Coefficient and Multilocus Heterozygosity: Theoretical Expectations and Empirical Data. *Heredity* 93:255-265.
- Fleischman RW y RA Squire. (1970) Verminous Pneumonia in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*). *Veterinary Pathology*. 7(2):89-101
- Gerber JD, AE Marron, EP Bass y WH Beckenhauer. (1977) Effect of Age and Pregnancy on the Antibody and Cell-Mediated Immune Responses of Horses to Equine Herpesvirus 1. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 41(4):471-478
- Godines CR, B Zelaya de Romillo, D Auriolles-Gamboa, A Vedugo-Rodriguez, EA Rodriguez-Reyes y A De la Peña-Moctezuma. (1999). Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups from Gulf of California. *Journal of Wildlife Diseases*. 35(1): 108–111.
- Goldsby RA, BA Osborne y TJ Kindt. (2007) INMUNOLOGÍA de Kuby. Editor J de León Fraga. Sexta Edición. McGraw-Hill Interamericana. Impreso en México. Pp697

- Golstein DB, A Ruiz, LL Cavalli-Sforza y MW Feldman. (1995) An Evaluation of Genetic Distances for Use With Microsatellite Loci. *Genetics Society of America*. 139:436-471
- Goldstein T, JAK Mazet, TS Zabka, G Langlois, KM Colegrove, M Silver, S Bargu, F Van Dolah, T Leighfield, PA Conrad, J Barakos, DC Williams, S Dennison, M Haulena y FMD Gulland. (2008) Novel Symptomatology and Changing Epidemiology of Domoic Acid Toxicosis in California Sea Lions (*Zalophus californianus*): An Increasing Risk to Marine Mammal Health. *Proceedings of the Royal Society B*. 275:267-276.
- Golstein T, TS Zabka, RL Delong, EA Wheeler, G Yitalo, S Baru y FMD Gulland. (2009) The Role of Domoic Acid in Abortion and Premature Parturition of California Sea Lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California. *Journal of Wildlife diseases*. 45(1):91-108
- Greig DJ, FMD Gulland y C Kreuder. (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):11-22.
- Gulland FMD, M Koski, LJ Lowenstine, A Colagross, L Morgan y T Spraker.(1996a) Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981–1994. *Journal of Wildlife Diseases* 32, 572–590
- Gulland FM, JG Trupkiewicz, TR Spraker y LJ Lowestine (1996b) Metastatic Carcinoma of Probable Transitional Cell Origin in 66 Free-Living California Sea Lions (*Zalophus californianus*), 1979-1994. *Journal Wild Infectious Diseases*. 32:250-258

- Gulland FMD (2000). Domoic Acid Toxicity in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) Stranded Along the Central California. Report to the National Marine Fisheries Service Working Group on Unusal Marine Mammal Mortality Events. (December)
- Harrison L. M., A. Nerlinger, R. D. Bungiro, J. L. Córdoba, P. Kuzmic y M. Cappello. (2002) Molecular Characterization of *Ancylostoma* Inhibitors of Coagulation Factor Xa: Hookworm anticoagulant activity *in vitro* predicts parasite bloodfeeding *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(8):6223-6229
- Hartl DL y AG Clark (1989) Principles of Population Genetics. (2nd Edition) SINAUER ASSOCIATES, INC. PUBLISHERS. Sunderland, Massachusets. Pp 682
- Higgins Robert. (2000) Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Canadian Veterinary Journal*. 41:105–16.
- Hochberg Y. (1988) A Sharper Bonferroni Procedure for Multiple Test of Significance. *Biometrika*. 75(4):800-802.
- Hotez PJ, S Brooker, JM Bethony, ME Bottazi, A Loukas y S Xiao. (2004) Hookworm infection. Department of Microbiology and Tropical Medicine, George Washington University, Washington, D.C.
- Huang Y y J Hsu. (2007) Hochberg's Step-Up Method: Cutting Corners off Holm's Step-Down Method. *Biometrika*. 94(4):965-975.
- Hughes JL, KB Beckmen, y KA Burek. (2004) Examination of hookworm burdens in Steller sea lion, *Eumetopias jubatus*, pups at three rookeries in Southeast Alaska: fecal egg counts and haematology. In Predator prey 2004 -joint conference and

annual meeting (ed. N. W. s. a. A. c. o. t. W. Society). Girwood, Alaska: Wildlife Society.

Ionita M, MG Varela, ET Lyons, TR Spraker y SC Tolliver. (2008). Hookworms (*Uncinaria lucasi*) and acanthocephalans (*Corynosoma* spp and *Bolbosoma* spp) found in dead northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island Alaska in 2007. *Parasitol Res.* 103(5):1025-1029

Johnson S, L Lowenstine, FMD Gulland, S Jang, D Imai, F Almy, R DeLong y I Gardner. (2006). Aerobic Bacterial Flora of the Vagina and Prepuce of California Sea Lions (*Zalophus californianus*) and Investigation of Associations With Urogenital Carcinoma. *Veterinary Microbiology.* 114(1-2):94-103

Karp Gerald. (2010). Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. Sexta Edición. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de Norte America. 765 pp

Keller LF y DM Waller. (2002) Inbreeding Effects in Wild Populations. *Trends in Ecology & Evolution.* 17(5):230-241

Kerr MG. (2002) VETERINARY LABORATORY MEDICINE, Clinical Biochemistry and Hematology. Segunda Edición. Blackwell Science. Pp 368

King DP, BM Aldridge, S Kennedy-Stodkopf y JL Stott (2001). Immunology. Dierauf LA y FMD Gulland (Editores). CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. CRC Press Boca Raton, London, New York, Washington, DC. Pp 237-348.

- King DP, MC Hure, T Goldstein, BM Aldridge, FMD Gulland, JT Lowenstine y JL Stott. (2002) Otarine Herpesvirus-1: A Novel Gammaherpesvirus Associated with Urogenital Carcinoma in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) *Veterinary Microbiology*. 86:131137
- Kita Hirohito. (2011). Eosinophils: Multifaceted Biological Properties and Roles in Health and Disease. *Immunological Reviews*. 242: 161:177
- Koski M, LJ Lowenstine, FMD Gulland, A Colagross y L Morgan. (1996) Leptospirosis in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) Stranded Along the Central California Coast, 1981-1994. *Journal of Wildlife Diseases*. 32(4):572-580
- Kovats S. (2012) Estrogen Receptors Regulate an Inflammatory Pathway of Dendritic Cell Differentiation: Mechanisms and Implications for Immunity. *Hormonal Behaviour*. 62(3):254-562
- Leberg, P. L., & Firmin, B. D. (2008). Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular ecology*, 17(1), 334–43.
- Lingappa J, T Kuffner, J Tappero, W Whitworth, A Mize, R Kaiser y J McNicholl. (2004) HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene–environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. *Genes and Immunity*. 5: 197-202.
- Lie HC, LW Simmons y G Rhodes. (2009) Does Genetic Diversity Predict Health in Humans? *PLoS ONE* 4(7):e6391.

- Loukas A, SL Constant y JM Bethony. (2005) Immunobiology of Hookworm Infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 43: 115-124
- Loukas A y P Prociv. (2001) Immune Responses in Hookworm Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (4) 689-703
- Lyons ET (1963) Biology of the Hookworm *Uncinaria lucasi* Stiles, 1901, in the Northern Fur Seals, *Callorhinus ursinus* Linn., on the Pribilof Islands, Alaska, vol. PhD dissertation Fort Collins, CO: Colorado State University. 196pp.
- Lyons ET, RL DeLong, SR Melin y SC Tolliver. (1997). Uncinariasis in Northern Fur Seal and California Sea Lion Pups from California. *Journal of Wildlife Diseases*. 33(4): 848-852.
- Lyons ET, SR Melin, RL DeLong, AJ Orr, FM Gulland y SC Tolliver. (2001) Current Prevalence of Adult *Uncinaria* spp. in Northern Fur Seal (*Callorhinus ursinus*) and California Sea Lion (*Zalophus californianus*) Pups on San Miguel Island, California, with Notes on the Biology of These Hookworms. *Veterinary Parasitology*. 97: 309-318.
- Lyons E. T. y R. L. DeLong. (2005). Photomicrographic Images of Some Features of *Uncinaria* spp (Nematoda: Ancylostomatidae) From Otariid Pinnipeds. *Springer-Verlag*. 95:346-352
- Lyons ET, RL DeLong, TR Spraker, SR Melin, JL Laake y SC Tolliver. (2005) Seasonal Prevalence and Intensity of Hookworms (*Uncinaria* spp.) in California Sea Lion (*Zalophus californianus*) Pups Born in 2002 on San Miguel Island, California. *Parasitology Research*. 96: 127-132

- Lyons EJ, W Amos, JA Berkley, I Mwangi, M Shafi, TN Williams, CR Newton, N Peshu, K March, JAG Scott y AVS Hill. (2009). Homozygosity and Risk of Childhood Death Due to Invasive Bacterial Disease. *BMC Medical Genetics*. 10(55)
- Lyons ET, RL De Long, SA Nadler, JL Laake, AJ Orr, BL DeLong y C Pagan. (2011) Investigations of Peritoneal and Intestinal Infections of Adult Hookworms (*Uncinaria* spp.) in Northern Fur Seal (*Callorhinus ursinus*) and California Sea Lion (*Zalophus californianus*) Pups on San Miguel Island, California (2003). *Parasitology Research*. 109(3):581-589.
- MacDougall-Shackleton EA, EP Derryberry, J Foufopoulos, AP Dobson y TP Hahn. (2005) Parasite-Mediated Heterozygote Advantage in an Outbred Songbird Population. *Biology Letters*. 1:105-107.
- Mackereth G. F., K. M. Webb, J. S. O’Keefe, P.J. Duignan y R. Kittelberger. (2005) Serological Survey of Pre-Weaned New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) for Brucellosis and Leptospirosis. *New Zealand Veterinary Journal*. 53(6), 428-432
- Mancia A, JC Ryan, RW Chaoman, Q Wu, GW Warr, FMD Gulland y FM Van Dolah. (2012) Health status, Infection and Disease in California sea lions (*Zalophus californianus*) Studied Using a Canine Microarray Platform and Machine-Learning Approaches. *Developmental and Comparative Immunology*. 36 (2012) 629–637.
- Meites E, MT Jay, S Deresinski, W-J Shieh, SR Zaki, L Tompkins y DS Smith. (2004). Reemerging leptospirosis, California. *Emerging Infectious Diseases*. 10(3):406-412
- Melin SR. (2002) The Foraging Ecology and Reproduction of the California Sea Lion (*Zalophus californianus californianus*). University of Minnesota.

- Miasnikova GY, AI Sergueeva, M Nouraie, X Niu, DJ Okhotin, LA Polyakova, T Ganz, JT Prchal y VR Gordeuk. (2011) The Heterozygote Advantage of the Chuvash Polycythemia VHL^{R200W} Mutation May Be Protection Against Anemia. *Haematologica*. 96(9):1371-1374.
- Miller DL, RY Ewing y GD Bossart. (2001) Emerging and Resurging Diseases en Dierauf LA y FMD Gulland (Editores). CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. CRC Press Boca Raton, London, New York, Washington, DC. Pp 237-348.
- Morales GA y CF Helmboldt. (1971) Verminous Pneumonia in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 7:22-27
- Montie EW, E Wheeler, N Pussini, TWK Battey, W VanBonn y FMD Gulland. (2012) Magnetic Resonance Imaging Reveals That Brain Atrophy is More Severe in Older California Sea Lions With Domoic Acid Toxicosis. *Harmful Algae*. 20:19-29
- Moore E, S Lyday, J Roletto, K Litle, JK Parrish, H Nevins, J Harvey, J Mortenson, D Greig, M Piazza, A Hermance, D Lee, D Adams, S Allen y S Kell. (2009) Entanglements of Marine Mammals and Seabirds in Central California and the North-West Coast of the United States 2001-2005. *Marine Pollution Bulletin*. 58(7):1045-1051.
- NOAA/ National Weather Service. Climate Prediction Center Internet Team. Description of Changes to Oceanic Niño Index (ONI). <www.nws.noaa.gov> Page last modified: February 7, 2013.
- O'Hara TM y TJ O'Shea. (2001) Toxicology en Dierauf LA y FMD Gulland (2001) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Segunda Edicion. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC.

- Pemberton JM. (2008) Wild Pedigrees: The Way Forward. *Proceedings of the Royal Society*. 275:613-621.
- Penaloza C, B Estevez, S Orlanski, M Sikorska, R Walker, C Smith, B Smith, RA Lockshin y Z Zakeri. (2009) Sex of the Cell Dictates its Response: Differential Gene Expression and Sensitivity to Cell Death Inducing Stress in Male and Female Cells. *FASEB Journal*. 23(6):1869-1879.
- Pennell LM, CL Galligan y EN Fish. (2012) Sex Affects Immunity. *Journal of Autoimmunity*. 38(2-3):282-291.
- Pullan RL, JM Bethony, SM Geiger, R Correa-Oliveira, S Brooker y RJ Quinnell. (2009) Human Helminth Co-Infection: No evidence of Common Genetic Control of Hookworm and Schistosoma Mansonii Infection Intensity in a Brazilian Community. *International Journal of Parasitology*
- Pocock G. y Richards C. D. (1999) Human Physiology *The Basis of Medicine*. OXFORD University Press. Great Britain
- Ramsey JM, E Schwarz, PC Guest, NJM Van Beveren, FM Leweke, M Rothermundt, B Bogerts, J Steiner, L Ruta, S Baron-Cohen y S Bahn. (2012) Molecular Sex Differences in Human Serum. *PloS One*. 7(12):1-11
- Riedman M. (1990) The Pinnipeds: Seals, Sea Lions, and Walruses. University of California Press. Berkeley/ Los Angeles. London. 439 pp.
- Rijks JM, JI Hoffman, T Kuiken, ADME Osterhaus y W Amos. (2008) Heterozygosity and Lungworm Burden in Harbour Seals (*Phoca vitulina*). *Nature, Heredity*. 100:587-593.

- Rudan I, D Rudan, H Campbell, A Carothers, A Wright, N Smolej-Narancic, B Janicijevic, L Jin, R Chakraborty, R Deka y P Rudan. (2003) Inbreeding and Risk of Late Onset Complex Disease. *J Med Genet.* 40:925-932.
- Ruiz AGJ. (2001) Fundamentos de Hematología. Editorial Médica Panamericana. México D.F. 3^{era} Edición. Capítulo 1
- Ross-Gillespie A, MJ O’Riain y LF Keller. (2007) Viral Epizootic Reveals Inbreeding Depression in a Habitually Inbreeding Mammal. *Evolution.* 61(9):2268-2273.
- Saraví D. Fernando. (2007) hemopoyesis. Universidad Nacional de Cuyo Facultad de Ciencias Médicas. *ETAS Hemodinámica.* Capítulo 10
- Scholin CA, F Gulland, GJ Doucette, S Benson, M Busman, FP Chavez, J Cordaro, R DeLong, A De Vogelaere, J Harvey, M Haulena, K Lefebvre, T Lipscomb, S Loscutoff, LJ Lowenstine, R Marin, III, PE Miller, WA McLellan, PD Moeller, CL Powell, T Rowles, P Silvagni, M Silver, T Spraker, V Trainer y FM Van Dolah. (2002) Mortality of sea Lions Along the Central California Coast Linked to a Toxic Diatom Bloom. *Nature.* 403: 80-84.
- Searcy GP. (1995) Hemopoietic System en Carlton WW y MD Mc Gavin (Editores) Thomson’s Special Veterinary Pathology. Mosby. Second Edition
- SEDP (2001) California Sea Lions. Sea World Education Department Publication. California, USA. 17 pp.
- Shaya EI, JM McLean y ACC Gibbs. (1981) Accumulation and Proliferation of Lymphocytes in the Lymph Nodes of the Female Rat Following First Mating. *Journal of Anatomy.* 132(1):137-143

- Silvagni, P. a, Lowenstine, L. J., Spraker, T., Lipscomb, T. P., & Gulland, F. M. D. (2005). Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary pathology*, 42(2), 184–91.
- Slate J, P David, KG Dodds, BA Veenvliet, BC Glass, TE Broad y JC McEwan. (2004) Understanding the Relationship Between the Inbreeding Coefficient and Multilocus Heterozygosity: Theoretical Expectations and Empirical Data. *Heredity*. 93(3):255-265.
- Spielman D, BW Brook, DA Briscoe y R Frankham. (2004) Does Inbreeding and Loss of Genetic Diversity Decrease Disease Resistance?. *Conservation Genetics*. 5(4):439-448.
- Spraker TR, RL DeLong, ET Lyons y SR Melin. (2007) Hookworm Enteritis with Bacteremia in California sea lion on San Miguel Island. *Journal of Wildlife Diseases*. 43 (2) 179-188.
- Streelman JT y TD Kocher. (2002) Microsatellite Variation Associated with Prolactin Expression and Growth of Salt-Challenged Tilapia. *Physiological Genomics*. 9:1-4
- Stanssens P, PW Bergum, Y Gansemans, L Jespers, Y Laroche, S Huang, S Maki, J Messens, M Lauwereys, M Cappello, PJ Hotez, I Lasters, y GP Vlasuk. (1996) Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 2149-2154
- Stiles CW. (1901). Uncinariasis (Anchylostomiasis) in Man and Animals in the United States. *The Texas Medical News*. 10:523-532
- Smith KF, K Acevedo-Whitehouse y AB Pedersen. (2009). The Role of Infectious Diseases in Biological Conservation. *Animal Conservation*. 12: 1-12

- Smith EM, JI Hoffman, LE Green y W Amos. (2012) Preliminary Association of Microsatellite Heterozygosity With Footrot in Domestic Sheep. *Livestock Science*. 143(2-3):293-299
- Snustad DP y MJ Simmons (2011) Principles of GENETICS. Wiley. Sexta Edición. Pp 784
- Suzuki K y TB Tomasi. (1979) Immune Responses During Pregnancy. *Journal of Experimental Medicine*. 150:898-908.
- Thomas, K., Harvey, J. T., Goldstein, T., Barakos, J., & Gulland, F. (2009). Movement, dive behavior, and survival of California sea lions (*Zalophus californianus*) posttreatment for domoic acid toxicosis. *Marine Mammal Science*, 26(1), 36–52.
- Torcia MG, L Nencioni, AM Clemente, L Civitelli, I Celestino, D Limongi, G Fadigati, E Perissi, F Cozzolino, E Garaci y AT Palamara. (2012) Sex Differences in the Response to Viral Infections: TLR8 and TLR9 Ligand Stimulation Induce Higher IL10 Production in Males. *PloS One*. 7(6):1-8
- Torres de la Riva G, CK Johnson, FMD Gulland, GW Langlois, JE Heyning, TK Rowles y JAK Mazet.(2009) Association of an Unusual Marine Mammal Mortality Event With *Pseudo-Nitzschia* spp. Blooms Along the Southern California Coastline. *Journal of Wildlife Diseases*. 54(1):109-121
- Valsecchi E, W Amos, JA Raga, M Podestá y William Shervin. (2004) The Effects of Inbreeding on Mortality During a Morbillivirus Outbreak in the Mediterranean Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Animal Conservation*. 7(2):139-146.
- Vedros, N. a, Smith, a W., Schonewald, J., Migaki, G., & Hubbard, R. C. (1971). Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science (New York, N.Y.)*, 172(3989), 1250–1.

- Virella G y JM Goust (1997) Introduction to Medical Immunology. Editor Virella G. Cuarta Edicion. Marcel Dekker INC. New York, NY United States of America 711pp
- Volokhov DV, T Norris, C Rios, MK Davidson, JB Messick, FM Gulland y VE Chizhikov (2009). Novel Hemotrophic Mycoplasma Identified in Naturally Infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*. 149:262-268.
- Walker D en Cowell RL, RD Tyler, JH Meinkoth y DB DeNicola. (2008) Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. MOSBY El Sevier. Third Edition. 390-410pp
- Wang HJ, RH Zhang, J Cole y F Chavez. (1999) El Niño and the Related Phenomenon Southern Oscillation (ENSO): The Largest Signal in Interannual Climate Variation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96(20):11071-11072
- Wilkinson, Dean M. 1996. National contingency plan for response to unusual marine mammal mortality events. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-OPR-9, 118 p.
- Ylitalo GM, JE Stein, T Hom, LL Johnson, KL Tilbury, AJ Hall, T Rowles, D Greig, LJ Lowenstine, FMD Gulland. (2005) The Role of Organochlorines in Cancer-Associated Mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Pollution Bulletin*. 50:30-39
- Zuerner, RL, CE Cameron, S Raverty, J Robinson, KM Colegrove, S Norman, F Gulland. (2009). Geographical dissemination of *Leptospira interrogans* serovar Pomona

during seasonal migration of California sea lions. *Veterinary microbiology*, 137(1-2), 105–110.

11.Anexo I

En la figura 1 se observa que los valores de eritrocito para A) crías no tiene una variación significativa y que para c) subadultos se obtienen valores irregulares para los años 1998, 2000, 2001, 2002, 2004 y 2005 en donde varios se salen de los parametros regulares.

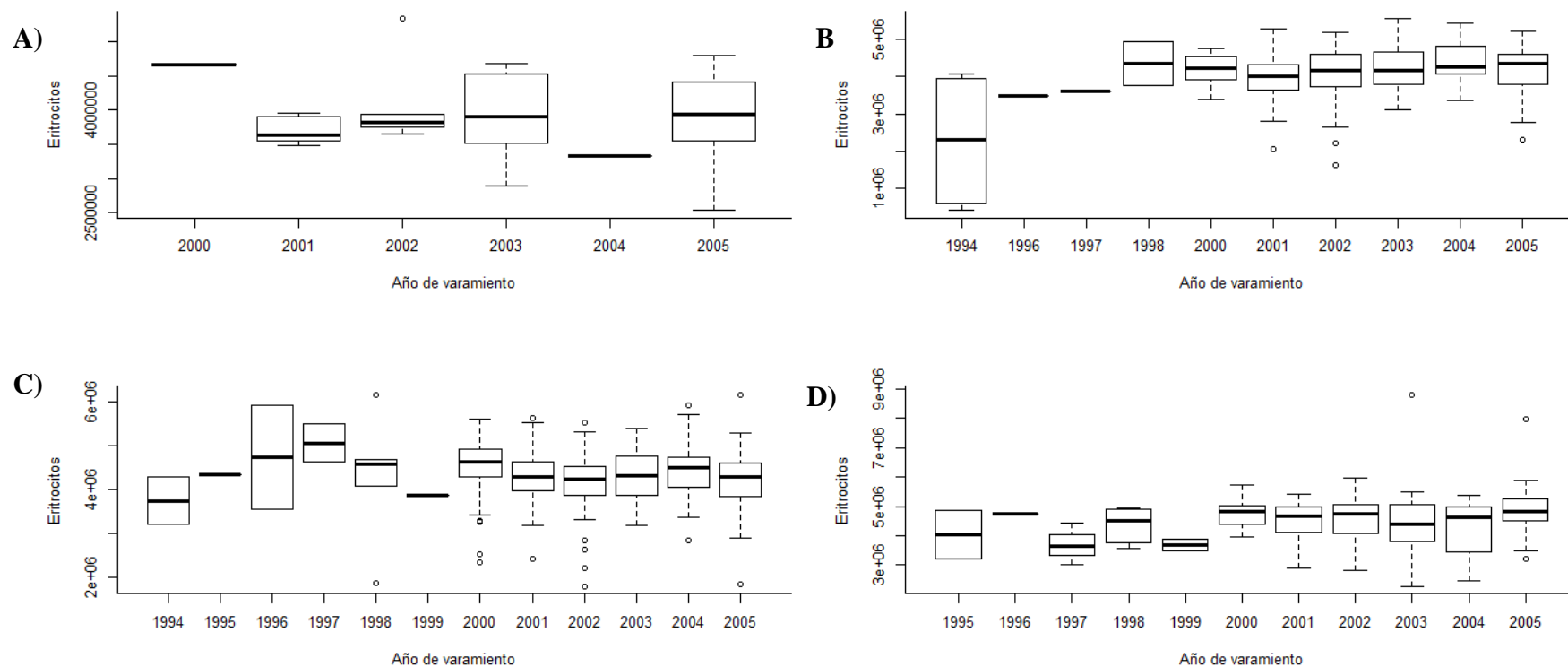


Figura 1. Variación temporal en el promedio de Eritrocitos registrado para A) Crías, B) Añeros, C) Subadultos y D) Adultos en lobo marino de California

Para la variación temporal de hemoglobina (Figura 2) en A) crías se obtienen valores fuera del promedio para el año 2002 y no se obtienen datos para los años de 1994 a 1999, los valores para B) crías, C) subadultos y D) adultos se mantiene dentro del promedio menos para los datos de subadultos que son en donde se encuentra mayor variación

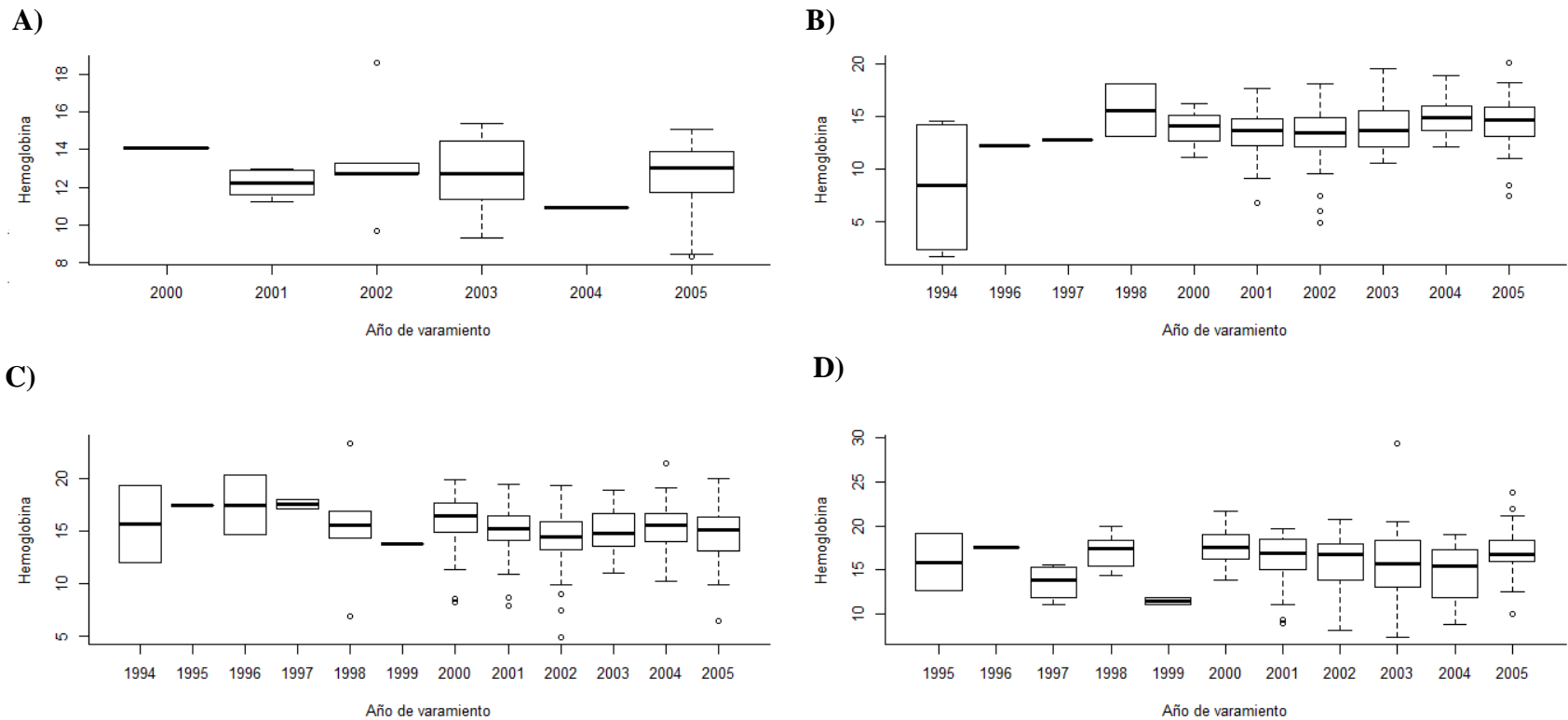


Figura 2. Varación temporal en el promedio de Hemoglobina registrado para A) Crías, B) Añeros, C) Subadultos y D) Adultos en lobo marino de California.

La variación temporal de hematocrito (Figura 3) es muy similar a la variación de hemoglobina lo que podría ser causado por la misma razón.

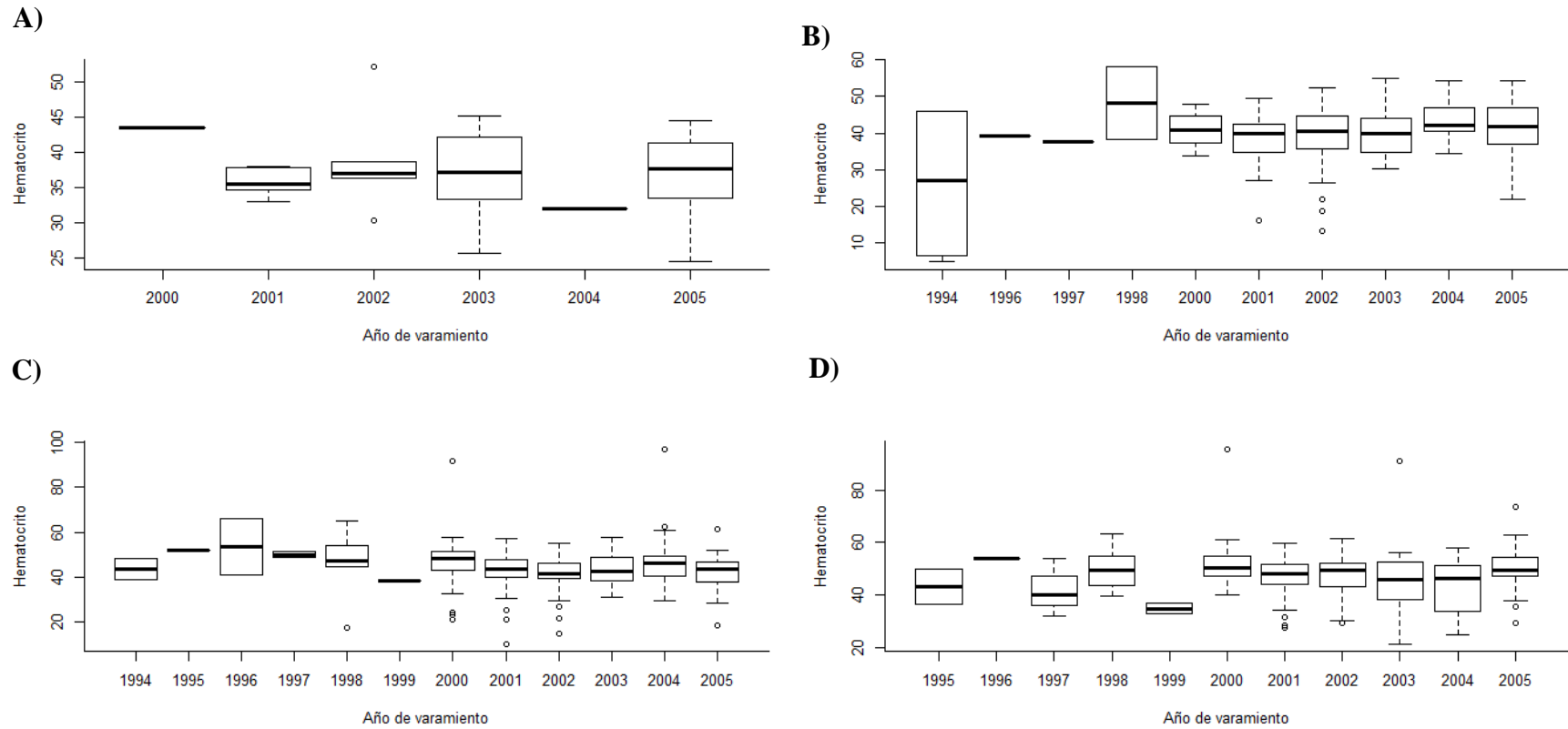


Figura 3. Variación temporal en el promedio de Hematocrito registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos de lobo marino de California.

Las crías obtuvieron los valores mas bajos de VCM (figura 4), para B) añeros se mantienen en el promedio menos uno para el año 2005 que obtiene los valores más altos. Para C) los subadultos los valores de VCM no hay individuos que se salgan del rango y para D) adultos para el año 1997 se obtiene un rango de error más amplio.

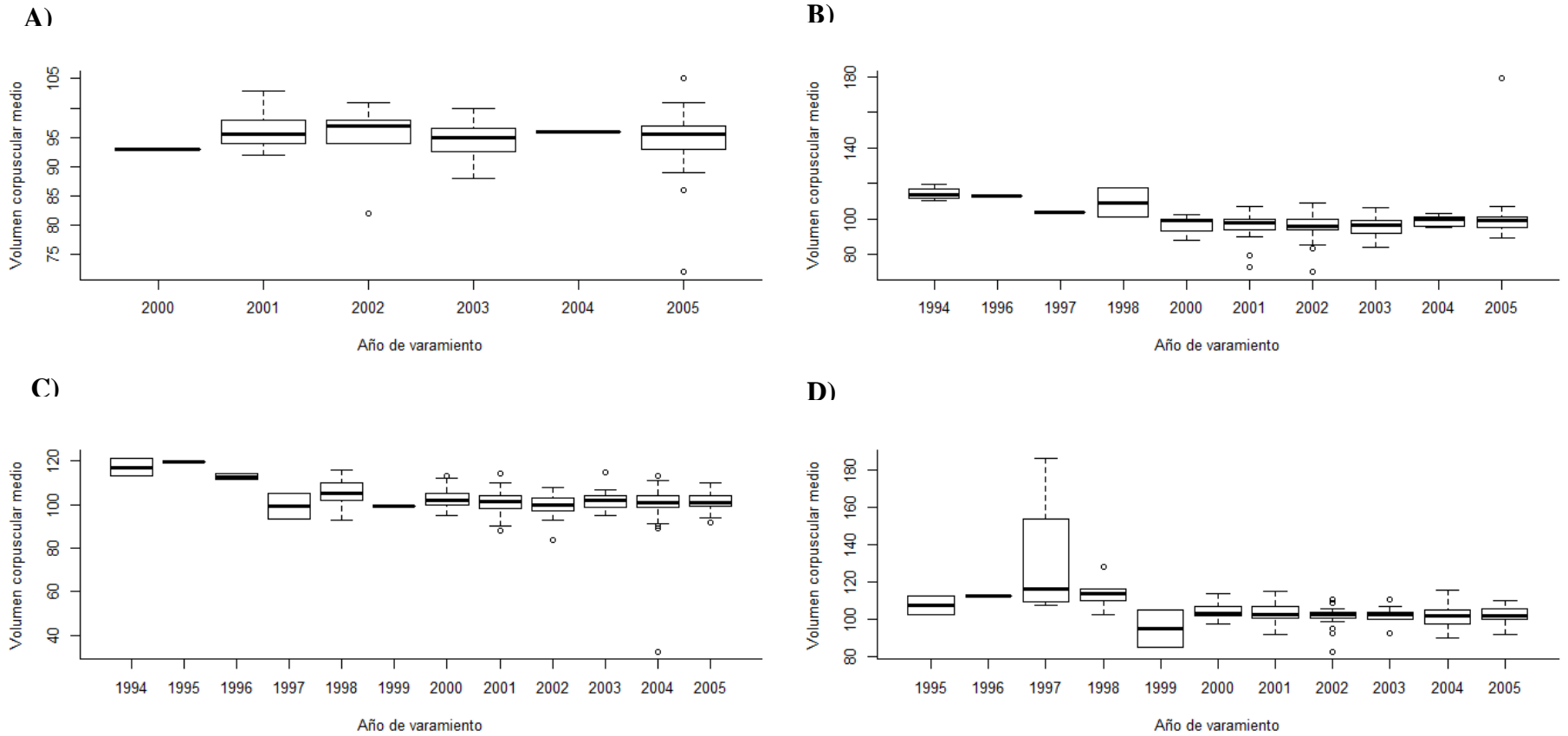
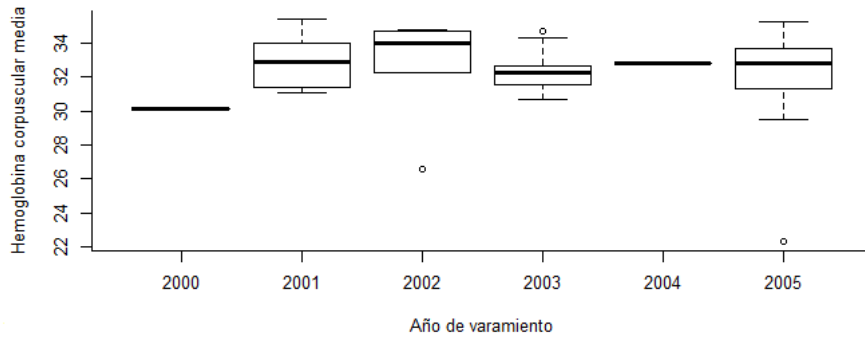


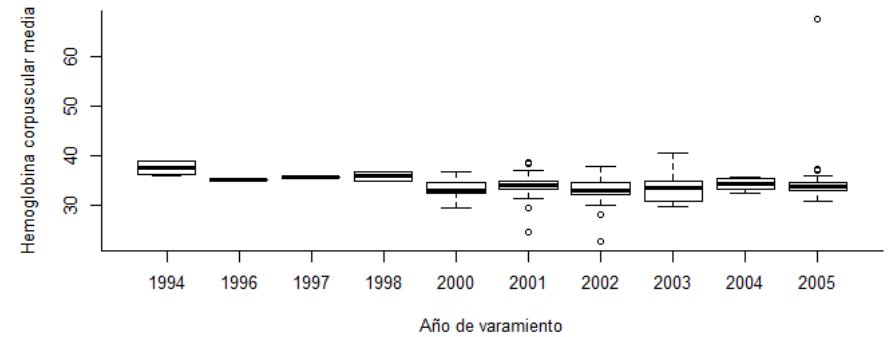
Figura 4. Variación temporal en el promedio de volumen corpuscular medio (VCM) registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos de lobo marino de California.

Para los valores de HCM (figura 5) no existe variación significativa entre cada rango de edad de lobo marino de California a excepción de un rango alto para B) añeros en el año del 2005 y para C) subadultos en el año 2001.

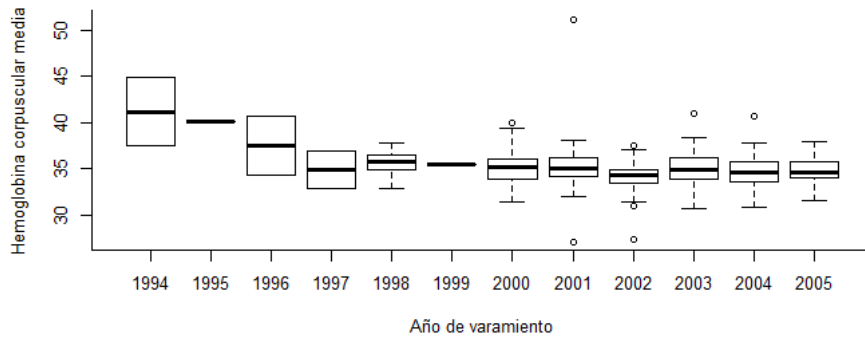
A)



B)



C)



D)

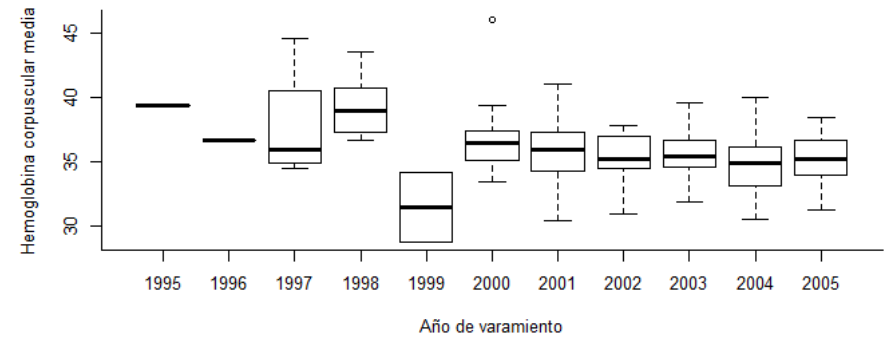


Figura 5. Variación temporal en el promedio de Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos de lobo marino de California.

Para el parámetro sanguíneo de concentración de hemoglobina corpuscular medica (figura 6) se observa en B) añeros una muestra que tiene niveles altos de CHCM en comparación al resto de las muestras.

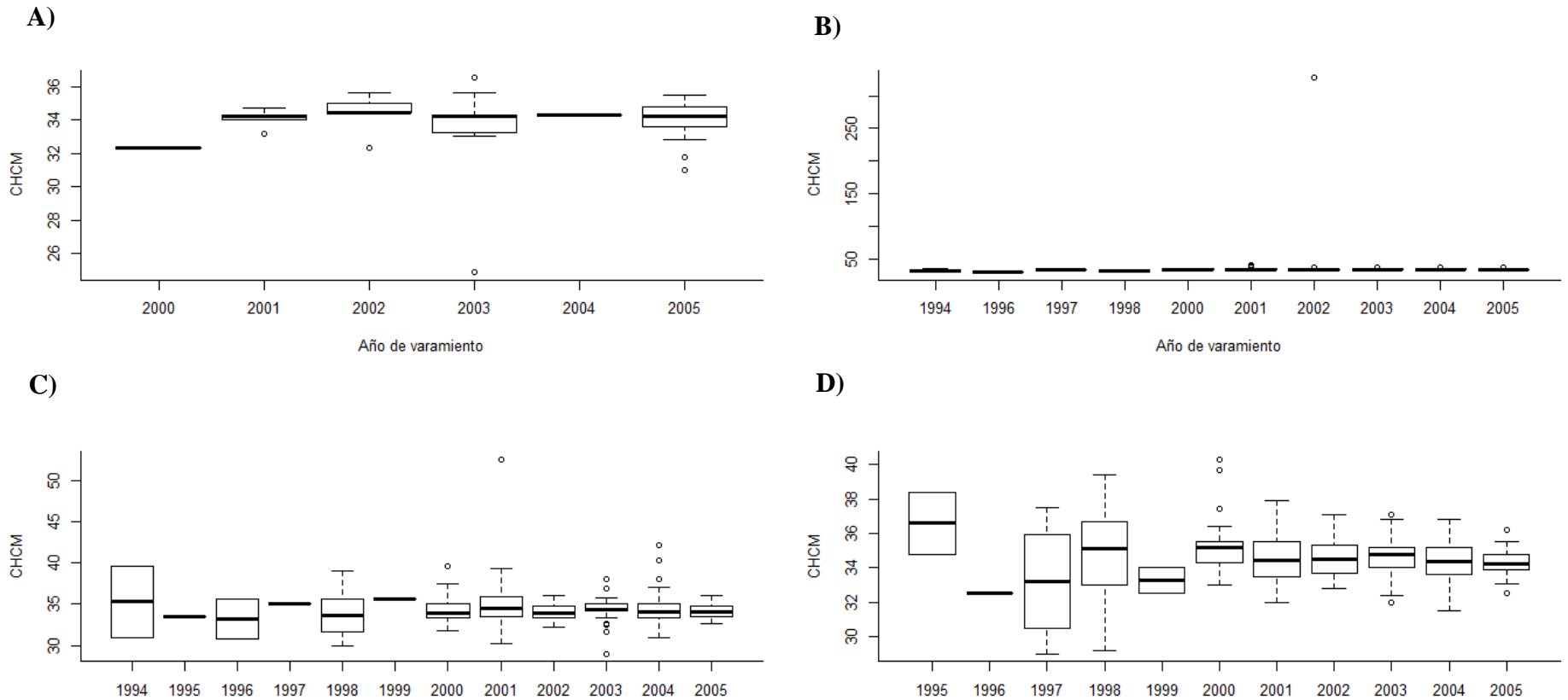


Figura 6. Variación temporal en el promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos de lobo marino de California.

Los valores de plaquetas obtenidos para crías en 2000 y 2004 son solo de un individuo, para años los parámetros durante los diferentes años se observan mas o menos dentro del mismo rango a excepción de los años 2001 y 2003 que se salen un poco. Para subadultos los valores no se encuentran dentro de los mismos parámetros para los años 1995, 1999 y 2000 en donde los valores son altísimos (Figura 7).

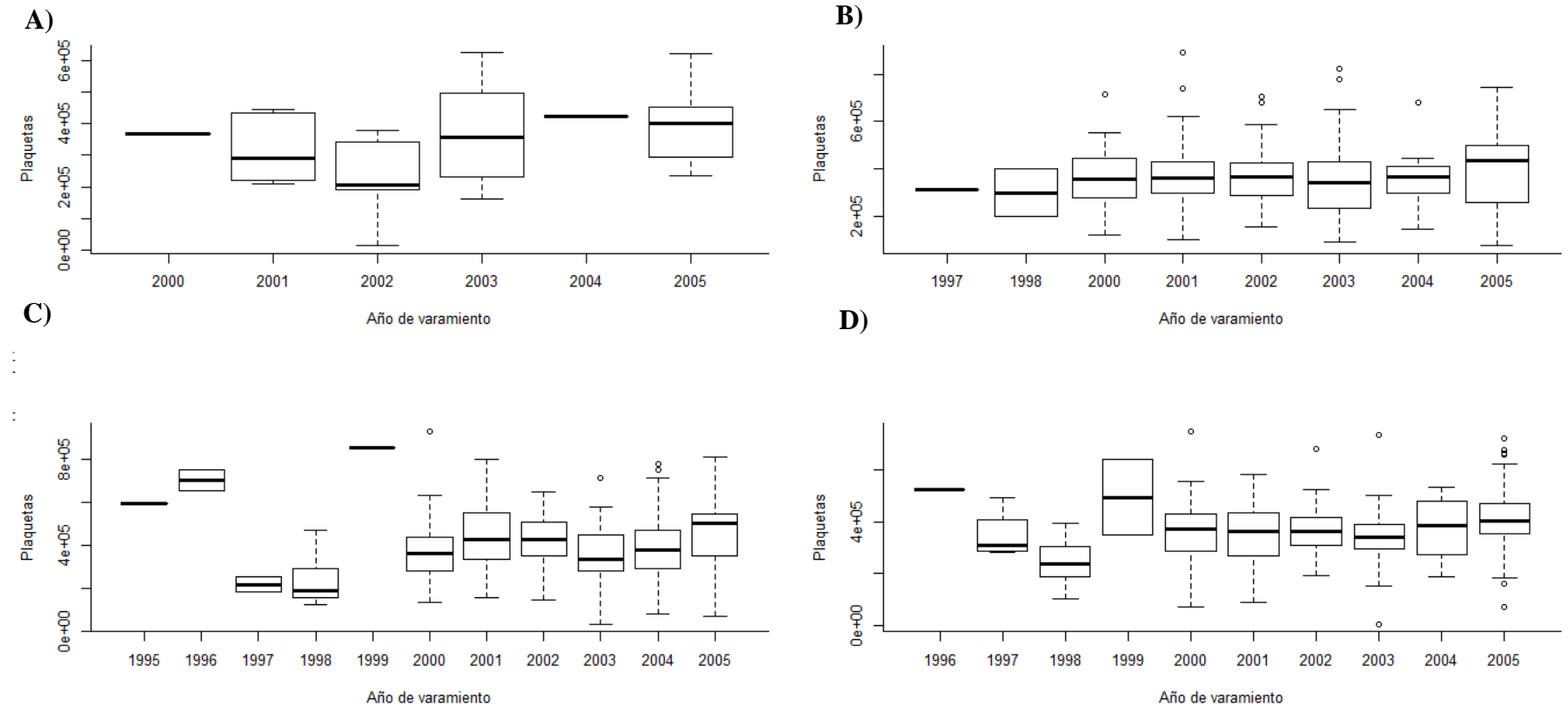


Figura 7 Variación temporal en el promedio de Plaquetas registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos de lobo marino de California.

La figura 8 muestra la variación temporal de leucocitos en las diferentes etapas de desarrollo del lobo marino de California y lo que se observa es que en varios años los rangos de leucocitos se disparan al resto del promedio, que podrían ser explicados por las diferentes enfermedades a las que se encuentran expuestos.

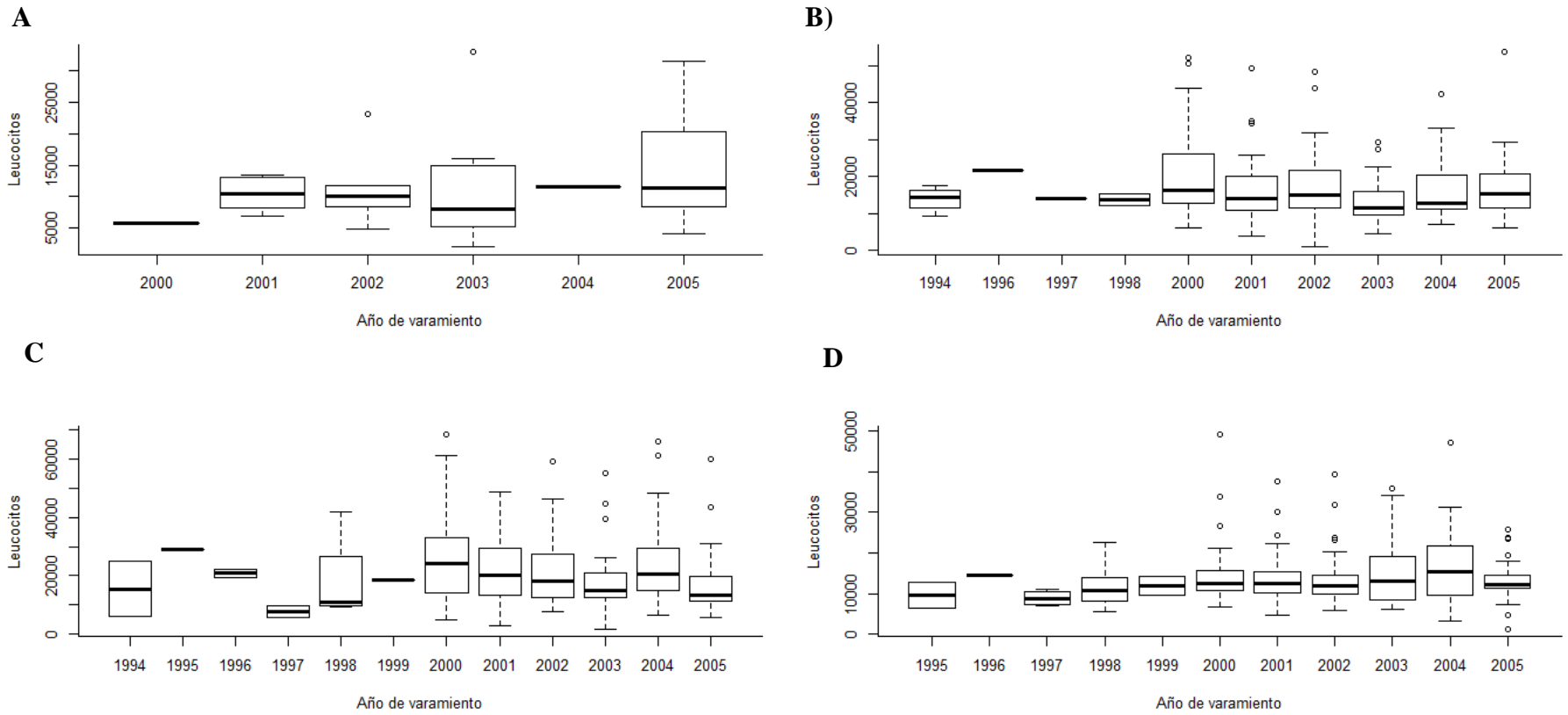


Figura 8. Variación temporal en el promedio de Leucocitos registrado para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos en lobo marino de California.

Los valores de neutrófilos segmentados para crías son muy similares para los seis años a excepción del 2002 y 2003 en donde se disparan, para la categoría de añero se obtuvieron los valores más altos de neutrófilos segmentados y para los adultos se obtuvieron valores bajos en comparación con los añeros y subadultos(figura 9).

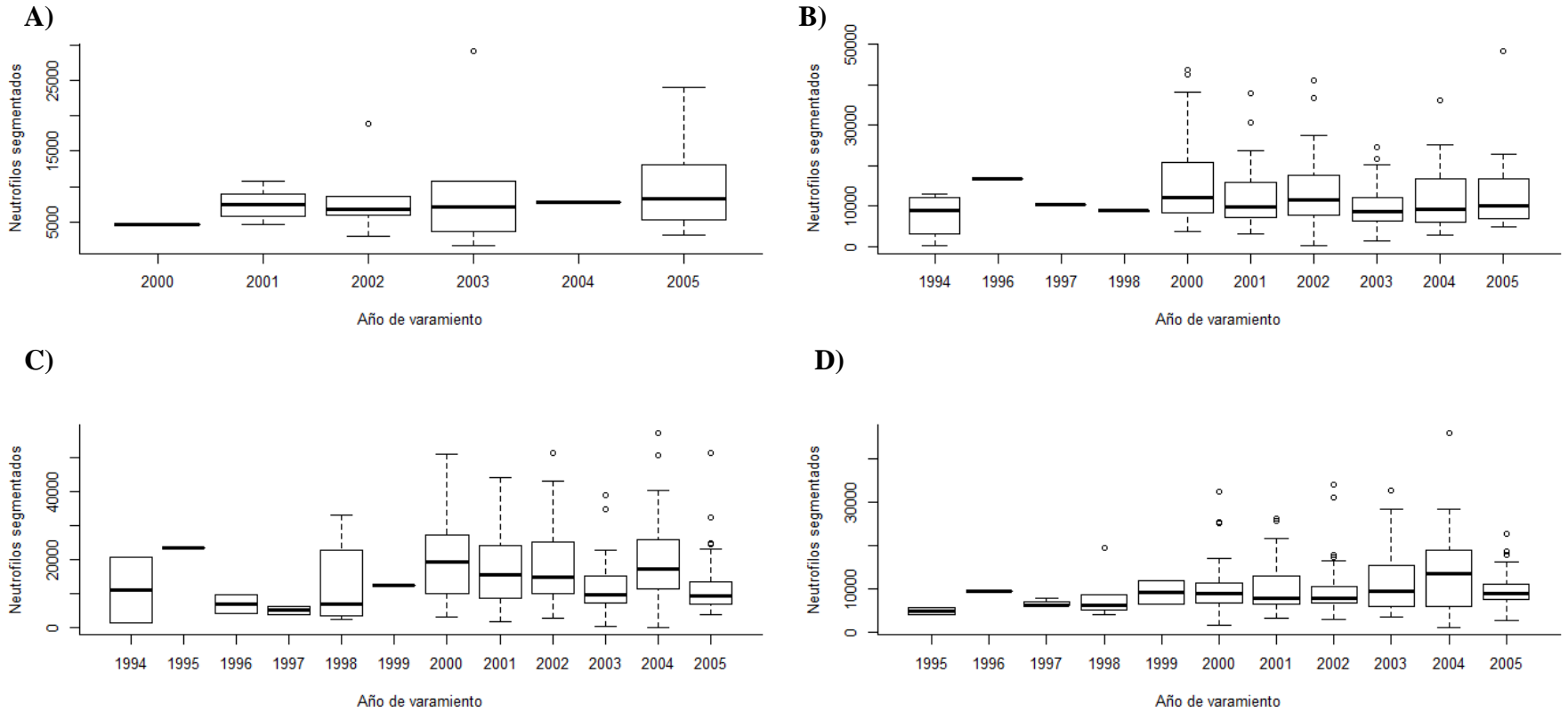


Figura 9. Variación temporal en el promedio de Neutrófilos Segmentados registrados para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos en lobo marino de California.

En la figura 10 para añeros se obtuvo el promedio más bajo de neutrófilos en banda y hubo dos eventos para el año 2003 y 2005 que dispararon los valores de NB, la variación más significativa se obtuvo para los subadultos del 2000 al 2005 y para el caso de los adultos en el 2000 y 2001 se dispararon los valores para dos lobos marinos de California.

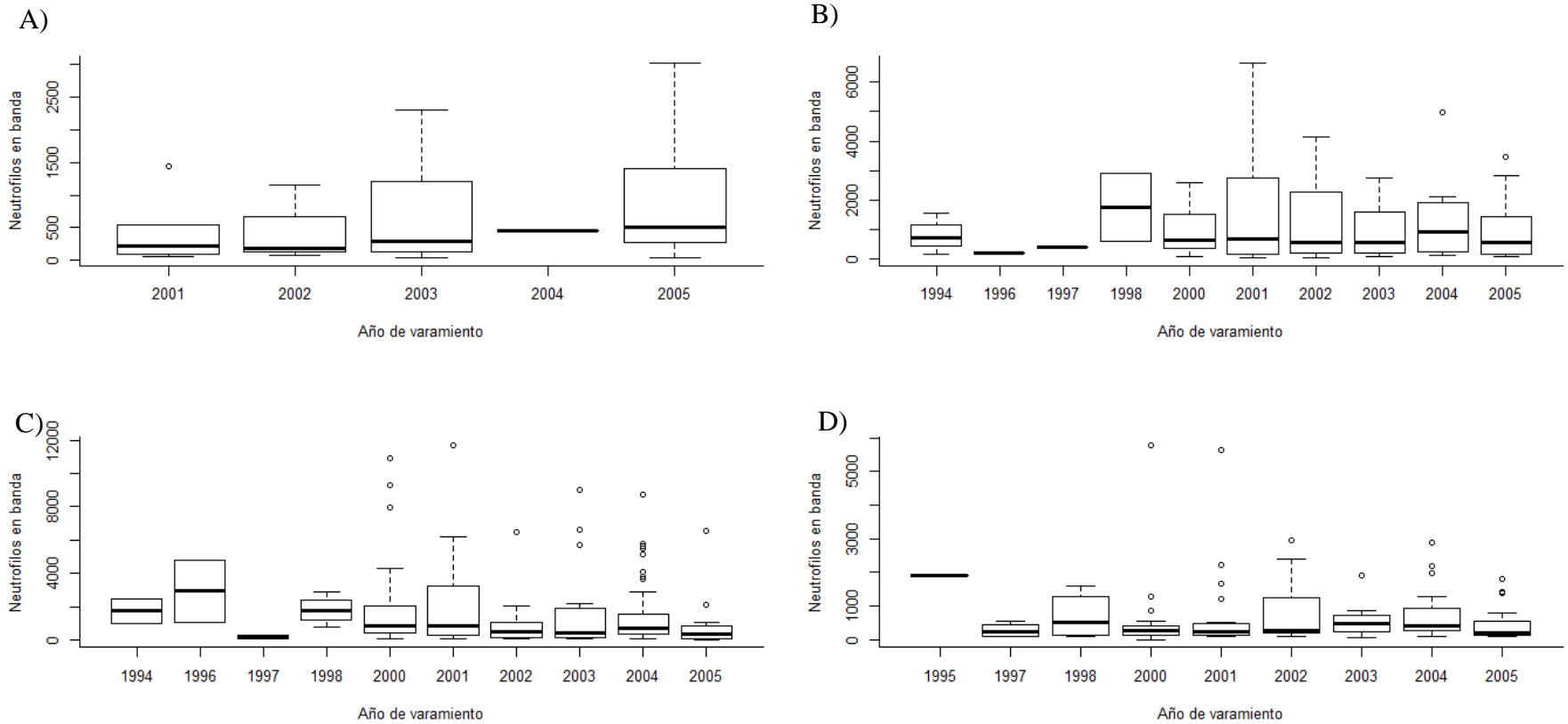


Figura 10 Variación temporal en el promedio de Neutrófilos en Banda registrados para **A)** Crías, **B)** Añeros, **C)** Subadultos y **D)** Adultos en lobo marino de California.

Los valores de linfocitos (Figura 11) en crías se obtuvieron los valores mas bajos y en el caso del año 1994 para los añeros no se obtuvieron valores promedio, si no que el rango de variación es muy alto. En el caso de subadultos en el año 2000 se dispararon dos valores de linfocitos y lo mismo ocurrió para el mismo año con adultos, siendo este el valor más alto de todas las edades.

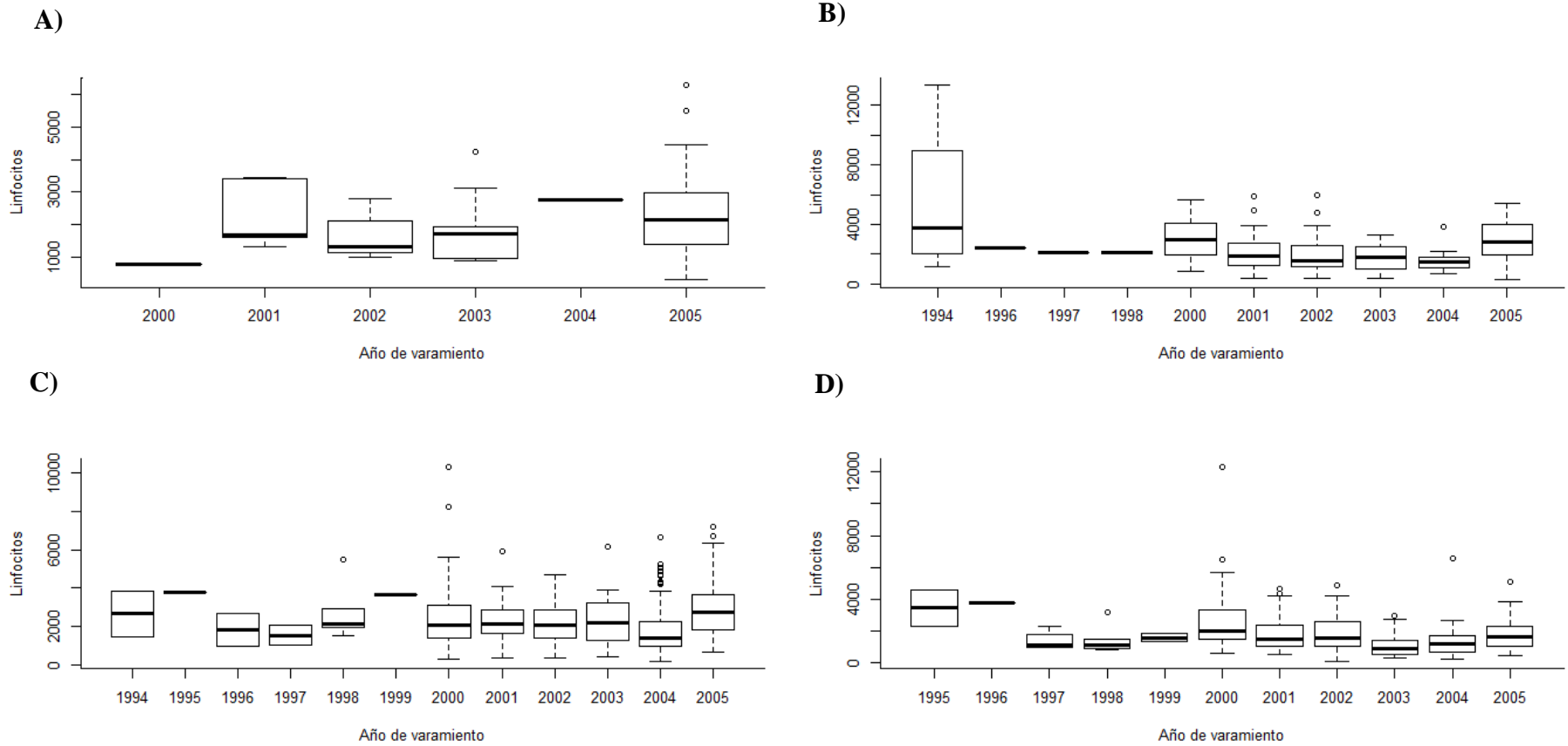


Figura 11. Variación temporal en el promedio de Linfocitos registrado para **A)** Crías, **B)** Añero, **C)** Subadulto y **D)** Adulto en lobo marino de California.

Los valores de eosinófilos (figura 12) para crías en el año 2005 hay cuatro valores que se dispararon, para añeros se mantienen masomenos en el rango de variación. Para los subadultos se observa que es una distribución uniforme menos para el año 2005 en donde se obtuvo un valor de 2900, de igual manera para la categoría de los adultos los valores se mantienen dentro de los 2000 con excepciones en donde se disparan los valores hasta los 4000.

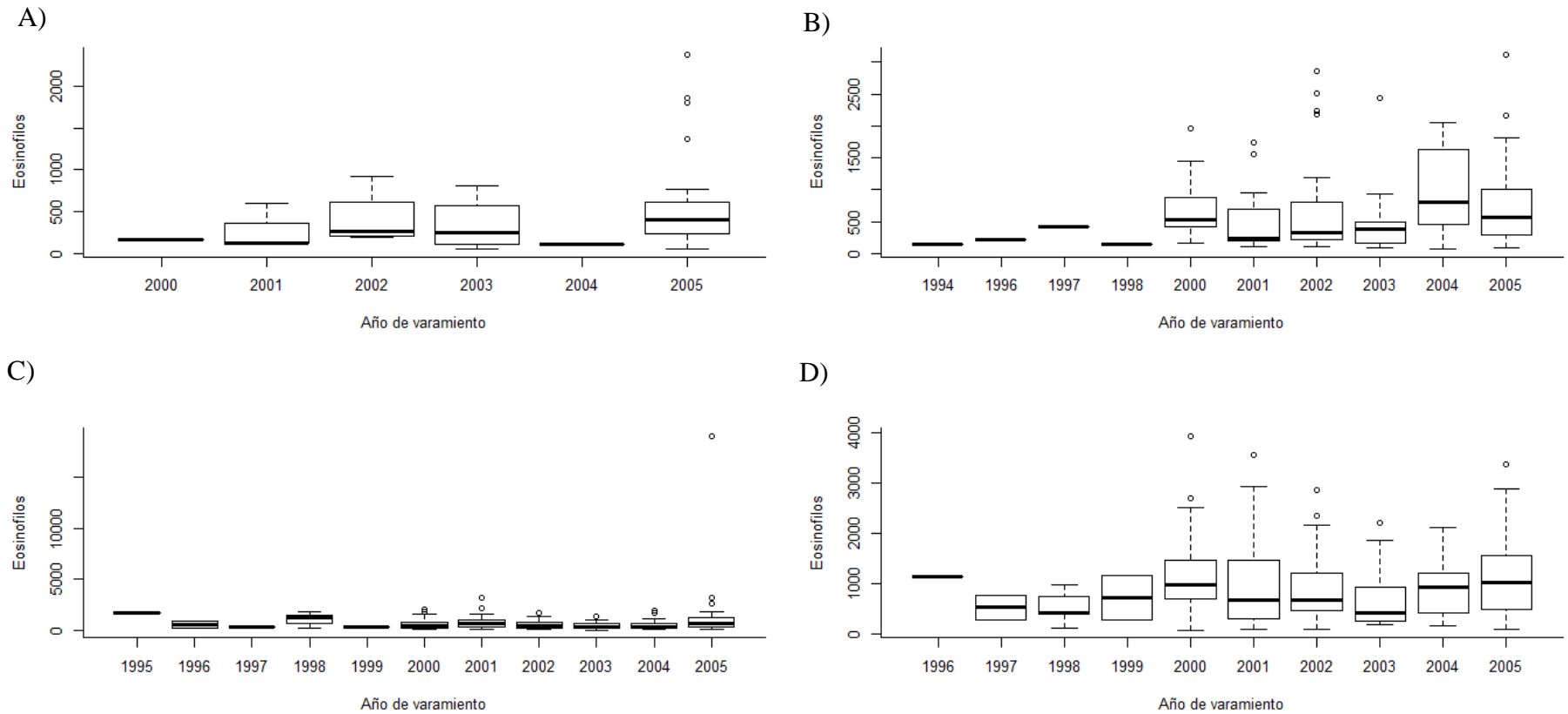


Figura 12. Variación temporal en el promedio de Eosinófilos registrado para **A)** Crías, **B)** Añero, **C)** Subadulto y **D)** Adulto en lobo marino de California.

En la figura 13 se obtuvieron valores dentro del mismo rango de distribución para todas las categorías de edades, pero para crías en el año 2005 se obtuvieron dos valores que están fuera del rango de distribución y para añeros fue para el año 2000 en donde se observa el valor más alto. Para subadultos y adultos después del 1999 es en donde se encuentra la distribución más dispereja.

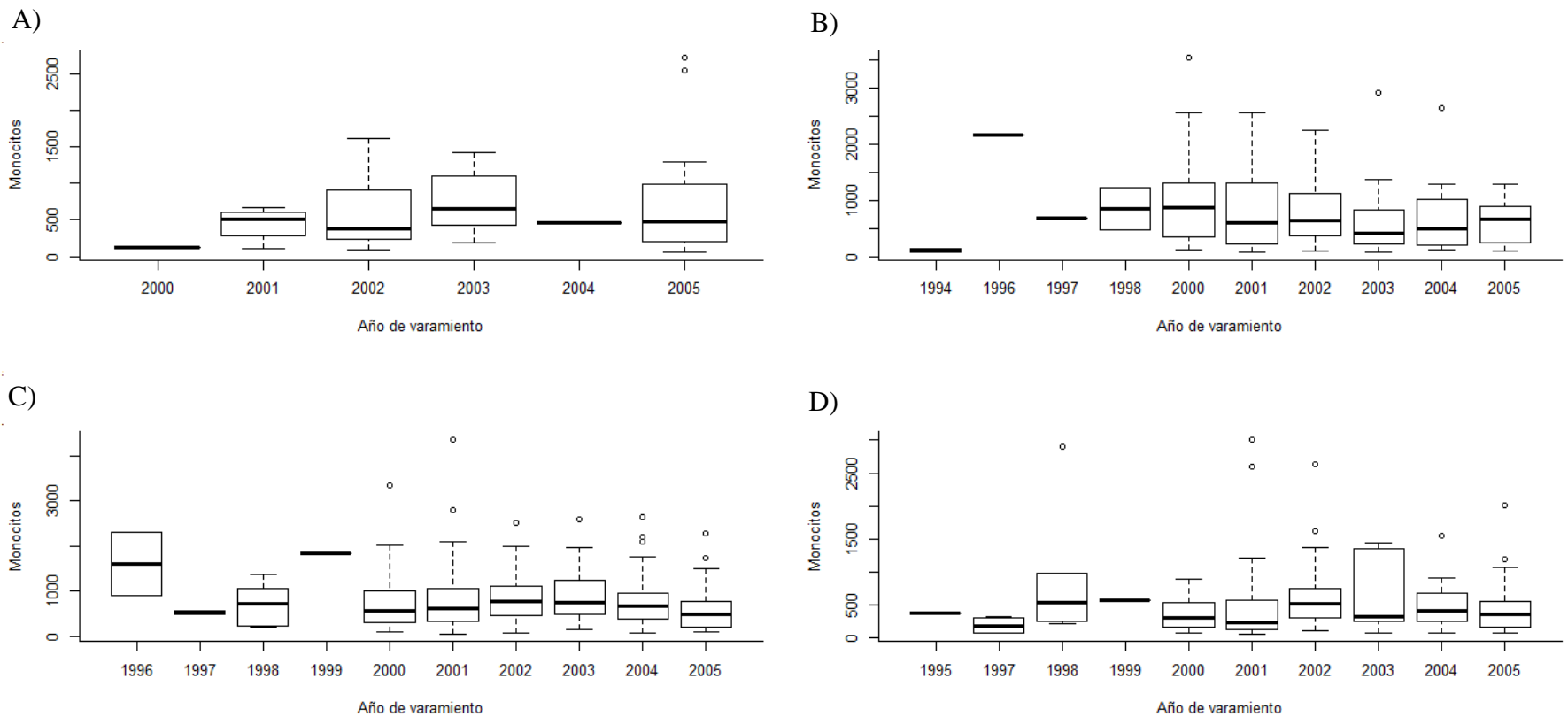


Figura 13. Variación temporal en el promedio de Monocitos registrado para **A)** Crías, **B)** Añero, **C)** Subadulto y **D)** Adulto en lobo marino de California.

El promedio de los valores de eritrocitos durante los años de 1994 a 2005 se encuentran en un rango de 6×10^6 con excepciones para los años de 2003 y 2005 en donde hay valores más altos al 8×10^6 y valores debajo de 3×10^6 para los años de 1994, 1998, 2000, 2001, 2002 y 2005 (Figura 14).

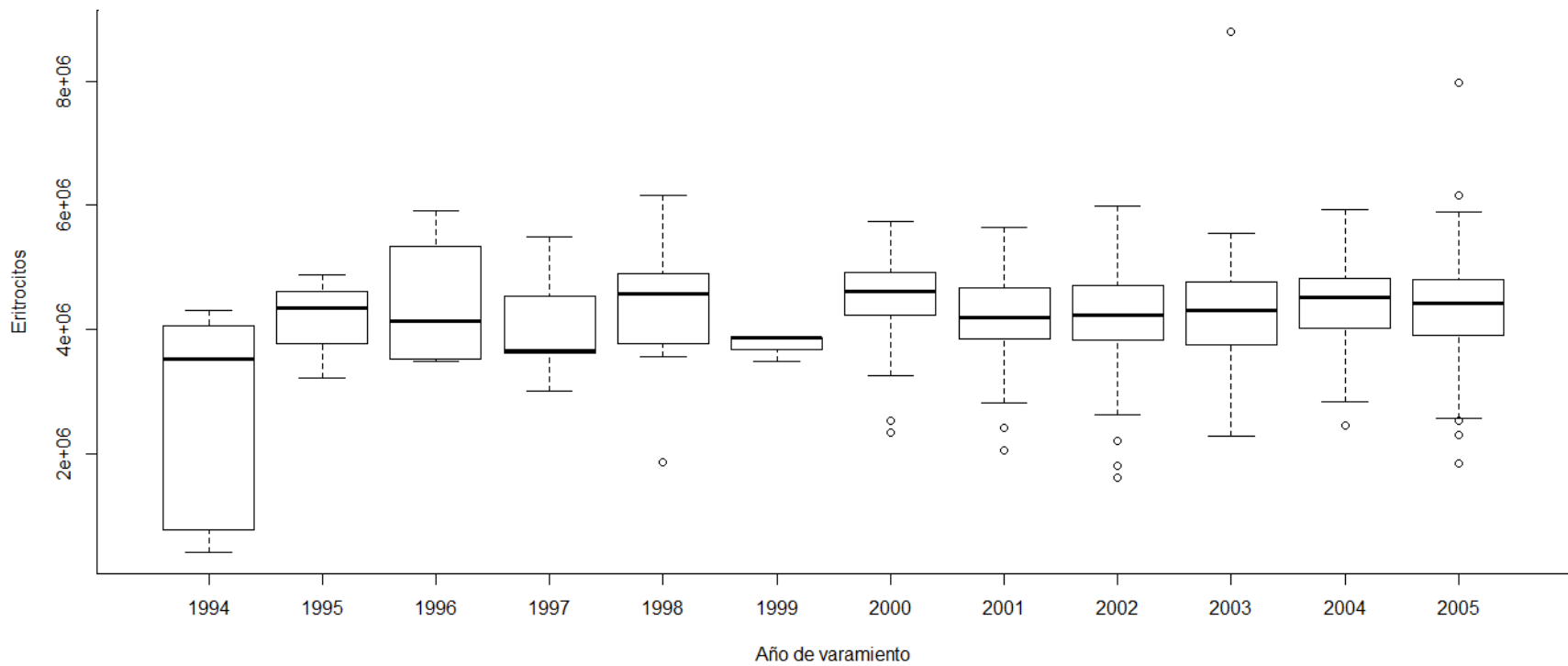


Figura 14. Promedio de eritrocitos durante los años de varamiento 1994-2005 para todas las edades de lobo marino de California

Los valores de hemoglobina más frecuentes y bajos fueron para el año de 1994 y durante los años de 1995 a 2005 se observa una distribución uniforme a excepción para el año 2003 en donde se disparan los valores para un individuo (Figura 15).

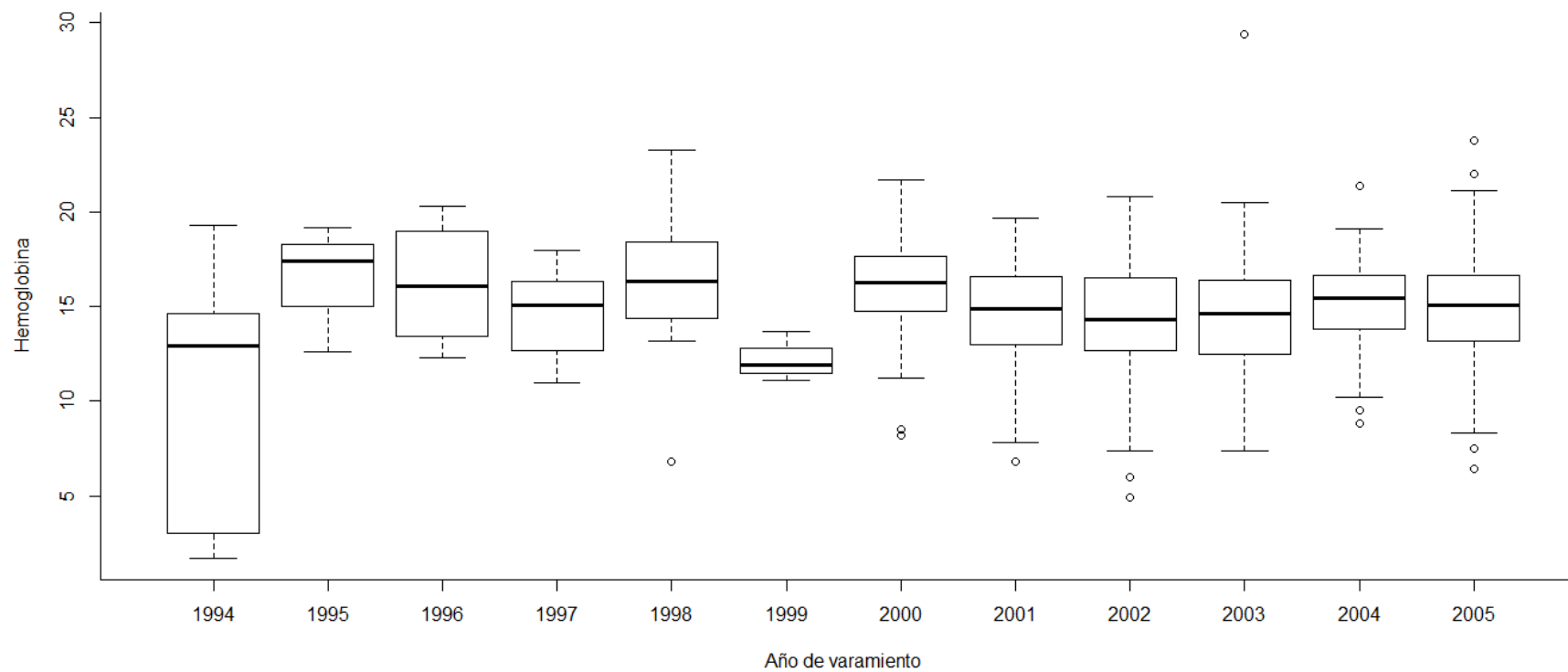


Figura 28. Promedio de hemoglobina durante los años de varamiento 1994-2005 para todas las edades de lobo marino de California

De igual manera se obtienen resultados similares a los de hemoglobina para el año de 1994 en valores de hematocrito ya que los valores se encuentran dentro de un rango más amplio. La distribución es mas o menos uniforme para los años 1995 a 2005 menos para el año de 1999 en donde la variación es mínima. Para los años del 2000,2003 y 2004 se observan valores más altos de los que normalmente fueron registrados (Figura 16).

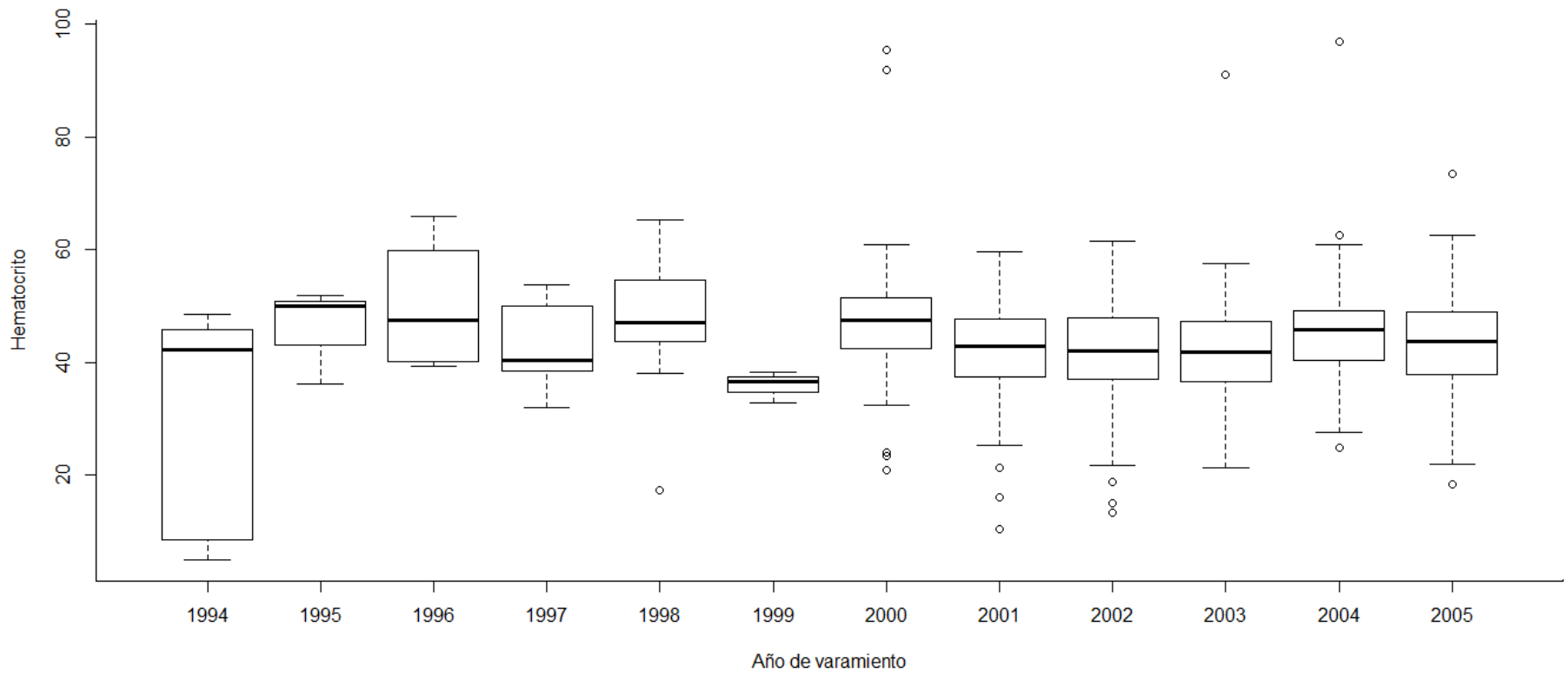


Figura 16. Promedio de Hematocrito durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Los valores de volumen corpuscular medio tienen una distribución similar durante todos los años de muestreo menos para los años 1997 y 2005 en donde hay individuos que presentan valores muy altos y en el 2004 hay un individuo que presenta valores muy bajos (Figura 17).

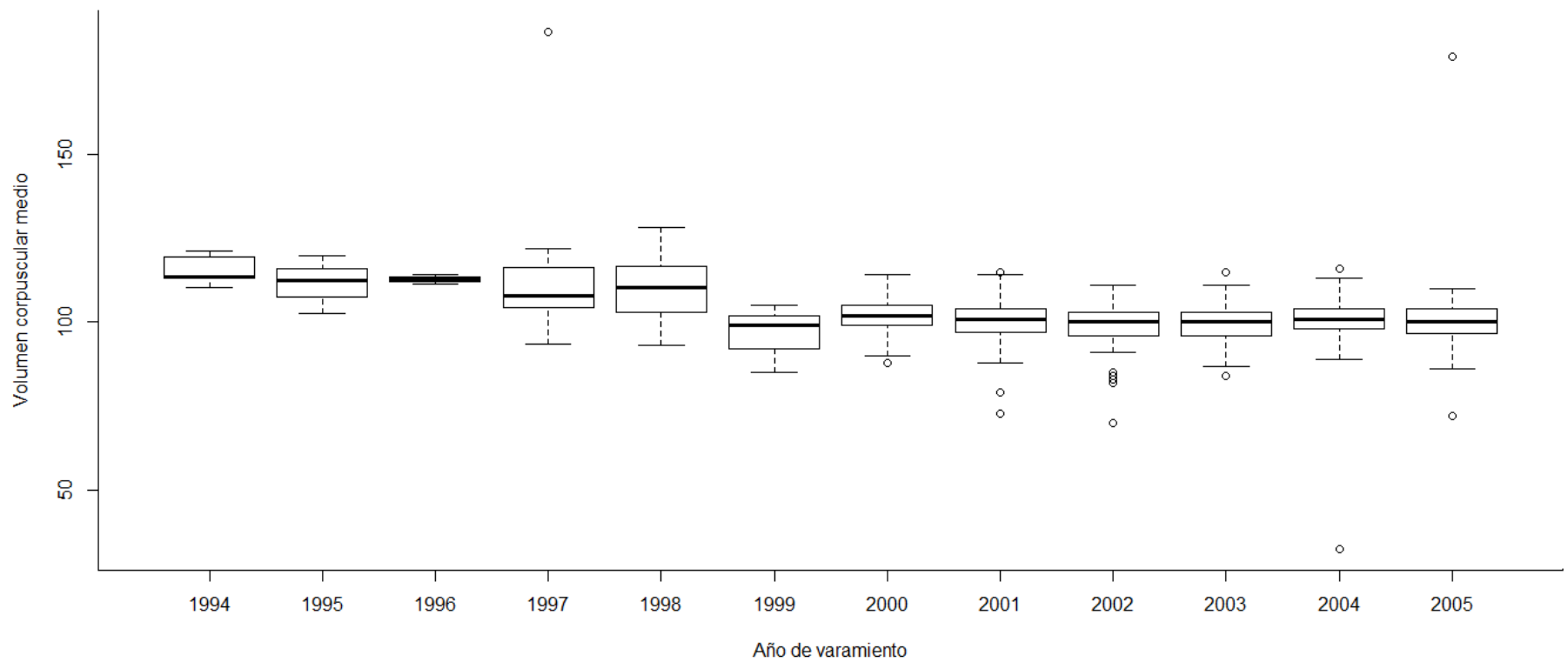


Figura 17 Promedio de volumen corpuscular medio durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

En la figura 18 se observa una distribución uniforme de los valores de HCM con pequeñas variaciones en los años de 1994, 2000, 2002 y 2005. Para el año del 2001 es en donde se encuentra la mayor diferencia de valor de hemoglobina corpuscular media.

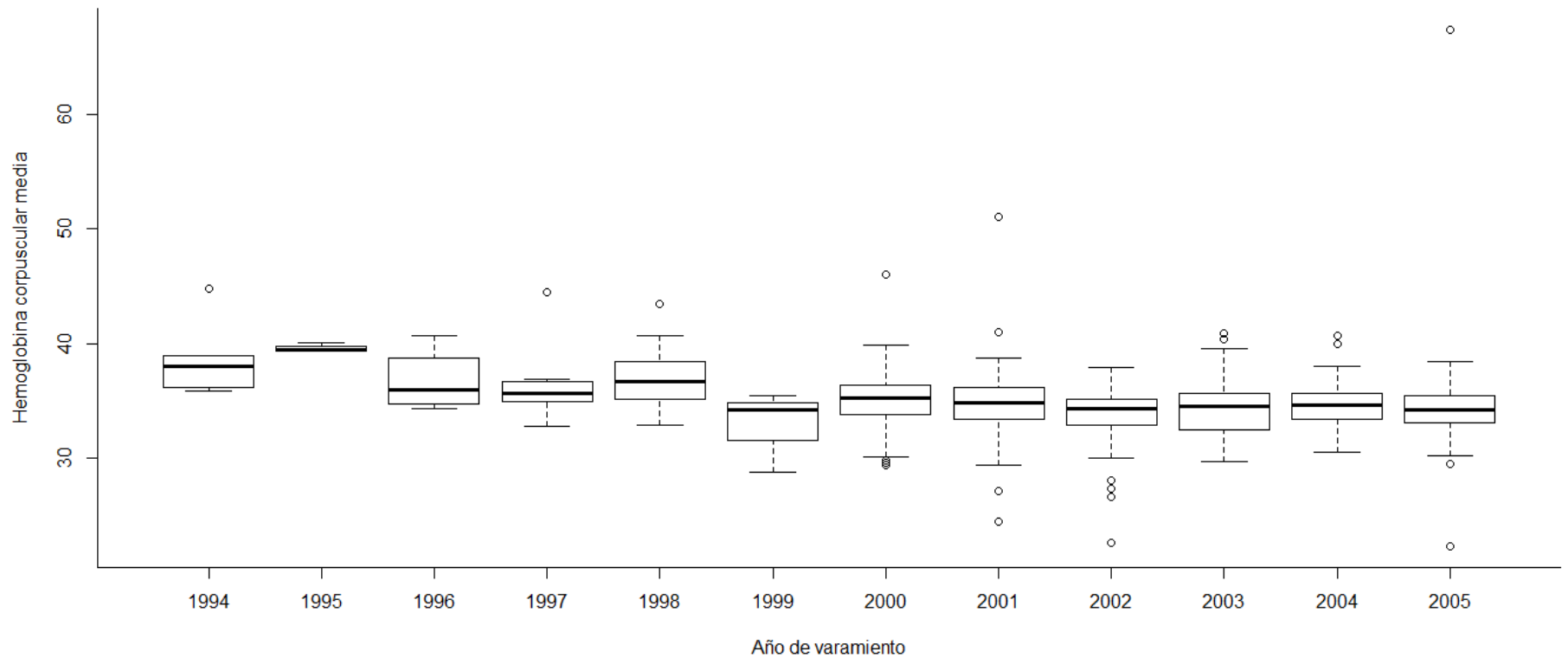


Figura 18 Promedio de hemoglobina corpuscular media durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Los valores de concentración de hemoglobina corpuscular media se encuentran dentro del mismo rango de concentración menos para el año del 2002 en donde el valor de CHCM incrementa cinco veces (figura 19).

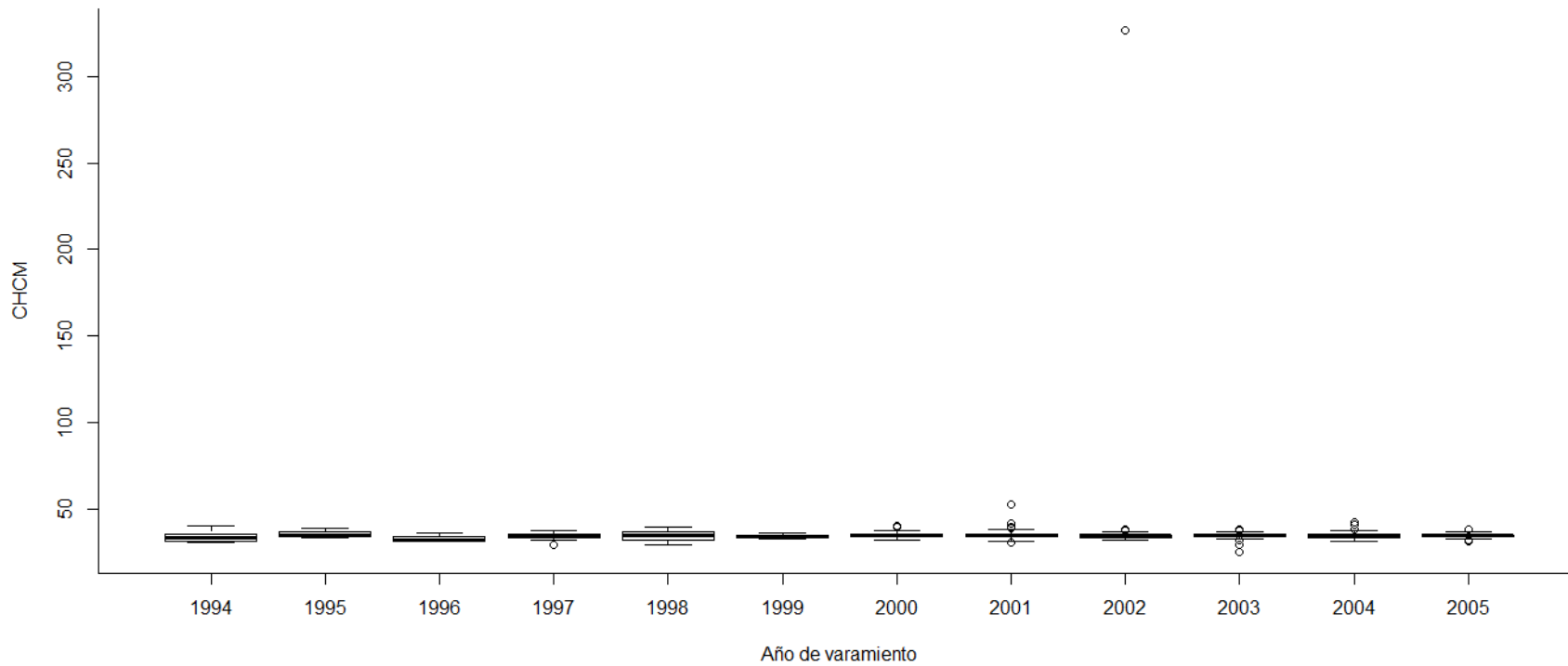


Figura 19. Promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

La distribución del promedio de plaquetas durante los años 1994 a 1999 no es uniforme pero, del 2000 al 2005 se observa una distribución muy variada pero uniforme (figura 20)

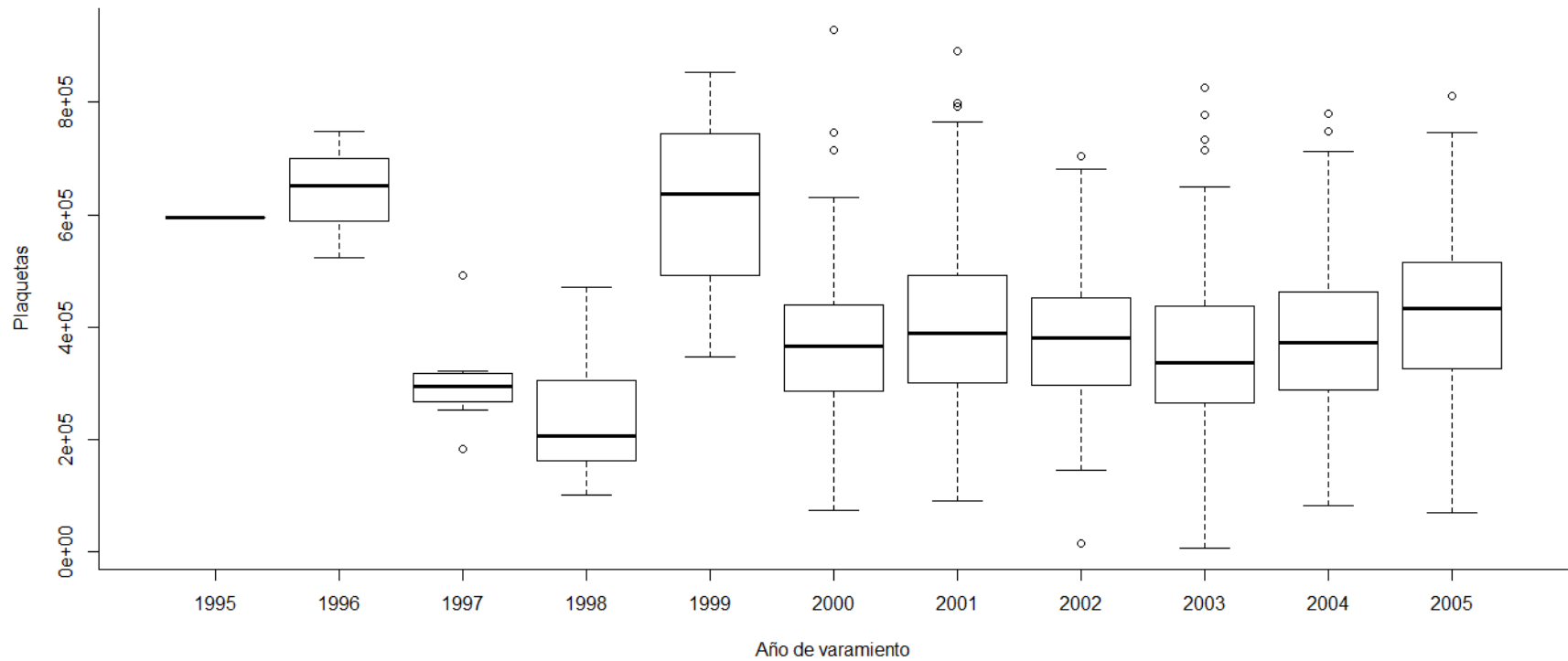


Figura 20. Promedio de plaquetas durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

En la figura 21 se observa una distribución variada de los valores de leucocitos , a partir del año 2000 al 2005 se obtuvieron valores arriba de los 6000.

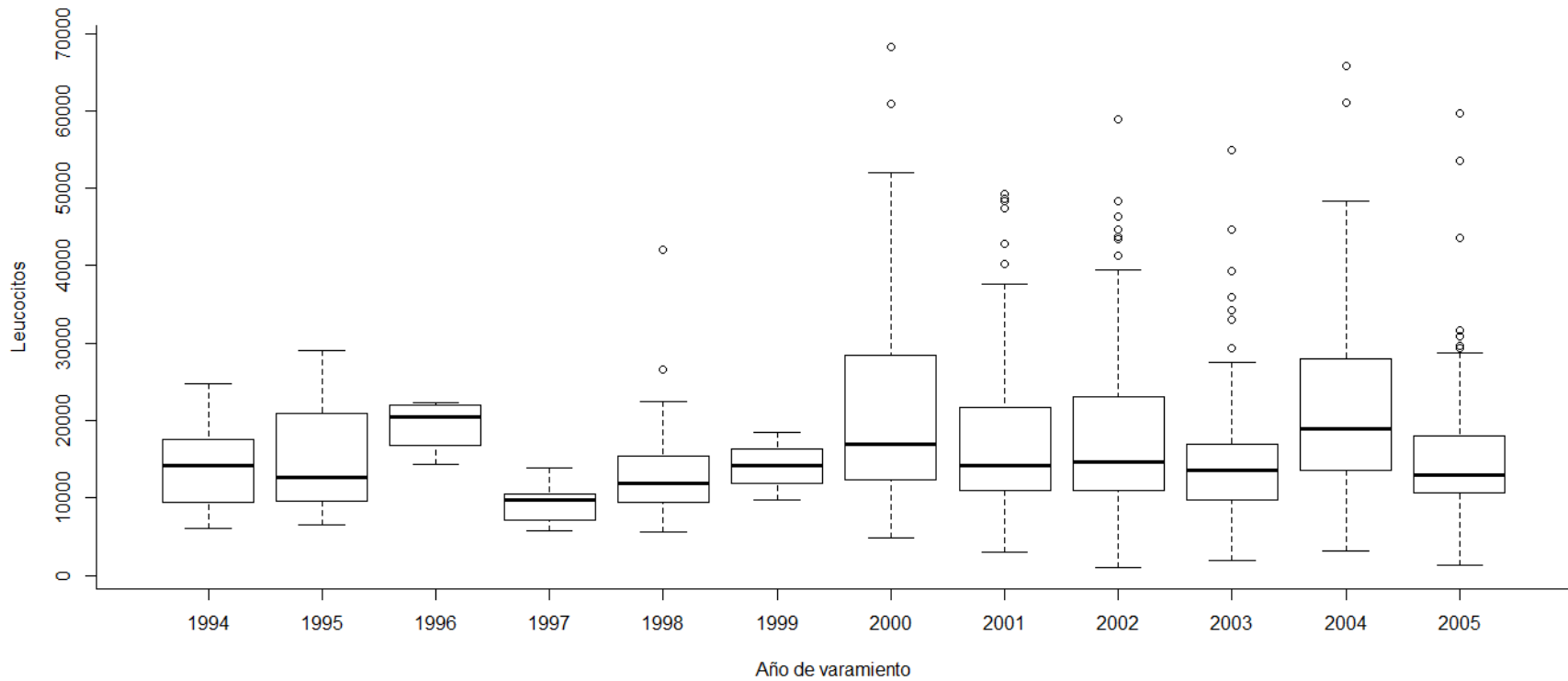


Figura 21 Promedio de leucocitos durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Para los neutrófilos segmentados la distribución promedio es de los 272 hasta 20,000, los años de 2000, 2002, 2004 y 2005 tienen valores más altos que los promedio (figura 22).

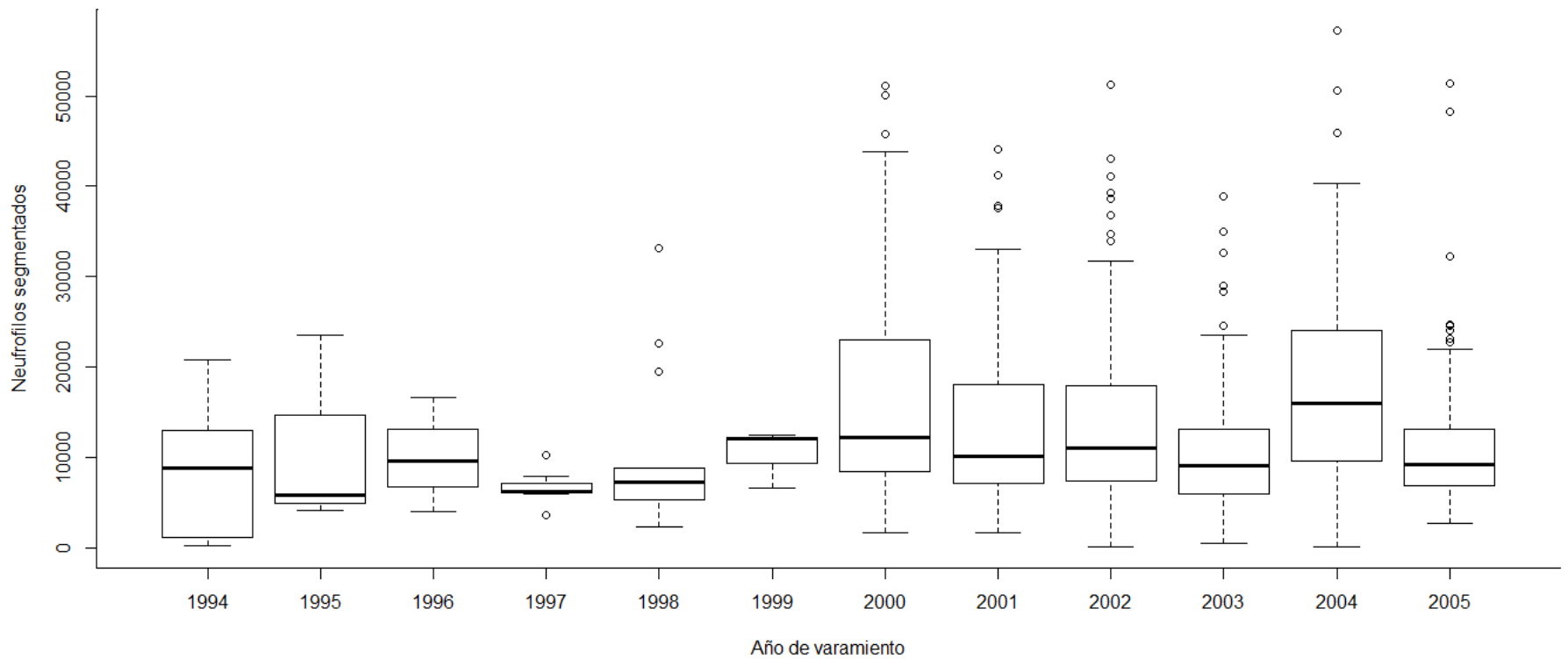


Figura 22. Promedio de neutrófilos segmentados durante los años de muestreo 1994-2005 de lobo marino de California

En la figura 23 se observan los valores de neutrófilos en banda con un promedio de los 1000 a los 4000 pero, para los años del 2000 a 2005 hay unos valores que llegan a los 11 000 siendo el año 2000 y 2001 los años con los valores mas altos.

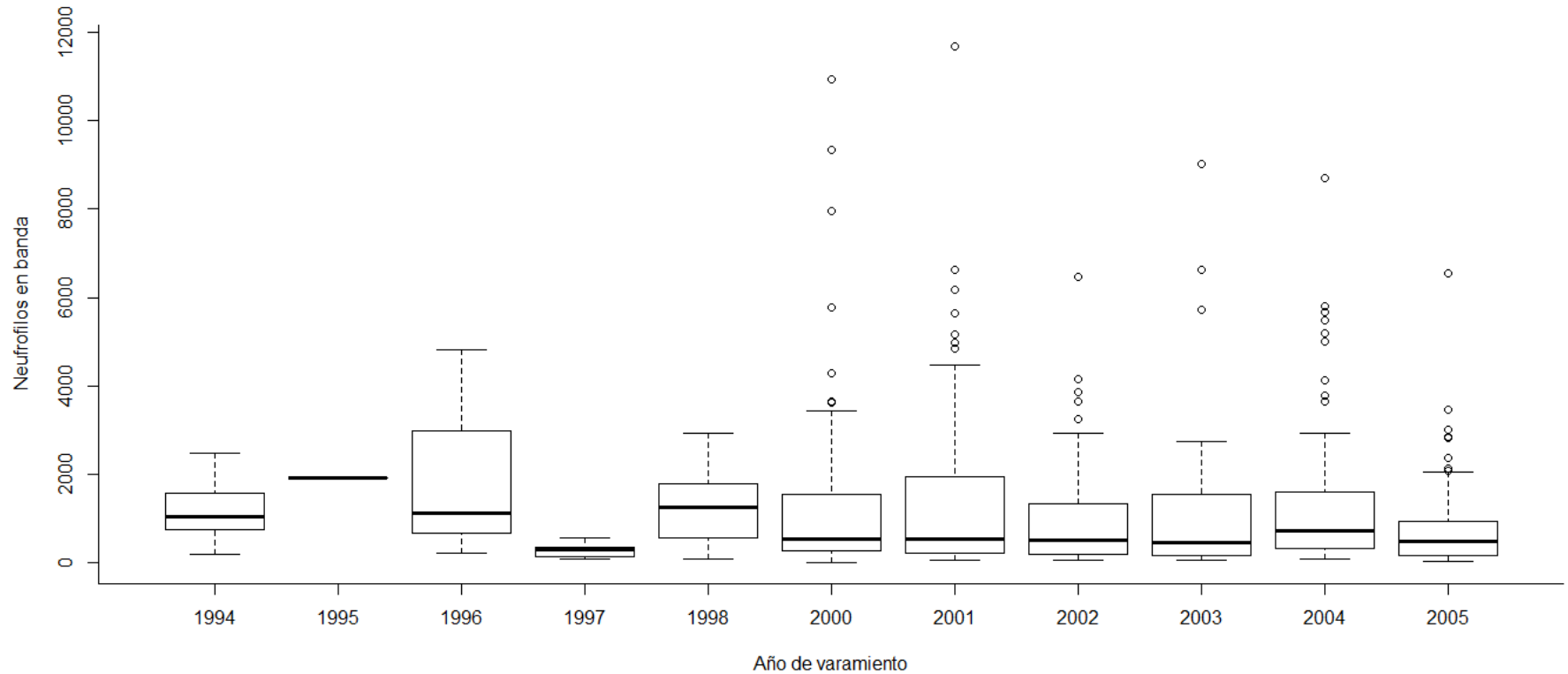


Figura 23. Promedio de neutrófilos en banda durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

El promedio de eosinófilos durante todos los años de muestreo se comporta en un rango no mayor a los 5 000 con excepción de un dato para el año 2005 en donde los valores se disparan (figura 24)

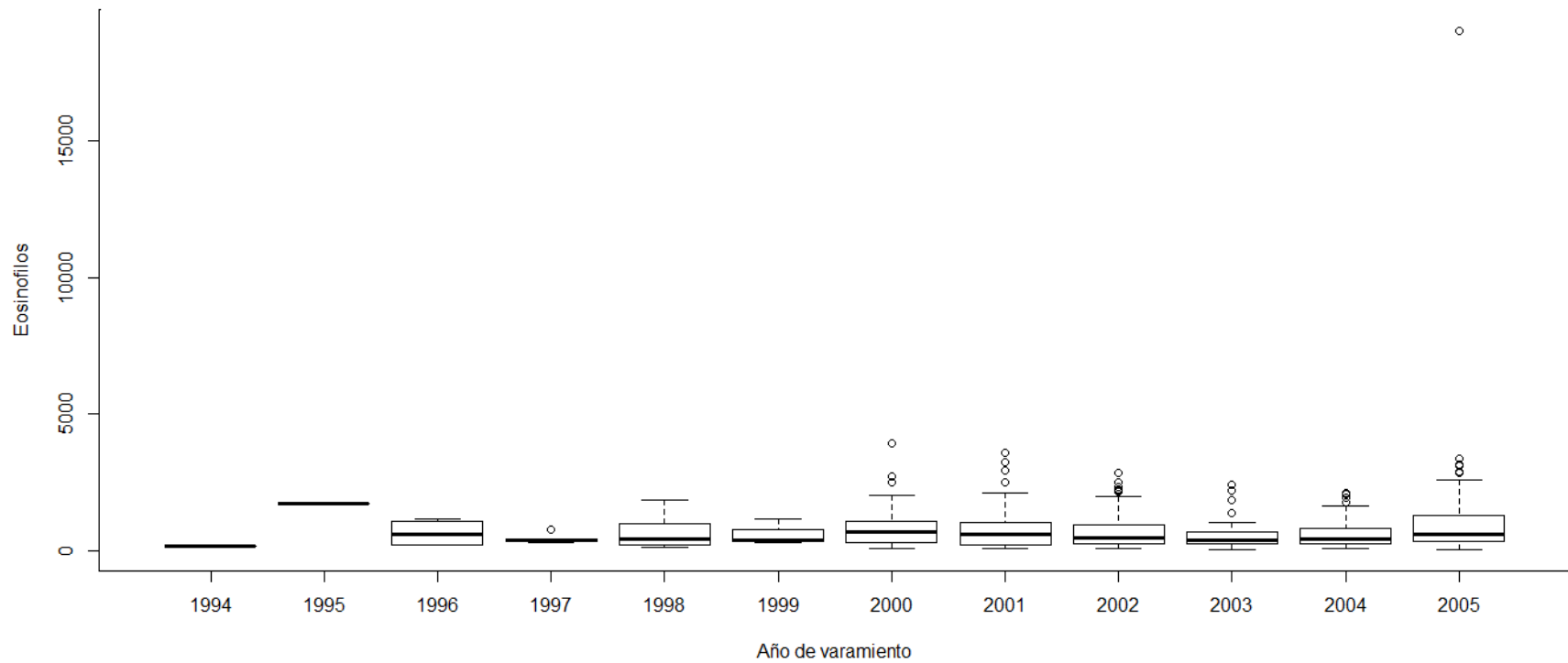


Figura 24. Promedio de eosinófilos durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Los valores de linfocitos (figura 25) para los años 1994, 1995 y 1996 no varían tanto entre años, para los años de 1997,1998 y 1999 se observa un incremento en los rangos de los valores y para los años del 2001 2002, 2003 y 2004 también se observa un comportamiento mas o menos estable. Para los años del 2000 y 2005 se muestran valores de linfocitos parecidos. En 1994 y 2000 se obtuvieron los valores más altos de linfocitos.

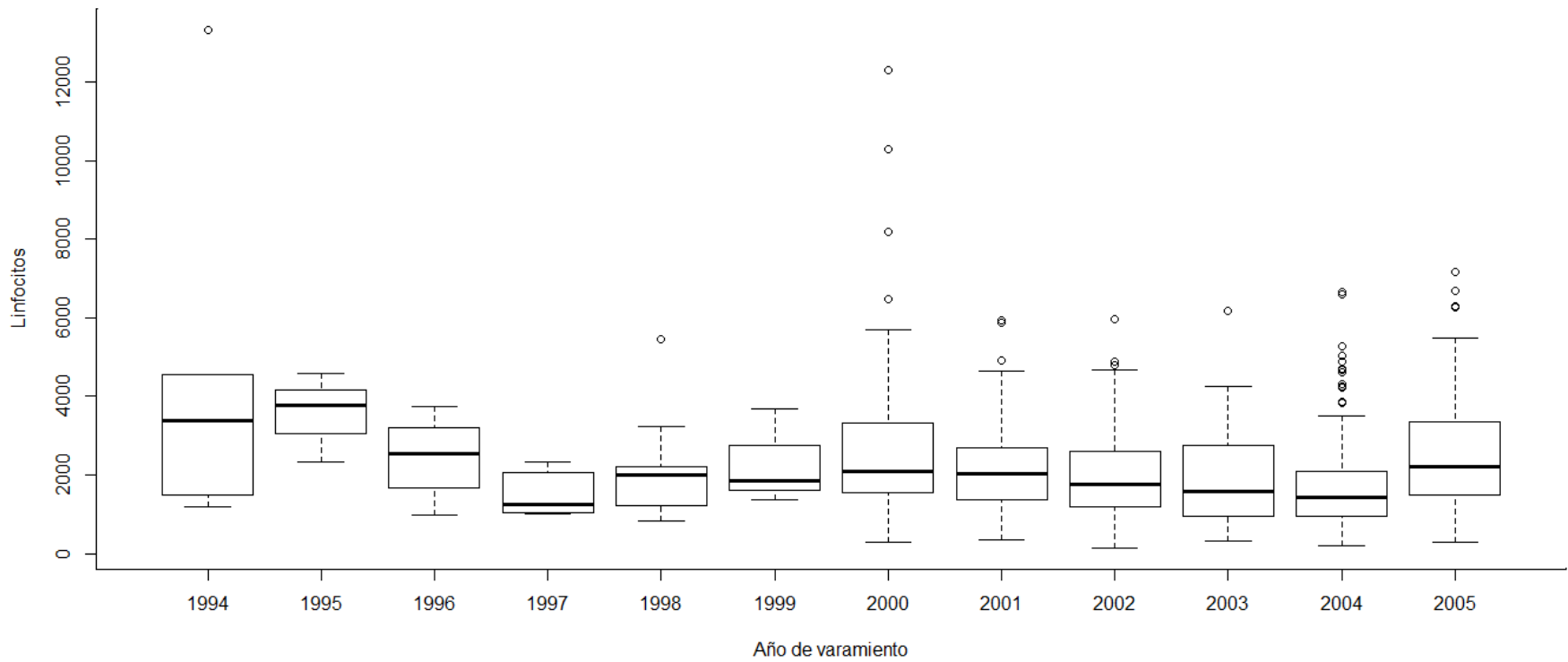


Figura 25. Promedio de linfocitos durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Los valores de monocitos durante 1994 a 1999 no presentan una distribución estable y, durante los siguientes años que son del 2000 al 2005 parece ser que los valores son mas semejantes. En el 2001 se obtuvo el valor mas alto de monocitos y de 1996, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 y 2005 se obtuvieron valores por arriba del promedio (figura 26).

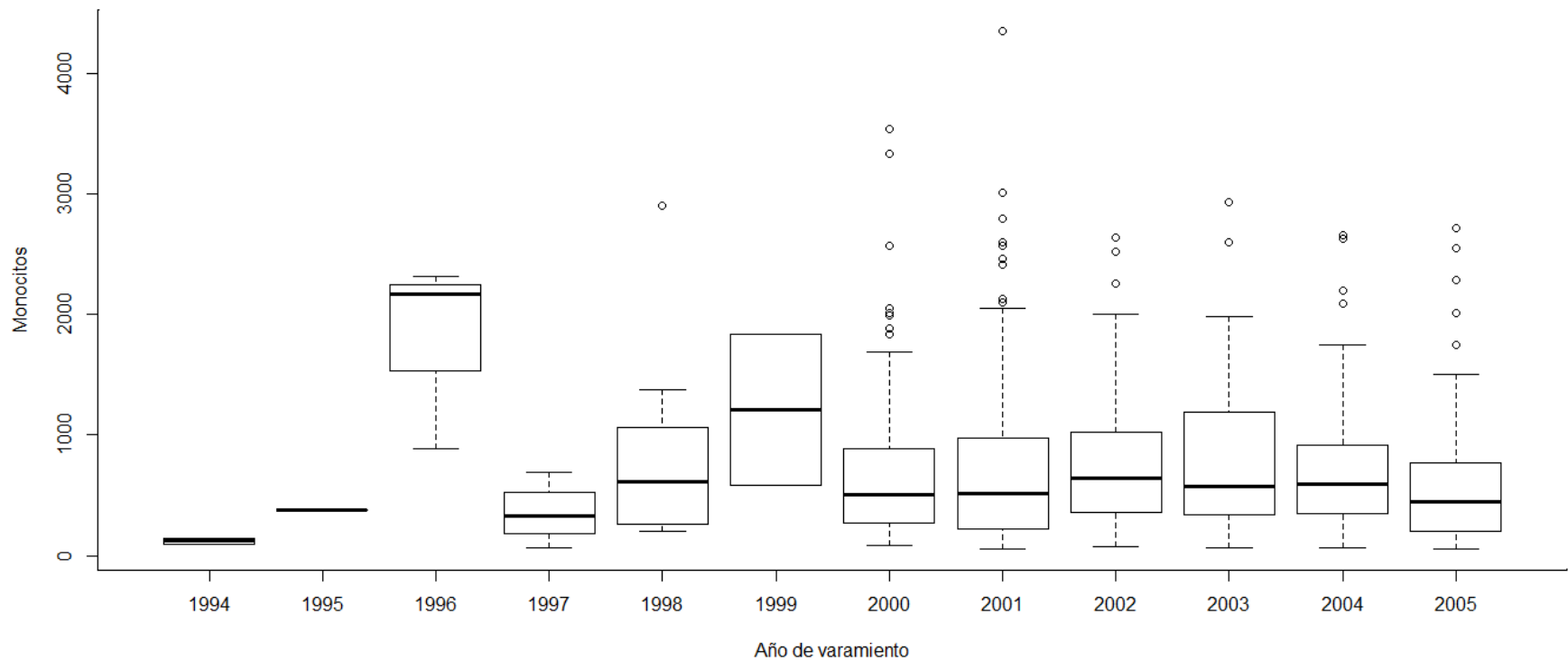


Figura 26. Promedio de monocitos durante los años de varamiento 1994-2005 de lobo marino de California

Los valores promedio de eritrocitos para hembras y machos de diferentes edades se muestra con muy poca variación, a excepción de los añeros que presentaron valores muy bajos afuera del promedio. Las hembras adultas mostraron los valores mas altos de eritocitos (figura 27).

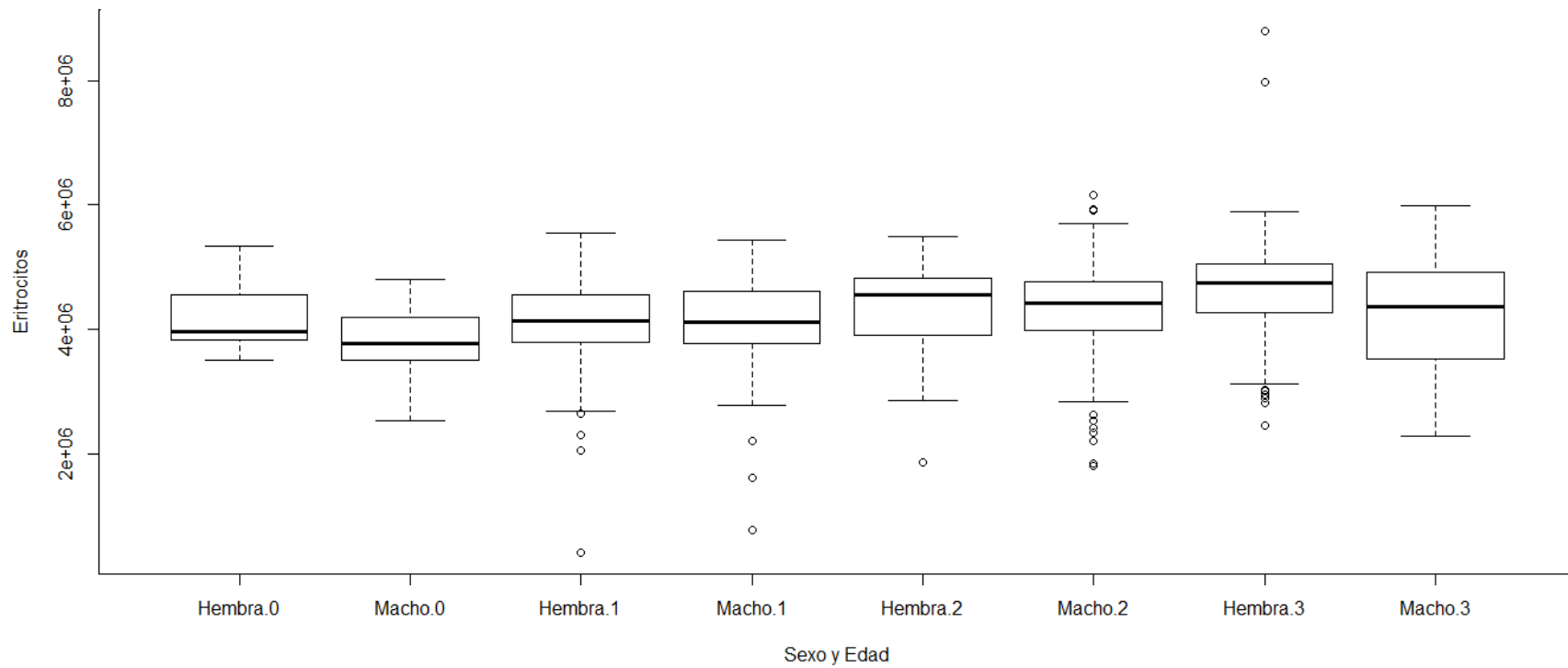


Figura 27. Promedio de eritrocitos de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Los valores de hemoglobina para hembras y machos crías y añeros son similares, con pequeñas variantes de hembras y machos añeros que muestran los valores mas bajos de todas las edades. Las hembras y machos subadultos y adultos muestran valores similares a excepción de las hembras adultas que obtuvieron los valores más altos y también en promedio tienen concentración de hemoglobina ligeramente mayor (figura 28).

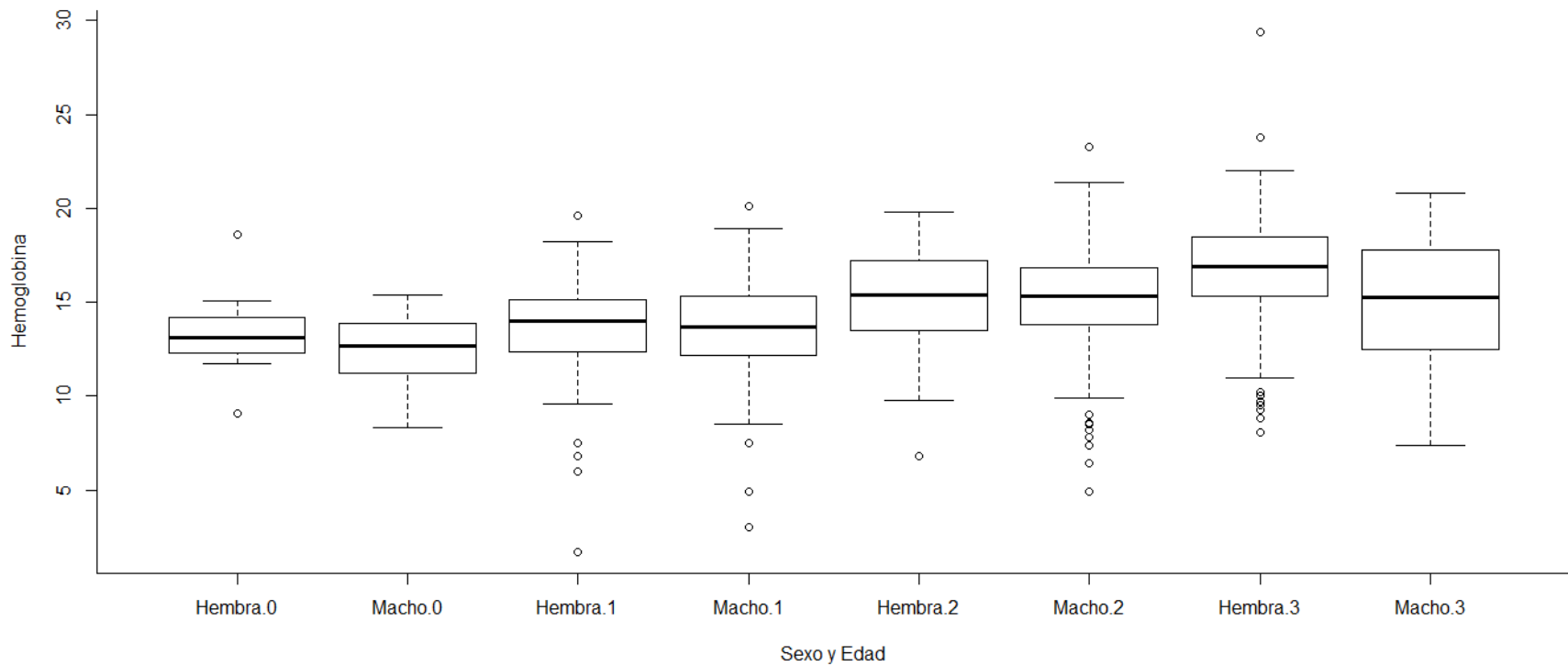


Figura 28. Promedio de hemoglobina de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

El promedio de hematocrito para crías y añeros es muy semejante, en subadultos es un poco mayor el valor y en adultas hembras es mayor que en machos adultos. En general parece ser que en las etapas de cría y adulto las hembras tienen mayores valores de hematocrito que los machos (Figura 29).

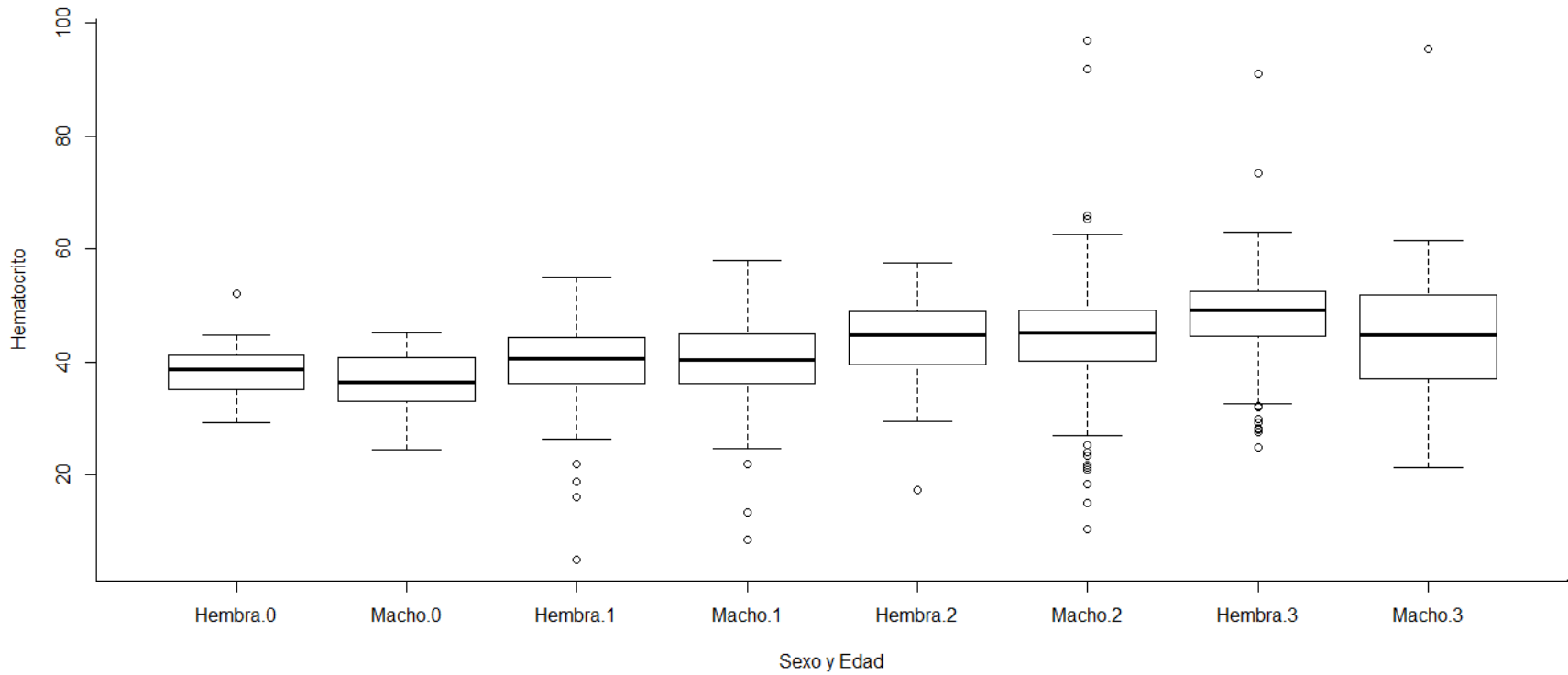


Figura 29. Promedio de hematocrito de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Parece ser que los valores de volumen corpuscular medio va aumentando durante las etapas del desarrollo del lobo marino de California y, que para las etapas de subadulto y adulto las hembras tiene ligeramente valores mas altos que los de los machos. Los valores más altos de VCM se encontraron en un macho añero y una hembra adulta (figura 30).

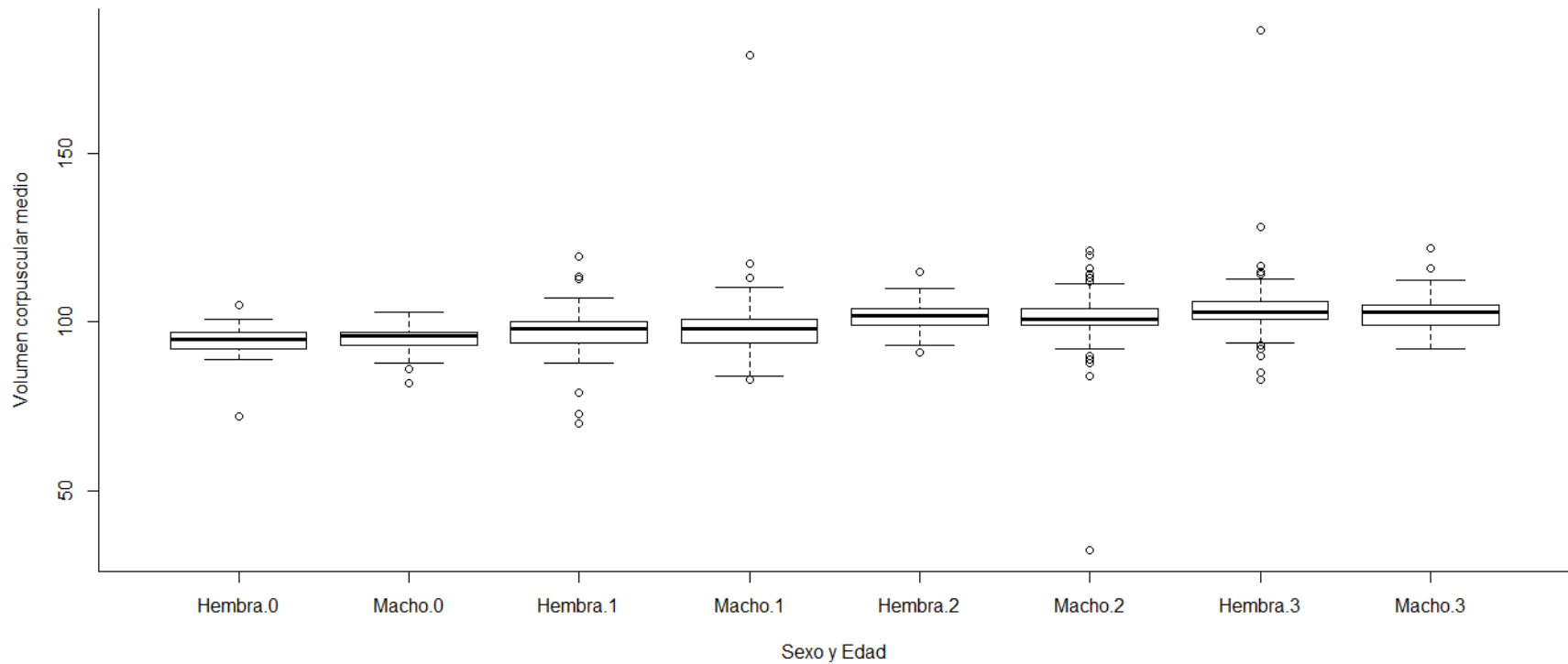


Figura 30 Promedio de volumen corpuscular medio de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

En la figura 3.4 se muestran los valores de hembras y machos crías que tienen un promedio de HCM parecido pero hay una hembra que obtuvo niveles muy bajos de este parametro. Las hembras subadultas y adultas parecen tener valores mas altos de HCM que machos. El valor mas alto de HCM fue para un macho añero (Figura 31).

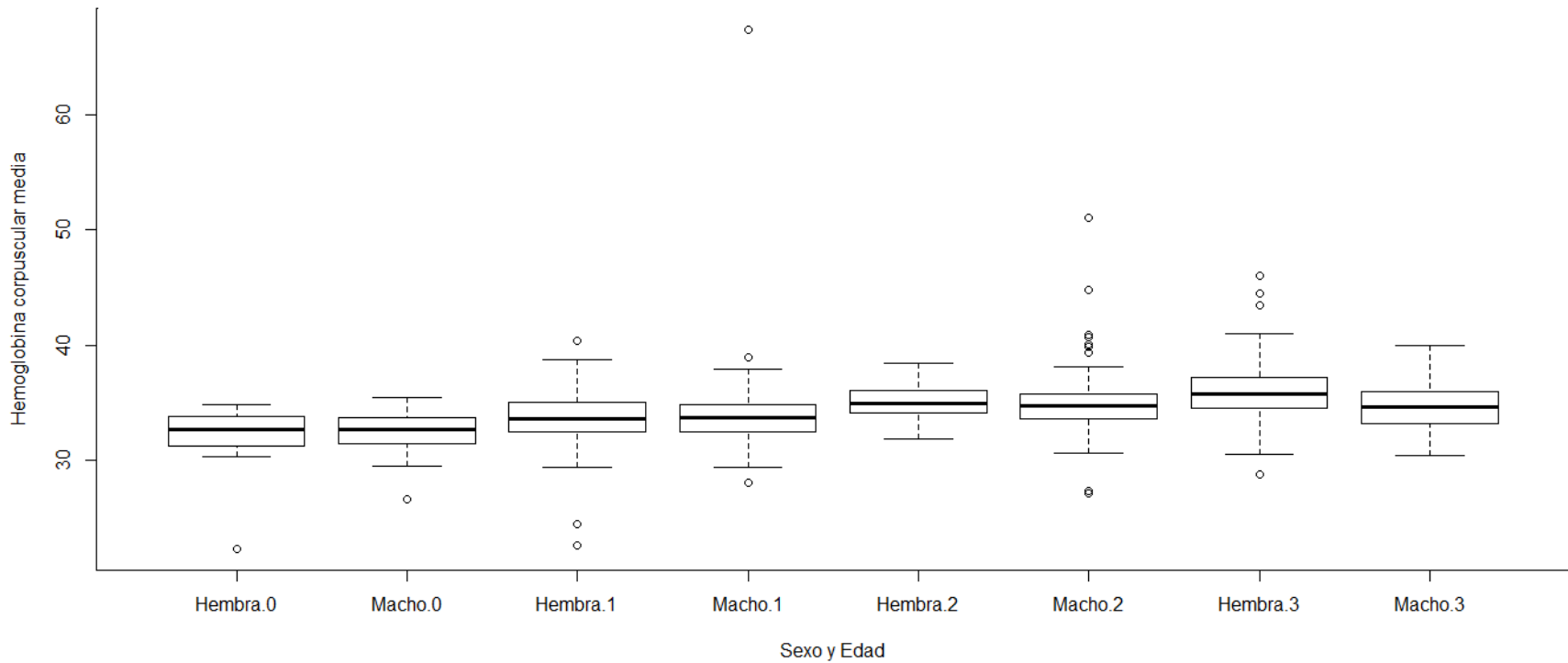


Figura 31. Promedio de hemoglobina corpuscular media de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Los valores de concentración de hemoglobina corpuscular media son muy uniformes entre machos, hembras y edades. El unico valor que obtiene los valores con diferencia de cinco veces en para una hembra añera (figura 32).

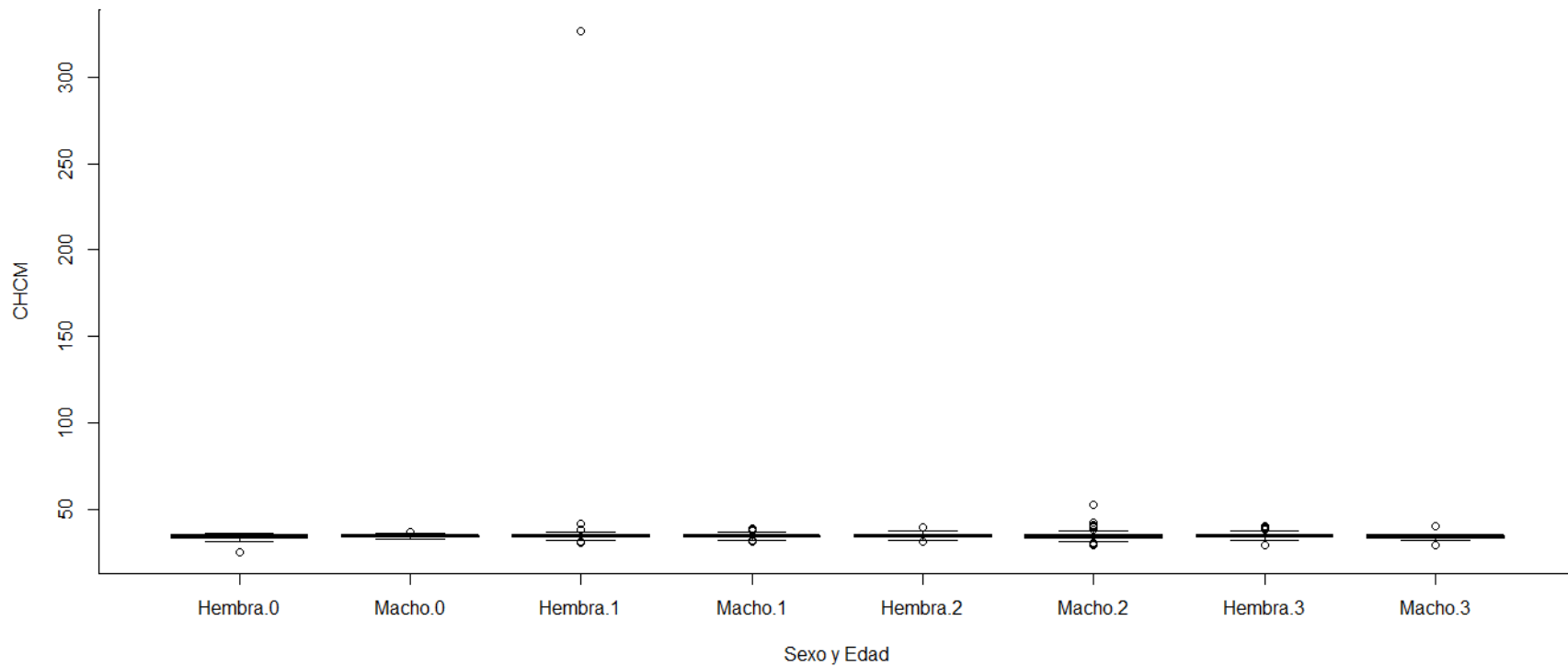


Figura 32. Promedio de concentración de hemoglobina corpuscular media de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Las plaquetas de crías hembras muestran valores superiores a los de los machos crías. Sin embargo para los añeros, subadultos y adultos hembra tienen valores menores a los de los machos. Los valores mas altos de plaquetas los obtuvieron los machos subadultos y las hembras añeras (figura 33).

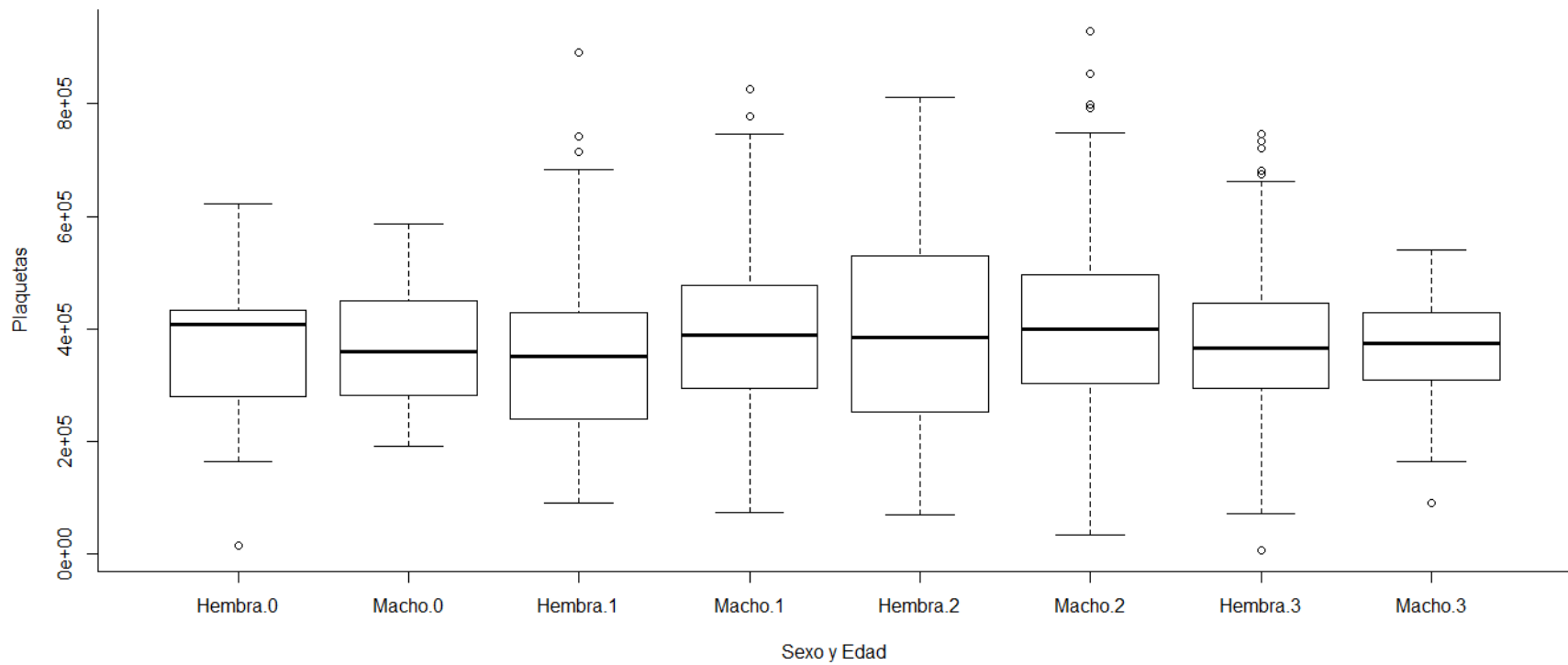


Figura 33. Promedio de plaquetas de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

El promedio de leucocitos para añeros, subadultos y adultos es mayor para machos que para hembras, las hembras crías tienen valores mayores a los de los machos crías. Los valores más altos de leucocitos fueron los de los machos subadultos (figura 34)

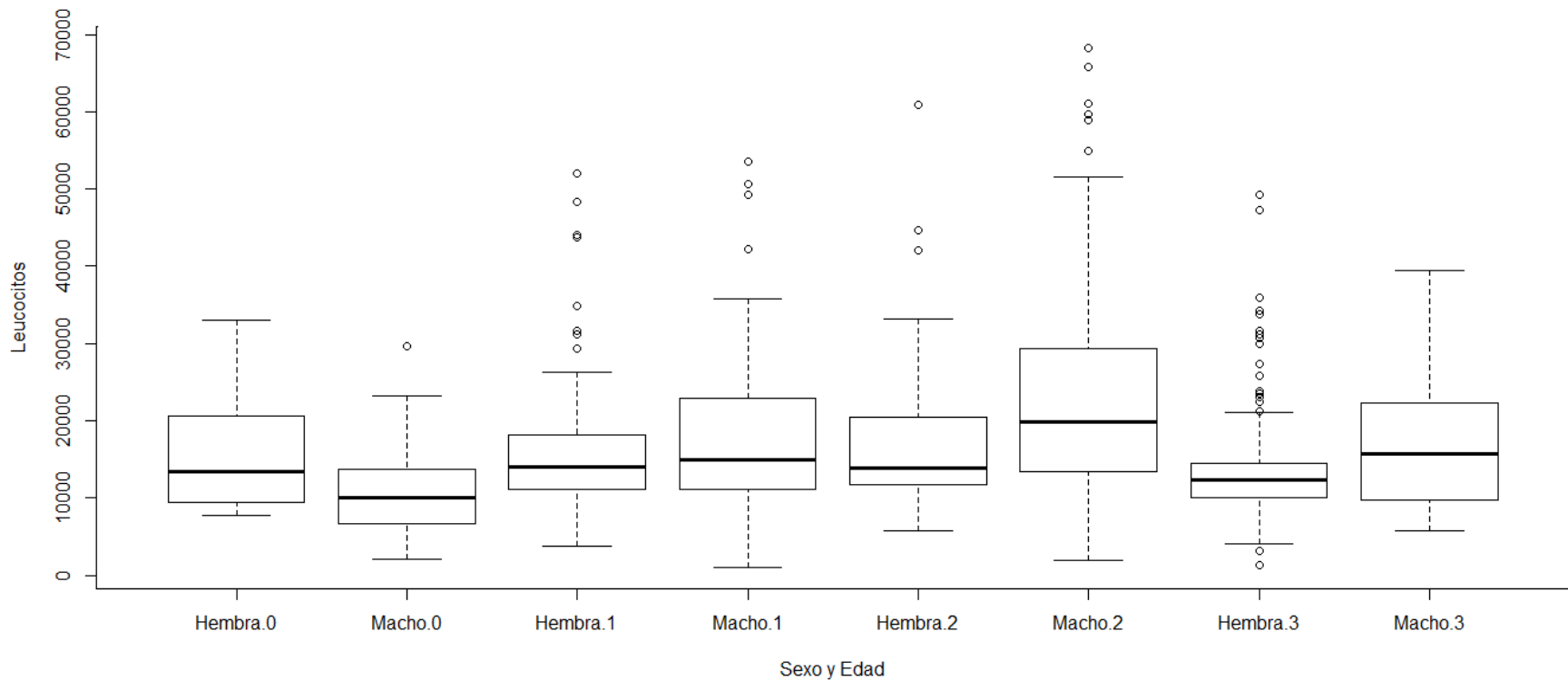


Figura 34 Promedio de leucocitos de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Los valores de neutrófilos segmentados para hembras crías son más altos que los de los machos, en cambio para añeros, subadultos y adultos los valores más altos los tienen los machos. El valor más alto de NS lo obtuvo un macho subadulto (figura 35).

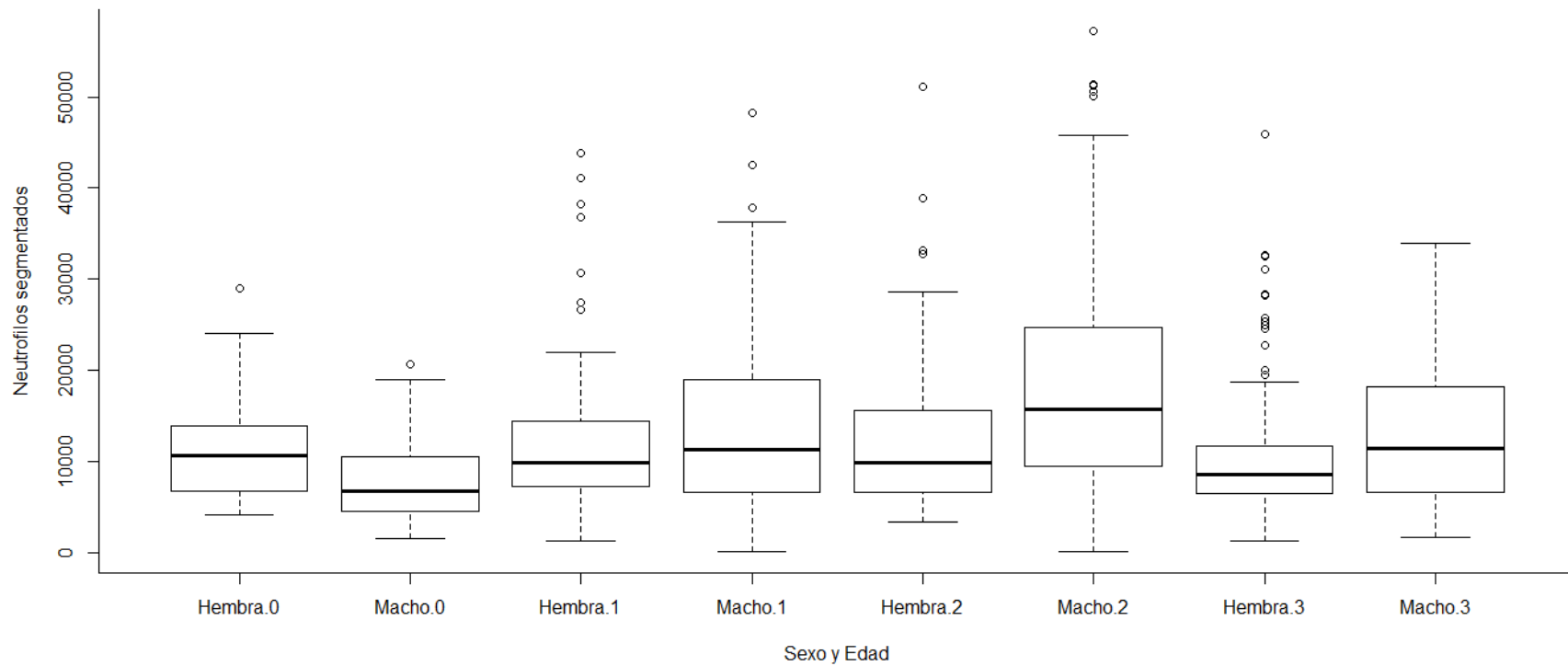


Figura 35. Promedio de neutrófilos segmentados de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

El promedio de neutrofilos en banda tiene una distribución parecida para todas las edades y para ambos sexos, con excepción de las hembras adultas que tiene los valores mas bajos de todos y, a los machos subadultos que tienen los parametros mas altos y son los que mas varian dentro del grupo (figura 36).

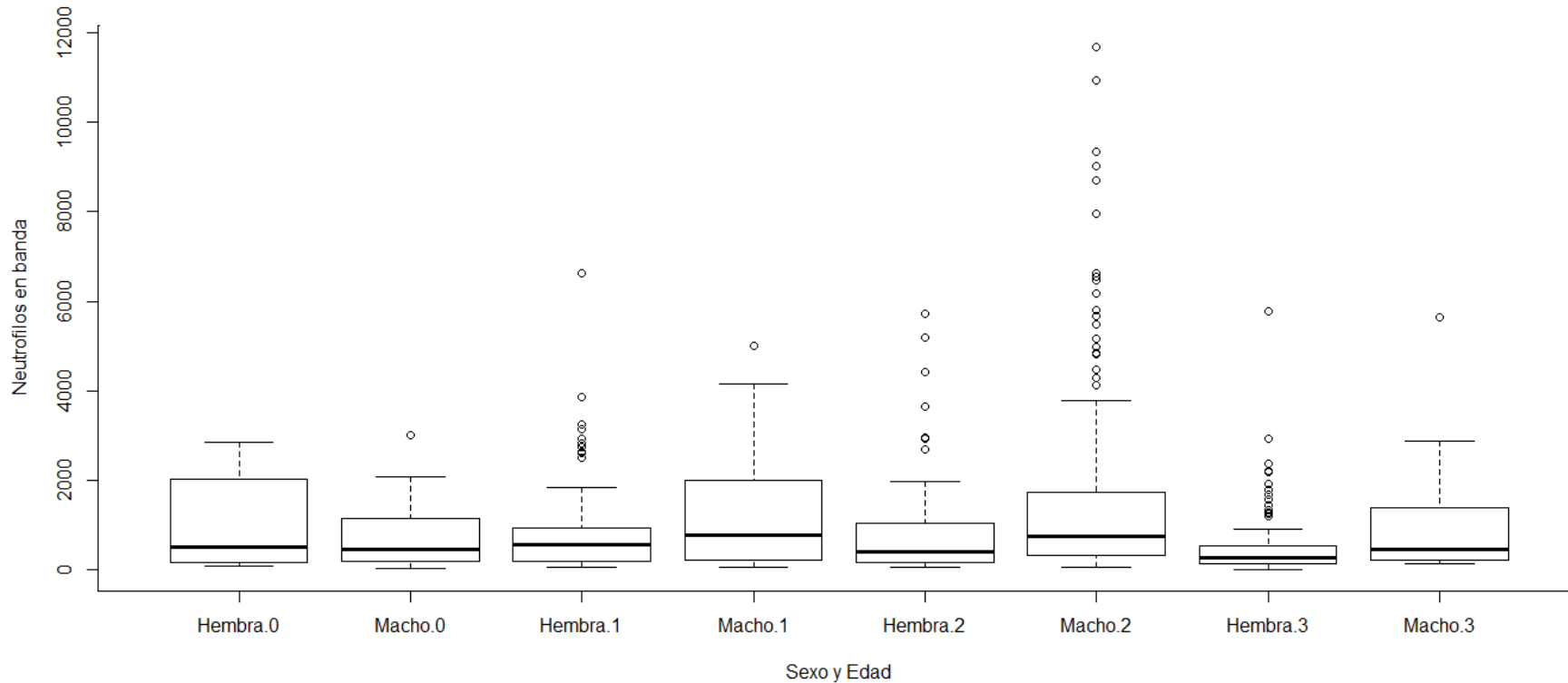


Figura 36. Promedio de neutrofilos en banda de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Se obtuvieron parámetros similares para machos y hembras de las cuatro clasificaciones de edades. Las hembras crías, añeras y subadultas tienden a tener valores más altos que los machos, menos para el caso de las hembras adultas que tienen valores más bajos en comparación de los machos adultos. Los valores más altos los obtuvieron machos añeros y subadultos y, una hembra adulta (figura 37).

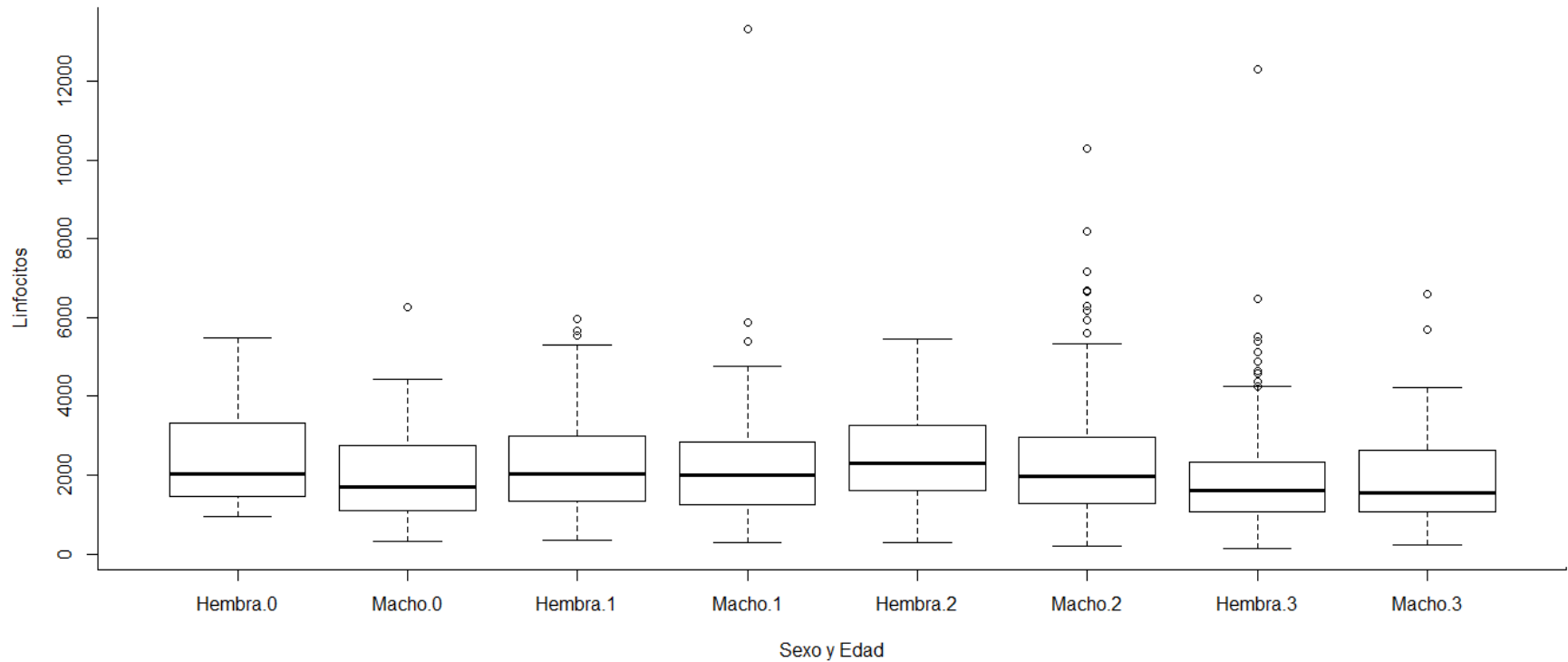


Figura 37. Promedio de linfocitos de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Los valores de eosinófilos parecen ser regulares durante las edades de cría, añero y subadulto en hembras y machos. Las hembras adultas parecen tener un promedio mas alto de eosinófilos que los demás. El valor mas alto fue para un macho subadulto (figura 38).

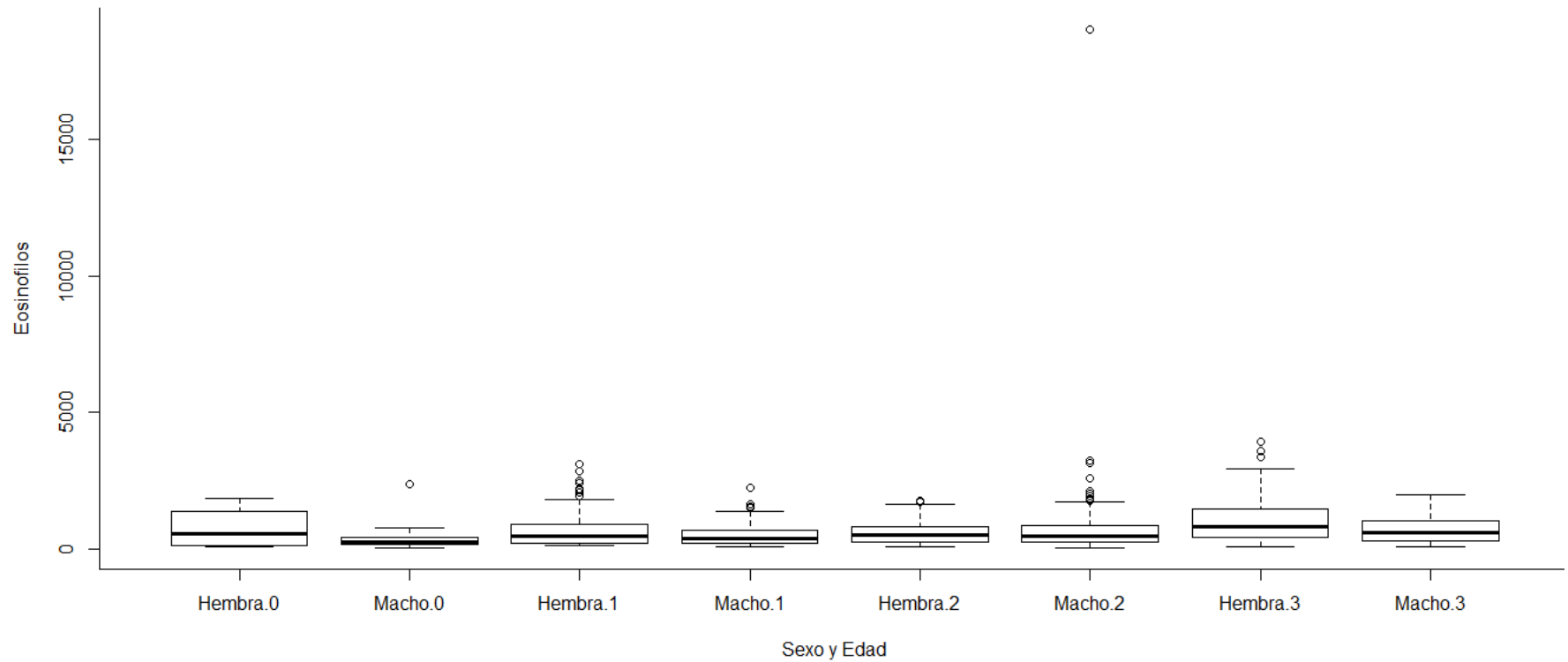


Figura 38. Promedio de eosinófilos de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

Los machos crías y añeros tienen mayores valores de monocitos y tienen una distribución más amplia. Los machos añeros y subadultos tienen los valores más altos de monocitos. Los valores de hembras y machos adultos no varían mucho, excepto por el valor más alto de monocitos que fue obtenido para los machos subadultos (figura 39).

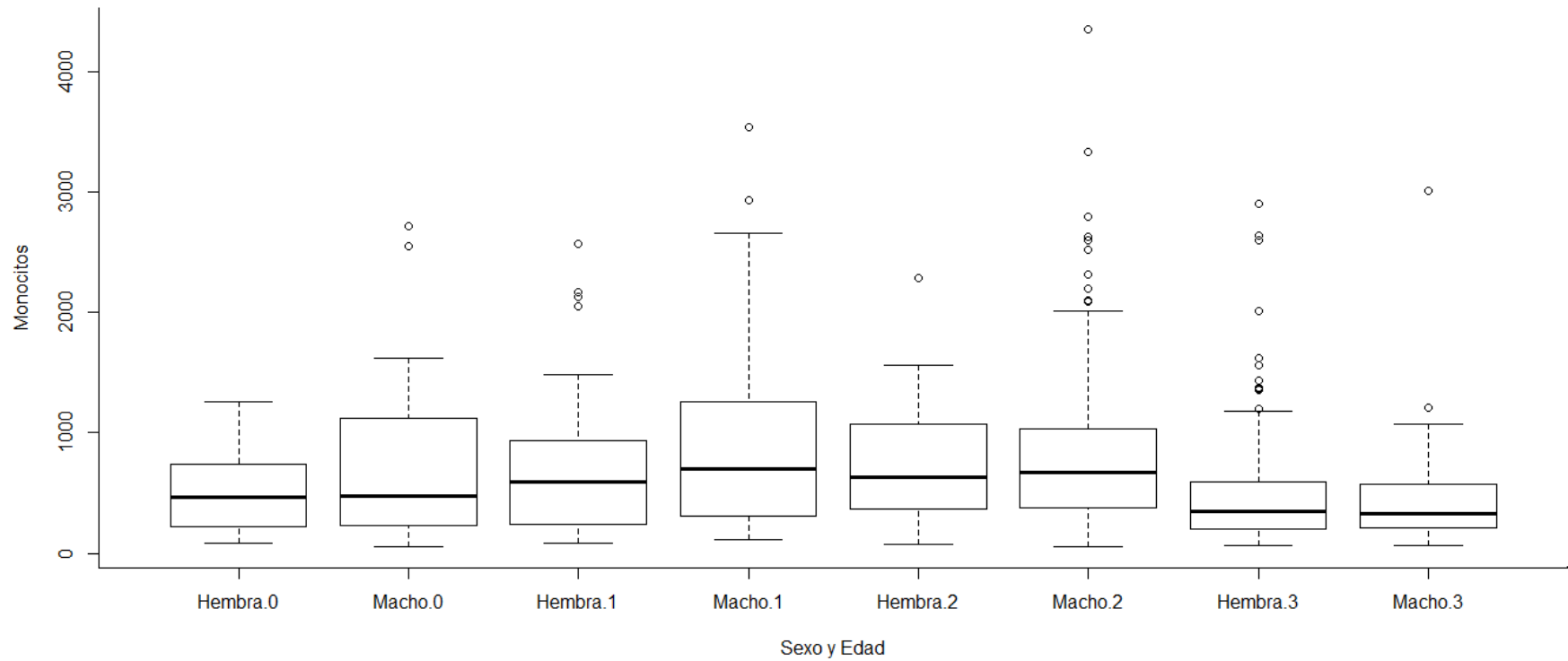


Figura 39. Promedio de monocitos de machos y hembras de lobo marino de California de acuerdo a su edad 0) Cría, 1) Añero, 2) Subadulto y 3) Adulto

En el año de 1994 la neumonía fue la causa principal de varamientos, en 1995 septicemia, leptospirosis y carcinoma UG fueron las causas de varamiento. En 1996 y 1998 la neumonía fue una de las principales causas de varamiento y para 1997 y 1999 lo fue la infección por leptospira (figura 40).

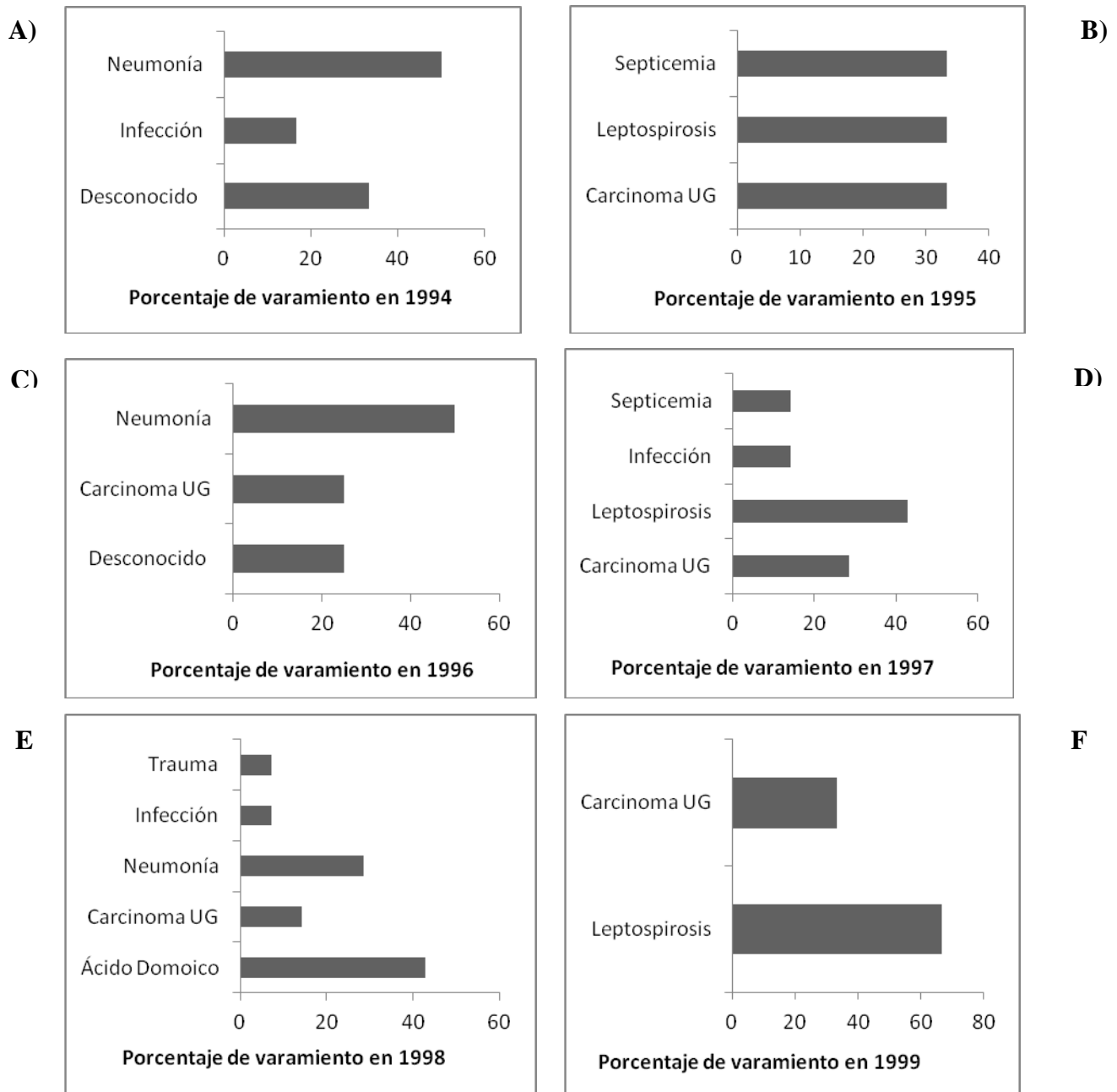
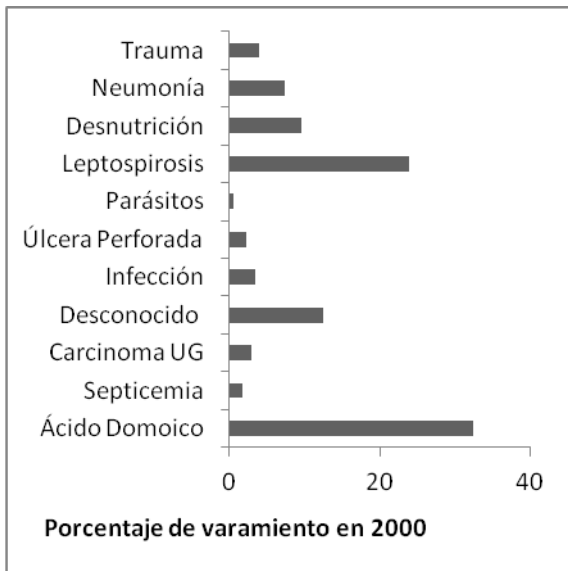
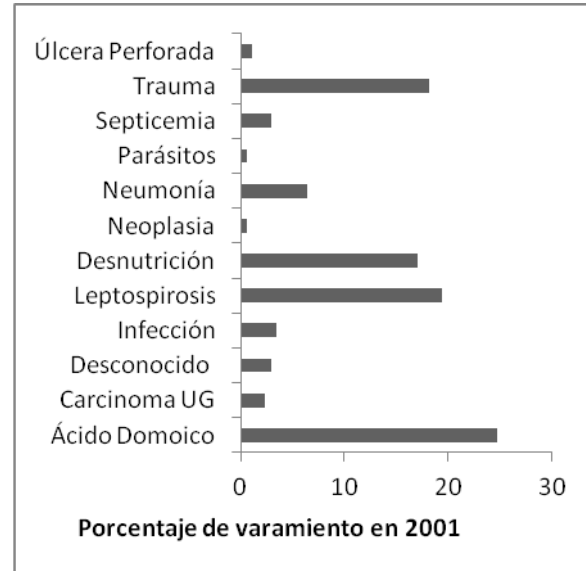
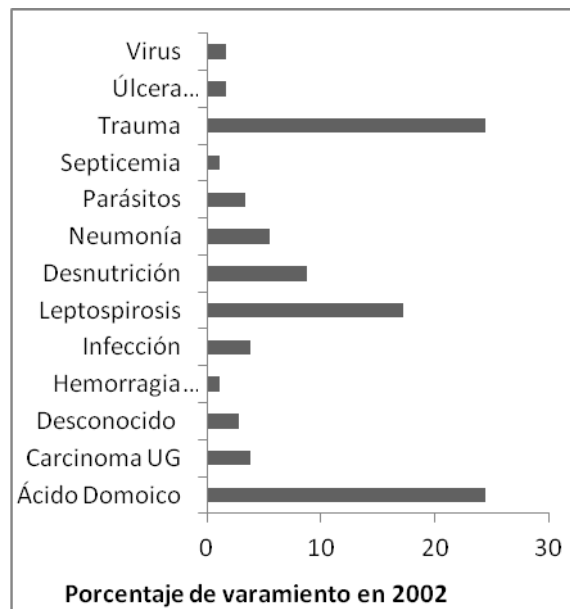
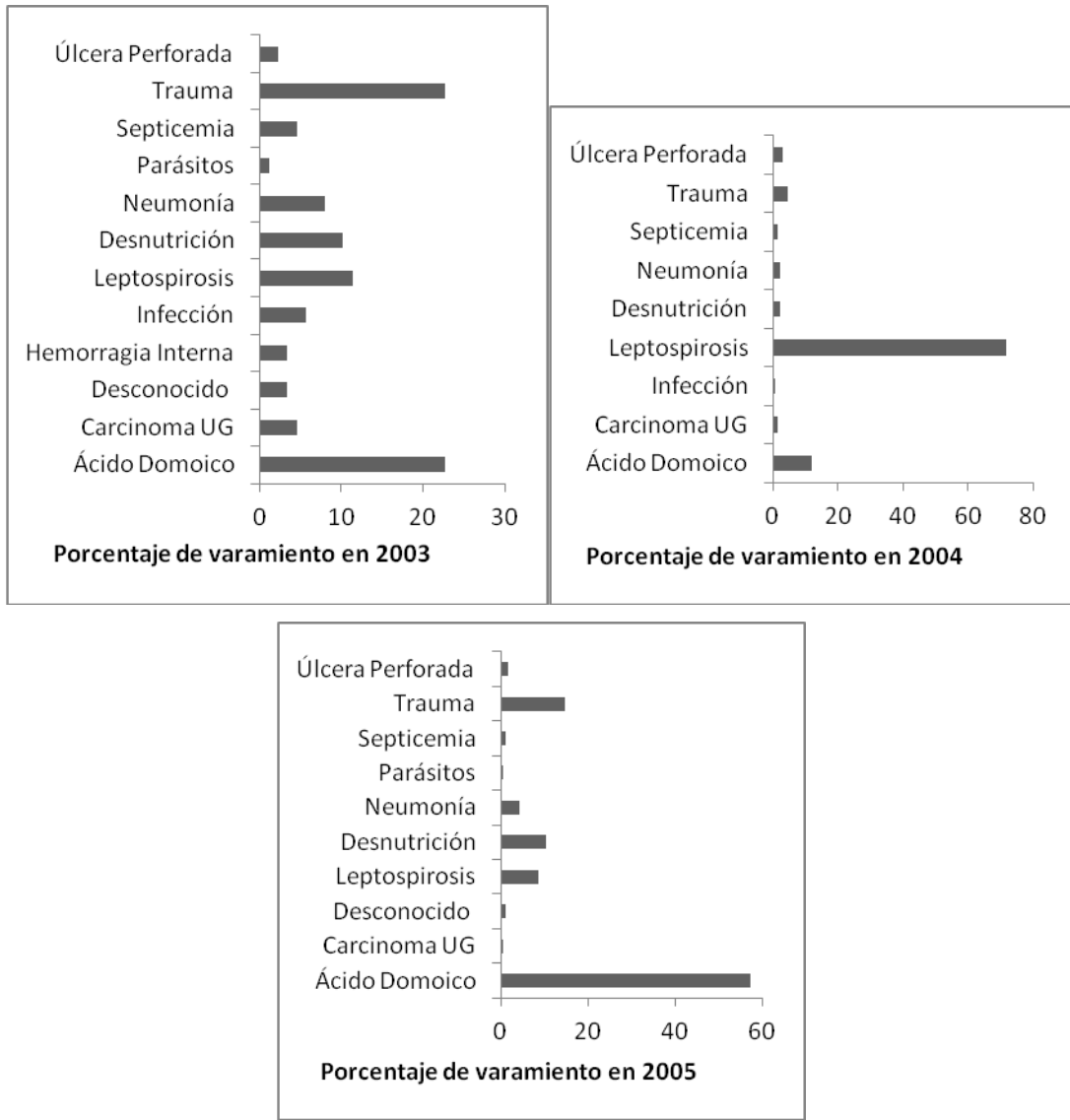


Figura 40. Causas de varamiento de lobo marino de California por año **A)** 1994 para 6 individuos, **B)** 1995 para 3 individuos, **C)** 1996 para cuatro individuos, **D)** 1997 para siete individuos, **E)** 1998 para catorce individuos y **F)** 1999 para tres individuos

A**B****C****D**



E

F

Fig 41. Causa de varamiento de lobo marino de California por año **A)** 2000 para ciento setenta y seis individuos, **B)** 2001 para ciento setenta individuos, **C)** 2002 para ciento ochenta individuos, **D)** 2003 para ochenta y ocho individuos, **E)** 2004 para ciento treinta y un individuos y **F)** 2005 para ciento ochenta y cuatro individuos.