



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

**ANORMALIDADES CELULARES Y PREVALENCIA DE OTHV-I Y
ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLÍTICOS EN TEJIDO GENITAL DE LOBOS
MARINOS DE CALIFORNIA (*Zalophus californianus*) EN LA REGION DE LAS
GRANDES ISLAS DEL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta:

Cecilia Barragán Vargas

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Presidente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Secretario

Firma

M. C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández
Sinodal

Firma

M. C. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Sinodal

Firma

M. C. Carlos Ramón Godínez Reyes
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2013
México

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



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

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

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

Bajo los siguientes términos:



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



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



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

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

Avisos:

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

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

**ANORMALIDADES CELULARES Y PREVALENCIA DE OTHV-I Y
ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLÍTICOS EN TEJIDO GENITAL DE LOBOS
MARINOS DE CALIFORNIA (*Zalophus californianus*) EN LA REGION DE LAS
GRANDES ISLAS DEL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO**

RESUMEN

Las causas del cáncer aún son poco entendidas, pero se sabe que la oncogénesis puede estar relacionada con infección de algunos microorganismos patógenos. El carcinoma urogenital (CUG) es un cáncer que afecta al lobo marino de California. Desde su reporte hace tres décadas, la prevalencia de CUG ha aumentado y el 18% de animales varados en el Pacífico Estadounidense (PE) lo presentan. En esa región geográfica el gammaherpesvirus otárico (OthV-1) se encontró en epitelio genital de individuos adultos con CUG. A la fecha, ni el CUG ni el virus se han reportado en el Golfo de California. En esta tesis se investigó la presencia de OthV-1, estreptococos beta-hemolíticos (SBH, también asociados estadísticamente con el CUG), Y anormalidades citológica, y se caracterizó la microbiota del tracto reproductivo del lobo marino en el Golfo de California. En 60 muestras de epitelio genital se buscó la presencia de ADN de OthV-1 y de SBH. Se analizó la morfología celular genital y se caracterizó de manera morfológica y bioquímica las colonias bacterianas genitales aisladas en medios de cultivo. El OthV-1 se detectó en 6.6% de las muestras y SBH en 58.33%. Se encontraron 13 tipos celulares incluyendo células precancerígenas (coilocitos, típicas de cáncer asociado a agentes patógenos en humanos). El 50% de las muestras positivas a OthV-1 presentaban anormalidades celulares. El número de coilocitos fue mayor en individuos con infección simultánea de OthV-1 y SBH (GLM, $p=0.0137$). Se encontraron morfotipos bacterianos que incluyeron diversos grupos de bacterias. Sugerimos que la reparación de células transformadas en el lobo marino de California que habita en el Golfo de California es eficiente y no permite el desarrollo de CUG. Es probable que esto se deba a la menor concentración de contaminantes orgánicos persistentes en el agua, comparativamente con lo reportado para el PE. En cuanto a los morfotipos bacterianos encontrados, estos posiblemente contienen especies de bacterias patógenas oportunistas que pudieran provocar infecciones severas en animales inmunosuprimidos, pero al ser este trabajo un primer acercamiento hacia la caracterización bacteriana genital de la especie en el Golfo de California, es necesario continuar con dichos estudios para generar información más concreta.

Palabras clave: Cáncer urogenital, *Zalophus californianus*, OthV-1, Estreptococos beta-hemolíticos, morfotipos bacterianos.

CELULAR ABNORMALITIES AND PREVALENCE OF OTHV-1 AND BETA-HEMOLYTIC STREPTOCOCCI IN GENITAL EPITHELIUM OF CALIFORNIA SEA LIONS (*Zalophus californianus*) IN THE MIDRIFF REGION OF THE GULF OF CALIFORNIA, MEXICO.

ABSTRACT

The causes of cancer are still poorly understood, but it is known that tumorigenesis could be related to infection by pathogenic microorganisms. Urogenital carcinoma (UGC) is a type of cancer that affects the California sea lion. Since its initial report three decades ago, the prevalence of UGC has increased and currently 18% of animals stranded in the US Pacific coastline (USP) present this condition. Otarine gammaherpesvirus (OthV -I) was found in genital epithelium of adult sea lion with UGC. To date, neither the UGC or the virus have been reported in sea lions from the Gulf of California. I investigated the presence of OthV-I, beta-hemolytic streptococci (BHS, also associated with UGC), cytological abnormalities and other bacterial microorganisms in the reproductive tract of 60 sea lions from the Gulf of California. Genital cell morphology was analyzed, and pathogen DNA was searched for in genital tissue. Also, bacterial colonies were characterized using stains and biochemical typing. OthV-I was detected in 6.6 % of the samples and Streptococci in 58.33%. I found 13 cell types including precancerous cells (koilocytes typical of cancer associated with human pathogens). Half (50 %) of the samples positive to OthV-I had cellular abnormalities. Koilocyte number was greater in individuals with a simultaneous OthV-1 and SBH infection (GLM, $p = 0.0137$). In terms of the characterization of bacteria genital, various morphotypes were detected. My results suggest that cellular transformation occurs and that the transformed cells ARE repaired efficiently in sea lions from the Gulf of California, thus inhibiting the development of UGC. This is likely due to the lower concentration of organic contaminants in this region, compared with the USP. The bacterial morphotypes found may contain groups of opportunistic pathogens that could cause severe infections, but being these theses a first approach to genital bacterial characterization in sea lions from this region, it is necessary to continue studies to generate more specific information on the regard.

Keywords: Urogenital cancer, *Zalophus californianus*, OthV-I, Beta-hemolytic Streptococci, Bacterial morphotypes.

DECICATORIAS

A mis padres y mis hermanas quienes han sido mi apoyo toda la vida. Quienes siempre han apoyado mis sueños y han permitido que se hagan realidad. Agradezco que a pesar de las inclemencias que hemos vivido como familia, la vida nos dé la oportunidad de seguir juntos y unidos con amor antes de todo.

Agradezco a la capacidad que nos brinda la vida de recordar, porque es quien permite tener presentes los recuerdos de una vida pasada, la cual me da la oportunidad de revivir la felicidad junto a mi hermana que ya no está presente como un mortal humano.

También dedico mi trabajo a Karina, quien creyó en mí y me dio la oportunidad de elaborar un trabajo tan apasionante y lleno de vivencias inolvidables y quien además de ser mi guía académica, me ha brindado su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

De alguna u otra forma son muchas las personas que han participado en este proceso conmigo. Quiero dar las gracias a todos aquellos que me ayudaron con muy buenos consejos para la elaboración de este proyecto y a quienes estuvieron presentes aunque fuera solo para escucharme en momentos de desesperación.

- A la Universidad Autónoma de Querétaro por todo el apoyo y conocimientos brindados que me permitieron y ayudaron a dar un paso más en mi vida académica.
- Al apoyo que me dio PROMEP para sustentar gastos necesarios.
- CONACYT, quien brindó apoyo para la realización del trabajo de campo.
- A Karina mi directora de tesis que me guió con sus conocimientos y me ayudó a encontrar cuales son las cosas importantes en mi vida.
- Agradezco también al personal de la CONANP, Lalo, Carlos quienes apoyaron con gran esfuerzo en las capturas. A Hugo, Rito y Joel quienes además de su apoyo en las capturas se encargaron de llevarnos sanos y salvos siempre a tierra. Y a todos ellos en general porque con sus chistes y buen sentido del humor me hicieron reír tanto.
- Mis amigos Camila y Anaí (mis cucharitas), Luis, Jorge, Wendy, Adriana y Oscar, gracias por estar apoyándome en la elaboración de este proyecto del cual forman parte y además gracias por haber formado un equipo de trabajo increíble y divertido que me hizo darme cuenta lo importante que es formar una familia de amistad.
- En especial y de lo más profundo de mi ser, quiero agradecer a Christian por ser parte fundamental en mi vida durante todo este proceso de formación. Que además de apoyarme con ideas, escucharme siempre y estar en todo momento en mi vida, por su amor incondicional que siempre me dio.
- A todos mis amigos conocidos como “Chukis” por que formaron parte de toda la trayectoria académica y personal para poder llegar hasta este punto de mi vida.
- Mis profesores de la Licenciatura quienes me apoyaron con consejos constructivos para llevar a cabo este proyecto
- A mis amigos Aldo y Mauricio que estuvieron conmigo hasta la última letra de mi tesis haciéndome la vida mas sencilla!.

CONTENIDO

| | | |
|--------|---|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | ANTECEDENTES | 6 |
| II.1 | Generalidades del cáncer | 6 |
| II.1.1 | Mecanismos genéticos de oncogénesis | 6 |
| II.1.2 | Mecanismos de reparación de daño celular | 8 |
| II.1.3 | Algunos patógenos asociados al desarrollo de cáncer | 9 |
| II.1.4 | El cáncer en animales silvestres | 11 |
| II.2 | El lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) como modelo de estudio ... | 12 |
| II.2.1 | Distribución y tamaño poblacional | 12 |
| II.2.2 | Historia de vida | 13 |
| II.2.3 | Causas de mortalidad en las poblaciones de lobo marino de California | 14 |
| III. | HIPÓTESIS | 21 |
| VI. | OBJETIVOS | 22 |
| IV.1 | Objetivo General | 22 |
| IV.2 | Objetivos particulares | 22 |
| V. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| V.1 | Área de estudio | 23 |
| V.2 | Logística de las salidas de campo | 24 |
| V.3 | Colecta de muestras | 24 |
| V.4 | Análisis de muestras | 27 |
| V.4.1 | Análisis molecular | 30 |
| V.4.2 | Caracterización celular de las improntas genitales | 35 |
| V.5 | Análisis estadístico | 37 |

| | |
|--|----|
| VI. RESULTADOS | 40 |
| VI.1 Presencia de ADN de bacterias genitales | 40 |
| VI.2 Presencia de ADN de OtHV-I..... | 41 |
| VI.3 Presencia de ADN de estreptococos beta-hemolíticos | 43 |
| VI.4 Diferencias en la prevalencia de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos entre sexos y categorías de edad. | 43 |
| VI.5 Diversidad de grupos bacterianos genitales y diferencias entre edad y sexo | 45 |
| VI.6 Tipos celulares genitales..... | 48 |
| VI.6.1 Presencia, intensidad y prevalencia de los tipos celulares..... | 50 |
| VI.7. La relación entre la infección por OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos con los tipos celulares genitales. | 56 |
| VII. DISCUSIÓN | 59 |
| VIII. CONCLUSIONES | 66 |
| IX. PERSPECTIVAS | 67 |
| LITERATURA CITADA..... | 68 |
| Anexo 1..... | 79 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1 Tipos de cáncer asociados a virus..... | 11 |
| Cuadro 2 Individuos por temporada, edad y sexo..... | 25 |
| Cuadro 3 Cantidad y pureza de ADN..... | 31 |
| Cuadro 4 Valores de similitud de la secuencia obtenida..... | 42 |
| Cuadro 5 Prevalencia de OtHV-1 y estreptococos beta-hemolíticos..... | 44 |
| Cuadro 6 Valores de “p” por prueba de Fisher exacta y X^2 de infección por OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos..... | 44 |
| Cuadro 7 Clasificación de morfotipos..... | 46 |
| Cuadro 8 Valores de “p” por prueba de Fisher exacta y X^2 de morfotipos bacterianos..... | 47 |
| Cuadro 9 Descripción de tipos celulares..... | 48 |
| Cuadro 10 Intensidad y variación de tipos celulares..... | 50 |
| Cuadro 11 Prevalencia de tipos celulares en la temporada de enero..... | 53 |
| Cuadro 12 Prevalencia de tipos celulares en la temporada de julio..... | 54 |
| Cuadro 13 Prevalencia de tipos celulares en la temporada de octubre..... | 55 |
| Cuadro 14 Modelo Generalizado Lineal de tipos celulares..... | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig 1 Protrusión vulvar a causa de carcinoma urogenital en hembra de <i>Zalophus californianus</i> | 16 |
| Fig 2 Modelo que representa los factores y su posible interacción con el desarrollo de cáncer urogenital en el lobo marino de California..... | 20 |
| Fig 3 Imagen del área de muestreo..... | 23 |
| Fig 4 Colecta de muestras..... | 26 |
| Fig 5 Electroforesis con bandas positivas para bacterias genitales..... | 40 |
| Fig 6 Electroforesis de productor de PCR para fragmento del gen Dpol de OtHV-1..... | 41 |
| Fig 7 Alineamiento de secuencia obtenida con gen Dpol de herpesvirus de <i>Zalophus californianus</i> | 42 |
| Fig 8 Electroforesis de productos de PCR con bandas positivas para el gen 16ARNr de <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos..... | 43 |
| Fig 9 Prevalencia de infección combinada por OtHV-I y <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos..... | 45 |
| Fig 10 Proporción de morfotipos bacterianos..... | 47 |
| Fig 11 Fotografías de tipos celulares detectados..... | 49 |
| Fig 12 Histogramas de frecuencia de tipos celulares..... | 52 |
| Fig 13 Infección simultánea entre OtHV-I y <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos asociados a células coilocíticas..... | 58 |
| Fig 14 Asociaciones entre infecciones genitales y tipos celulares..... | 57 |

I. INTRODUCCIÓN

Los cambios demográficos y ambientales han repercutido en la calidad de vida de las especies. Sin duda, las enfermedades infecciosas han estado presentes desde hace siglos y su efecto a través del espacio y tiempo han generado que una gran parte de las investigaciones se enfoquen a su estudio (Solidoro, 2006). El estudio de las enfermedades infecciosas requiere de un análisis que permita su detección para determinar parámetros como la prevalencia, mecanismos de propagación y su distribución, para así poder dar seguimiento a su monitoreo y tener más conocimiento de las enfermedades presentes (Nusser y cols. 2008).

El conocimiento previo sobre la presencia de enfermedades y agentes patógenos en una población natural resulta ser muy útil cuando se requiere investigar epidemias o determinar la causa de eventos de mortalidad inusuales, así como para tener una acertada interpretación de los resultados obtenidos en dichas investigaciones (Gulland y Hall, 2007). Esto porque las enfermedades que causan mortalidad masiva pueden tener impactos significativos en las poblaciones. Ejemplos de éstos son los brotes de morbilivirus, herpesvirus, influenza A, adenovirus y leptospirosis, que han ocasionado alta mortalidad en algunas poblaciones de mamíferos marinos como lo son los pinnípedos (Mackereth y cols. 2005).

A pesar de que la visión clásica de la dinámica de poblaciones consideraba que las enfermedades infecciosas tenían una distribución aleatoria en la población, cada vez hay más estudios que demuestran que la mortalidad asociada a infecciones en las poblaciones naturales puede deberse a fenómenos no estocásticos, y que algunos individuos; por ejemplo, aquellos con mayor nivel de consanguinidad, pueden actuar como reservorios más eficaces de agentes infecciosos, por lo cual los patógenos pueden ser un factor determinante de las tasas de mortalidad de las poblaciones. Esto ha quedado en evidencia en estudios realizados en algunas poblaciones naturales de vertebrados, como el lobo marino de California (Acevedo-Whitehouse y cols. 2003) y la ballena piloto (Valssechi y Zanelatto, 2003) entre otros. Algunas investigaciones demuestran que las poblaciones de foca común

(*Phoca vitulina*) que habitan en el mar del norte fueron devastadas por un morbilivirus que mató a más de 18000 individuos en 1988 y tuvo un nuevo registro de alta mortalidad en el año 2002 (Heide-Jorgensen y cols. 1992). También se tienen documentadas en este mismo año epidemias causadas por la bacteria *Klebsiella pneumoniae* en lobos marinos de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*) que se prevé tendrá un impacto sobre la dinámica poblacional de esta especie amenazada (Mackereth y cols. 2005).

El estado sanitario de los mamíferos marinos en relación con los agentes patógenos es en gran parte desconocido. Esto se debe principalmente debido a la dificultad de obtener muestras para el diagnóstico de mamíferos silvestres, particularmente para organismos como los cetáceos que son completamente acuáticos, a diferencia de los pinnípedos que llevan a cabo algunas de sus actividades en tierra (Acevedo-Whitehouse y cols. 2010). En estos últimos hay además posibilidades de que patógenos típicos de mamíferos terrestres puedan entrar en la población por sus comportamientos anfibios y hábitos costeros (Duignan, 2002).

En la década de los años 70s y 80s, los reportes de neoplasias en mamíferos marinos no eran comunes, y en pinnípedos eran particularmente escasos (Gulland y cols. 1996), pero en las últimas tres décadas el número de casos de cáncer en distintas especies de mamíferos marinos ha ido en incremento (Howard y cols. 1983; Gulland y cols. 2001) con reportes de hasta 50% de prevalencia en poblaciones de belugas (*Delphinapterus leucas*) para el año de 1994 (De Guise y cols. 1994). Dado que los reportes de tumores cancerígenos en mamíferos marinos eran relativamente escasos, tampoco se tenían datos sobre las causas del desarrollo de estos tumores, pero sí se comenzaron a reportar factores en asociación con los tumores, como los contaminantes químicos en el ambiente marino (Howard y cols. 1983; Gulland y cols. 1996).

Meta-análisis sobre neoplasias en mamíferos marinos han puesto en evidencia el dramático incremento de algunos tipos de cáncer. Estas muestran que para especies como la beluga y el lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) hay un alto número de casos de tumores (Gulland y cols. 2001). Ciertamente, los mamíferos marinos están expuestos a una variedad de factores potencialmente oncogénicos y la susceptibilidad o

resistencia a estos factores podría estar modulada por la edad y la genética de los individuos (Gulland y cols. 2001; McAloose y cols. 2009).

Desde su descripción en 1980 (Brown y cols. 1980) el cáncer urogenital (CUG) del lobo marino de California ha aumentado en los últimos 30 años (Buckles y cols. 2006). Aunque esta enfermedad está presente en el 18% de los lobos marinos varados en las costas del Pacífico Estadounidense (PE) a los que se les practica una necropsia (Gulland y cols. 1996), no se sabe cuál es la prevalencia del CUG en animales de vida silvestre.

En términos de la etiología de CUG, a semejanza de la mayoría de los tipos de cáncer, éste se genera por una combinación de factores. Entre ellos están factores genéticos como la endogamia donde los animales con niveles de heterocigocidad más bajos son más propensos al desarrollo de CUG (Acevedo Whitehouse y cols. 2003), o genes específicos como el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (Zaca-DRB; Bowen y cols. 2004), donde los individuos con el genotipo Zaca-DRB-A tienen casi cuatro veces mayor probabilidad de desarrollar CUG a diferencia de los otros genotipos (Bowen y cols. 2005).

Los pesticidas organoclorados también juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer. Los compuestos bifenil policlorados (PCBs) y dicloro difenil tricloroetano (DDTs) son contaminantes orgánicos que persisten en el ambiente marino y que son frecuentemente detectados en los tejidos de mamíferos marinos. Se sabe que la exposición a estos contaminantes tiene efectos negativos en la capacidad reproductiva y en la función inmune de los pinnípedos (Ross y cols. 1996). El efecto potencial de estos contaminantes hacia el desarrollo del CUG en lobos marinos de las costas de California se mostró al detectar altas concentraciones de PCBs y DDTs en la grasa de los organismos con cáncer. Se mostró que los animales que murieron por esta patología tenían una capa de grasa más delgada, por lo cual hubo una mayor concentración de pesticidas y por tanto una asociación significativa con la muerte por CUG (Ylitalo y cols. 2005).

En cuanto a patógenos emergentes asociados con el cáncer en el lobo marino de California, la presencia de *Streptococcus* beta-hemolíticos (EBH) en el tracto genital de lobos marinos con cáncer llevó a pensar en una asociación etiológica, ya que otras especies bacterianas

reportadas en los estudios no mostraron asociaciones significativas con el CUG (Johnson y cols. 2006).

Por último, se ha demostrado la presencia de un herpesvirus (OtHV-I) en tejidos de lobos marinos con carcinoma. Este virus fue clasificado dentro de la familia de los *Gammaherpesvirinae*, género *Radinovirus* (Lipscomb y cols. 2000). El OtHV-I inicialmente se asoció con el desarrollo de CUG debido a su localización en el epitelio genital y nódulos linfáticos de lobos con CUG más frecuentemente que en los tejidos de animales que no presentaban evidencia de esta condición patológica (Lipscomb y cols. 2000; Buckles y cols. 2006), lo que sugería una posible asociación etiológica. Como el virus se localiza frecuentemente en el epitelio genital de los animales adultos, se ha sugerido una transmisión de tipo sexual para este patógeno (King y cols. 2002; Buckles y cols. 2006). Sin embargo hay cierta evidencia que OtHV-I puede ser transmitido por vía vertical durante el parto pues ha sido encontrado en el epitelio oral y genital de crías de lobo marino de California (Buckles y cols. 2007).

A pesar de que el CUG ha sido detectado crecientemente en lobos marinos de las costas del PE, resulta interesante que en los lobos marinos de California que residen en el Golfo de California no se ha detectado ni un solo caso con esta patología. Si bien se sabe que los niveles de endogamia son semejantes entre lobos marinos de las costas PE y los del Golfo de California (Acevedo-Whitehouse, 2004), y que no hay una diferencia significativa en la frecuencia de los alelos del Zaca-DRB.A entre ambas regiones (Bowen y cols. 2005), resulta interesante que las concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes son varias órdenes de magnitud menores en tejido de lobos marinos de California del Golfo de California que los del PE (Niño-Torres y cols. 2009). A la fecha no se ha determinado la presencia de OtHV-I ni se ha caracterizado la carga bacteriana genital en los lobos del Golfo de California.

En este sentido, es válido plantearse que la ausencia de CUG en las loberas del Golfo de California responda a la ausencia de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos en el tracto urogenital de estos animales. Con este trabajo de investigación pretendemos determinar la presencia o ausencia de ADN de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos como posibles agentes infecciosos implicados en el desarrollo de CUG. Por medio de metodología basada

en la extracción de ADN y amplificación de fragmentos por la reacción en cadena de la polimerasa se buscó determinar la prevalencia de dichos agentes así como caracterizar la morfología celular del tracto urogenital para tener un diagnóstico más detallado sobre el CUG en el Golfo de California.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es un conjunto de patologías caracterizada por la proliferación anormal de células desdiferenciadas que se desarrolla por la acumulación sucesiva de alteraciones genéticas y tiene la capacidad de evadir los mecanismos de regulación homeostática de los organismos (Andreu y cols. 2005; Willingham y cols. 2004). Dicha patología es el resultado de procesos como la proliferación anormal de células en un tejido, evento conocido como *neoplasia*, seguido de la invasión de tejidos distintos del sitio de origen de las células transformadas, proceso que se conoce como *metástasis* (Muñoz, 1997). Las causas de la transformación cancerígena aún son difíciles de establecer con certeza, pero a partir de estudios en humanos, se sabe que el desarrollo de estas patologías está influenciado por factores genéticos, inmunes, infecciosos y tóxicos (Cruz y cols. 2004).

Nuestro organismo se compone por alrededor de 200 tipos de células que potencialmente pueden ser transformadas y dar lugar al desarrollo de tumores cancerígenos. El tipo celular donde se origina esa transformación neoplásica dará lugar al nombre del cáncer. Por ejemplo, aquellas neoplasias originadas en células epiteliales se denominan carcinomas, mismas que componen aproximadamente el 90% de las neoplasias en humanos (Muñoz, 1997). Otros tipos de cánceres son las leucemias, originados por células de la sangre; sarcomas, del tejido conjuntivo o muscular; y neuroblastomas, del sistema nervioso (Muñoz, 1997).

II.1.1 Mecanismos genéticos de oncogénesis

El funcionamiento de las células es coordinado estrictamente por procesos de diferenciación y proliferación, pero cuando las células escapan del balance entre la división celular y diferenciación, el equilibrio celular puede verse afectado con el comienzo de una etapa de proliferación y desdiferenciación descontrolada (Ramírez y cols. 1999; Andreu y cols. 2005). En conjunto con mutaciones, este desequilibrio puede conducir a que los genes

reguladores de división y diferenciación alteren sus funciones y conduzcan a procesos oncogénicos (Andreu y cols. 2005). Las mutaciones representan un riesgo a nivel de genes las cuales pueden ser hereditarias o esporádicas cuando el genoma se ve afectado por influencia del entorno o por la sustitución, adición y/o deleciones a nivel de nucleótidos que pueden inducir la transformación celular. De esta forma, las células poseen mecanismos encargados de reparar daños en el ADN o eliminar células dañadas (Andreu y cols. 2005; Meza-Junco y cols. 2006).

La transformación celular anormal puede deberse a la activación, inactivación o mutación en genes esenciales para la división y/o diferenciación. Cuando son alterados, estos genes se conocen como oncogenes y como proto-oncogenes cuando no están alterados pero requieren de activación para conducir a cáncer (Ramírez y cols. 1999; Meza-Junco y cols. 2006). La activación en muchos casos es dada por la presencia de genes virales que transforman la estructura o expresión de los proto-oncogenes. A cambio, los oncogenes heredados pueden presentarse como genes dominantes y contribuir o no a la proliferación anormal y al desarrollo de cáncer (Meza-Junco y cols. 2006).

Dentro del mismo contexto genético, existen también los genes supresores de tumores. Estos genes tienen la capacidad de parar la proliferación de células anormales. (Ramírez y cols. 2006). Los genes supresores de tumores funcionan como reguladores negativos y la pérdida de un alelo no impacta en el funcionamiento de tal gen de forma que se requeriría de mutación en los dos alelos para que tuvieran una pérdida de función (Meza-Junco y cols. 2006).

Como puede verse, el desarrollo del cáncer depende en gran medida de una regulación genética correcta y en la mayoría de los casos requiere de otros factores como los ambientales, la presencia de patógenos y la actividad del sistema inmune de los organismos para que haya una transformación celular anormal (Ball, 1999).

II.1.2 Mecanismos de reparación de daño celular

Siendo el cáncer un proceso de transformación celular, es indispensable conocer los mecanismos que permitan a las células repararse o autodestruirse (Wang, 1999). Dentro de los mecanismos celulares encargados de reparar daño celular están la apoptosis y los componentes del sistema inmune que actúan para mantener el equilibrio de la proliferación celular actuando en la eliminación de dichas células con mal funcionamiento y/o proliferación anormal (Fridman y cols. 2003; Dasgupta, 2000).

La apoptosis es el proceso encargado de dar muerte a células con daño celular impidiendo que la integridad de los tejidos se vea afectada (Bellamy, 1997). Cuando es inadecuado, este mecanismo de reparación se asocia con la ocurrencia de distintas enfermedades. En el caso del cáncer la proliferación excesiva de células transformadas no es contrarrestada eficientemente por la apoptosis debido a que genes reguladores de apoptosis pueden sufrir mutaciones que inactivan o activan su actividad y por tanto inhiben la apoptosis de tal forma que la proliferación celular continúa hasta generar cáncer (Ramírez y cols. 1999).

Este mecanismo de reparación celular actúa por dos vías principales, una intrínseca y otra extrínseca, que tienen la capacidad de regular a nivel de receptores, ligandos, moléculas y proteínas. En el área intracelular están presentes proteínas que participan como segundos mensajeros encargados de traducir señales extracelulares así como de transmitir las señales de la apoptosis (Ramírez y cols. 1999). Mientras tanto, la vía extrínseca puede estar regulada por factores como inhibidores de proteínas apoptóticas que a su vez afectan a otros elementos que inician y ejecutan la apoptosis. Dicho mecanismo actúa como una cascada de señalización, puesto que desde el área extracelular se generan señales que entran a la célula y se desencadena una serie de procesos de activación é inactivación de moléculas y proteínas para que la célula pueda autodestruirse (Cascales, 2003).

De esta forma, la apoptosis es un mecanismo celular considerado como *muerte fisiológica* ante la necesidad de contrarrestar posibles patologías como el cáncer. El conocimiento de apoptosis, desde los receptores involucrados hasta su ejecutores directos, ha permitido dilucidar un poco de la complejidad del cáncer (Jordán, 2003).

Respecto a los mecanismos encargados de la vigilancia del daño celular, el sistema inmune juega un papel fundamental, ya que se encarga de eliminar células anormales para evitar su proliferación y por consiguiente reducir la probabilidad de desarrollar patologías como el cáncer (Rincón y cols. 2007). Las respuestas de vigilancia del sistema inmune son principalmente activadas por la presencia de un agente infeccioso, como ocurre con el Virus del Papiloma Humano (VPH) que de no ser resuelto puede desencadenar el desarrollo de cáncer cervico-uterino (Ball 1999; Rincón y cols. 2007).

Las respuestas inmunes ante desafíos infecciosos asociados al desarrollo de cáncer resultan de interacciones entre mecanismos innatos y adaptativos que comienza con procesos inflamatorios genéricos que sirven de alerta y activan a los neutrófilos y macrófagos que fagocitan a las células comprometidas por la infección (Rincón y cols. 2007). Subsecuentemente, son activadas las células NK (*natural killer*) que destruyen células infectadas o transformadas mediante la inducción de lisis celular (Nacayama y cols. 2011).

La activación del sistema inmune ante desafíos como infecciones por VPH, resulta ser una compleja confrontación entre el agente infeccioso y el sistema inmune. Cuando los patógenos logran evadir las respuestas inmunes, las probabilidades de desarrollar cáncer incrementan (Rincón y cols. 2007).

II.1.3 Algunos patógenos asociados al desarrollo de cáncer.

Varios agentes infecciosos juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer. La presencia de ADN de virus potencialmente oncogénicos como el VPH, Herpesvirus tipo II (VSH-2) y agentes bacterianos como *Streptococcus* beta-hemolíticos y algunas especies de *Chlamydia*, entre otros, pueden descontrolar a la célula y dar lugar al desarrollo de cáncer (Bosch y cols. 1997; Cruz y cols. 2004). En general, los estudios dedicados a explicar la forma en que los virus logran incorporar sus genes infectando a sus hospederos, en gran medida han permitido dilucidar que estos agentes están asociados al desarrollo de cáncer (Meza-Junco y cols. 2006).

Los estreptococos beta-hemolíticos son por ejemplo, un tipo de bacterias asociadas al desarrollo de cáncer cervical. A pesar de ser microorganismos que forman parte de la flora vagina comúnmente en las mujeres, especialmente *Streptococcus agalactiae* ha sido fuertemente asociada con cáncer cervical. (Grupta y cols. 2013).

Chlamydia trachomatis es una especie de bacteria que afecta en gran medida el tracto genital en mujeres y hombres. El primer sitio de infección en mujeres es el endocervix donde el patógeno se divide e infecta las células de este epitelio. Se estima que existen 90 millones de casos por año con infección de distintos niveles por *C. trachomatis* y en poblaciones del sur de Asia estudios recientes muestran que el número de casos de infección por año han aumentado a 60 millones mediante transmisión sexual principalmente. Dicho patógeno en estudios recientes ha confirmado que sí existe una co-infección con el VPH se incrementa el riesgo de transformaciones celulares a nivel cervical (Marks y Lycke, 2008).

El VPH es un virus relacionado con el cáncer cervical en humanos (Cerigo y cols. 2013). Se estima que VPH cuenta con aproximadamente 70 serotipos identificados según el nivel de riesgo por su potencial oncogénico. Para niveles de alto riesgo los serotipos 16 y 18 son los de suma importancia (Koshiol y cols. 2008). Desde trabajos realizados años atrás, se sabe también que existen un periodo largo entre la infección inicial y el desarrollo de cáncer, pues es desarrollo de éste puede llevar consigo otros factores a parte de la presencia de VPH (Koshiol y cols. 2008; Cerigo y cols. 2013; Ball, 1999).

Los herpesvirus son otros virus asociados con el desarrollo de cáncer, especialmente los herpesvirus tipo I (HSV-I) y tipo II (HSV-II). Son de gran relevancia por ser de transmisión vertical, donde los neonatos pueden tener serias complicaciones por esta infección como inestabilidad en el neurodesarrollo y, en algunos casos, la muerte (Brown y cols. 1997).

Respecto a la presencia de HSV tipo I y II en, estudios con mujeres, al igual que con VPH se han realizado estudios donde se ha confirmado la presencia de ADN de HSV I y II en mujeres con distintos grados de displasia cervical. Lo más interesante que se observó fue una co-infección por VPH y HSV tipo II. Dicha asociación se mostró en mujeres con

neoplasia cervical intraepitelial y las que ya presentaban carcinomas. Por esto, se propuso que la coinfección es un factor ligado al desarrollo de cáncer cervical (Zhao y cols. 2012).

II.1.4 El cáncer en animales silvestres

McAloose y Newton (2009) en una revisión sobre cáncer en fauna silvestre, mencionan que esta patología es una importante causa de mortalidad en distintas especies silvestres afirmando que el impacto que tiene el cáncer en los individuos puede amenazar la viabilidad de las poblaciones. Por ejemplo, el cáncer facial contagioso del demonio de Tasmania, que desde su surgimiento hace un par de décadas, se ha propagado en la población hasta en un 65%, de tal suerte que ésta ha disminuido hasta en un 53% , ya que provoca alta mortalidad (Pycroft et al 2007).

Es bien sabido que algunos agentes infecciosos están asociados al desarrollo de tumores cancerígenos, y también se conocen muchos de los mecanismos que utilizan los agentes infecciosos para persistir en los hospederos, además de las posibles vías de transmisión de algunos de ellos (Cuadro 1).

Cuadro 1 Tipos de cáncer asociados a virus en distintas especies (Datos tomados de McAloose y Newton 2009)

| Especie | Virus asociado | Cáncer |
|--|-----------------------|----------------|
| Tortuga marina verde <i>Chelonia mydas</i> | Herpesvirus | Fibropapilomas |
| Pavo silvestre <i>Meleagris ocellata</i> | Gammaretrovirus | Linfomas |
| Beluga <i>Delphinapterus leucas</i> | Papilomavirus | Carcinoma |
| Lobo marino de California <i>Zalophus californianus</i> | Gama herpesvirus | Carcinoma |

Los casos de cáncer de fauna silvestre reportados y estudiados a la fecha, nos dan evidencia de cuán importante es tratar de comprender los procesos que conllevan al desarrollo de cáncer para que nos permitan potencialmente incorporar acciones en planes de manejo que permitan reducir la incidencia de esta patología.

II.2 El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) como modelo de estudio

Los pinnípedos son mamíferos carnívoros que se encuentran adaptados a la vida marina a pesar que varias de sus actividades son llevadas a cabo en tierra. Éstos mamíferos están representados por 34 especies de focas, lobos marinos, lobos finos y la morsa (King 1983). De las tres familias de Pinnípedos, Otariidae representa a 14 especies de lobos marinos y de lobos finos que se encuentran distribuidos en aguas templadas y subtropicales (King 1983; Zsteren 2006).

Los lobos marinos de California son una especie altamente gregaria que forma colonias y se distribuye sobre islas cercanas a la costa. Su territorio comprende una parte de tierra y una parte acuática, que usan principalmente para la alimentación y la termorregulación (Peterson y Bartholomew, 1967; García, 1992). Una de las características más representativas del lobo marino de California es que se encuentran cubiertos por pelaje espeso y una capa de tejido adiposo subcutáneo. Presentan un pabellón auditivo externo, y dos pares de glándulas mamarias además de que su estructura pélvica es móvil, lo cual les permite apoyar sus extremidades posteriores para poder desplazarse en tierra (Reijnders y cols. 1994).

II.2.1 Distribución y tamaño poblacional.

Zalophus californianus (Lesson 1828) tiene una distribución que abarca desde Columbia Británica en Canadá (51° N), hasta las costas de Jalisco (19° N), incluyendo algunas islas e

islotos del golfo de California en México (Zavala 1993; Zsteren 2006). En aguas mexicanas el lobo marino de California es el pinnípedo más abundante y de distribución más amplia habitando permanentemente en el Golfo de California (Mellink y Romero, 2005).

De acuerdo al último conteo se estima que la población total de lobos marinos de California fue entre 237,000 y 244,000 individuos (Carretta y cols. 2003). La población de lobos marinos en México se estimó entre los 25,000 y 30,000 individuos en los años 90, con 13 principales colonias reproductivas dentro del Golfo de California y dos en la costa noroccidental de México (Lowry y cols. 1991; Auriolles-Gamboia y Zavala-González, 1994).

II.2.2 Historia de vida

El sistema reproductivo de los lobos marinos de California es la poliginia, donde un macho puede copular con varias hembras. En este caso los machos delimitan un territorio acuático y las hembras que entran a éste territorio forman parte del harem del macho (Peterson y Bartholomew, 1967). La poliginia también está relacionada con el dimorfismo sexual, pues se considera la base de la competencia reproductiva que presenta esta especie. Los machos cuentan con caracteres anatómicos diferentes a los de las hembras (Bartholomew, 1970). El marcado dimorfismo sexual se presenta en la etapa adulta, caracterizada por una cresta sagital externa en los machos, quienes, además son de pelaje más oscuro que las hembras y tienen mayor tamaño incluyendo la presencia de dos caninos sumamente fuertes y de mayor tamaño (Bartholomew, 1970; Reijnders y cols. 1994).

Al igual que otros mamíferos los lobos marinos de California, paren una cría por año y en este caso las hembras de esta especie entran en estado estral después del parto a pesar de que continúen amamantando a su cría por un largo periodo (Coffey, 1977).

En cuanto a su alimentación, los lobos marinos de California explotan diversas presas en distintas profundidades de acuerdo con su área de distribución (Lowry y cols. 1991). Son especies generalistas que aprovechan las agrupaciones de presas que se encuentran más

abundantes y accesibles según la estación del año, por lo que su dieta varía temporal y geográficamente (Lowry y cols. 1991). Se alimentan de una gran variedad de organismos marinos como krill, crustáceos, moluscos, lampreas, pulpos, arenques, peces roca, macarelas, sardina entre otros (King, 1983; Mellink y Romero, 2005).

II.2.3 Causas de mortalidad en las poblaciones de lobo marino de California

Existen factores extrínsecos que pueden influir sobre las tendencias poblacionales de los lobos marinos. Entre estos, se encuentran la contaminación antropogénica con químicos persistentes, los disturbios provocados por los humanos, incluyendo el turismo, la caza ilegal, la captura incidental, y cambios en la disponibilidad del alimento además de enfermedades infecciosas (Szteren y Aurióles, 2006).

De acuerdo a su tamaño relativamente grande, y a sus hábitos anfibios, los lobos marinos de California fueron blanco del aprovechamiento comercial y de subsistencia, y se explotaron durante muchas décadas antes de que se implementaran leyes de protección de la especie (Zavala-González y Mellink, 2000). En el Golfo de California la especie sigue siendo sujeta a caza furtiva, aunque en menor medida. Los lobos marinos de California se han recuperado de la explotación pero las consecuencias de esta explotación en términos genéticos aún no se conocen del todo (Szteren y Aurióles, 2006).

En el Golfo de California el lobo marino de California comparte zonas de alimentación con la que utiliza la pesquería ribereña y comercial, misma que se lleva a cabo con redes agalleras, de cerco y atarraya, lo cual provoca frecuentemente enmallamientos (Gamboa y cols. 2003) En la actualidad, las actividades de los pescadores afecta sobre todo cuando los acercamientos hacia las áreas donde está esta especie (Gamboa y cols. 2003). El turismo actualmente está teniendo un mayor impacto aunque aparentemente no se observen los cambios a corto plazo. Dadas estas actividades, se considera que el ambiente donde habita y se reproduce esta especie está siendo deteriorado.

Los contaminantes inorgánicos y orgánicos persistentes también son factores que pueden afectar a la salud y viabilidad reproductiva de las poblaciones de lobos marinos de

California debido a que pueden ocasionar alteraciones fisiológicas y provocar procesos patológicos que llegan hasta la muerte (Ross y cols. 1996; Ylitalo y cols. 2005). Estudios recientes han detectado metales pesados en tejido de lobos marinos de California del Golfo de California (Szteren y Auriolles, 2006). Sin embargo, debido a que el grado de industrialización es comparativamente bajo en el Golfo de California, se sospecha que los contaminantes no sean un factor tan relevante en la salud de los lobos marinos, al contrario de lo que ocurre en las poblaciones del Pacífico Estadounidense (Szteren y Auriolles, 2006; Niño-Torres y cols. 2009).

A pesar de que se han estudiado las poblaciones de lobos marinos en las costas del Golfo de California desde los años 80s, las investigaciones se han centrado en cuestiones relacionadas con la historia natural y ecología poblacional, como aspectos de la dieta, distribución y taxonomía. Sin embargo, a la fecha se han realizado pocos esfuerzos para estudiar las enfermedades más comunes de estos animales en aguas mexicanas. A diferencia, las enfermedades de los lobos marinos de California residentes en aguas estadounidenses, se encuentran bien caracterizadas debido principalmente a la cercanía de las poblaciones con las zonas urbanizadas (Acevedo-Whitehouse, 2001; Gulland y cols. 1996). Los estudios sobre epidemiología y patología en esta especie han demostrado que son diversas las condiciones de enfermedad que pueden afectar la estabilidad y viabilidad de sus poblaciones. A continuación se describen algunas de las enfermedades más importantes que afectan a la especie:

- a) **Leptospirosis.** La leptospirosis es provocada por una bacteria espiroqueta nombrada *Leptospira interrogans*. Es una enfermedad zoonótica cosmopolita con una amplia variedad de hospederos mamíferos, desde humanos hasta especies silvestres (Gulland y cols. 1996). Los brotes epidémicos de esta enfermedad afectan a los lobos marinos de California provenientes de las loberas reproductivas de California, y han provocado la muerte de cientos de animales en cada brote, la primera de las cuales fue documentada en 1970 con una tasa de mortalidad muy alta (Vedros y cols. 1971). Desde entonces, con brotes cada cuatro a seis años, la leptospirosis parece mantenerse en la población como una enfermedad zoonótica entre periodos epidémicos (Lloyd-Smith y cols. 2007).

- b) **Uncinariasis.** Es una enfermedad infecciosa de relevancia poblacional para el lobo marino de California y otras especies de pinnípedos otáridos (Lyon y cols. 1997). La patogenicidad del nemátodo *Uncinaria* se debe a sus hábitos hematófagos en el intestino de las crías de lobo marino de California, en los que puede causar la muerte (Spraker y cols. 2007). A nivel poblacional, la mortalidad que ocasiona puede ser alta, llegando a ser de hasta el 50% en algunos años para algunas islas, particularmente cuando la infección se da en combinación con características adversas del medio ambiente y/o el estrés nutricional (Lyon y cols. 1997).
- c) **Carcinoma urogenital.** El carcinoma urogenital en lobo marino de California fue reportado alrededor de los años 80's, descrito como tumores neoplásicos (Landy, 1980; Howard y cols. 1983). Esta patología ha incrementado desde entonces. Se estima que para 1996 la prevalencia de cáncer urogenital en individuos que habían varado y muerto en las costas del Pacífico Estadounidense ya era de un 18% (Gulland y cols. 1996) (Fig. 1).

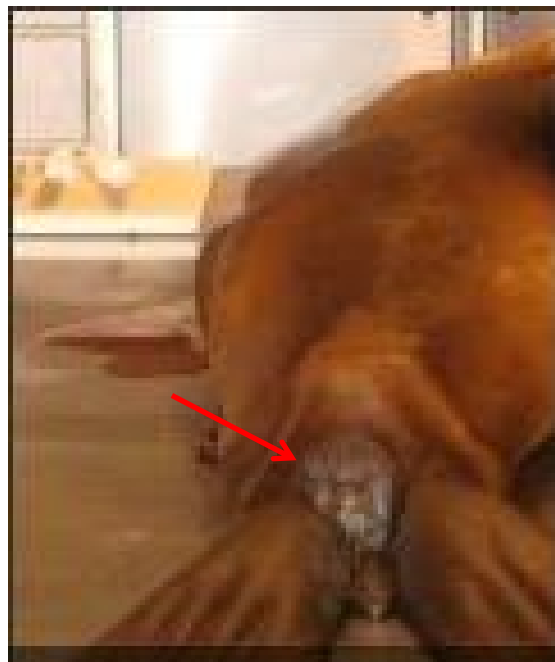


Fig. 1 Protrusión vulvar a causa de carcinoma urogenital en una hembra de *Zalophus californianus*

Después de los primeros estudios que dieron evidencia de la existencia de cáncer en el lobo marino de California, la investigación se enfocó en determinar las posibles causas de dicha patología. Teniendo como antecedentes los reportes de neoplasia en otras especies de mamíferos marinos como en *Delphinapterus leucas* asociadas a contaminantes orgánicos persistentes y metales pesados en el medio marino (De Guise y cols. 1994) las preguntas comenzaron a surgir. Ylitalo y cols. (2005), basados en estudios previos sobre contaminantes en focas y marsopas (Jepson y cols. 1999; Hall y cols. 2003), cuantificaron la presencia de pesticidas organoclorados (OCs por sus siglas en inglés), en la grasa de lobos marinos de California varados en las costas de California. Sus resultados mostraron una relación significativa entre los individuos que habían muerto a causa de cáncer urogenital con altas concentraciones de OCs como los PCBs y DDTs a diferencia de aquellos animales que murieron por otras causas. Tomando como precedente este estudio, Niño-Torres y cols. (2009) comenzaron estudios sobre OCs en el lobo marino de California en el Golfo de California. Su investigación se basó en determinar las concentraciones de PCBs y DDTs en la capa de grasa de los individuos en vida libre. Sus resultados hasta la fecha sugieren que las concentraciones encontradas en los individuos de costas mexicanas tienen niveles significativamente menores (cuatro órdenes de magnitud) a los reportados en el Pacífico Estadounidense. Con estos resultados se puede inferir que es plausible que los OCs juegan un papel en la ocurrencia del carcinoma urogenital y la diferencia en la concentración de OC podría explicar la ausencia de esta patología en lobos marinos del Golfo de California.

Antes de que se realizaran las investigaciones sobre la asociación de pesticidas en relación al carcinoma urogenital, ya se planteaba una estrecha relación entre el desarrollo de cáncer y la presencia de virus oncogénicos. Los primeros estudios en realizar la búsqueda de posibles virus asociados detectaron fragmentos de ADN viral a partir del uso de oligonucleótidos degenerados que incluían herpesvirus de humanos, cánidos, félidos, peces y conejos, entre otros (Van Devanter y cols. 1996).

Estos estudios fueron la base de trabajos futuros que detectaron un “nuevo” gammaherpesvirus asociado al desarrollo de cáncer en el lobo marino de California.

Años más adelante, Lipscomb y cols. (2000) dedicaron sus estudios a la búsqueda de las supuestas infecciones virales relacionadas con dicha patología. Sus estudios se basaron en determinar por medio de microscopía electrónica, amplificación por PCR e histopatología, si había evidencia de un agente infeccioso involucrado en el carcinoma urogenital. Para dicho estudio se tomaron muestras de 10 individuos varados en las costas del Pacífico Estadounidense que presentaban neoplasia intraepitelial en el tracto genital. De los resultados de la microscopía electrónica se observaron cuerpos de inclusión que sugerían la presencia de un agente viral. El ADN de estos agentes virales fue encontrado en el tejido genital. Se determinaron características particulares que sugerían daño celular y se corroboró la presencia de ADN viral en los individuos con los carcinomas además de que se clasificó el virus como un Radinivirus, en el grupo de los gammaherpesvirus. Con estos resultados ellos sugirieron que los carcinomas reportados tenían su origen en epitelio genital y que además este gammaherpesvirus podía ser una posible causa de desarrollo de cáncer.

Más tarde, después de clasificar al gammaherpesvirus y asociarlo con el desarrollo de cáncer genital en lobos marinos de California, King y cols. (2002) se encargaron de mostrar nuevamente que el gammaherpesvirus nombrado OtHV-I pertenecía realmente a este grupo de herpesvirus. Ellos también encontraron que OtHV-I está presente en los carcinomas. Unos años más tarde se corroboró que se trataba de un gammaherpesvirus y no un papilomavirus, como algunos investigadores habrían propuesto (Buckles y cols.2006). Datos adicionales sugirieron la vía de transmisión sexual para OtHV-I y plantearon la posibilidad de una transmisión vertical (Buckles y cols. 2007).

A nivel genético también se realizaron estudios sobre las causas del desarrollo de carcinomas. El trabajo realizado por Acevedo-Whitehouse y cols. (2003) mostró

evidencia respecto a la heterocigocidad de los individuos, donde los lobos marinos de California con mayores niveles de heterocigocidad tenían una mayor probabilidad de desarrollar cáncer urogenital. Este estudio se realizó con animales que vararon en las costas de California. Los resultados, basados en marcadores genéticos neutrales mostraron que los individuos que presentaron cáncer tenían los niveles de heterocigocidad más altos en comparación con otras causas de varamiento.

Bowen y colaboradores (2005) realizaron un estudio a nivel de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés). Con este estudio se mostró que aquellos individuos con genes específicos (Zaca-DRB-A) son más propensos (3.46 veces) a desarrollar cáncer urogenital que aquellos individuos que no tenían dicho alelo.

Al mismo tiempo que se realizaban estudios sobre la influencia de contaminantes, la presencia de un virus y la misma genética de los individuos hacia el desarrollo de carcinomas urogenitales, Johnson y cols. (2006) realizaban estudios sobre la flora genital de lobos marinos de California. Con este estudio pretendían identificar grupos bacterianos que forman parte de la flora genital y grupos de posibles patógenos bacterianos. Ellos plantearon la posibilidad de que hubiera bacterias asociadas a esta patología como sucede con otros tipos de cáncer. Encontraron que los estreptococos beta-hemolíticos ocurrían en el 3.4 % de las hembras adultas en vida libre y estaban significativamente asociados con la presencia de carcinomas.

Además de todos aquellos factores asociados al desarrollo de cáncer. Años más adelante, Colegrove y cols. (2009) presentaron información respecto a la expresión de receptores estrogénicos y progesterona en relación a la presencia de lesiones intraepiteliales de distintos grados. Sus resultados mostraron que la expresión de receptores estrogénicos (RE) fue significativamente más baja en células con bajo grado de lesión intraepitelial y ausencia de expresión de RE en células con alto grado de lesión intraepitelial y metástasis en comparación a epitelios sin lesiones.

Adicionalmente midiendo la expresión de proteínas involucradas en las vías de reparación celular, determinaron que la expresión de Ki67 y p53 incrementaron su expresión en lesiones de alto grado de lesión intraepitelial en comparación al epitelio que no presentó ningún tipo de lesión. Con lo cual se sugiere que estas proteínas actúan más activamente cuando se presentan problemas a nivel de displasias de alto grado. Por otro lado, la expresión de los receptores estrogénicos y de progesterona son moléculas que actúan con la expresión de hormonas que interactúan a su vez con contaminantes ambientales y que incrementan el riesgo de carcinogénesis en el lobo marino de California.

En conjunto, las investigaciones que se han realizado para tratar de entender el cáncer urogenital de lobos marinos de California han permitido generar modelos que proponen las distintas vías y mecanismos por los cuales se generó y ha incrementado este tipo de carcinomas (Fig. 2). Por dicha razón, esta tesis pretende dar a conocer nueva información que permita un mejor entendimiento de esta patología.

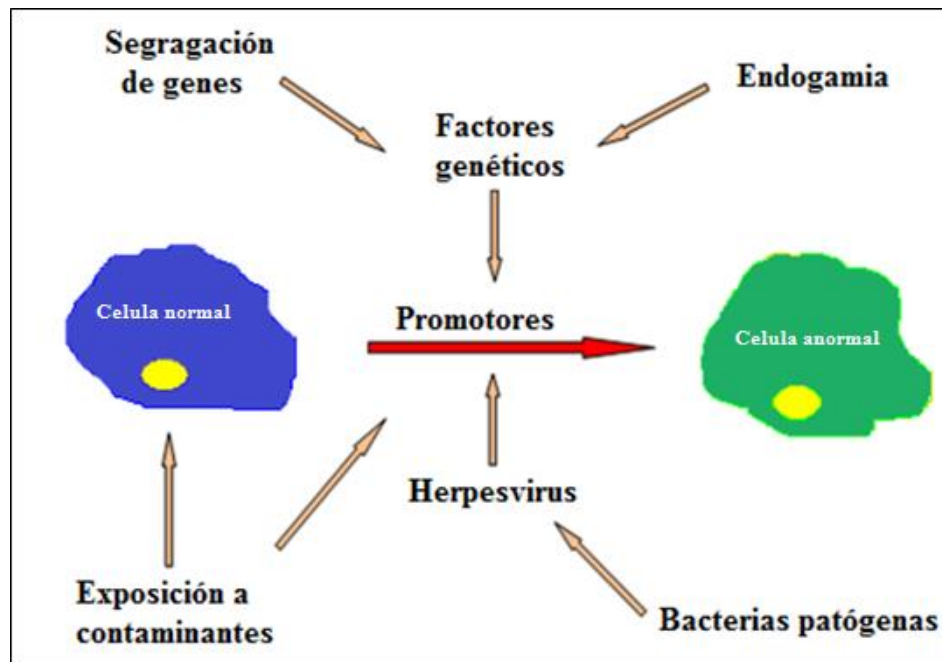


Fig. 2 Modelo que representa los factores y su posible interacción con el desarrollo de cáncer urogenital en el lobo marino de California.

III. HIPÓTESIS

1. Debido a la larga historia coevolutiva entre la microbiota genital y el lobo marino de California, la diversidad bacteriana del tracto genital del lobo marino de California será semejante a los grupos reportados para lobos marinos de California del Pacífico Estadounidense.
2. La prevalencia de estreptococos beta-hemolíticos será semejante en lobos marinos del Golfo de California a la reportada en lobos marinos del Pacífico Estadounidense pero;
 - 2.1) OtHV-I estará ausente en el lobo marino del Golfo de California o;
 - 2.2) OtHV-I estará presente en el lobo marino del Golfo de California pero a una prevalencia menor de la necesaria para que OtHV-I pueda mantenerse en la población.

VI. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Determinar la composición de la microbiota bacteriana genital del lobo marino de California en una isla representativa de la población en el Golfo de California, e investigar la presencia de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos así como caracterizar su morfología celular genital.

IV.2 Objetivos particulares

1. Identificar molecularmente la presencia de ADN de OtHV-I del tracto genital de lobos marinos de California de las colonias reproductivas Granito y Cantiles en el Golfo de California.
2. Identificar molecularmente la presencia de ADN de estreptococos beta-hemolíticos del tracto genital de lobos marinos de California de las colonias reproductivas Granito y Cantiles en el Golfo de California.
3. Caracterizar la estructura celular del tracto urogenital de lobos marinos de California de las colonias reproductivas Granito y Cantiles en el Golfo de California.
4. Determinar la asociación entre el OtHV-I y los estreptococos beta-hemolíticos con alteraciones celulares del epitelio genital del lobo marino de California.
5. Identificar los grupos bacterianos cultivables del tracto genital del lobo marino de California del Golfo de California.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Área de estudio

El Golfo de California se encuentra al noroeste de la república Mexicana entre los 20 y 30° N y los 112 y 118° W con una longitud aproximada de 1500 km y dividida en cuatro áreas oceanográficas: Alto Golfo, Región Central, Boca del Golfo y Región de las Grandes Islas (Maluf, 1983) (Fig. 3).

La región de las grandes islas se delimita desde Isla Ángel de la Guarda en los 29°, hasta la Isla San Pedro Martir en los 28° aproximadamente (Case y Cody, 1983). Ésta región es caracterizada por profundidades que van desde los 900 m de profundidad hasta los 1400 m en la cuenca de Salsipuedes. Respecto al clima, las islas se caracterizan por ser áreas secas y calientes con temperaturas entre los 21°C y 23°C y siendo más altas en el verano con temperaturas de 30°C aproximadamente. En cuanto a las precipitaciones se tiene un estimado de 100 a 150 mm de lluvia anualmente (Case y Cody, 1983).



Fig. 3 Imagen del área de muestreo. La flecha indica la ubicación de la Región de las Grandes Islas donde están situadas las islas Granito y Cantiles.

V.2 Logística de las salidas de campo

Se realizaron salidas de campo en tres temporadas, enero, julio y octubre, durante el año 2012. Se visitaron las colonias reproductivas de lobos marinos de California en las islas Granito y Cantiles ubicadas en la Región de las Grandes Islas.

Las visitas se realizaron con apoyo de miembros del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva (GMEE) quienes apoyaron con las capturas, manejo y procesamiento de las muestras en campo, y con la participación de miembros de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) de la Reserva de las Islas del Golfo ubicada en la localidad de Bahía de los Ángeles, Ensenada, Baja California, México. Para el estudio se contó con el permiso de investigación y Colecta de la Dirección General de Vida Silvestre en el marco de la NOM-059 SEMARNAT 2010, al estar enmarcado en el proyecto de Investigación “Monitoreo del estado de salud de aves marinas y lobos marinos en la Región de las Grandes Islas y norte del Golfo de California, México” otorgado al Dr. Carlos Godínez Reyes, Director del Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California.

Las salidas se hicieron a bordo de pangas motorizadas para navegación, partiendo de Bahía de los Ángeles hacia las loberas Granito y Cantiles donde se realizaron las colectas de muestras para los proyectos de investigación en proceso.

V.3 Colecta de muestras

Para determinar el número de muestras a obtener se realizó un análisis de poder. Con el objetivo de detectar al menos un individuo positivo al virus, tomamos en cuenta la prevalencia del 18% encontrado para OtHV-I detectado en lobos marinos de California que vararon en el Pacífico Estadounidense (Gulland et al, 1996). El análisis de poder nos mostró que requeríamos de la captura de cuando menos 16 individuos por temporada para tener una muestra representativa del total de la colonia.

El número de muestras varió según la temporada de colecta debido a limitaciones meteorológicas que definían el periodo de muestreo efectivo y a la dificultad de la captura

de animales en algunas temporadas. Durante la salida de enero se obtuvieron muestras de 15 individuos, en la salida de julio se muestrearon 28 individuos y en la salida de octubre se colectaron muestras de 20 individuos. El sexo y la edad de los individuos también variaron entre las salidas. En enero se realizó la captura de hembras adultas, juveniles y crías. En las visitas de julio y octubre el esfuerzo de muestreo fue para crías aunque también se obtuvieron algunas muestras de individuos juveniles (ver detalles en el Cuadro 2).

Cuadro 2 Total individuos por temporada, edad y sexo. Sexo: M= Macho, H= Hembra. Edad: A= Adulto, J= Juvenil, C= Cría

| ENERO | | | JULIO | | | OCTUBRE | | |
|--------|------|------|--------|------|------|---------|------|------|
| Numero | Sexo | Edad | Número | Sexo | Edad | Número | Sexo | Edad |
| 3 | H | A | 20 | H | C | 9 | H | C |
| 4 | H | C | 8 | M | C | 8 | M | C |
| 1 | H | J | | | | 1 | M | J |
| 6 | M | C | | | | | | |

El método utilizado para la captura de los individuos fue el acechamiento y captura con redes mariposeras. La contención fue física para evitar el uso de anestésicos. En el manejo se registraron datos morfométricos (masa, longitud total, longitud curvilínea, grosor de capa de grasa, sexo y edad) y además de las muestras de epitelio genital que se utilizaron en la presente tesis, se colectaron muestras de piel, pelo, sangre, hisopados oculares, nasales y orales, ya que el estudio se encuentra enmarcado en un estudio más amplio sobre la salud y funcionamiento inmune del lobo marino de California. Se hizo la revisión de presencia o ausencia de lesiones superficiales y la colecta de parásitos externos en caso de que estuvieran presentes.

Para la toma de los hisopados genitales se usaron dos cepillos cervicales estériles por individuo. En las crías, los dos hisopados se colectaron introduciendo el cepillo en la cavidad genital hasta tocar el cuello uterino (hembras) o frotando el cepillo alrededor del pene, mediante la eversión manual del mismo (machos) (Fig. 4). En las hembras adultas se

hizo uso de un espéculo vaginal en el que se introducía el cepillo directamente al cuello uterino hasta llegar directamente al cérvix.



Fig. 4 Colecta de muestras. Imagen superior izquierda; Hisopado cervical en hembras adultas. Imagen superior derecha; Hisopado cervico-vaginal en hembras crías. Imagen inferior central; Hisopado peneano en machos.

Uno de los dos cepillos se preservó en microtubos estériles de 1.5 ml con etanol al 96 % para su posterior análisis molecular. El segundo cepillo se utilizó para hacer improntas inmediatamente después de retirarlo de la cavidad vaginal o peneana. Las improntas se realizaron rodando el cepillo por toda la superficie de la laminilla sin hacer presión para no romper las células y así dejar una cantidad considerable de células impresas. La laminilla se

fijó con un fijador citológico o sumergiendo en metanol al 100% por 10 minutos y posterior secado al aire libre.

En la salida de enero y julio se realizaron hisopados genitales para siembra en placa. Se tomó un hisopado por cada individuo haciendo uso de hisopos estériles individuales. El hisopo se introdujo en la cavidad genital (hembras) y por el contorno del pene (machos) como se describió arriba. Inmediatamente después de tomar la muestra con el hisopo, ésta se sembró por estría en toda la placa en medio de cultivo agar sangre y sal manitol. Se sellaron las placas y se identificaron incubándolas a temperatura ambiente dentro de una caja. Después de la siembra en las placas el hisopo se preservó en etanol al 96 %.

Debido a que en las placas sembradas crecieron distintos grupos de bacterias (de tres a cuatro colonias diferentes por individuo), después de dejar incubar por un día, en el campo se hizo la separación de colonias en placas de agar sangre para evitar que las colonias continuaran expandiéndose y evitar contaminación. Al separar cada colonia se realizó la descripción morfológica tomando en cuenta su diámetro, tipo de crecimiento, forma, consistencia, tipo de borde, apariencia, presencia de hemólisis y según el caso si existía alguna característica muy distintiva de las demás colonias. Ya separadas las colonias, éstas se resembraron cada dos días para su mantenimiento en el campo hasta que pudieran ser procesadas en laboratorio.

V.4 Análisis de muestras

Todas las muestras obtenidas se analizaron en el laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias Naturales (de la Universidad Autónoma de Querétaro).

A las colonias bacterianas se les dio seguimiento con la resiembra en laboratorio para mantenerlas vivas hasta llevar a cabo los análisis moleculares y bioquímicos. En laboratorio las colonias se incubaron a 37 °C por 24 horas y se vigiló para detectar contaminación potencial de las colonias. Para determinar el tipo de bacteria se realizaron frotis en laminilla

y se hizo tinción de Gram de cada colonia, método mediante el cual se obtuvo la primera identificación de los grupos bacterianos.

Algunas colonias presentaban crecimiento de otro grupo de bacterias al ser revisadas en laminilla. En estos casos, fueron identificadas en el microscopio compuesto con objetivo de 100x, y se les realizaron diluciones en medio líquido infusión cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés) para hacer la separación de las colonias. Las diluciones consistieron en verter 1 ml de medio BHI a cada uno de los 6 tubos de ensayo estériles para cada colonia que se requería separar. Se prepararon también 6 tubos de ensayo como control negativo. Al primer tubo, se le agregó con la punta del asa la colonia y con una micropipeta se resuspendió el medio sembrado. Se procedió a tomar del tubo sembrado 100 µl del medio y se vertieron al siguiente tubo resuspendiendo nuevamente. Este procedimiento se realizó hasta llegar al último tubo y obtener una concentración baja de la colonia. Las diluciones fueron incubadas a 37 °C en agitación a 220 rpm durante 7 horas. En caso de no observar crecimiento, se dejaban incubar alrededor de 10 a 12 horas adicionales (Díaz y cols. 2000; Struthers y Westran, 2003).

Después del crecimiento, las diluciones de cada colonia fueron sembradas en placas de medio de cultivo sólido BHI, se dejaron crecer por 24 horas en incubación nuevamente a 37 °C. Después se observó la morfología de la colonia y por medio de la descripción ya obtenida en campo de cada colonia se determinó cual era la colonia aislada del tracto genital. A continuación se realizaron los frotis y tinción de Gram para determinar si se habían separado las colonias y ya estaban listas para continuar con su identificación bioquímica.

La tinción de Gram consistió en una serie de pasos que permitían determinar la morfología de tinción de cada colonia. Los pasos fueron los siguientes:

1. Colocar con un la punta del asa la colonia dentro de una gota de agua en laminilla y continuar extendiendo la gota de agua revolviendo homogéneamente con la colonia.
2. Fijar el frotis a fuego medio sin permitir que la laminilla se caliente para no romper las células.

3. Cubrir el frotis con una solución de colorante cristal violeta durante 30 seg.
4. Enjuagar con agua corriente
5. Colocar solución yodada durante 1 min
6. Enjuagar con agua corriente nuevamente
7. Decolorar con una mezcla de alcohol/acetona (1:1)
8. Escurrir y cubrir con fucsina durante 1 min
9. Enjuagar todos los residuos del colorante y dejar secar a temperatura ambiente

Después de la identificación por tinción Gram (Díaz y cols. 2000), se hizo la identificación bioquímica. Para esto, las cuatro pruebas bioquímicas aplicadas fueron la prueba de KOH, oxidasa, catalasa y coagulasa. Cada una de las pruebas consistió en los siguientes protocolos descritos:

a) Prueba de KOH (para corroborar resultados de la tinción de Gram)

- Poner con la punta del asa la colonia sobre la laminilla
- Agregar solución de hidróxido de potasio al 3% sobre la colonia
- Mezclar y esperar 60 seg
- Si la consistencia es viscosa, la colonia es Gram negativa

b) Prueba de oxidasa (para diferenciar entre bacterias Gram negativas)

- Poner con la punta del asa la colonia sobre la laminilla
- Agregar una gota de reactivo de Kovacs sobre la colonia
- Mezclar y esperar 30 seg
- Observar el cambio de coloración a púrpura (positivo)

c) Prueba catalasa (Para diferenciar entre especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus*)

- Poner con la punta del asa la colonia sobre la laminilla
- Con un tubo capilar tomar la solución de peróxido de hidrógeno al 30%

- Poner el tubo capilar sobre la colonia.
- Si se producen burbujas de oxígeno es una especie perteneciente al género *Staphylococcus spp.*
- Si no se producen burbujas de oxígeno es una especie perteneciente al género *Streptococcus.*

d) Prueba de coagulasa (Para diferenciar entre especies de *Staphylococcus*)

- Poner con la punta del asa la colonia sobre la laminilla
- Agregar solución de plasma de conejo más EDTA sobre la colonia
- Mezclar y esperar 30 seg
- Si hay aglutinación, la colonia es un *Staphylococcus aureus*
- Si no hay aglutinación, la colonia es otra especie de *Staphylococcus.*

Después de las pruebas bioquímicas (Díaz y cols. 2000; Struthers y Westran, 2003), se hizo una revisión bibliográfica de los grupos posibles aislados tomando en cuenta el origen de la muestra así como las características ya identificadas por tinción Gram y pruebas bioquímicas.

V.4.1 Análisis molecular

De los cepillos preservados en etanol al 96 % se extrajo y purificó el ADN de cada uno. El protocolo consistió en purificar el ADN total de las muestras por medio del protocolo de lisis con solución hiperconcentrada de sales, digestión protéica con proteinasa K y lavados con alcohol (Green y Sambrook, 2012). Para la preparación de la solución de lisis se mezcló Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, NaCl 1M, SDS 5%, proteinasa K y agua destilada estéril. La preparación de la solución concentrada de sales se hizo con NaCl 6M.

Para la extracción de ADN total los pasos fueron los siguientes: los tubos que contenían los cepillos preservados con etanol se mezclaron por vórtex por 2 min para desprender del cepillo la mayor cantidad posible del material biológico colectado. Después, las muestras se centrifugaron por 2 min a 10,000 rpm y se sacó el cepillo retirando el material restante del

cepillo al frotarlo por las paredes del tubo. Nuevamente se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm y se retiró el etanol agregando posteriormente 500 µl de solución de lisis (ver arriba) y homogenizando por inversión cada muestra. Para permitir que actuara la solución de lisis, se incubaron las muestras a 58 °C por 1 h y se continuó con el procedimiento agregando 300 µl de solución hiperconcentrada de sales (NaCl 1M, SDS 5 %) e inmediatamente se mezcló por inversión y agitación manual por 5-8 seg. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 30 min a 13,000 rpm y el sobrenadante después de la centrifugación se transfirió a otro tubo estéril y se le agregó un volumen de 700 µl de isopropanol mezclando inmediatamente por inversión y agitación. Las muestras se incubaron a -20 °C por 1 h y se centrifugaron por 20 min a 13,000 rpm. Inmediatamente después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante desechándolo para después agregar lentamente al tubo 200 µl de etanol al 70 % y se centrifugaron por 2 min a 13,000 rpm como último lavado del ADN. Para finalizar, después de la centrifugación se decantó cuidadosamente el etanol para no perder el material genético y se dejó secar a temperatura ambiente antes de resuspender el pellet de ADN obtenido en 100 µl de agua estéril. Las muestras se preservaron a -20°C para su posterior análisis.

A cada muestra se le determinó la cantidad y la pureza. Las mediciones se realizaron directamente tomando 2 µl de las muestras resuspendidas en los 100 µl de agua estéril. Por medio del espectrofotómetro Nanodrop (Qiagen) se determinó la cantidad de ADN en ng/µl y las absorbancias 260/280 y 260/230 para determinar la pureza (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio de cantidad y pureza de ADN de las muestras purificadas

| | Cantidad ng/µl | Absorbancia 260/280 | Absorbancia 260/230 |
|----------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Promedio | 101.39375 | 1.82509434 | 2.38188679 |
| Desviación estándar | ± 202.225438 | ± 0.53736402 | ± 1.23461775 |

a) Detección de fragmentos de ADN de grupos bacterianos genitales

Para la obtención de ADN de los grupos bacterianos genitales no fue necesario realizar un protocolo de extracción de ADN. Para la obtención de ADN bacteriano se usó un protocolo llamado “Colony PCR”. Dicho protocolo consistió en tocar con un asa estéril cada una de las colonias puras sembradas en las placas y pasarlas a un microtubo de 1.5 µl con agua estéril y se preservaron en congelación. La preparación obtenida fue utilizada como template para el análisis molecular.

La amplificación de fragmentos para cada colonia bacteriana obtenida se realizó con oligonucleótidos específicos del gen 16s de la subunidad ribosomal pequeña del ARN para obtener un producto de 1505 pb. Los oligonucleótidos usados fueron 27FC (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492RP (3'CGGCTACCTTGTTACGAC) (Zeng y cols. 2010). Los reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR fueron: buffer [1x] 1.25 µl, DNTPs [200 µM] 0.25 µl, 27FC [0.3 µM] 0.375 µl, 1492RP [0.3 µM] 0.375 µl, Hotstar taq (Qiagen) 0.0625 µl, H₂O estéril 7.687 µl y 2.5 µl de muestra de ADN para un volumen final de 12.5 µl.

El programa utilizado para el PCR fue el siguiente:

95 °C por 15 min

35 ciclos de:

94 °C por 30 seg

52 °C por 30 seg

72 °C por 90 seg

72 °C por 10 min

4 °C hasta su análisis por electroforesis

Para verificar la amplificación de los productos de la PCR esperados con 1505 pb, se corrieron en gel de agarosa al 1 % teñidos con 3 µl de bromuro de etidio. En una cámara de electroforesis se corrieron a 100 volts durante 30 min. En los pozos del gel se pusieron cada una de las muestras preparadas con 5 µl del producto de la PCR con 2 µl de buffer

[6x] y 3 μ l de H₂O estéril para un volumen final de 10 μ l. Se utilizó un marcador de pesos moleculares de 1kb que fue preparado con 2 μ l de DNA ladder, 1 μ l de buffer [6x] y 7 μ l de H₂O estéril para un volumen final de 10 μ l y se puso en uno de los pozos del gel preparado para corroborar el peso esperado de las muestras.

b) Análisis molecular para la detección de OtHV-I

La técnica usada para la amplificación de fragmentos de ADN fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Para la amplificación de fragmentos de OtHV-I se usaron oligonucleótidos específicos para el gen Dpol (polimerasa de ADN) para obtener un producto de 510 pb. Los oligonucleótidos usados fueron Dpol 697 (5'GCGGGAACGCAACTATATCCT) y Dpol 65 (3'TCTTCGTCCAGTATCATTG) (Vélez, 2012). Los reactivos y concentraciones utilizadas para las reacciones de 12.5 μ l fueron: buffer [2x] 1.25 μ l, DNTPs [200 μ M] 1.25 μ l, MgCl₂ [2.5 μ M] 1.25 μ l, Dpol 697 [10 μ M] 0.25 μ l, Dpol 65 [10 μ M] 0.25 μ l, Hotstar taq (Qiagen) 0.0625 μ l, agua estéril libre de nucleasas 6.263 μ l y 2 μ l de muestra de ADN (>0.01 μ g).

El programa utilizado para la PCR fue el siguiente:

95 °C por 15 min

40 ciclos de:

94 °C por 40 seg

52 °C por 30 seg

72 °C por 40 seg

72 °C por 10 min

4 °C hasta su análisis por electroforesis

Como control positivo, se incluyó en cada corrida ADN de OtHV-I que fue proporcionado para este estudio por Martha Vélez (San Francisco State University). Para verificar si fue exitosa la amplificación del fragmento de Dpol del virus OtHV-I, los productos de la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con 3 μ l de bromuro de etidio en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 45 min. En cada pozo se cargaron 5 μ l del

producto de PCR, 2 μ l de buffer [6x] y 3 μ l de agua. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (TrackIt, Invitrogen™). Los productos positivos se enviaron a secuenciar bidireccionalmente para confirmar que el producto obtenido en la amplificación correspondía al gen esperado.

c) Análisis molecular para la detección de estreptococos beta-hemolíticos

Para la amplificación de fragmentos de estreptococos beta-hemolíticos se usaron oligonucleótidos específicos de la subunidad ribosomal pequeña del ARN para obtener un producto de 458 pb. Los oligonucleótidos usados fueron StreF (5´TGCTAGGTGTTAGGCCCTTT) y StreR (3´CTTGCGACTCGTTGTACCAA) (Ahmet y cols. 1999). Los reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR fueron: buffer [1x] 1.25 μ l, DNTPs [200 μ M] 0.25 μ l, StreF [0.3 μ M] .375 μ l, StreR [0.3 μ M] 0.375 μ l, Hotstar taq 0.0625 μ l, H₂O estéril 7.687 μ l y 2.5 μ l de muestra de ADN para un volumen final de 12.5 μ l.

El programa utilizado para el PCR fue el siguiente:

95 °C por 15 min

35 ciclos de:

95 °C por 30 seg

55 °C por 30 seg

72 °C por 45 seg

72 °C por 10 min

4 °C hasta su análisis por electroforesis

Para verificar si hubo amplificación del fragmento de 547 pb, los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1 % teñidos con 3 μ l de bromuro de etidio y se corrieron en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 40 min. En cada uno de los pozos del gel se pusieron las muestras preparadas con 5 μ l del producto con 2 μ l de buffer [6x] y 3 μ l de H₂O estéril para un volumen final de 10 μ l. Se utilizó un marcador de pesos moleculares de 1 kb, el cual se preparó mezclando 2 μ l de DNA ladder, 1 μ l de buffer [6x] y 7 μ l de H₂O

estéril para un volumen final de 10 µl y se puso en uno de los pozos del gel preparado para corroborar el peso esperado de las muestras.

V.4.2 Caracterización celular de las improntas genitales

El análisis de las improntas se llevó a cabo con un protocolo de tinción de Papanicolaou modificado para mejorar la calidad de tinción (Intermedico, Papanicolaou staining procedure). La modificación se estableció después de que se realizaron pruebas de tinción con el protocolo modificado y sin modificar a improntas celulares tomadas de la cavidad oral de voluntarios del laboratorio de GMEE. Estas pruebas permitieron estandarizar la técnica de tinción de Papanicolaou sin perder muestras de los lobos marinos muestreados. Las modificaciones realizadas al protocolo de Papanicolaou fueron agregar 100 µl de permanganato de potasio (KMnO₄) a la hematoxilina de Harris, 20 µl de ácido clorhídrico (HCl) al colorante OG6 y 100 µl de ácido acético (C₂H₄O₂) al colorante eosina EA50. Estas modificaciones permitieron la maduración de los colorantes puesto que no habían sido utilizados con anterioridad y de esta forma proporcionaron una mejor fijación de color a las células. Dicha recomendación fue proporcionada por la citotecnóloga Lila Tristán Flores del Departamento de Citopatología del Hospital del ISSSTE quienes han estandarizado el método para las tinciones de Papanicolaou.

El protocolo de tinción de Papanicolaou consiste en pasar las laminillas por un tren de tinción con colorantes, lavados, decoloraciones y fijación de color. El procedimiento utilizado fue:

Sumergir las laminillas en etanol al 80% por 30 seg.

Etanol 70 % por 30 seg

Etanol 50 % por 30 seg Agua destilada por 30 seg para enjuagar los alcoholes.

Hematoxilina de Harris por 4 min con 30 seg para la coloración de núcleos.

Transferir a un recipiente con agua destilada por 30 seg

Solución de HCl 0.25 % sumergiendo las laminillas 6 veces continuas para desteñir el exceso de colorante en los núcleos.

Lavar las laminillas en agua corriente durante 6 min para estabilizar el color de los núcleos

Las laminillas se sumergen en agua destilada durante 30 seg

Sumergir en etanol al 50 % por 30 seg

Etanol al 70 % por 30 seg

Etanol al 80 % por 30 seg

Etanol al 95 %, por 30 seg

Colorante OG6 durante 90 seg

Inmediatamente se transfieren a etanol al 95 % por 30 seg para fijar el color (se repite este paso dos veces)

Colorante EA-50 por 90 seg para la fijación de los organelos celulares

Etanol al 95 % por 30 seg (se repite este paso tres veces)

Etanol al 100 % por 30 seg.

Solución de xilol-alcohol (1:1) por 30 seg

Xilol al 100 % por 30 seg

Secar a temperatura ambiente

Después de la tinción, las laminillas se montaron con una resina sintética a base de xilol al 60 % poniendo 50 μ l sobre la tinción y cubriendo la laminilla con un cubreobjetos haciendo ligera presión para evitar la formación de burbujas. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior observación al microscopio.

Para caracterizar las células del tracto genital se observaron las laminillas teñidas bajo el microscopio compuesto con un aumento de 100 X. La técnica usada consistió en revisar

toda la laminilla. Primero se hizo una revisión para determinar cuántos tipos diferentes de células estaban presentes, incluyendo células leucocitarias. Una vez familiarizada con los tipos celulares se revisaron nuevamente las laminillas para hacer un conteo de cada tipo celular. La unidad de conteo se determinó como la laminilla completa. Con la platina del microscopio se movía la laminilla de forma que el nuevo campo coincidiera con el borde de lo ya contabilizado y así sucesivamente hasta tener contabilizada toda la superficie teñida de la laminilla.

Se determinó el área de tinción de la laminilla para establecer una unidad arbitraria que permitiera hacer comparable y equivalente las muestras entre sí. La delimitación del área consistió en contar por cuadros de 1 mm^2 toda el área teñida utilizando una hoja milimétrica que se colocaba bajo la luz de un microscopio estereoscopio y fijando encima de la hoja la laminilla. Este método permitió observar con aumento las partes teñidas de la laminilla correspondiendo a las células que ya habían sido contabilizadas. A continuación se determinó el área de tinción por cada 1 mm^2 para calcular el número de células presentes y tomando como unidad arbitraria 100 mm^2 el número de células se multiplicó por 100 para obtener el número de células por cada 100 mm^2 . La caracterización celular se realizó con apoyo de la Dra. María de Jesús Guerrero Carrillo de la Facultad de Ciencias Naturales, la citotecnóloga Lilia Tristán Flores y la Dra. María Teresa Uribe Casillas del Departamento de Citopatología del ISSSTE Querétaro.

V.5 Análisis estadístico

Para determinar la proporción de los morfotipos bacterianos para clasificar los diversos géneros bacterianos posibles encontrados, se realizaron pruebas de Fisher exacta y X^2 para determinar si existían diferencias significativas en los morfotipos en cuanto a grupos de edad y sexo de los individuos muestreados.

Para determinar si la infección por los dos agentes variaba entre edades y sexos se realizaron pruebas de Fisher exacta y X^2 . También se realizaron representaciones gráficas de la proporción de infección por categoría de edad y sexo.

Se analizó la distribución de los datos sobre morfología celular genital mediante la construcción de histogramas de frecuencia y pruebas de normalidad de Tukey. Los datos que no presentaban una distribución normal fueron transformados para normalizarlos.

Se calculó la prevalencia de OtHV-I, estreptococos beta-hemolíticos y cada tipo celular para crías, adultos, machos, hembras y temporadas mediante la fórmula:

$$Prevalencia = \frac{N_{ii} \times 100}{N_{tc}}$$

, donde:

N_{ii} : Número de individuos infectados

N_{tc} : Total de individuos muestreados en cada categoría

Se construyeron modelos generalizados lineales (GLM, por sus siglas en ingles) para determinar si estar infectado por OtHV-I o por estreptococos beta-hemolíticos estaba asociado con cada uno de los tipos celulares. Se tomaron en cuenta edad y sexo como variables adicionales, y se investigó la importancia de las interacciones entre variables. En total se corrieron ocho GLMs, uno para cada tipo celular identificado con la siguiente fórmula:

$$TC \sim I_v \cdot I_s \cdot e \cdot s$$

, donde

TC : Número de células de cada tipo celular

I_v : Presencia (1) o ausencia (0) de OtHV-I

I_s : Presencia (1) o ausencia (0) de estreptococos beta-hemolíticos

e: edad (variable categórica, cría, juvenil, adulto)

s: sexo (variable categórica; macho, hembra)

Los tipos celulares que quedaron excluidos de los GLM fueron las células fisuradas, células lisadas, eritrocitos y células normales. Las células fisuradas quedaron excluidas de los GLM así como los eritrocitos debido a que esta característica suele estar dada por acción mecánica durante la toma de la muestra. La lisis celular no se analizó mediante los GLMs puesto que las conglomeraciones de células no permitían hacer un conteo y caracterización individual.

Las esporas de hongos, caracterizadas como tipo celular fueron tomadas en cuenta como factores binomiales (presencia-ausencia). Los otros siete tipos celulares fueron consideradas variables continuas.

Todos los análisis fueron realizados en R, versión 2.12.2 (R Foundation for Statistical Computing, 2011).

VI. RESULTADOS

VI.1 Presencia de ADN de bacterias genitales

De las 61 colonias aisladas por medio de cultivos bacteriológicos, se obtuvo ADN bacteriano del 100% de las colonias bacterianas genitales de los 14 individuos muestreados (Fig. 5) Por cuestiones de tiempo, la identificación molecular no se logró realizar para este estudio, por lo cual solo se realizó la electroforesis.

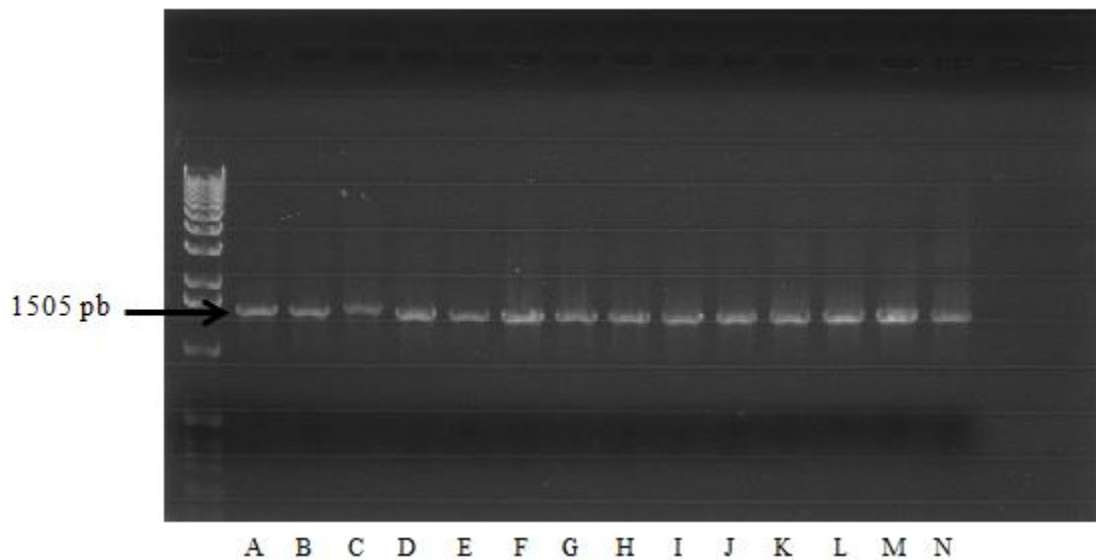


Fig. 5 Electroforesis con bandas positivas para bacterias genitales de 1505 pb. A) Control positivo. B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N muestras de ADN de colonias aisladas. Todas las muestras resultaron positivas para bacterias.

VI.2 Presencia de ADN de OtHV-I

De los 60 individuos muestreados, 4 individuos (6.6%) tuvieron presencia de ADN de OtHV-I. (Fig. 6).

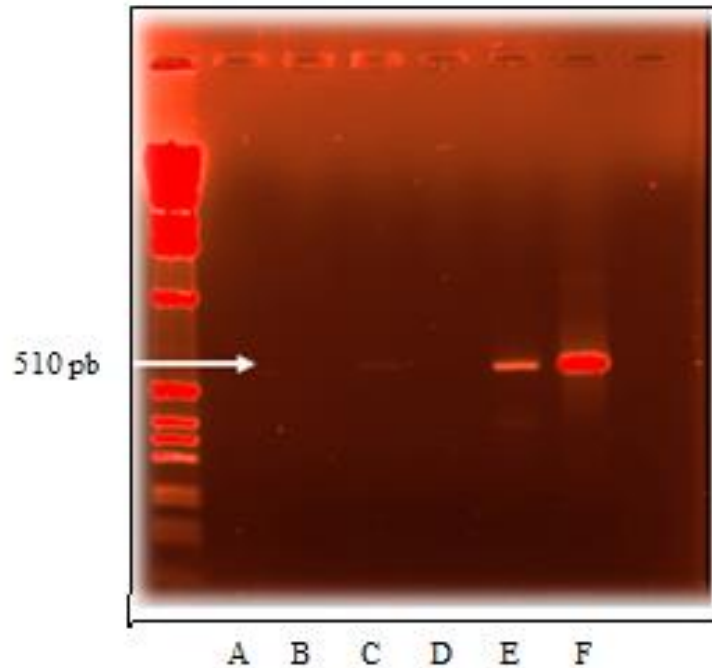


Fig. 6 Electroforesis de productos de PCR para un fragmento del gen Dpol de OtHV-1. La imagen muestra individuos positivos a OtHV-1. Carril A, control negativo; B, muestra 1, negativa; C, muestra 2, positiva; D, muestra 3, negativa; E, muestra 4, positiva; F, control positivo.

Por medio de la secuenciación se determinó que el fragmento de 510 pb correspondía a un fragmento del gen Dpol de la polimerasa. Se realizó la alineación del fragmento con secuencias del banco de secuencias “genebank” para confirmar la similitud con otros organismos, lo cual confirmó el fragmento esperado para OtHV-I (Cuadro 4, Fig. 7).

Cuadro 4 Valores de similitud de la secuencia obtenida con base de datos genebank.

| Organismo | Gen | Identidad | E value | No. Acceso |
|--|-----------------------|-----------|-------------------|------------|
| Herpesvirus de lobo marino de California | Dpol (ADN polimerasa) | 91 % | 1 ^{e-59} | AF236050 |

| | | | |
|------|-----|--|-----|
| Sec. | 27 | AACATTGCATACTTTTATG-ACCATATGTGCTGGAGCGTGCTCTCACAGGTGTACAATCT | 85 |
| | | | |
| Dpol | 236 | AACATTGCAAAC TTGATGTACCATATGTGCTGGAGCGTGC -CACACAGGTGTACAATAT | 294 |
| Sec. | 86 | GTGCGCTGCTATCTTTTGTGCGTGTGCACAGAGGGCAGTGTTAGAGGTGCAACGGGTGCG | 145 |
| | | | |
| Dpol | 295 | GTGCGCTGCTAACTTTTGTGCGTGTGCACAGTGGGGCAGTGTTTGTAGGTGCAACGGGTGCG | 354 |
| Sec. | 146 | TTGACGGACATCCGAGGTGAGGAACTTGCAATGCCTAAGCTTCGCATGGGTGGACTA | 202 |
| | | | |
| Dpol | 355 | -TGACGGACATCCG-GGTGTGGCAGTGCAATGCCAAAGCTTCGCATGGGTGGACTA | 409 |

Fig. 7 Alineamiento de secuencia obtenida con gen Dpol de herpesvirus; Sec. = secuencia obtenida. Dpol = secuencia genebank.

VI.3 Presencia de ADN de estreptococos beta-hemolíticos

El epitelio genital de 35 individuos (58.33 %) presentaron ADN de estreptococos beta-hemolíticos (Fig. 8).

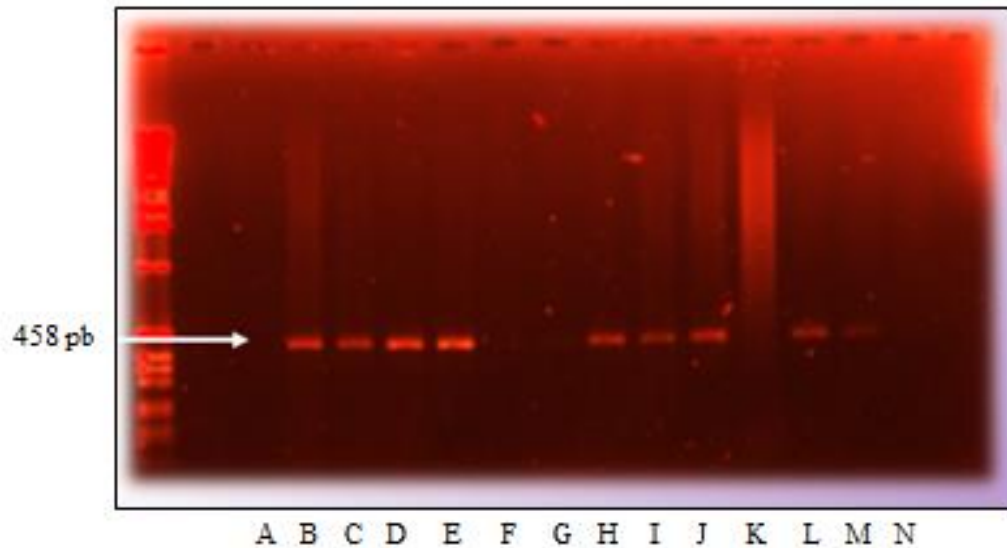


Fig. 8 Electroforesis de productos de PCR con bandas positivas para el gen 16SARNr de estreptococos beta-hemolíticos (458 pb). Carril A) agua como control negativo. B) muestra1 positiva. C) muestra2 positiva. D) muestra3 positiva. E) muestra4 positiva. F) muestra5 positiva. G) muestra6 positiva. H) muestra7 positiva. I) muestra8 positiva. J) muestra9 positiva. K) muestra10 negativa. L) muestra11 positiva. M) muestra 12 positiva. N) muestra13 negativa.

VI.4 Diferencias en la prevalencia de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos entre sexos y categorías de edad.

La prevalencia de OtHV-I para cada temporada de muestreo resultó ser muy variable. La mayoría de los lobos marinos positivos a OtHV-I se muestrearon en enero, seguido de octubre y sin encontrar positivos en el mes de julio. Esto fue semejante a lo observado para la infección por estreptococos beta-hemolíticos, donde en la temporada de enero se

encontraron más casos, aunque para estas bacterias la prevalencia fue menor en octubre y no en julio (Cuadro 5).

Cuadro 5 Prevalencia de OtHV-I y EBH por temporada

| Temporada | OtHV-I (%) | EBH (%) |
|------------------|-------------------|----------------|
| Enero | 21.42 | 64.28 |
| Julio | 0 | 60.7 |
| Octubre | 5.55 | 50 |

Al analizar si esta tendencia se relacionaba con diferencias entre las edades de los lobos marinos de California muestreados durante cada temporada, o a diferencias entre sexos, se vio que el sexo no impactaba en la infección por OtHV-I ni por estreptococos beta-hemolíticos. Sin embargo, al investigar la contribución de la edad, ésta si fue significativa (Cuadro 6) ya que en nuestra población se obtuvieron muestras solo de dos juveniles de los cuales uno de ellos si presentó infección por OtHV-I (Fig. 9).

Cuadro 6 Muestra los valores de P con la prueba de Fisher exacta y X^2 . Los valores de X^2 y los grados de libertad son tomados de la prueba de X^2 .

| | Variable explicativa | Valor de P Fisher exacta | Valor de P X^2 | Valor de X^2 | GL |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| Infección por OtHV-I y EBH | Edad | 0.0314 | 0.0055 | 10.4014 | 2 |
| | Sexo | 1 | 0.8797 | 0.0229 | 1 |

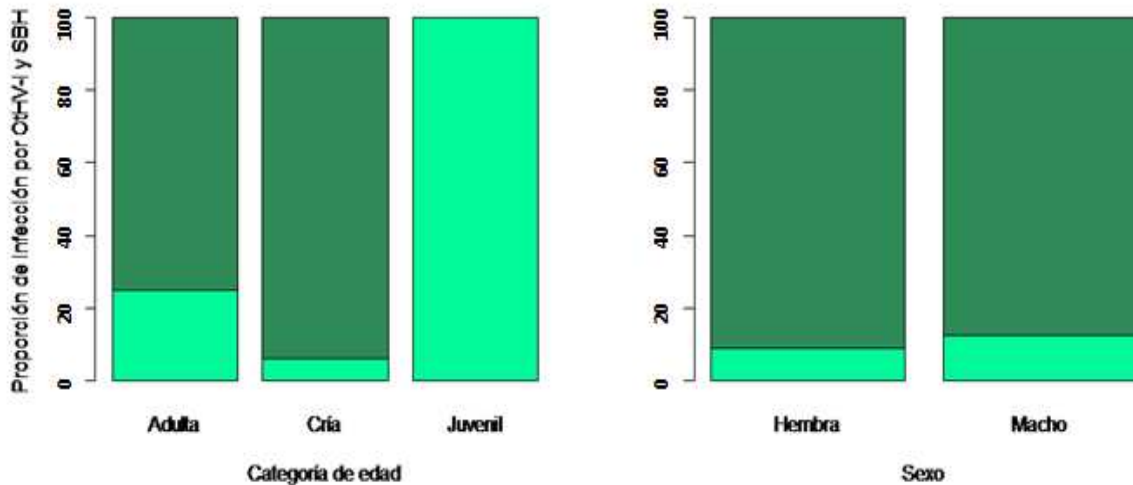


Fig. 9 Prevalencia de infección combinada por OtHV-1 y SBH. (A) Prevalencia entre edades. (B) prevalencia entre sexos. El color verde claro representa a los infectados.

VI.5 Diversidad de grupos bacterianos genitales y diferencias entre edad y sexo

Se aislaron al menos 9 especies de bacterias diferentes de 14 individuos muestreados. De las colonias aisladas se hicieron agrupaciones y se clasificaron en morfotipos bacterianos. Esta clasificación se realizó incluyendo en cada morfotipo los géneros de bacterias candidatas localizadas en el tracto genital (Cuadro 7). Esta clasificación se realizó con base en la morfología de colonias, tinción de Gram y pruebas bioquímicas (Anexo 1). Los análisis estadísticos de los morfotipos celulares no mostraron relación significativa para los grupos de edad y sexo (Cuadro 8) a pesar de que en los gráficos se muestran morfotipos representados en gran proporción en los grupos de edad y sexo y otros morfotipos no están representados en algunos de grupos (Fig. 10).

Cuadro 7 Clasificación de morfotipos. Cada letra corresponde a un grupo específico de géneros de bacterias.

| Clasificación | Géneros bacterianos posibles detectados en el tracto genital |
|-------------------------------|---|
| morfotipos bacterianos | |
| A | <i>Pseudomonas, Aeromonas, Plesiomonas, Campylobacter, Vibrio, Brucella, Haemophylus, Flavobacterium, Photobacterium, Chryseobacterium</i> |
| B | <i>Moraxella, Neisseria, Pasteurella</i> |
| C | <i>Lactobacillus, Erysipelothix, Arcanobacterium</i> |
| D | <i>Estafilococos, Estomatococos</i> |
| E | <i>Acinetobacter</i> |
| F | <i>Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Proteus, Yersinia, Morganella, Edwardsiella, Serratia, Providencia, Citrobacter</i> |
| G | <i>Bacillus</i> |
| H | <i>Corynebacterium</i> |
| I | <i>Enterococos, Estreptococos, Aerococos, Gemella</i> |

Cuadro 8 Muestra los valores de P con la prueba de Fisher exacta y X². Los valores de X² y los grados de libertad son tomados de la prueba de X².

| | Variable explicativa | Valor de P Fisher exacta | Valor de P X ² | Valor de X ² | GL |
|--------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----|
| Morfotipos | Edad | 0.7607 | 0.655 | 11.3914 | 14 |
| Bacterianos | Sexo | 0.3918 | 0.3304 | 8.0252 | 7 |

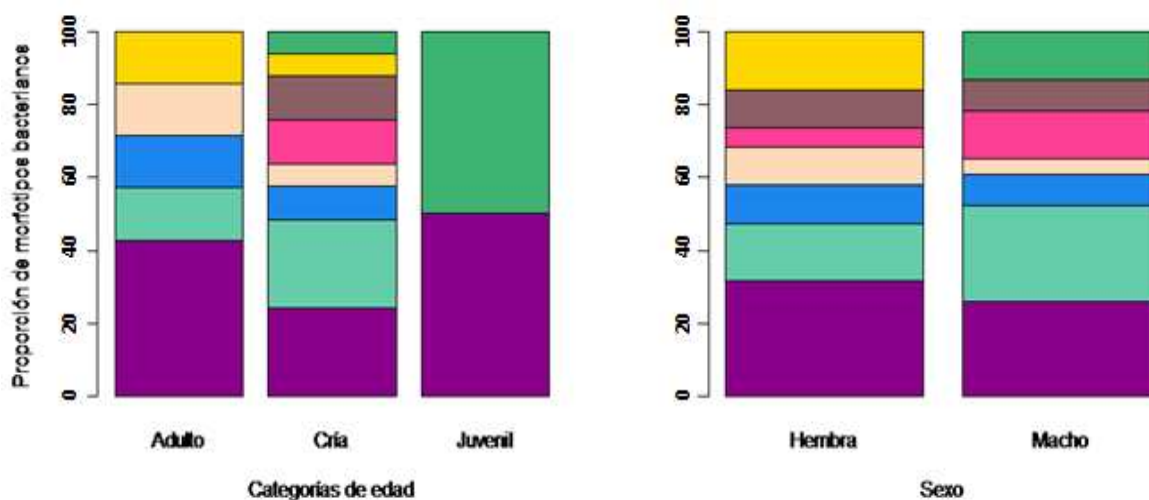


Fig. 10 Proporción (%) de morfotipos bacterianos. A = turquesa oscuro, B = morado, C = turquesa claro, D = amarillo, E = azul, F = grisáceo-púrpura, G = rosa, H = coral claro. I = no aparece representado debido a que la proporción del morfotipo es mínima en los grupos de edad y sexo.

VI.6 Tipos celulares genitales

De la caracterización celular se observaron 13 tipos celulares, incluyendo células del sistema inmune y estructuras pertenecientes a microorganismos. A las células y estructuras no celulares detectadas se les dio nombre de acuerdo con su morfología (Cuadro 9).

Cuadro 9 Descripción de características principales de cada tipo celular y letra que representa las fotografías de la Fig. 8.

| Tipo celular | Morfología | Figura 10 |
|----------------------------|--|------------------|
| Células normales | Típicas de tracto genital caracterizadas por su forma de contorno cuadrangular y/o triangular, con núcleos redondos | E |
| Inclusiones intranucleares | Estructuras internas dentro del núcleo, ocurriendo como manchas oscuras pequeñas en comparación al diámetro del núcleo celular. | M |
| Células coilocíticas | Presentan una separación entre el núcleo celular y el citoplasma conocido como halo perinuclear, lo cual corresponde a un deterioro y/o anomalía de la célula | A |
| Núcleos sin citoplasma | Representa a todos los núcleos encontrados sin aparente citoplasma | J |
| Células pleomórficas | Todas aquellas células que no tienen una forma definida incluyendo en muchos de los casos núcleos amorfos | D |
| Células fisuradas | Células que tienen algún tipo de fragmentación o ruptura ya sea en la parte citoplasmática o nuclear | L |
| Linfocitos | Células del sistema inmune con forma muy redonda y condensada | H |
| Ausencia de cromatina | Todas las células con núcleos huecos (sin material biológico) con un delgado contorno que define el núcleo. En otros casos el contorno no existe | B |
| Células binucleadas | Células con dos núcleos en fase de mitosis compartiendo citoplasma | C |
| Lisis celular | Células características de una conglomeración sin capacidad de distinción entre la estructura de las células | K |
| Eritrocitos | Caracterizados por su forma redonda y la parte cóncava central | I |
| Granulocitos | Células del sistema inmune principalmente polimorfonucleares y secundariamente mastocitos, eosinófilos y basófilos. Caracterizados por sus estructuras definidas | F |
| Esporas de hongos | Estructuras redondeadas pequeñas con un halo semitransparente recubriendo la espora. Suelen ocurrir en conjuntos y estar asociadas a capas citoplasmáticas | G |

De la estructura celular se generó una base de datos fotográfica la cual representa los distintos tipos celulares caracterizados (ejemplos en Fig. 11).

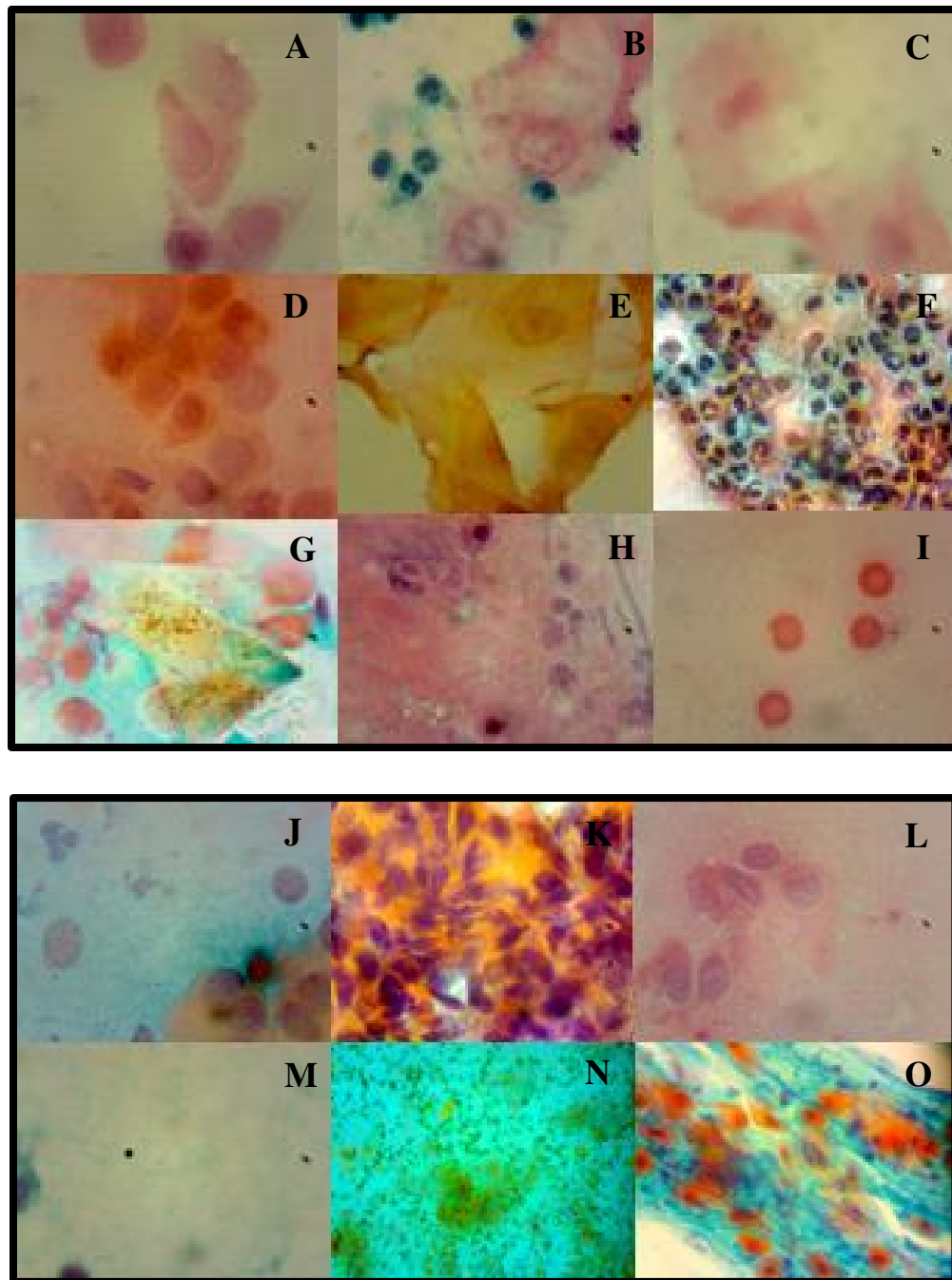


Fig. 11 A) Coilocitos, B) ausencia de cromatina, C) binucleadas, D) pleomórficas, E) normales, F) granulocitos, G) esporas de hongos, H) linfocitos, I) eritrocitos, J) núcleos sin citoplasma, K) lisis celular, L) fisuradas, M) inclusiones intranucleares, N) vista a 10 X de tinción de Papanicolaou, O) vista a 40 X de tinción de Papanicolaou.

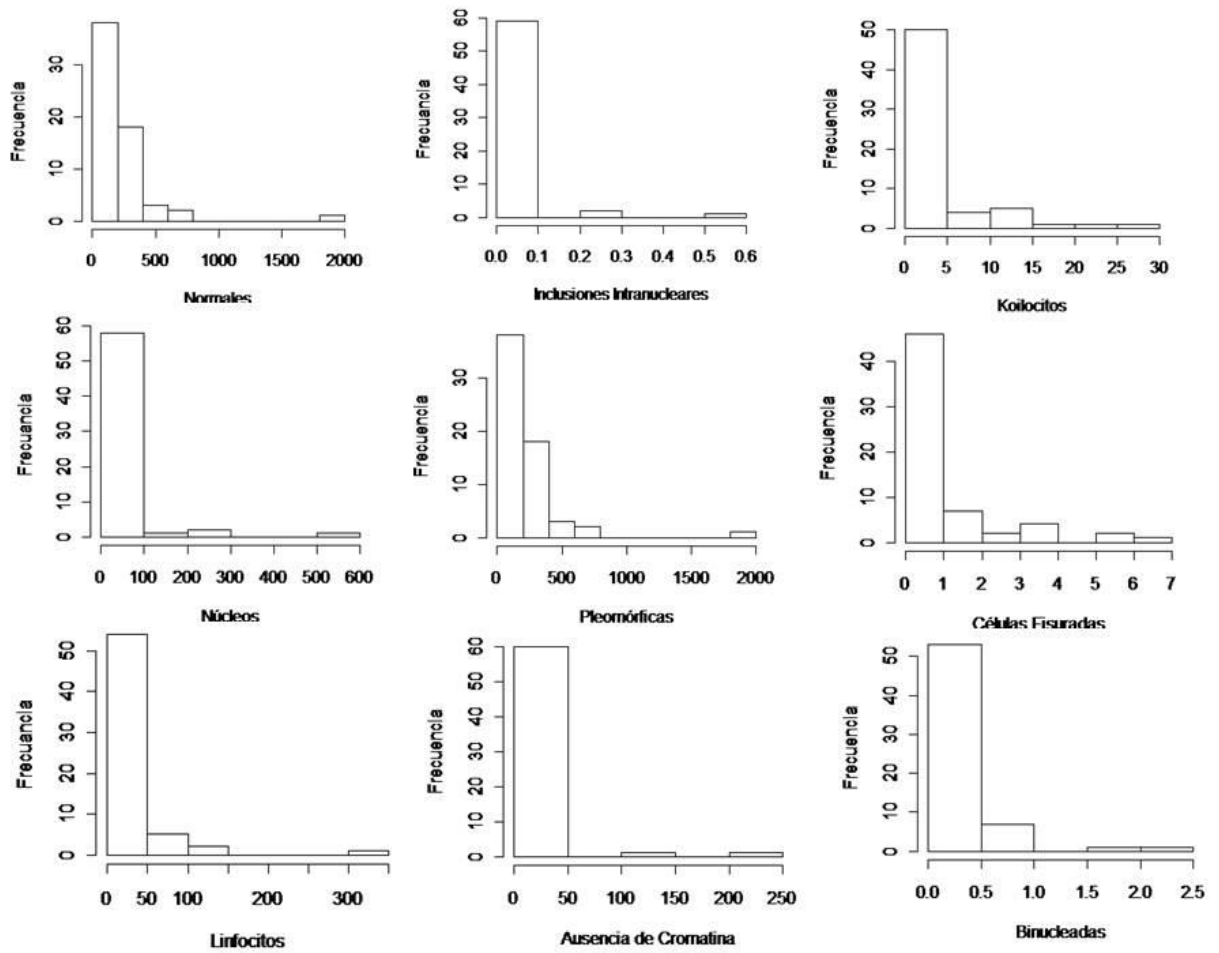
VI.6.1 Presencia, intensidad y prevalencia de los tipos celulares

La ocurrencia de cada tipo celular se determinó con base en su presencia o ausencia en cada uno de los 60 individuos muestreados (Cuadro 10), y se obtuvo un análisis de la cantidad de células por organismo de cada tipo celular por el área de conteo en laminilla.

Cuadro 10 Muestra porcentaje de cada tipo celular en total de los individuos con la intensidad y la variación de los tipos celulares.

| Tipo celular | Individuos | Porcentaje (%) | Intensidad | DesvEst |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|----------------|
| Células normales | 56 | 93.33 | 28.98 | ± 44.25 |
| Inclusiones intranucleares | 3 | 5 | 0.31 | ± 0.16 |
| Células coilocíticas | 25 | 41.66 | 7.05 | ± 7.53 |
| Núcleos sin citoplasma | 44 | 73.33 | 33.77 | ± 99.52 |
| Células pleomórficas | 60 | 100 | 202.50 | ± 268.17 |
| Células fisuradas | 38 | 63.33 | 1.43 | ± 1.60 |
| Linfocitos | 43 | 71.66 | 28.60 | ± 55.33 |
| Ausencia de cromatina | 21 | 35 | 21.57 | ± 56.46 |
| Células binucleadas | 19 | 31.66 | 0.59 | ± 0.55 |
| Lisis celular | 56 | 93.33 | 17.02 | ± 18.67 |
| Eritrocitos | 50 | 83.33 | 21.66 | ± 56.72 |
| Granulocitos | 53 | 88.33 | 171.97 | ± 498.77 |
| Esporas de hongos | 46 | 76.66 | 3.95 | ± 4.08 |

La presencia de cada uno de los 13 tipos celulares tuvo una distribución no normal en la población muestreada (Fig. 12).



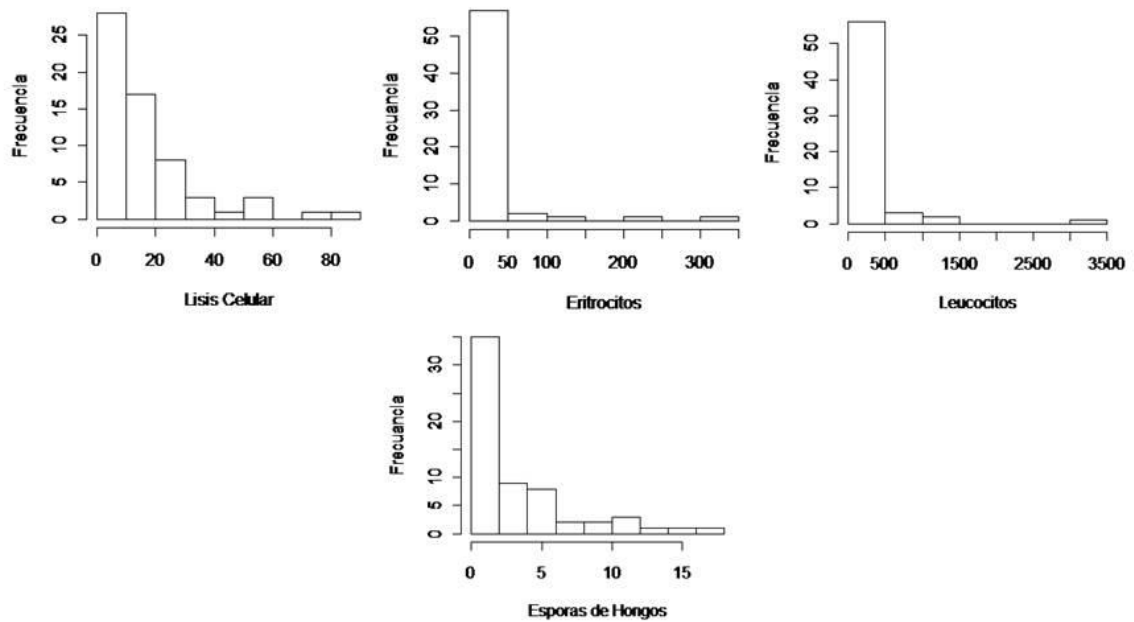


Fig. 12 Histogramas de frecuencia de tipos celulares. A) normales, B) inclusiones intranucleares, C) coilocitos, D) núcleos sin citoplasma, E) pleomórficas, F) fisuradas, G) linfocitos, H) ausencia de cromatina, I) células binucleadas, J) lisis celular, K) eritrocitos, L) leucocitos, M) esporas de hongos.

Existen diferencias en la ocurrencia de cada uno de los 9 tipos celulares según la edad y sexo por cada temporada de muestreo. En los resultados de los cuadros siguientes se puede observar que la ocurrencia de los tipos celulares tiende a ser mayor en las hembras en todas las temporadas muestreadas a excepción de los cuerpos de inclusión. Este porcentaje se encuentra sesgado en la temporada de enero y julio hacia hembras y machos respectivamente puesto que solo se encontró en un individuo de cada temporada los cuerpos de inclusión. (Cuadros 11, 12, 13).

Cuadro 11 Prevalencia de cada tipo celular según el sexo en la temporada de Enero

ENERO 2012

| Tipo celular | Total ind | hembras | | | machos | | |
|----------------|-----------|---------|------------|---------|--------|------------|----------|
| | | % | Intensidad | Desvest | % | Intensidad | Desvest |
| Normales | 11 | 54.54 | 1.28 | ± 0.99 | 45.45 | 1.60 | ± 2.05 |
| Inclusiones | 2 | 100 | 0.22 | ± 0.02 | 0 | NA | NA |
| Coilocitos | 7 | 57.14 | 8.69 | ± 11.34 | 42.86 | 2.19 | ± 2.11 |
| Sin citoplasma | 9 | 66.66 | 9.95 | ± 15.16 | 33.33 | 2.73 | ± 3.55 |
| Pleomórficas | 14 | 57.14 | 56.52 | ± 46.51 | 42.85 | 22 | ± 22.42 |
| Fisuradas | 9 | 66.66 | 1.03 | ± 0.82 | 33.33 | 2.22 | ± 2.51 |
| Linfocitos | 10 | 60 | 6.13 | ± 5.12 | 40 | 5.74 | ± 6.93 |
| Sin cromatina | 1 | NA | NA | NA | 100 | 2.1937 | NA |
| Binucleadas | 7 | 57.14 | 0.36 | ± 0.17 | 42.86 | 0.37 | ± 0.28 |
| Lisis | 11 | 72.72 | 4.46 | ± 5.65 | 27.27 | 5.21 | ± 5.77 |
| Eritrocitos | 12 | 58.33 | 9.34 | ± 11.32 | 41.66 | 0.90 | ± 1.11 |
| Granulocitos | 12 | 50 | 3.70 | ± 4.28 | 50 | 169.23 | ± 260.87 |
| Esporas hongos | 5 | 40 | 2.29 | ± 2.02 | 60 | 1.10 | ± 0.96 |

Cuadro 12 Prevalencia de los tipos celulares según el sexo en el mes de julio

JULIO 2012

| Tipo celular | Total ind | hembras | | | machos | | |
|-------------------|-----------|---------|------------|---------|--------|------------|---------|
| | | % | Intensidad | desvest | % | Intensidad | desvest |
| Normales | 28 | 71.42 | 26.39 | ± 27.58 | 28.57 | 78.97 | ± 87.82 |
| Inclusiones | 1 | NA | NA | NA | 100 | 0.50 | NA |
| Coilocitos | 16 | 87.5 | 8.72 | ± 7.34 | 12.5 | 0.73 | ± 0.75 |
| Sin citoplasma | 24 | 79.16 | 6.58 | ± 8.08 | 20.83 | 6.15 | ± 5.29 |
| Pleomórficas | 28 | 71.42 | 256.93 | ± 180.8 | 28.57 | 132.13 | ± 119.7 |
| Fisuradas | 22 | 77.27 | 1.57 | ± 1.58 | 22.72 | 2.45 | ± 2.60 |
| Linfocitos | 19 | 89.47 | 22.47 | ± 38.16 | 10.52 | 8.73 | ± 12.05 |
| Sin cromatina | 12 | 83.33 | 7.45 | ± 12.45 | 16.66 | 2.22 | ± 0.07 |
| Binucleadas | 13 | 84.61 | 0.64 | ± 0.64 | 15.38 | 1.05 | ± 0.78 |
| Lisis | 27 | 74.07 | 20.84 | ± 19.03 | 25.92 | 16.73 | ± 25.64 |
| Eritrocitos | 25 | 80 | 17.76 | ± 25.30 | 20 | 1.73 | ± 1.36 |
| Granulocitos | 24 | 83.33 | 89.95 | ± 228.8 | 16.66 | 5.85 | ± 3.14 |
| Esporas hongos | 27 | 74.07 | 4.07 | ± 3.43 | 25.92 | 5.99 | ± 6.25 |

Cuadro 13 Prevalencia de cada tipo celular en base al sexo en la temporada de octubre.

OCTUBRE 2012

| Tipo celular | Total ind | % hembras | Intensidad | Desvest | % machos | Intensidad | Desvest |
|-------------------|--------------|--------------|------------|---------|-------------|------------|---------|
| Normales | 18 | 50 | 19.03 | ± 18.04 | 50 | 35.03 | ± 35.87 |
| Inclusiones | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Coilocitos | 2 | 50 | 11.19 | NA | 50 | 0.20 | NA |
| Sin citoplasma | 12 | 58.33 | 159.72 | ± 199.5 | 41.66 | 4.53 | ± 5.52 |
| Pleomórficas | 19 | 47.36 | 471.46 | ± 507.3 | 52.63 | 106.03 | ± 74.41 |
| Fisuradas | 8 | 62.5 | 0.45 | ± 0.13 | 37.5 | 0.72 | ± 0.80 |
| Linfocitos | 13 | 61.53 | 74.33 | ± 99.32 | 38.46 | 17.95 | ± 21.37 |
| Sin cromatina | 7 | 71.42 | 61.72 | ± 98.70 | 28.57 | 0.76 | ± 0.39 |
| Binucleadas | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Lisis | 19 | 47.36 | 16.71 | ± 7.40 | 52.63 | 23.49 | ± 25.55 |
| Eritrocitos | 12 | 66.66 | 73.83 | ±120.3 | 33.33 | 1.25 | ± 1.11 |
| Granulocitos | 16 | 56.25 | 472.16 | ± 1034 | 43.75 | 213.12 | ± 357.5 |
| Esporas hongos | 15 | 53.33 | 5.36 | ± 4.83 | 46.66 | 1.48 | ± 1.39 |

VI.7. La relación entre la infección por OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos con los tipos celulares genitales.

De los tipos celulares analizados se observó que el número de células coilocíticas incrementa cuando hay una infección simultánea por OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos a diferencia de los individuos no infectados o bien, infectados solo por alguno de los dos agentes (Fig. 13). El sexo y la edad de los individuos en este modelo de infección simultánea también influían sobre el número elevado de coilocitos, principalmente en hembras adultas (Cuadro 14).

Cuadro 14 El cuadro muestra las variables representativas de los GLM para los cinco tipos celulares que fueron significativos con una $p > 0.05$.

| Tipo celular | Variables explicativas | Relación +/- | AIC | G/L | Valores F | Valores P |
|------------------------|------------------------|--------------|--------|-----|-----------|-----------|
| Coilocitos | Sexo | - | 387.19 | 1 | 7.5848 | 0.0080 ** |
| | OtHV-I- EBH | + | 387.19 | 1 | 6.4967 | 0.0137 * |
| | OtHV-I- Edad | + | 387.19 | 1 | 9.6333 | 0.0030 ** |
| Pleomórficas | OtHV-I | - | 204.24 | 1 | 8.1926 | 0.0060** |
| | Sexo | - | 204.24 | 1 | 11.3654 | 0.0014** |
| Linfocitos | EBH | - | 227.50 | 1 | 7.8736 | 0.0070** |
| | EH | - | 227.50 | 1 | 7.7245 | 0.0076** |
| | Sexo | - | 227.50 | 1 | 11.4903 | 0.0013* |
| | EBH-Edad | + | 227.50 | 1 | 4.4562 | 0.0396* |
| Granulocitos | OtHV-I | - | 259.87 | 1 | 5.7412 | 0.0199* |
| | EH | - | 259.87 | 1 | 8.4567 | 0.0052** |
| | Edad | - | 259.87 | 1 | 4.7839 | 0.0329* |
| Núcleos sin citoplasma | Sexo | - | 234.63 | 1 | 9.7543 | 0.0029** |

Respecto a otros tipos celulares patológicos, OtVH-1 también explicó significativamente el número de células pleomórficas así como el número de granulocitos infiltrados. Por otro lado, las infecciones por estreptococos beta-hemolíticos y esporas de hongos explicaron significativamente la presencia y cantidad de linfocitos y granulocitos (Figura 14).

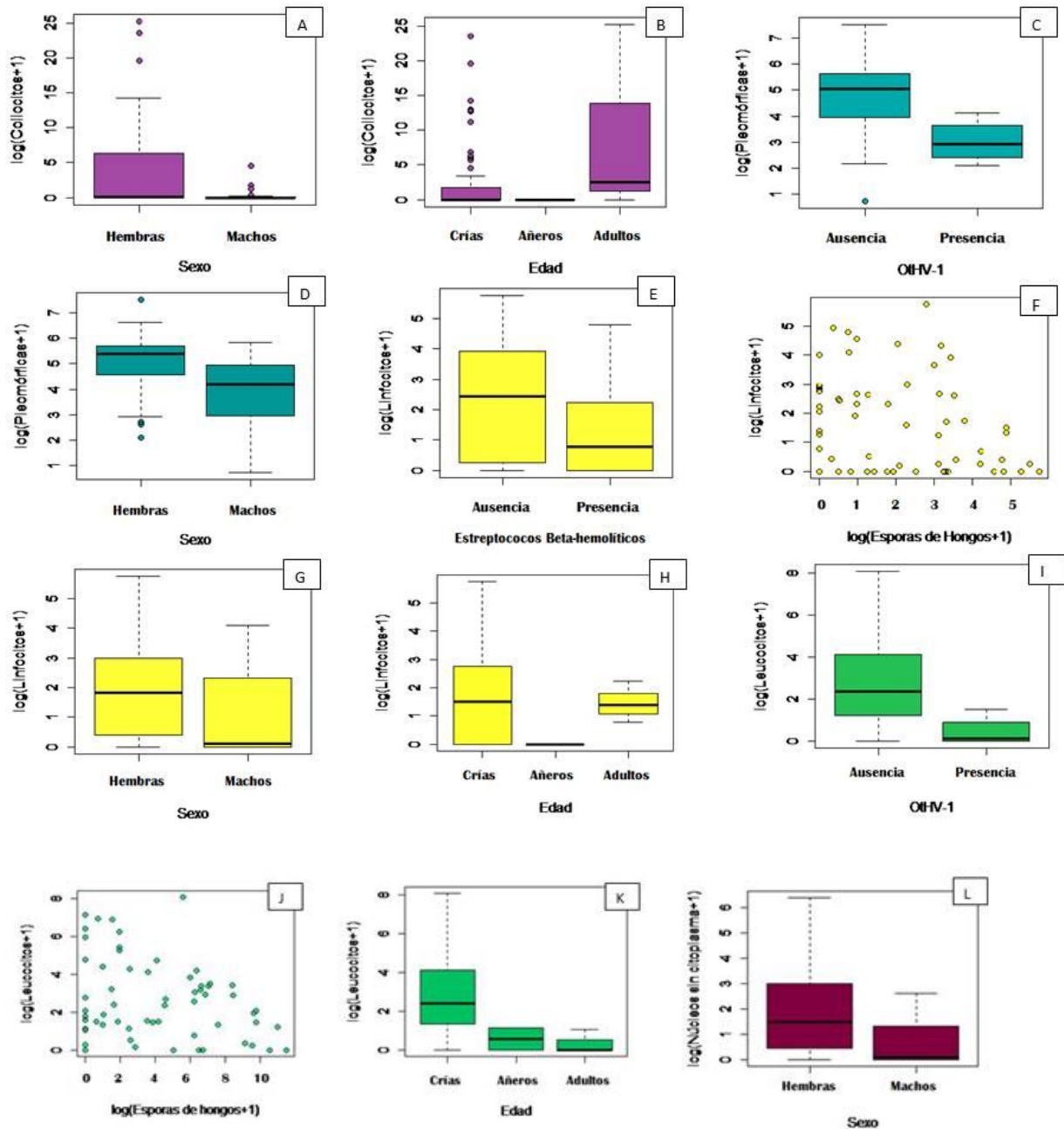


Fig. 14 Asociaciones entre infecciones genitales y tipos celulares. A) coilocitos y sexo, B) coilocitos y edad, C) pleomórficas y OtHV-1, D) pleomórficas y sexo, E) linfocitos y estreptococos beta-hemolíticos, F) linfocitos y esporas de hongos, G) linfocitos y sexo, H) linfocitos y edad, I) leucocitos y OtHV-1, J) leucocitos y esporas de hongos, K) leucocitos y edad y, L) núcleos sin citoplasma y sexo.

Respecto a los modelos restantes, las otras morfologías celulares no estuvieron relacionadas significativamente con ningún tipo de infección, pero si eran explicadas por el sexo y la edad de los individuos (Cuadro 14).

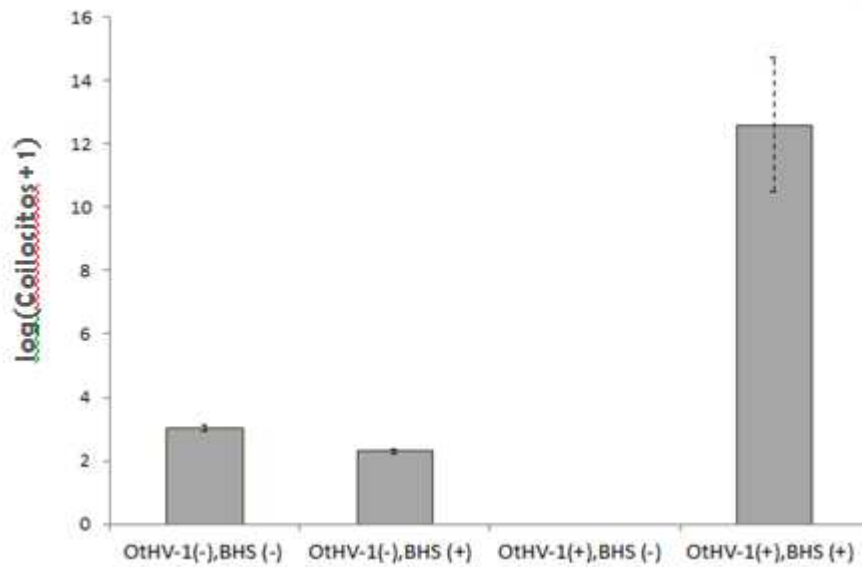


Fig. 13 Representación gráfica de la infección simultanea entre OthV-1 y estreptococos beta-hemolíticos explicando el número de células coilocíticas.

VII. DISCUSIÓN

Desde los años 80's el número de neoplasias genitales en lobos marinos de California residentes de las costas de California ha incrementado considerablemente (Landy, 1980; Gulland y cols. 1997). Hasta la fecha no se sabe cuál es la causa directa del desarrollo de cáncer urogenital en estos organismos. Con base en distintas investigaciones que se han realizado respecto a esta patología, como la presencia de infecciones virales, bacterianas, condiciones genéticas de los propios organismos y concentraciones altas de contaminantes, se considera que este tipo de cáncer es multifactorial, (Acevedo Whitehouse y cols. 2003; Bowen y cols. 2005; Johnson y cols. 2006; Lipscomb y cols. 2000; Ylitalo y cols. 2005).

Este trabajo de investigación se enfocó en tratar de responder si infecciones virales y bacterianas por agentes como OtHV-I y EBH están presentes en los lobos marinos de California residentes del Golfo de California. Adicionalmente se realizó una caracterización celular del tejido genital de los lobos marinos para determinar si existían lesiones que nos dieran evidencia de lesiones epiteliales. Por último se llevó a cabo el aislamiento de colonias bacterianas del tracto genital de tal forma que este método permitiera encontrar bacterias asociadas al desarrollo de cáncer. A continuación se discuten los resultados que se encontraron.

Del aislamiento bacteriano se obtuvieron 61 colonias, de los cuales al menos se obtuvieron nueve grupos distintos de bacterias. Estas no pudieron ser identificadas al nivel de especies, ya que por motivos logísticos y limitaciones de tiempo no se realizó la secuenciación de las colonias aisladas. Los grupos de morfotipos bacterianos permitieron identificar posibles géneros bacterianos representativos del tracto genital de los lobos marinos de California. Se había hipotetizado que debido a la estrecha historia coevolutiva de la microbiota genital en el lobo marino de California, no se esperarían diferencias en la composición de la misma comparativamente con lo reportado para los lobos marinos de las costas de California.

Con base en la literatura, los grupos que nosotros presentamos como posibles géneros del tracto genital de lobos marinos de California, son géneros compartidos en un 73.91% con los reportados para lobos marinos de California en vida silvestre residentes de aguas Estadounidenses (Johnson y cols. 2006). Algunos de los géneros reportados son;

Psytrobacter, *Moraxella*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Entrerobacter*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Streptococos*, entre otros. De los géneros que nosotros reportamos con base en las características morfológicas, de tinción y bioquímicas, se sabe que algunos son propios de la flora genital, pero otros de estos géneros son considerados patógenos que pueden generar infecciones potencialmente patógenas (Gillet y cols. 2012). Por ejemplo, los *Streptococos beta-hemolíticos* son bacterias patógenas o facultativamente patógenas. *Streptococos agalactiae* a pesar de formar parte de la flora vaginal puede dar origen a infecciones severas. Estas infecciones tienen el potencial de conducir a transformaciones en el epitelio que den lugar a cáncer cervical. Este tipo de infecciones además tienen la capacidad de ser transmitidas muy comúnmente de madres a hijos al momento del parto por la vía genital (Grupta y cols. 2012; Park y cols. 2001). Respecto a esta especie de bacteria, mis resultados sugieren que es altamente posible que y caracterizamos especies del género de *estreptococos*.

Dada la semejanza de géneros reportados por Johnson y colaboradores (2006) con los resultados de esta tesis, se propone que la carga bacteriana genital de lobos marinos de California residentes del Golfo de California no difiere de la reportada para los lobos marinos de California de las costas Californianas. Sin embargo, para constatar dicha semejanza de géneros se requerirá de la secuenciación de las colonias bacterianas aisladas de estos organismos.

No se observó una relación significativa entre la edad y sexo de los individuos con los morfotipos bacterianos aislados, a pesar de que parece existir una tendencia con algunos grupos. Por ejemplo, el morfotipo bacteriano D (*Estafilococos* y *Estomatococos*) está presente solo en hembras y el morfotipo G (*Bacillus*) sólo está presente en las crías. *Bacillus* por ejemplo se conoce por ser uno de los primeros colonizadores del trato genital al nacer y es comúnmente encontrada en neonatos. De ser así, en edad juvenil o adulta, otros grupos de bacterias pueden estar remplazando o disminuyendo la presencia de otros grupos bacterianos. Para casos como el morfotipo D, puede ser una condición dada por las diferencias fisiológicas entre sexos o deberse a las distintas actividades que realizan las hembras y machos en su vida diaria.

En términos de la diversidad de morfotipos bacterianos, ésta fue más baja en los juveniles. Sin embargo, este resultado es derivado del muestreo que incluyó muy pocos individuos juveniles. Al aumentar la muestra de individuos juveniles, la diversidad de morfotipos posiblemente incrementaría y sería semejante a la reportada para crías y adultas. Si tomamos el resultado como cierto a pesar de las limitaciones del muestreo, entonces podríamos decir que posiblemente es una etapa de recambio en la biota genital por cambios de hábitos, cambios ambientales o dependiente de la estación del año donde posiblemente ciertos grupos bacterianos predominan colonizando en mayor número desplazando otros grupos bacterianos.

Independientemente de la similitud entre grupos bacterianos reportados por Johnson y colaboradores (2006) y el presente estudio, ellos aislaron *Streptococcus beta-hemolíticos* exclusivamente en hembras adultas en vida libre, lo que les representó el 3.4% de prevalencia. Ellos propusieron que la bacteria se asocia a una transmisión de tipo sexual ya que no lo encontraron en crías ni en individuos juveniles. En contraste, el presente estudio determinó que el 58.33% de los lobos marinos de California muestreados presentaban ADN de al menos una especie de *streptococos* beta-hemolíticos. Tomando en cuenta que el 93.33% de nuestra población muestreada son crías, más que una transmisión sexual, este resultado implica que los *streptococos* beta hemolíticos han de ser transmitidos por vía genital de las madres a las crías como ha sido comúnmente reportado para humanos (Park y cols. 2001).

En el estudio de Johnson y colaboradores (2006), de los individuos que presentaban carcinomas urogenitales, el 50% estaba infectado por estreptococos beta hemolíticos, sugiriendo una relación con esta patología urogenital. En la presente tesis se encontraron resultados comparables en términos de la citología anormal genital, pero para que la relevancia de otras variables tomadas en cuenta en este estudio se discutirán más adelante.

La prevalencia de OtHV-I en lobos marinos de California de las loberas Granito y Cantiles en el Golfo de California fue de 6.6 %. Aparentemente este resultado indica que la prevalencia de OtHV-1 en lobos marinos del Golfo de California es menor en comparación a la prevalencia de 19.91% para lobos marinos de las costas de California (incluyendo individuos de todas clases de edad y sexo) (Buckles y cols. 2007).

Respecto a las vías de transmisión se ha sugerido que la transmisión del OtHV-I es principalmente por vía sexual debido al bajo número de individuos juveniles infectados por OtHV-I en comparación con hembras y machos adultos. Existe evidencia de que la transmisión de agentes virales en el humano es común en individuos con una vida sexual activa y que en muchas ocasiones estas infecciones están implicadas en el desarrollo de diversas patologías como el cáncer (Eltom y cols. 2002; Cook y cols. 2002). La evidencia de infección por OtHV-I en una hembra adulta del presente estudio, concuerda con una posible transmisión sexual.

Además de este tipo de transmisión, estudios previos sugieren una vía alterna para la transmisión, la vertical ya que detectaron un individuo prematuro infectado de OtHV-I al igual que la madre (Buckles y cols. 2007). Los resultados encontrados en la presente tesis concuerdan con esta hipótesis, ya que dos crías, presentaron infección por OtHV-I. Existe evidencia de que virus como herpesvirus simplex (HSV por sus siglas en inglés) ha sido detectado en bebés cuando las madres infectadas no llevaron a cabo un tratamiento adecuado para contrarrestar la infección durante la gestación (Cindy y cols. 2012).

De los 13 tipos celulares que detectamos por su morfología y condición en el tejido genital de lobos marinos de California, encontramos que las células coilocíticas, las ausentes de cromatina y las binucleadas son conocidas por ser células transformadas conocidas como células precancerígenas asociadas al desarrollo de cáncer (Fletcher y cols. 1983; Sarita y cols. 1997). De estos tres tipos celulares detectados, los coilocitos son células asociadas directamente con la presencia de infecciones virales como papilomavirus y herpesvirus en humanos que a su vez están asociadas a displasias en el tejido genital. (Fletcher y cols. 1983; Sarita y cols. 1997).

El virus de papiloma humano (VPH), asociado con la progresión de lesiones epiteliales cervicales, es un ejemplo de interacciones entre agentes infecciosos y el desarrollo de cáncer. Se sabe que alrededor del 70 % de las mujeres a nivel mundial con cáncer cervicouterino presentan infecciones persistentes de los tipos 16 y 18 de VPH (Koshiol y cols. 2008).

Relacionando nuestros resultados de infección por OtHV-I y EBH y la presencia de células coilocíticas, se puede decir que la presencia de estos agentes infecciosos influyen significativamente el incremento de células coilocíticas en el tejido genital de lobos marinos. Estudios recientes han corroborado que bacterias como *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* y especies del género *Prevotella*, a pesar de ser habitantes comunes de la microbiota vaginal de humanos, pueden generar infecciones severas e incrementando el riesgo de padecer cáncer cervical. (Verstraelen y cols. 2009; Gillet y cols. 2012).

Aún más interesante son los casos reportados de infecciones simultáneas entre virus y bacterias. Estudios reportan que grupos de mujeres han presentado infecciones por agentes infecciosos como HVS, citomegalovirus y papilomavirus humano que a su vez tienen algún tipo de infección por patógenos como *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Chlamydia trichomatis* además de algunas levaduras (Marks y Lycke, 2008). En particular, existe una correlación significativa de infecciones de microorganismos como *Mycoplasma* y *Chlamydia* spp. que están asociadas con la presencia de VPH en mujeres que presentan células coilocíticas, por lo que se ha sugerido que los microorganismos pueden promover, en conjunto con el VPH, displasias cervicales (Guijon y cols. 1992; Marks y Lycke, 2008). Es posible que la relación entre la infección simultánea de OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos con la ocurrencia e intensidad de las células coilocíticas posiblemente desempeñan un papel semejante para el desarrollo de cáncer urogenital en el lobo marino de California.

Además de la relación arriba descrita, el sexo y la edad son factores que influyen en el número de células coilocíticas en humanos, debido al incremento en el riesgo de la transmisión sexual de los patógenos pro-transformación celular (Sarita y cols. 1997). Con los resultados de esta tesis no es posible asegurar que al haber encontrado un número de células precancerígenas estadísticamente mayor en las hembras adultas es debido a la transmisión sexual del OtHV-I y de estreptococos beta-hemolíticos, ya que se cuenta con un cohorte de hembras adultas muy limitado. Sin embargo, es válido plantear que ésta sea una vía de infección que explique la alta intensidad de células precancerígenas. En el mismo contexto de células precancerígenas, las ausentes de cromatina y las binucleadas no fueron significativamente explicadas por ningún tipo de infección ni por categorías de edad

o sexo, pero se sabe que la presencia de estas células es de suma importancia cuando se requiere realizar un diagnóstico detallado de displasia cervical en humanos (Fletcher y cols. 1983).

Al analizar la presencia de células pleomórficas, resulta interesante que la condición de estas células fue significativamente explicada por una relación inversamente proporcional con la infección por OtHV-I, donde había un número menos de células pleomórficas cuando los individuos estaban infectados por OtHV-I. Es posible que el pleomorfismo celular refleje cambios en el epitelio genital debido al proceso de maduración celular o transición del epitelio cilíndrico a escamoso (Echebarría y cols. 2008). O posiblemente las células pleomórficas son una etapa de transición hacia la transformación celular.

Tomando en cuenta que los virus, bacterias y hongos suelen inducir una respuesta inmune, se esperaría encontrar una relación entre parámetros inmunes y las infecciones. Se observó que los linfocitos y granulocitos infiltrados en las muestras de epitelio genital estaban inversamente relacionados con las infecciones por OtHV-I, EBH y esporas de hongos. Si los granulocitos infiltrados reflejan la cantidad de granulocitos sistémicos, implicaría que los animales con infección por estos agentes patógenos posiblemente presentaban cierta inmunosupresión. También puede ser que esta relación indique que los linfocitos y granulocitos pudieran estar en el epitelio en respuesta a otras infecciones que no fueron investigadas en el presente.

El presente estudio ofrece evidencia molecular de la presencia de OtHV-I en lobos marinos de al menos dos loberas del Golfo de California, que los estreptococos beta-hemolíticos son bacterias genitales comunes en crías y adultos y que existe transformación celular precancerígena del epitelio genital desde temprana edad. en cuenta que todos los elementos previamente identificados como relacionados con el carcinoma urogenital, desde aspectos genéticos hasta infecciosos, están presentes en los lobos marinos del Pacífico Estadounidense y el Golfo de California, y que la excepción son los pesticidas organoclorados (Acevedo Whitehouse y cols. 2003; Bowen y cols. 2005; Niño-Torres y cols. 2009), serían los contaminantes organoclorados (encontrados en concentraciones significativamente mayores en el Pacífico Estadounidense) los que juegan un papel crucial. Posiblemente su presencia en altas concentraciones no permite que el sistema inmune

detecte y destruya a las células precancerígenas transformadas por el OtHV-I y estreptococos beta-hemolíticos en los animales del Pacífico Estadounidense y como consecuencia estos desarrollan cáncer urogenital. El efecto de inmunosupresión por contaminantes organoclorados ya se ha reportado para marsopas (*Phocoena phocoena*) (Jepson y cols. 2005).

Es bien sabido que el cáncer urogenital del lobo marino de California es una patología compleja. Nuestros resultados hasta el momento generan nueva información que puede ayudar a proponer nuevos modelos de ocurrencia de este tipo de carcinomas, pero muchos estudios más son necesarios para poder entender mejor la complejidad de esta enfermedad.

VIII. CONCLUSIONES

Los morfotipos bacterianos detectados en este trabajo sirven como una línea base para conocer algunos de los microorganismos bacterianos que habitan en el tracto genital de lobos marinos de Golfo de California.

El gamaherpesvirus otárico (OthV-I) está presente en lobos marinos de California residentes del Golfo de California a una menor prevalencia de la encontrada en los lobos marinos de California del Pacífico Estadounidense.

Los estreptococos β -hemolíticos (EBH) son bacterias genitales comunes del tracto genital del lobo marino de California en el Golfo de California.

La transformación celular del epitelio genital está significativamente asociada a la infección simultánea por OthV-I y EBH.

A pesar que todos los factores asociados con cáncer, incluyendo los agentes infecciosos, están presentes en los individuos del Golfo de California, a excepción de niveles de contaminantes comparables, hasta la fecha no hay casos reportados de carcinomas ni de posibles protuberancias que sugieran cáncer en lobos marinos de California en el Golfo de California.

Considerando el punto anterior, propongo que los lobos marinos del Golfo de California tienen mecanismos eficientes de reparación y eliminación de células transformadas que les impide la acumulación de células precancerígenas y a su vez evitar la formación de carcinomas. La ausencia de evidencia de carcinomas en animales del Golfo de California, sugiere que los contaminantes son posibles desencadenantes de carcinomas en lobos marinos de California en aguas del Pacífico Estadounidense.

IX. PERSPECTIVAS

Para determinar concretamente cuáles son los grupos de bacterias genitales aislados de estos animales, se requeriría de la secuenciación de las colonias bacterianas que se encuentran preservadas en el Laboratorio de GMEE.

Es recomendable realizar estudios que permitan investigar la prevalencia de OtHV-I, EBH y células preneoplásicas a lo largo de la distribución de lobo marino de California.

X. LITERATURA CITADA

Acevedo Whitehouse, Karina Alethya. 2001. *Prevalencia de Leptospirosis en crías de Zalophus californianus californianus en siete colonias reproductivas del Golfo de California durante la temporada reproductiva del 2000*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos William. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature*. 442: 35

Acevedo-Whitehouse K. 2004. *Influence of inbreeding on disease susceptibility in natural populations* [dissertation]. Cambridge: University of Cambridge.

Acevedo-Whitehouse K, Rocha-Gosselin A, Gendron D. 2010. A novel non- invasive tool for disease surveillance of free-ranging whales and its relevance to conservations programs. *Animal Conservation*.13: 217-225.

Ahment Z, Stanier P, Harvey D, Holt D. 1999. New PCR primers for the sensitive detection and specific identification of Group B β -hemolytic streptococci in cerebrospinal fluid. *Molecular and Cellular Probes*. 13: 349-357.

Andreu PG, Casaña HP, Delgado HR. 2005. La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev. cubana med*. 44(1-2): 1-12

Aurioles-Gamboa D, Zavala-González A. 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino, *Zalophus Californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*. 20(4): 535-549

Ball E. 1999. Revisión; Virus Papiloma Humano. *Biología Molecular, Genética y Mecanismo Oncogénico*. Parte II. *Dermatología Venezolana*. 37(1): 5-10

Bartholomew A. 1970. A model for the evolution of pinniped polygyny. *Evolution* 24: 546-559.

Bellamy COC. 1997. p53 and Apoptosis. *British Medical Bulletin* 53(3): 522-538

Bosch FX, Muñoz N, Sanjosé S. 1997. Human papillomavirus and other risk factor for cervical cancer. *Biomed Pharmacother.* 51:268-275.

Bosch FX. 2011. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 14:2189-2204.

Bowen L, Aldridge BM, Gulland F, Bonn W, DeLong R, Melin S, Lowenstine LJ, Stott JL, Johnson ML. 2004. Class II multiformity generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics* 56(1): 12-27

Bowen L, Aldridge BM, DeLong R, Melin S, Buckles EL, Gulland F, Lowenstine LJ, Stott, JL, Johnson ML. 2005. An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics.* 56: 846-848

Brown RJ, Smith AW, Morejohn GV, DeLong RL. 1980. Metastatic adenocarcinoma in two California sea lions, *Zalophus c. californianus*. *J Wild Dis.* 16: 261-263.

Brown ZA, Selke S, Zeh J, Kopelman J, Maslow A, Ashley RL, Watts H, Berry S, Herd M, Corey L. 1997. The acquisition of Herpes Simplex Virus during pregnancy. *Journal of Medicine.* 337(8): 509-515.

Buckles EL, Lowenstine LJ, Funke C, Vittore KR, Wong NH, St Leger AJ, Greig JD, Duerr SR, Gulland FMD, Stott JL. 2006. Otarine Herpesvirus-1, not papillomavirus, is associated with Endemic Tumours in California Sea Lion (*Zalophus californianus*). *J. Comp. Pathol.*

Buckles EL, Lowenstine LJ, DeLong RL, Melin Sr, Vittore RK, Wong H, Ross GL, St Leger JA, Greig JD, Duerr SR, Gulland FMD, Stott LJ. 2007. Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. *Veterinary microbiology.* 120: 1-8.

Case TJ, Cody ML. 1983. Islands biogeography in the Sea of Cortez. University of California Press. Berkeley. 503 pp.

Cascales AM. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. Anal. Real. Acad. Nal. Farm. 69(1):37-64.

Carretta JV, Forney KA, Muto MM, Barlow J, Baker J, Lowry M. 2003. Draft U.S. Pacific Marine Mammal Stock Assessments: 2003. NOAA-TM-NMFS-SWSC. Technical memorandum. 307 pp.

Cindy W, Becky MA. 2012. Treatment of HSV Infection in Late Pregnancy. FPNI's Clinical Inquiries. American Family Physician Web site at www.aafp.org/afp. [En línea].

Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine K. 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes and Infection 5: 598–600.

Coffey DJ. 1977. Dolphins, whales and porpoises: in Encyclopedia of sea mammals. McMillan Pub. Co. New York. Chapter; Pinnipeds: Seals, sea lions and walruses pp. 125-197.

Cook RD, Hodgson TA, Waugh AC, Molyneux EM, Borgstein E, Sherry A, Teo CG, Porter SR. 2002. Mixed patterns of transmission of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families. J. Gen. Virol. 83: 1613-1619.

Cruz GL, Faxas ME. 2004. Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. Rev Cubana Med. 43(1):1-8.

Dandekar S, Sankaran S, Glavan T. 2008. Chapter 17. HIV and the mucosa: no safe haven. In Immunity against mucosal pathogens. (Eds) Vajdy Michael. 459- 482 pp.

Dasgupta S. 2000. Immunology of cancer cervix. J Indian Med Assoc. 98(2):56-59.

De Guise SA, Lagace A, Beland P. 1994. Tumors in St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Vet Pathol. 31: 444-449.

Díaz R, Gamazo C, López-Goñi. 2000. Manual práctico de microbiología. 2ª Edición. Editorial Masson. Barcelona, España. 216 p.

- Duignan, P.J. 2000. Diseases in New Zealand sea mammals. *Surveillance* 27(3): 9–15.
- Echebarría AP, Urizar AJM. 2008. Displasia epitelial. Concepto y significación. *Av. Odontostomatología*. 24(1): 81-88.
- Eltom MA, Mbulaiteye SM, Dada AJ Whitby D, Biggar RJ. 2002. Transmission of human herpesvirus 8 by sexual activity among adults in Lagos. *Nigeria Aids*. 16: 2473-2478.
- Fletcher S, Norval M. 1983. On the nature of the deep cellular disturbances in humans papilloma-virus infections of the squamous cervical epithelium. *The Lancet*. 546-548
- Fridman JS, Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 22: 9030-9040.
- García RMC. 1992. *Conducta territorial de lobo marino *Zalophus californianus* en la lobera los Cantiles, Isla Ángel de la Guarda, Golfo de California, México*. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. 123 p.
- Gamboa DA, Rodríguez FG, Rodríguez MR, Camacho CH. 2003. Interacción entre el lobo marino de California y la pesquería artesanal en la Bahía de La Paz, Golfo de California, México. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España y Portugal. REDALYC*. 29(3): 357-370.
- Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. 2012. Association between Bacterial Vaginosis and Cervical Intraepithelial Neoplasia: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7(10): e45201. doi:10.1371/journal.pone.0045201
- Greenblatt RJ, Quackenbush SL, Casey RN, Rovnak J, Balasz GH, Work TM, Casey JW, Sutton CA. 2005. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marina turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. *J. Virol*. 79: 1125-1132.
- Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 4^a edition. Cold Spring Harbor, New York. 630 pp.

Guijon F, Paraskevas M, Rand F, Heywood E, Brunham R, McNicol P. 1992. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 37: 185-191.

Gulland FMD, Trupkiewicz JG, Spraker TR, Lowenstine LJ. 1996. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *Journal of Wildlife Diseases.* 32(2): 250-258.

Gulland FMD, Lowenstine LJ, Colagross A, Morgan L, Spraker T. 1996. Leptospirosis in California sea lions stranded along the central California coast, 1981-1994. *J. Wild. Dis.* 32 (4): 572-578.

Gulland FMD, Lowenstine LJ, Spraker TR. 2001. Noninfectious Diseases. Section VI. Pathology of Marine Mammals. In *CRC Handbook of Marine Mammals Medicine*. Second Edition. Ed. Gulland FMD, Dierafu LA. 521-537 pp.

Gulland FMD, Hall AJ. 2007. Is marine mammals health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammals disease. *EcoHealth.* 4: 135- 150.

Gupta R, Das A, Krishna PS. 2012. *Streptococcus agalactiae* causing pyometria in an elderly female with cervical cancer. *J Infect Dev Ctries.* 6(12): 891-894.

Hall AJ, Kalantzi OI, Thomas GO. 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in grey seals during their first year of life-are they thyroid hormone endocrine disrupters?. *Environmental Pollution.* 126(1): 29-37.

Heide-Jorgensen M.P, Harkonen T, Aberg P.1992. Long term effects of epizootic in harbor seals in the Kattegat-Skagerrak and adjacent areas. *Ambio* 21. 511 pp.

Herbst LH, Klein PA. 1995. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. *Environ. Health. Perspect.* 103(4): 27-30.

Herbst LH. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Dis. Aquat. Org.* 22: 1-12.

Howard EB, Brit JO, Simpson JG. 1983. Neoplasm in marine mammals. In Pathobiology of marine mammals diseases, Vol II. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 95-107.

Inter medico, Papanicolaou staining procedure. Ontario, Canada. www.intermedico.com [en línea].

Jepson PD, Bennett PM, Allchin CR, Law RJ, Kuiken T, Baker JR, Rogan E, Kirkwood JK. 1999. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbor porpoises from England and Wales. *Science of the Total Environment*. 243, 244: 339-348.

Jepson PD, Bennett PM, Deaville R, Allchin CR, Baker JR, Law RJ. 2005. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(1): 238-248.

Johnson S, Lowenstine L, Gulland F, Jang S, Imai D, Almy F, DeLong R, Gardner I. 2006. Aerobic bacterial flora of the vagina and prepuce of California sea lions (*Zalophus californianus*) and investigation of association with urogenital carcinoma. *Veterinary Microbiology*. 114: 94-103.

Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*. 22(6): 100-106.

King JE. 1983. *Seals of the World*. British Museum Nat. Hist. 2da ed., Cornell University Press. Ithaca, N.Y. 240 p.

King PD, Hure CM, Goldstein T, Aldridge MB, Gulland MD, Saliki TJ, Buckles LE, Lowenstine JL, Stott LJ. (2002). Otarine herpesvirus-1: a novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*. 86: 131-132.

Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. 2008. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 168: 123–137.

Landy RB. 1980. A review of neoplasia in marine mammals: In *The comparative pathology of zoo animals*. Montali RJ, Migaki G (Eds). Smithsonian Institution Press. Washington D.C. 579-584 pp.

Lipscomb TP, Scott DP, Garber RL, Krafft AE, Tsai MM, Lichy JH, Taubenberger JK, Schulman FY, Gulland FMD. 2000. Common Metastatic Carcinoma of California Sea Lions (*Zalophus californianus*): Evidence of Genital Origin and Association with Novel Gammaherpesvirus. *Vet Pathol.* 37: 609-615.

Lloyd-Smith JO, Greig DJ, Hietala S, Ghneim GS, Palmer L, Leger J, Grenfell BT, Gulland FMD. 2007. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species?. *Bio Med Central.* 7(125): 2

Lowry MS, Stewart BS, Heath CB, Yochem PK, Francis JM. 1991. Seasonal and annual variability in the diet of California sea lions *Zalophus californianus* at San Nicolas Island, California, 1981-86. *Fishery Bulletin, U. S.* 89:331-336.

Lyon ET, DeLong RL, Melin SR, Tolliver SC. 1997. Uncinariasis in northern fur seal and California sea lion pups from California. *Journal of Wildlife Diseases.* 33(4): 848-849.

Mackereth GF, Webb KM, Keefe JS, Duignan PJ, Kittelberger R. 2005. Serological survey of pre-weaned New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) for brucellosis and leptospirosis. *New Zealand Veterinary Journal* 53(6): 428-432

Maluf LY. 1983. The Physical Oceanography. En: *Island Biogeography of the Sea of Cortez.* Univ. Calif. Press. pp. 26-48

Marks E, Lycke N. 2008. Chapter 16. Immunity against *Chlamydia trachomatis*. In *Immunity against mucosal pathogens.* (Eds) Vajdy Michael. pp. 433-458

McAloose D, Newton AL. 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature reviews.* 9: 517-526.

Mellink E. y Romero A. 2005. Dieta del lobo marino de california, (*Zalophus californianus*) en la Isla San Jorge, en el norte del Golfo de California, México. *Ciencias Marinas.* 31(2): 369-377.

Meza-Junco J, Montaña-Loza A, Aguayo-González A. 2006. Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación Clínica*. 58(1): 56-70

Muñoz A. 1997. Cáncer. Genes y nuevas terapias. Capítulo 1; Origen y causas del cáncer. Editorial Helices. pp. 6-23.

Niño-Torres CA, Gardner SC, Zenteno-Savín T, Ylitalo GM. 2009. Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in California Sea Lion (*Zalophus californianus californianus*) from the Gulf of California, México. *Arch Environ Contam Toxicol*. 56:350-359.

Nacayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. 2011. Natural Killer (NK)- dendritic cell interactions generated MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4, T cells. *PNAS*. 108(45): 18360-18365

Nusser SM, Clark WR, Otis DL, Huang L. 2008. Sampling Considerations for Diseases Surveillance in Wildlife Populations. *Journal of Wildlife Management*. 72(1): 52-60.

Park CH, Vandel NM, Ruprai DK, Martin EA, Gates KM, Coker D. 2001. Detection of group Streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1): 408-409.

Peterson SR. and Bartholomew AG. 1967. The Natural History and Behavior of the California sea lion. *Am. Soc. Mammal. Spec. Pub. No 179 p.*

Pyecroft SB, Pearse AM, Loh R, Swift K, Belov K, Fox N, Noonan E, Hayes D, Hyatt A, Wang L, Boyle D, Church J, Middleton D, Moore R. 2007. Towards a case definition for devil facial tumor diseases: what is it?. *EcoHealth*. 4: 346-351.

Ramírez CR, Carracedo AJ, Moreno AC, Guerra PF. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin*. 14(6):367-374

Reijnders P, Brasseur S, Vandern JP, Vander-Wolf, Boyd L, Harwood J, Lavigne D, Lowry L. 1994. Seals, fur seals, sea lions and walrus. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Seal specialist Group, Gland, Switzerland. 88 pp.

Rincón OL, Pareja LR, Jaramillo J, Aristizabal BH. 2007. Virus del Papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 58(3): 202-212

Ross PS, De Swart RL, Timmerarman HH, Reijnders PJH, Vos JG, Van Loveren H, Osterhaus ADME. 1996. Suppression of natural Killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring. Aquatic Toxicology. 34: 71-84

Sakamoto K, White M. 2002. Dermal melanoma with schwannoma-like differentiation in a Brown bullhead catfish (*Ictalurus nebulosus*). J. Vet. Diagn. Invest. 14: 247-250.

Sarita CD, Valdéz SS, Reyes RI. 1997. Incidencia de cambios citológicos por el Virus del Papiloma Humano (VPH): Hallazgos citológicos confirmados por biopsias. Rev. Med. Dom. 58(2): 8-12.

Solidoro AS. 2006. Cáncer en el siglo XXI. Acta Med Per. 23(2):112-118.

Spraker TR, DeLong RL, Lyons ET, Melin SR. 2007. Hookworm enteritis with bacteremia in California sea lion pups on San Miguel Island. Journal of Wildlife diseases. 43(2): 179-188.

Struethers JK, Westran RP. 2003. Clinical Bacteriology. Editorial Masson. Publishing Ltd. London UK. 189 p.

Szteren Jezierski Diana Irene. 2006. *Regionalización Ecológica de las colonias reproductivas de Zalophus c. californianus en el Golfo de California., México*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur.

Szteren D. y Aurióles D. (2006). Population status and trends of the California Sea Lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California. AK-SG-01: 379-381.

Valsecchi E, Zanelatto RC. 2003. Molecular analysis of the social and population structure of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*): conservation implications. *J Cetacean Res Manag.* 5: 69–75.

Van Bresseem MF, Van Waerebeek K, Raga JA. 1999. A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbiliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host populations dynamics. *Dis. Aquat. Org.* 38:53-65.

VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz E, Coulter S, Garber L, Rose TM. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 34(7): 1666-1671.

Vedros NA, Smith AW, Schnewal MG, Hubbard R. 1971. Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science.* 172: 1250–1251.

Velez Martha María. 2012. *Identification of accurate sampling technique to detect OtHV-I in California sea lions.* Master of Science in Biology: Conservation Biology. San Francisco, California.

Verstraelen H, Verhelst R (2009) Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 1109–1124.

Villacís SD. 1998. Reunión para la elaboración del proyecto de conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Pinnípedos en México. Ensenada, Baja California.

Wang XW. 1999. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer.* 19(6A): 4759-4771

Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, Aza-Blanc P. 2004. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene.* 23:8392-8400.

Ylitalo GM, Stein JE, Hom T, Johnson LL, Tilbury KL, Hall AJ, Rowles T, Greig D, Lowenstine LJ, Gulland FMD. 2005. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lion (*Zalophus californianus*). Marine pollution Bulletin 50: 30-39.

Zhao X, Cao X, Zheng Y, Tanq J, Cai W, Wang H, Gao Y, Wang Y. 2012. Relationship between cervical diseases and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. J Med Virol. 84 (12): 1920-1927.

Zavala GA. 1993. Biología del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) en la región de las Grandes Islas del Golfo de California, México. Facultad de Ciencias. UNAM. Tesis de Maestría. México, D.F.

Zavala-González A, y Mellink E. 2000. Historical exploitation of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico. Mar. Fish. Rev. 62(1):35-38

Zeng J, Yang H, Lou K. 2010. Prokaryotic diversity of a non-sulfide, low-salt cold spring sediment of Shawan County, China. Journal of Basic Microbiology. 50: 484-493.

R 2.12.2. Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Acceso Abril-Agosto 2013.

Anexo 1 Descripción de colonias bacterianas y clasificación según morfología, tinción gram y bioquímica.

| DESCRIPCIÓN DE COLONIAS | | | | | | | | TINCIÓN GRAM | | | BIOQUÍMICA | | | Mo | |
|-------------------------|---------------|------------|------------|-------|---------|----------|-----------|--------------|-----------|--------------|------------|-----|-----|-----|---|
| ID | Color | Diámetro | Forma | L/R | Consist | Elevac | Bordes | +/- | FORMA | ESTRUCT | KOH | OXI | CAT | COA | A |
| Placa 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12AGR02 | Blancas | 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | redes | + | + | + | | A |
| 12ACA01 | Blanquecinas | 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | agrupaciones | + | + | + | | B |
| | blanquecinas | 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| | amarillenta | 1.5mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| 12ACA01 | blanquecinas | < 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| | Blanquecinas | 1.5 mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| 12AGR01 | blanquecinas | 1 mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | bacilos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| | Blanquecinas | 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | | A |
| | blanquecinas | 2mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | redes | + | + | + | | A |
| | transparente | <1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | empalizada | + | + | + | | A |
| | transparente | 1mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | empalizada | + | + | + | | A |
| Placa 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12GR04 | blanquecinas | < 1mm | amorfa | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | - | Cocos | agrupaciones | + | + | + | | B |
| | blanquecinas | 1 mm | circulares | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | + | bacilos | cadena | - | - | - | | C |
| 12GR04 | transparentes | < 1 mm | circulares | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | | A |
| 12GR02 | transparentes | < 1mm | circulares | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | + | cocos | cadena | - | - | + | - | D |
| 12GR02 | transparentes | puntiforme | circulares | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | - | cocos | agrupaciones | + | + | + | | B |
| 12GR06 | blanquecinas | puntiforme | amorfa | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocos | diplococos | + | - | + | | E |
| | blanca | 1.2mm | circulares | lisas | Creмосa | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | - | + | | F |
| | transparentes | puntiforme | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | | A |
| Placa 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12GR07 | blancas | 2.5 mm | circulares | lisa | Seca | plana | continuos | + | Bacilos | solos | - | - | - | | C |
| | blancas | 1.4 mm | amorfo | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | empalizada | + | - | + | | F |
| | transparentes | puntiforme | amorfo | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | agrupaciones | + | + | + | | A |
| | blancas | 1mm | amorfo | lisa | Húmedas | plana | continuos | + | Cocos | agrupaciones | - | - | + | - | D |
| 12GR07 | Amarilla | 1mm | ameboide | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | + | cocos | redes | - | - | + | - | D |
| 12GR09 | blanquecinas | 1mm | amorfa | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | cadena | + | + | + | | A |
| | amarillenta | NA | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | | A |
| 12GR09 | blancas | 3mm | amorfa | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | empalizada | + | + | + | | A |
| | blancas | 1mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | cerrulado | - | Cocos | diplococos | + | + | + | | B |
| | transparentes | puntiforme | circulares | lisa | Húmedas | plana | continuos | + | Cocos | agrupaciones | - | + | + | | B |
| 12AGR08 | blanquecinas | 2mm | amorfa | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Cocos | agrupaciones | - | - | + | - | D |
| | blanquecinas | 1mm | amorfa | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Estreptoc | cadena | - | - | + | - | D |
| | transparentes | puntiforme | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | + | bacilos | agrupaciones | - | - | + | - | G |
| 12GR06 | blanquecinas | 1mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | + | bacilos | cadena | - | - | + | - | H |
| | blanquecinas | 1mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | cerrulado | - | Cocos | diplococos | + | + | + | | B |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------|------------|---------------------|-------|----------|----------|-----------|---|-----------|--------------|---|---|---|---|
| Placa 4 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12GR10 | rosada | 2mm | amorfa | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | cadena | + | + | + | B |
| | amarillenta | 1.5 mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | cadena | + | + | + | B |
| 12GR10 | blanquecinas | 3.5 mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | A |
| | blanquecinas | 2mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | en pares | + | + | + | B |
| | blanquecinas | 2mm | radial | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | en pares | + | - | + | E |
| | rosada | 2mm | radial | lisa | /cremosa | cóncavas | continuos | - | Cocobac | en pares | + | + | + | A |
| | blanquecinas | 1mm | circulares | lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | A |
| 12GR11 | blanquecinas | 3mm | radial | lisa | Butirosa | cóncavas | continuos | - | Bacilos | empalizada | + | - | + | F |
| | transparente | NA | amorfa | Lisa | Seca | cóncavas | continuos | + | Bacilos | empalizada | - | + | + | H |
| | blanquecinas | 2mm | circulares | Lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | en pares | + | - | + | E |
| 12GR12 | blanquecinas | 5mm | amorfo | NA | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Estreptoc | cadena | - | - | - | I |
| | blanquecinas | 1.5mm | amorfa | Lisa | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Cocobac | redes | + | + | + | A |
| | amarillenta | puntiforme | circulares | Lisa | acuosa | cóncavas | continuos | - | Bacilos | agrupaciones | + | + | + | A |
| Placa 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12GR12 | rosada | 1mm | circulares | NA | NA | cóncavas | continuos | + | Cocobac | agrupaciones | - | - | + | H |
| 12GR11 | rosada | 2.5 mm | circulares | NA | NA | cóncavas | continuos | - | Diplococ | en pares | + | + | + | B |
| 12GR14 | blanquecinas | <1mm | NA | Rug | Secas | NA | NA | - | Cocobac | agrupaciones | + | + | + | A |
| | blanquecina | 4mm | ovoide | NA | Húmedas | cóncavas | continuos | - | Bacilos | agrupaciones | + | + | + | A |
| 12GR13 | blancas | NA | amorfo | Rug | cremosas | NA | irregular | - | cocos | redes | + | + | + | B |
| | blanquecinas | < 1mm | circulares | lisas | NA | NA | continuos | - | Cocobac | agrupaciones | + | - | + | F |
| | blanquecinas | < 1 mm | circulares | lisas | NA | cóncavas | continuos | + | bacilos | agrupaciones | - | - | + | H |
| 12GR14 | rosada | < 1mm | circulares | lisas | NA | cóncavas | continuos | - | Bacilos | en pares | + | + | + | A |
| | rosadas | 2mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Bacilos | empalizada | - | - | + | H |
| 12GR13 | blanquecina | 2.5 mm | ameboide | lisas | Húmedas | cóncavas | irregular | - | Cocobac | cadena | + | + | + | A |
| 12GR08 | transparentes | < 1 mm | circulares | NA | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Bacilos | agrupaciones | - | - | - | C |
| 12GR06 | rosada | 3-4 mm | amorfo | NA | Húmedas | cóncavas | continuos | - | cocos | agrupaciones | + | - | + | E |
| | blanquecinas | 1.5 mm | circulares | lisas | Húmedas | cóncavas | continuos | + | Bacilos | empalizada | - | - | - | C |
| | Blanca-verde | 2mm | colonia filamentosa | NA | NA | NA | NA | - | cocos | solos | + | + | + | B |