



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología.

Morfología, ultraestructura y genética de parásitos de lobo marino de California,  
*Zalophus californianus*, en el Golfo de California

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de  
Licenciada en Biología

**Presenta:**

Mónica Izquierdo Suzán

**Dirigido por:**

Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Santiago Vergara Pineda  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Rolando Tenoch Barcenás Luna  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

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.

## RESUMEN

Los endoparásitos helmintos y ectoparásitos del lobo marino de California (*Zalophus californianus*), especie que se distribuye desde Columbia Británica en Canadá hasta las islas Marías en México, están ampliamente documentados para sus poblaciones en Estados Unidos y Canadá. Sin embargo, existen pocos registros para sus poblaciones en el Golfo de California y Pacífico Mexicano. Durante una salida de campo en invierno de 2012, se realizaron necropsias de tres hembras adultas de lobo marino muertas en las colonias de reproducción de Isla Granito y Los Cantiles. En cada caso se registraron y colectaron parásitos pertenecientes a cinco grupos taxonómicos diferentes. Los nematodos se encontraron en congregaciones dentro del intestino y se identificaron mediante el uso de claves para helmintos como pertenecientes al género *Contraecum* y *Anisakis*. En el tracto digestivo también fueron encontrados parásitos acantocéfalos y cestodos. Los primeros, identificados como género *Corynosoma*, se encontraban completamente adheridos al intestino, incluso perforando la pared del mismo. Los cestodos encontrados fueron identificados macroscópicamente como *Diphyllobothrium* sp. Solo se encontró un tipo de ectoparásito en los tres animales, el cual fue identificado como *Antarctophthirus microchir*. También se detectó la presencia atípica de un ácaro perteneciente al género *Orthohalarachne* sp. en el tracto digestivo. Es probable que su hallazgo en el tracto digestivo se deba a una deglución accidental. Sin embargo, el espécimen encontrado era una larva y no presentaba daño químico ni mecánico en su cutícula, como se esperaría a partir de la exposición a pH bajo y sales biliares gástricas, lo cual plantea preguntas sobre su localización accidental. Estudios futuros, a nivel molecular y ultraestructural, sobre la diversidad parasítica del lobo marino de California permitirán generar información útil para monitorear el estado de las colonias en el Golfo de California, además de ayudar a entender las relaciones coevolutivas entre parásitos y hospederos.

## SUMMARY

The California sea lion (*Zalophus californianus*) is distributed along the British Columbia in Canada throughout the western coast of the US and to the Islas Marias in Mexico. Endoparasitic helminths and ectoparasites are widely documented for California sea lion populations from the US and Canada, however there are extremely few parasitological records for the species in the Gulf of California and Mexican Pacific coast. In winter of 2012, during a research survey of sea lion diseases in the Gulf of California, three necropsies were conducted on apparently healthy adult female sea lions that died on the breeding colonies of Granito and Los Cantiles. In each case ecto and endoparasites were recorded, collected and preserved. The parasites belonged to five different taxonomic groups. Nematodes were found in congregations inside the gut, and were identified, using taxonomical keys, as belonging to the genus *Contracaecum* and *Anisakis*. Acantocephala and cestodes were also found in the intestines. The first, firmly adhered to the gut and occasionally perforating the intestinal mucosa, were identified as *Corynosoma*. The cestodes were identified as belonging to the genus *Diphyllobothrium*. The sea lions only harbored one type of ectoparasite, identified as *Antarctophthirus microchir*, a hematophagous sucking louse. We also detected the atypical presence of a pharyngeal mite belonging to the genus *Orthohalarachne* in the intestinal tract. This unexpected finding is most likely due to accidental swallowing of the mite, however the specimen found was a larval stage that did not show any damage to the cuticle as would be expected from exposure to low pH and biliary salts in the stomach. Further studies at a molecular and ultrastructural level, to investigate patterns of diversity of these parasites will offer information that might prove useful to monitor the status of sea lion colonies in the Gulf of California, and might help clarify phylogenetic relationships between the parasites and their host.

## DEDICATORIAS

A mi papá por sus historias, su motivación, su apoyo y por fomentar en mí la semilla de la curiosidad que me ha servido enormemente en esta carrera que elegí: *Sin ti no sería la persona que soy ahora, te admiro y amo papá.*

A mi mamá por compartir tantas cosas conmigo y por apoyarme en cada decisión y paso que he dado en mi vida: *Sé que algunas de mis decisiones no fueron fáciles para ti pero gracias por apoyarme, te amo mamá.*

A mis hermanos porque sin su buen humor, críticas y molestias la vida sería aburrida y monótona, además de ayudarme a ser mejor persona cada día: *siempre seremos los zurditos*

A Trujo por ser siempre tan competitivo conmigo lo que me hace dar lo mejor de mí y por demostrarme un sin número de veces que me apoyas sin importar cuál sea mi decisión: *Gracias por dejarme conocer quien realmente eres, te amodoqui.*

*“La vida es la constante sorpresa de saber que existo”*

Rabindranath Tagore

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que han colaborado de alguna forma en la realización de este proyecto, no puedo nombrarlos a todos pero en verdad agradezco su apoyo:

- FOFI por su apoyo económico sin el cual no hubiera sido posible realizar este proyecto.
- Al Área de Protección de Flora y Fauna de islas del Golfo de California por brindar el permiso y el apoyo logístico que permitió la colección de muestras.
- A mi directora la Dra. Karina Acevedo Whitehouse por su paciencia durante mi aprendizaje, su comprensión en todo momento, por siempre brindarme su apoyo, darme su amistad y mostrarme que aunque la ciencia es un camino difícil y lleno de obstáculos la recompensa es inigualable.
- A mis sinodales: La Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, el Dr. Rolando Tenoch Barcenás Luna y el Dr. Santiago Vergara Pineda por tomarse el tiempo de leer, corregir y cuestionar mi proyecto.
- A mis profesores de licenciatura por la formación, el apoyo y la confianza que me brindaron, en especial Fausto, Aurelio y Gualito.
- A todo el grupo de trabajo del laboratorio GMEE por brindarme su apoyo en especial a Ana por su infinita paciencia para ayudarme con mis nematodos y a Ale por explicarme la función de los aparatos, ayudarme con mi tesis y hacerme reír a lo largo de las horas en el laboratorio.
- A mi conciencia (Yiyis) por siempre escucharme, brindarme sus consejos y compartir un sin número de travesuras y aventuras increíbles, te amo amiga.
- A mi esposa Yara por siempre estar cuando la necesito, acompañarme “de compras” (a comer) y por darme su cariño.

- A lle por las aventuras y brindarme su amistad en este corto tiempo en que nos hemos conocido, a Edda por su sinceridad y sus consejos, en verdad los aprecio, a Brenda y Fer que las veo poco pero sé que siempre están para apoyarme.
- A mis amigos: Adrián, Eunice, Chuy, Emi, Dany, Karen, Mario, Adán y Beto por apoyarme aunque muchos de ustedes no encontraban sentido a mi trabajo.
- A mi hermanita Marijose que sin importar la distancia siempre está al pendiente de mí: *no tengas miedo, el tortillero no va a atacarte.*

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
SUMMARY .....	3
DEDICATORIAS .....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
TABLA DE CONTENIDOS .....	7
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1 PARASITISMO .....	14
2.1.1 Evolución del parasitismo.....	15
2.1.2 Co-evolución entre parásitos y hospederos .....	16
2.2 EL LOBO MARINO DE CALIFORNIA.....	18
2.3 HELMINTOS REPORTADOS PARA EL LOBO MARINO DE CALIFORNIA.....	20
2.3.1 Nematodos de los pinnípedos otáridos.....	21
2.3.2 Acantocéfalos de los pinnípedos otáridos .....	23
2.3.3 Cestodos de los pinnípedos otáridos.....	26
2.3.4 Ectoparásitos de los pinnípedos otáridos .....	28
2.4 RELEVANCIA DE LOS PARÁSITOS SOBRE LA SALUD DEL LOBO MARINO.....	30
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	32
4. HIPÓTESIS .....	33
5. OBJETIVO .....	34
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34



<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1 ÁREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS.....</b>	<b>36</b>
<b>6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....</b>	<b>37</b>
6.3.1 Nematodos.....	37
6.3.2 Acantocéfalos y cestodos.....	38
6.3.3 Ácaros.....	38
6.3.4 Piojos.....	39
<b>6.4 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL.....</b>	<b>39</b>
<b>6.5 ANÁLISIS MOLECULAR.....</b>	<b>40</b>
6.5.1 Extracción de ADN.....	40
6.5.2 Purificación.....	41
6.5.3 Amplificación de regiones genéticas.....	41
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de los parásitos.....	42
Cuadro 2 Se muestran las características utilizadas en el PCR para cada primer.....	43
Cuadro 3 Medidas de características distintivas de <i>Contracaecum</i> y <i>Anisakis</i> , todas las unidades son en mm a excepción del largo total el cual se midió en cm.....	47
Cuadro 4 Comparación de medidas de los machos encontrados en este estudio con respecto a las descritas por Mattiuci y colaboradores (2003) para <i>C. margolisi</i> y por Shamsi y colaboradores (2009) para <i>C. ogmorhini</i> . A.V se refiere al apéndice ventricular. P.p.c: papilas post cloacales (número de pares).V.e.a: vulva del extremo anterior Tabla presentada en mm a excepción de donde se indican unidades.....	50
Cuadro 5 Comparación de las medidas presentadas para <i>Antarctophthirus microchir</i> por Leonardi y colaboradores (2009) y las medidas obtenidas en este estudio (mm).....	60

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modelos propuestos para el origen del parasitismo.....	16
Figura 2 Zona necrótica en tejido de un mamífero marino, provocado por el enquistamiento de un nematodo perteneciente al género <i>Contracaecum</i> .....	22
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Corynosoma</i> .....	25
Figura 4 Microfotografías de <i>Corynosoma</i> .....	26
Figura 5 Partes principales del cuerpo de un cestodo.....	27
Figura 6 Diagrama que muestra el ciclo de vida de <i>Diphyllbothrium</i> .....	28
Figura 7 Se muestran las islas reproductivas de <i>Zalophus californianus</i> en el Golfo de California siendo el 4 Granito y el 5 Cantiles las áreas de estudio de este trabajo.....	36
Figura 8 Se muestra la agrupación que presentaban los nematodos en el tracto digestivo de los lobos marinos de California, así como el enrojecimiento de la mucosa ocasionado por los parásitos.....	45
Figura 9 Microfotografías de <i>Contracaecum</i> .....	46
Figura 10 Características de <i>Anisakis</i> .....	48
Figura 11 Características ultraestructurales de machos de <i>Contracaecum</i> .....	49
Figura 12 Amplificaciones de regiones genéticas de los parásitos.....	50
Figura 13 Mucosa y lumen intestinal. Se observan los acantocéfalos adheridos a la pared del sistema digestivo.....	51
Figura 14 Características de <i>Corynosoma</i> .....	52
Figura 15 Fotografía de un gel de agarosa donde se observa el fragmento del tamaño esperado para la región de COXI amplificada en los <i>Corynosoma</i> .....	53
Figura 16 Se muestra un fragmento del cestodo que se encontró dentro del intestino de una de las hembras de Granito.....	54
Figura 17 Características de <i>Diphyllbothrium</i> .....	55
Figura 18 Escólex de <i>Diphyllbothrium</i> en microscopia electrónica de barrido.....	56
Figura 19 Gel de agarosa de <i>Diphyllbothrium</i> .....	57
Figura 20 Ácaro encontrado en el tracto digestivo de un lobo marino de California.....	58
Figura 21 Microfotografías de un piojo colectado en el lobo marino de California.....	60

Figura 22 Microfotografías de *Antarctophirus microchir*.....61

Figura 23 Microfotografías de *Antarctophirus microchir*.....62

## 1. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida parasitario ha tenido mucho éxito a lo largo de la historia evolutiva. Aun sin contar a las bacterias, hongos y virus, los parásitos funcionalmente agrupados como helmintos son altamente diversos y poseen estrategias únicas que les permiten sobrevivir en su hospedero (Schmidt y Roberts 1984). Los parásitos juegan un papel importante para la fauna silvestre, ya que estos pueden regular las poblaciones, influir sobre el éxito reproductivo u ocasionar cambios de conducta en los hospederos (Luque y Godínez 2000). En condiciones naturales, los animales silvestres tienden a tener cargas parasitarias altas sin que estas les ocasionen enfermedad *per se*; sin embargo, cuando se enfrentan a condiciones de estrés los parásitos pueden provocar daños severos locales o sistémicos, e incluso llevarlos a la muerte (Schmidt y Roberts 1984). Tomando en cuenta que las infecciones parasitarias han sido causa principal o concomitante de procesos de extinción local y están implicados como factores que pueden conducir a la pérdida de biodiversidad (Smith *et al* 2009), resulta pertinente investigar la presencia de parásitos potencialmente patógenos y caracterizarlos mediante técnicas moleculares y estructurales.

Entre los vertebrados marinos, los pinnípedos son portadores de gran número de parásitos, y el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) no es la excepción (Aznar *et al* 2001). A la fecha se han descrito algunos problemas de salud causados por endoparásitos helmintos (trematodos, acantocéfalos, protozoarios y nematodos) y ectoparásitos en el lobo marino de California debido principalmente a un comportamiento oportunista en condiciones de desnutrición, inmunosupresión, estrés ambiental o cambios en el hábitat (Luque y Godínez 2000). De manera general, los lobos marinos y demás mamíferos marinos carnívoros poseen una alta carga parasitaria (Aznar *et al* 2001), ya que los parásitos no solo son transmitidos entre los individuos de la población, sino que tienen ciclos de vida

complejos que involucran uno o varios hospederos intermediarios, generalmente presas del lobo marino(Leidenberger et al 2007).

El lobo marino de California se distribuye desde Columbia Británica, Canadá, hasta las islas Marías en México, incluyendo zonas insulares del Golfo de California (Aurioles y Zavala 19942). Actualmente se cuenta con datos parasitológicos detallados para la especie a lo largo de su distribución en las costas del Pacífico de Estados Unidos de Norteamérica; sin embargo, es casi nula la información que existe sobre parásitos para la especie en el Golfo de California y el Pacífico Mexicano. Los ambientes insulares son fragmentos de hábitat natural donde se han establecido y evolucionado comunidades que suelen ser únicas y distintas a las localizadas en el continente o en otros ambientes insulares (INE 2009). Dentro del Golfo de California existen diversas islas en las cuales los lobos marinos de California establecieron sus colonias reproductivas y de reposo. Las islas del Golfo de California representan un ecosistema con un aislamiento geográfico notable, lo que da origen a variaciones en las especies que viven en ellas (Santos et al. 2009). Ante un aislamiento geográfico las poblaciones evolucionan de manera diferente a otras poblaciones localizadas en diferentes sitios, pues las presiones a las que se ven sometidos no son iguales. Debido a su historia co-evolutiva y a su aislamiento en la región, es posible que los helmintos y ectoparásitos del lobo marino de California en el Golfo de California presenten diferencias morfológicas y genéticas con los parásitos reportados para la especie en otras regiones geográficas.

Por esto, este estudio buscó caracterizar, mediante métodos microscópicos y moleculares, a los parásitos del lobo marino de California en el Golfo de California y los comparó con los reportados en otras zonas geográficas y en otros hospederos pinnípedos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Parasitismo**

Un parásito se define como un organismo que poseen una asociación física obligada con un hospedero del cual obtiene un recurso esencial para sobrevivir y reproducirse, lo cual representa un costo para la eficacia biológica de este último (Poulin 2011). En este sentido los parásitos no son un grupo taxonómico, sino un grupo artificial que abarca especies de diferentes grupos taxonómicos que en muchos casos comparten características como hermafroditismo, partenogénesis y reproducción asexual, tiempos generacionales cortos, poblaciones altamente fragmentadas y fluctuación estacional marcada (Huyse et al 2005). Al ser un grupo artificial comprende un gran número de especies entre los que podemos encontrar helmintos, artrópodos, hongos, virus, bacterias y protozoarios (Guégan et al 2005).

La diversidad parasitaria varía entre hospederos debido a sus interacciones coevolutivas y a las presiones ambientales a las que se ven sometidos (Korallo et al. 2007). Esta diversidad es regulada por factores locales como la competencia interespecífica y la heterogeneidad de hábitat, y factores regionales que influyen sobre los procesos evolutivos como migración y la historia de vida (Guégan et al 2005).

Existen seis estrategias básicas de parasitismo; siendo el parasitoidismo, castración, transmisión directa, transmisión trófica, vectores y microdepredación (Poulin 2011). En esta tesis nos enfocaremos en dos de las estrategias, los parásitos de transmisión directa que son aquellos que solo se encuentran en un hospedero y generalmente presentan poca virulencia, como los piojos, ácaros e isópodos y los parásitos de transmisión trófica que utilizan a un hospedero intermediario para llegar a su hospedero final (Poulin 2011). La evolución de los parásitos ha permitido el desarrollo de características únicas que los

ayudan a optimizar sus ciclos de vida y a adaptarse de mejor manera a sus hospederos. Aquellos parásitos de ciclo de vida directo tienden a presentar una alta especialización y diversificación debido a que parasitan a un solo hospedero (Huyse et al 2005), mientras que los parásitos de transmisión trófica tienen que adaptarse a diversos hospederos. En estos parásitos la estructura trófica afectó la evolución de ciertas características. Por ejemplo los parásitos marinos tuvieron que adaptarse a ciclos de vida complejos y estados larvales largos al mismo tiempo que a la tolerancia de sus huevos ante condiciones de salinidad del agua de mar (Thompson et al 2005).

### 2.1.1 Evolución del parasitismo

El parasitismo no es un estilo de vida que haya surgido una sola vez a lo largo de la historia evolutiva, sino en repetidas ocasiones en diferentes grupos taxonómicos, lo cual ha dado como resultado la diversificación de linajes parasitarios (Poulin 2011). Es difícil saber cuántas veces ha surgido el parasitismo a lo largo de la historia evolutiva, pues en muchos casos los parásitos se extinguen sin dejar un registro fósil o algún indicio que nos indique si surgió en más grupos de los que conocemos actualmente. Existen grupos de parásitos en donde este estilo de vida tiene un origen monofilético, es decir, solo surgió una vez a lo largo de su historia evolutiva como en los Acantocéfalos y otros grupos en los que el parasitismo tiene un origen polifilético (surgió varias veces a lo largo de la historia del grupo) como es el caso de los piojos (Poulin 2011) (Figura 1)



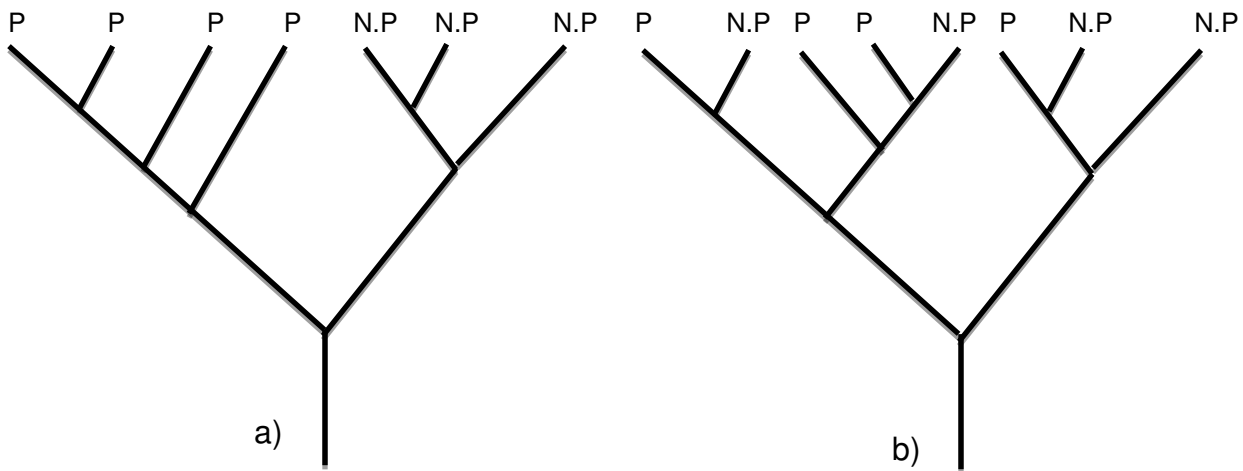


Figura 1 Modelos propuestos para el origen del parasitismo a) Se ejemplifican el origen monofilético del parasitismo y b) origen polifilético del parasitismo. P= parasito y N.P= no parasito.

### 2.1.2 Co-evolución entre parásitos y hospederos

Las asociaciones parásito-hospedero pueden darse debido a una larga coevolución o a una colonización relativamente reciente, siendo la colonización uno de los factores que afecta la incidencia en parásitos de amplio rango geográfico (Hober 1992). En cualquiera de estos casos los parásitos se enfrentan a diferentes presiones de selección como lo son las defensas de los hospederos que co-evolucionan a la par de los parásitos (Korallo et al. 2007). Entender el origen y la diversidad de los parásitos requiere de conocimiento acerca de la historia evolutiva de la asociación parásito-hospedero y sus interacciones con el medio (Guégan et al 2005). Para los endoparásitos, los tejidos de los hospederos proveen un ambiente con características físicas, químicas y biológicas específicas, que se convierte en su hábitat por lo que tiene que adaptarse a este (Bush et al 1997). Un ejemplo de esto son los parásitos de tracto digestivo de los vertebrados, los cuales requieren mecanismos y estructuras de fijación, un metabolismo anaerobio y resistencia a ataques enzimáticos (Poulin 2011). Entender los efectos negativos que tienen los parásitos sobre sus hospederos y cómo estos últimos se contraponen al daño nos permite elucidar las adaptaciones que

estos dos organismos han tenido a lo largo de su historia evolutiva (Ebert and Herre 1996). En este sentido el destino evolutivo de los parásitos es en gran medida dependiente de sus hospederos (Aznar et al 2001).

La coevolución entre parásitos y hospederos moldea tanto las características de adaptación de uno como las defensas anti-parasitarias del otro (Poulin 2011) un proceso conocido como la Reina Roja (Van Valen 1973). Esta hipótesis establece que los organismos se encuentran en una constante competencia por sobrevivir, el cambio en un organismo tiene efectos sobre otros organismos, los cuales a su vez se adaptan y cambian a fin de sobrevivir. Esta dinámica se observa en la relación de parásitos-hospederos donde lo que gana el depredador lo pierde la presa y viceversa ante lo cual tanto parásito como hospedero reaccionan y se adaptan (Van Valen 1974). En varios linajes parasíticos la evolución ha llevado a formas morfológicas más sencillas; un ejemplo son los cestodos y acantocéfalos que evolucionaron hasta perder su sistema digestivo pues sus hospederos realizan la digestión de los alimentos y estos parásitos obtienen sus nutrientes por la absorción a través del tegumento (Poulin 2011). La virulencia es un carácter determinado por rasgos entre las interacciones del hospedero-parásito y el ambiente (Lambrechts et al 2006), la cual se ve modificada a lo largo del tiempo a manera que pueda mantenerse en la población que infecta.

La relación parásito-hospedero refleja una relación de largo tiempo entre estos dos individuos (Hober 1996), estas relaciones se aprecian en filogenias comparativas las cuales pueden mostrarnos la diversificación tanto de los parásitos como de sus hospederos (Huyse et al 2005). Debido a la estrecha relación de los parásitos con sus hospederos estos pueden funcionar como indicadores del desarrollo histórico, ecológico biogeográfico y filogenético; además de la longevidad temporal, salud actual, estructura social, movimientos y varios aspectos de diferentes biotas (Hober 1996, Aznar et al 2001).

## 2.2 El lobo marino de california

Los pinnípedos son un grupo de mamíferos marinos que datan del Oligoceno (Uhen 2007); surgen después de la separación de Feliformia y Caniformia hace 45 millones de años (Leidenberger et al 2007). En este grupo se encuentran tres familias pertenecientes al orden Carnivora, los otáridos (lobos marinos y lobos finos), los fócidos (focas) y los odobenidos (morsas) (Harington 2008). Se han desarrollado varias teorías acerca del origen evolutivo de los pinnípedos, siendo la teoría del origen monofilético la más apoyada en los últimos años tanto por evidencias morfológicas como moleculares. Esta teoría propone que las tres familias de pinnípedos comparten un origen evolutivo junto con carnívoros arctoideos (Uhen 2007, Harington 2008). Se piensa que este grupo tiene origen en Norte América, donde los primeros otáridos se dispersaron a lo largo del Pacífico Noroeste y los fócidos en la costa sureste presentaron una dispersión hacia el norte del Atlántico, al Ártico y Antártico (Arson et al 2006, Harington 2008), para después diversificarse como grupo. Los fósiles indican que los pinnípedos que hoy observamos son solo una pequeña fracción de un grupo que alguna vez fue sumamente diverso (Harington 2008). Hoy en día las especies pertenecientes a este grupo se encuentran en áreas de alta productividad marina localizadas alrededor de los 40°N y 40°S (Schipper et al 2008). La adaptación al mar ejerció una presión adaptativa sobre estos individuos y sus parásitos, los cuales tuvieron que desarrollar estilos de vida, estructuras y adaptaciones únicas a fin de sobrevivir junto con sus hospederos al medio marino (Leidenberger et al 2007).

*Zalophus californianus* es un pinnípedo otárido que habita desde el Pacífico noroeste en las costas de la Columbia Británica, Canadá, hasta las islas Marías en México incluyendo el interior del Golfo de California (Aurioles y Zavala 1994). Las colonias que habitan dentro del Golfo de California son genéticamente diferentes tanto con las registradas fuera del golfo como entre ellas. Estudios han demostrado que existen 3 colonias genéticamente diferentes

dentro del Golfo de California, estas presentan diferencias demográficas, biológicas y ecológicas como diferente alimentación, variaciones isotópicas de C y N, y variaciones anatómicas en el cráneo de los machos al comparar colonias del norte y sur del golfo (Mellink y Romero Saavedra, 2005; Szteren y Auriolles-Gamboa, 2011).

Los lobos marinos de California se distinguen de otras especies por el espeso pelaje que los cubre y la capa de tejido adiposo subcutáneo que poseen. Como todos los otáridos, presentan un pabellón auditivo externo y una estructura pélvica móvil la cual les permite desplazarse en tierra. En los adultos existe un dimorfismo sexual siendo los machos más grandes que las hembras, además los primeros presentan una cresta sagital en la parte anterior de la cabeza (Odell, 1981; Reijnders et al 1994). El lobo marino de California es el único pinnípedo que habita en el Golfo de California, no obstante en varias ocasiones la foca de puerto (*Phoca vitulina*), el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) y el lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*) llegan a encontrarse aquí (Auriolles y Zavala 1994, Mellink y Romero-Saavedra 2005 ).

La reproducción de la especie se lleva a cabo básicamente en tres regiones geográficas, la primera se extiende desde Canadá hasta la frontera de E.U.A con México, la segunda abarca el oeste de baja California de la frontera con E.U.A hasta la punta de la Península de Baja California y la tercera se encuentra en las islas del Golfo de California (Szteren et al 2006). Dentro del Golfo de California, sus mayores poblaciones se encuentran en el cinturón de las Grandes Islas y en el Norte del Golfo debido a la mayor productividad primaria y abundancia de presas (Mellink y Romero-Saavedra 2005). En las costas de las islas los lobos marinos prefieren las islas rocosas para reproducción ya que proveen protección y playas de arena para el descanso de los machos (Auriolles y Zavala 1994, Mellink y Romero-Saavedra 2005).

Esta especie de pinnípedo es estrictamente carnívoro, se alimenta de alrededor de 50 especies diferentes de peses y cefalópodos (Li et al. 2011). Entre las presas principales de los lobos dentro del Golfo de California se encuentran especies de sardinas, anchoveta, marcela y merluza entre otras (Aurioles y Zavala, 1994). Las crías de *Z. californianus* empiezan a ingerir peces alrededor de los 5 meses de nacidos además de la leche materna y a los 10 o 12 meses son destetadas completamente (Li et al. 2011), estando expuestos a la adquisición de parásitos transmitidos por peces desde que comienzan a alimentarse de estos.

La fauna parasítica reportada para los pinnípedos en general, y para el lobo marino de California en particular, es muy diversa e incluye endo y ectoparásitos; entre los más comunes encontramos nematodos, acantocéfalos, platelmintos, ácaros (subclase Acarina) y piojos (suborden Anoplura) (Leidenberger et al 2007).

### **2.3 Helminthos reportados para el lobo marino de California**

En este grupo de organismos parásitos se encuentra una gran diversidad de especies, y lo mismo ocurre para las especies que parasitan mamíferos marinos. Aznar y colaboradores (2001) reportaron 315 especies de helminthos parásitos de mamíferos marinos. Los pinnípedos también poseen un alto número de parásitos helminthos y en muchos casos son hospederos finales de los mismos. Los pinnípedos adquieren los helminthos al ingerir a sus presas como peces y calamares que son utilizados como hospederos intermediarios o paraténicos. Varias de estas especies de parásitos presentan una baja especificidad hacia su hospedero final (Poulin y Valtonen 2001, Aznar et al 2001). Dentro del tracto intestinal de sus hospederos intermediarios interactúan las diferentes especies de helminthos (Sinisalo et al 2004). La mayoría de los helminthos parásitos de pinnípedos presentan ciclos de vida

complejos, por lo que nos pueden proveer una estimación directa de asociaciones ecológicas al igual que gran cantidad de información acerca de la salud del ecosistema (Hober 1996). Los pinnípedos, incluyendo a *Zalophus californianus*, suelen estar parasitados por helmintos como lo son nematodos, acantocéfalos y cestodos (Colón-Llavina et al. 2009).

### 2.3.1 Nematodos de los pinnípedos otáridos

El parasitismo ha sido una forma de vida exitosa para los nematodos ya que más del 33% de las especies existentes lo son (Anderson 2000). Varias familias de nematodos parasitan pinnípedos, incluyendo a *Z. californianus*. Algunos parásitos de mayor relevancia clínica pertenecen a la superfamilia Ascaridoidea. Existen varios taxones en esta superfamilia con parecido morfológico y diferencias genéticas y ecológicas (Kijewska et al 2002). La superfamilia Ascaridoidea de 5 familias siendo Anisakidae, Ascarididae, Crossophoridae, Heterocheilidae y Acanthocheilidae. Los anisakidos parasitan mamíferos y reptiles acuáticos y peces como hospederos definitivos e infectan peces e invertebrados como hospederos paraténicos e intermediarios (Anderson 2000, Lymbery y Cheah 2007). Entre los hospederos invertebrados para estos parásitos encontramos a: celenterados, tenóforos, gasterópodos, cefalópodos, poliquetos, copépodos, misidáceos, anfípodos, eufáusidos, decápodos, equinodermos y quetognatos (Anderson 2000, Leidenberger et al 2007). La familia Anisakidae presenta una alta adaptación al ambiente marino y a la mucosa gástrica de sus hospederos finales. Sin embargo puede causar daño por ejemplo dentro del tracto gastrointestinal de los hospederos finales las etapas adultas de nematodos pueden causar úlceras que microscópicamente se observan como áreas necróticas y hemorrágicas alrededor de los parásitos (Harris y Gordiner 2011) (Figura 2)



Figura 2 Zona necrótica en tejido de un mamífero marino, provocado por el enquistamiento de un nematodo perteneciente al género *Contracaecum* (Yáñez et al 2012)

Los anisakidos poseen un ciclo de vida complejo que comprende hospederos invertebrados y vertebrados en varios niveles de la cadena trófica (Kijewska et al 2002, Mattiucci y Nascetti 2007), dentro de esta familia encontramos a los géneros *Anisakis* y *Contracaecum* que se han reportado como parásitos del lobo marino de California (Anderson 2000, Paggi et al 2000, Nadler et al 2005, Lymbery y Cheah 2007). El ciclo de vida de estos dos géneros es parecido, e inicia cuando los huevos salen por las heces y pasan por un periodo en el que los organismos maduran dentro del huevo antes de eclosionar como larva de vida libre para ser ingerida por el hospedero invertebrado. Los peces y moluscos cefalópodos se infectan al ingerir a presas infectadas y son a su vez ingeridos por el hospedero definitivo donde habitan en el tracto digestivo terminando de desarrollarse y reproduciéndose completando así su ciclo de vida (Anderson 2000, Lorenzo Iglesias 2000, Lymbery y Cheah 2007).

Muchas de las especies consideradas cosmopolita en verdad son complejos de individuos que comprenden especies primas con características genéticas diferentes y aisladas reproductivamente (Mattiucci y Nascetti 2007). Este es el caso de *Anisakis simplex* y *Contracaecum ogmorhini* (Kijewska et al 2002, Nadler et al 2005). *A. simplex* es una de las especies más conocidas dentro del género *Anisakis*, *A. simplex C* es la especie registrada

en el Pacífico norte por lo que es la especie de interés (Lymbery y Cheah, 2007). Los organismos pertenecientes al complejo *Anisakis simplex* presentan muy poca variabilidad genética, se piensa que esto se debe a la alta movilidad de sus hospederos como peces o mamíferos marinos (Lymbery y Cheah, 2007; Colón et al 2009). *Contracaecum* es un género distribuido globalmente (Barson and Marshall 2004), dentro de este encontramos al complejo de especies *Contracaecum ogmorhini* reportado en la región boreal y en las costas del Pacífico de Canadá, Estados Unidos y México parasitando a *Zalophus californianus* (Mattiucci et al. 2003; Nadler et al. 2005). *C. ogmorhini* también parasita a otros pinnípedos como *Eumatopias jubatus* en California, *Arctocephalus pusillus* y *A. australis* en la región austral y *Otaria flavescens* y *A. australis* en la Patagonia, Argentina (Mattiucci et al. 2003; Nadler et al. 2005; Hernández-Orts et al. 2012). Sin embargo en la mayoría de los reportes solo se menciona *C. ogmorhini* y no se especifica la especie dado que *Contracaecum ogmorhini sensu lato* es un complejo que consiste en dos especies *C. ogmorhini sensu stricto* y *C. margolisi* (Nadler et al 2005). Esta última se ha descrito y reportado para *Z. californianus* en costas del Pacífico norte en Canadá, California y el Pacífico mexicano (Nadler et al 2005)

### 2.3.2 Acantocéfalos de los pinnípedos otáridos

La diversidad parasítica del lobo marino de California incluye al filo de los acantocéfalos. Este grupo único de parásitos no segmentados se caracteriza por tener una probóscide retráctil en el extremo anterior del cuerpo además de poseer solamente sistema nervioso, reproductivo y excretor. Carecen de sistema digestivo porque obtienen su alimento al absorber nutrientes a través de las paredes de su cuerpo (Wilford Olsen 1974). Los adultos son parásitos de diversas especies de vertebrados (Wilford Olsen 1974). Aquellos acantocéfalos pertenecientes a la familia Polymorphidae son endoparásitos obligados de mamíferos marinos (Aznar et al 2001). Poseen un ciclo de vida complejo que utiliza



invertebrados como hospederos intermediarios (Aznar et al 2001, García-Varela et al. 2005, Poulin 2011). Los acantocéfalos están distribuidos globalmente; la familia consta de 12 géneros y 127 especies, de los cuales el más relevante para los pinnípedos es el género *Corynosoma* (García-Varela et al. 2013).

El ciclo de vida del género *Corynosoma* empieza cuando un hospedero infectado expulsa huevos en las heces. En su interior los huevos contienen una larva llamada acantor (Vidal Martínez et al 2002; Aznar et al 2006). Al ser ingeridos por invertebrados, anfípodos por lo general, el acantor eclosiona y penetra la pared intestinal con su rostelo, estructura que pierde, y se desarrolla la fase larval acantela. El desarrollo de los *Corynosomas* sigue en el invertebrado hasta llegar a su fase juvenil, aun no presenta gónadas. El invertebrado es ingerido por un pez el cual cumple el papel de hospedero paraténico. Los pinnípedos ingieren a los peces infectados, permitiendo así la que los *Corynosomas* se establezcan el tracto digestivos de los pinnípedos y terminen de madurar; es dentro del hospedero definitivo donde los acantocéfalos pierden su envoltura juvenil y crecen hasta la madurez sexual (Vidal Martínez et al 2002, García-Varela et al 2005, Aznar et al 2006, Ionita et al 2008, Kuzmina et al 2012) (Figura 3)

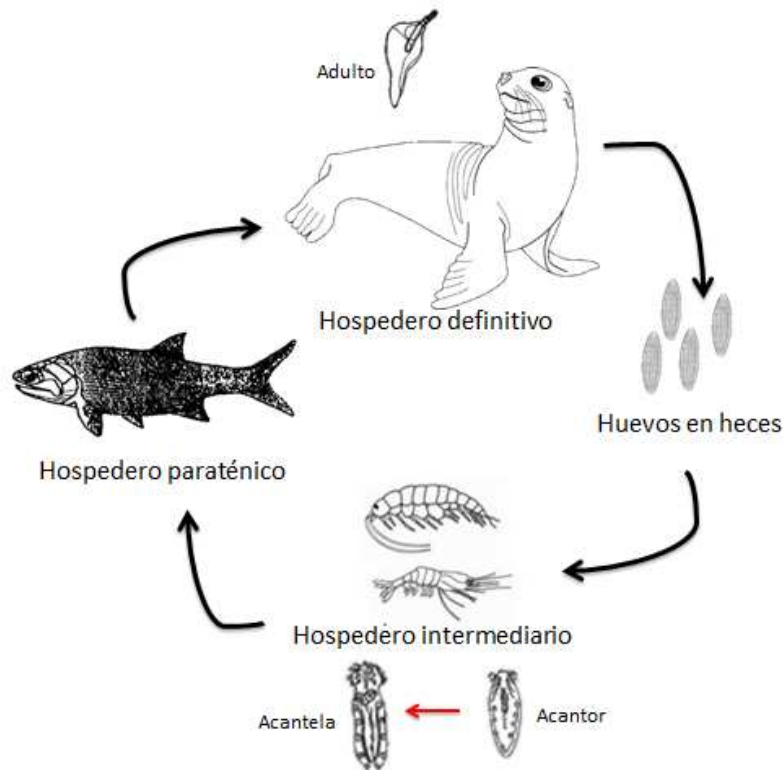


Figura 3 Ciclo de vida de *Corynosoma*

Existen varias especies de acantocéfalos del género *Corynosoma* reportadas para el lobo marino de California entre las que encontramos a *C. obtuscens*, especie también reportada para el lobo marino del sur (*Otaria flavescens*) y *C. strumosum*, la cual es muy común en pinnípedos del hemisferio norte (Van Cleave 1953, Margolis y Dailey 1972, Shults 1982, Castillo et al 1998, Ionita et al 2008). Estas dos especies de *Corynosomas* son morfológicamente diferentes como se ve en la figura 4, la forma del cuerpo de *C. obtuscens* es redondeada, siendo más compactos, presentan espinas a lo largo de su cuerpo y un disco de fijación marcado y redondo mientras que *C. strumosum* es más alargado, la parte anterior de su cuerpo es redondeada y su tronco es muy estirado (Ionita et al 2008). A pesar de los reportes que se tiene en los lobos marinos de California de *Corynosoma* estos son parásitos típicos de fócidos y no son tan comúnmente encontrados en otáridos.

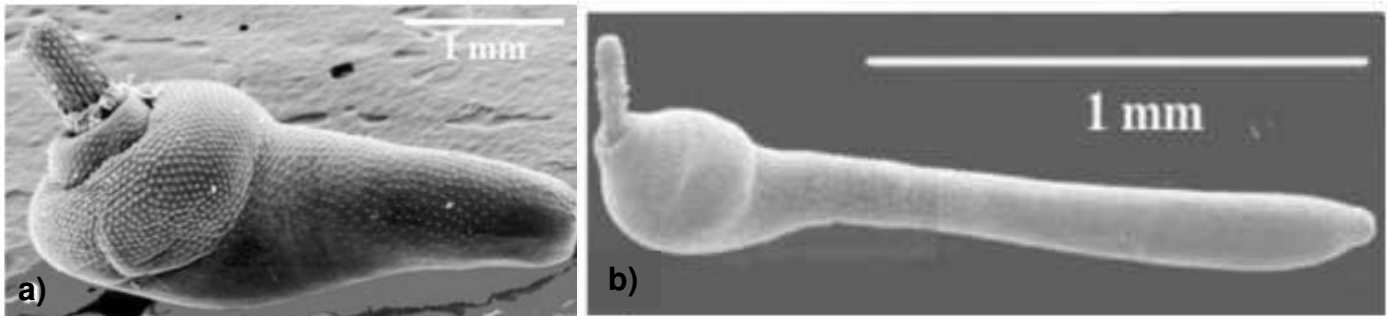


Figura 4 Microfotografías de *Corynosoma* a) *Corynosoma obtuscens* y b) *Corynosoma strumosum*. Tomado de Ionita y colaboradores 2008.

### 2.3.3 Cestodos de los pinnípedos otáridos

Los cestodos son gusanos endoparásitos planos y segmentados del sistema digestivo de los vertebrados. Su cuerpo está constituido por tres partes; el escólex u órgano de fijación, el cuello donde se originan los proglótidos inmaduros y el estróbilo que es la cadena de proglótidos maduros (Figura 5). Son organismos hermafroditas por lo que los órganos reproductores masculinos como femenino se encuentran en los proglótidos (Vidal Martínez et al 2002). Los parásitos carecen de canal alimenticio pues su cutícula se encarga de transportar nutrientes al interior de su cuerpo y excretar los desechos (Smyth y Mcmanus 1989).

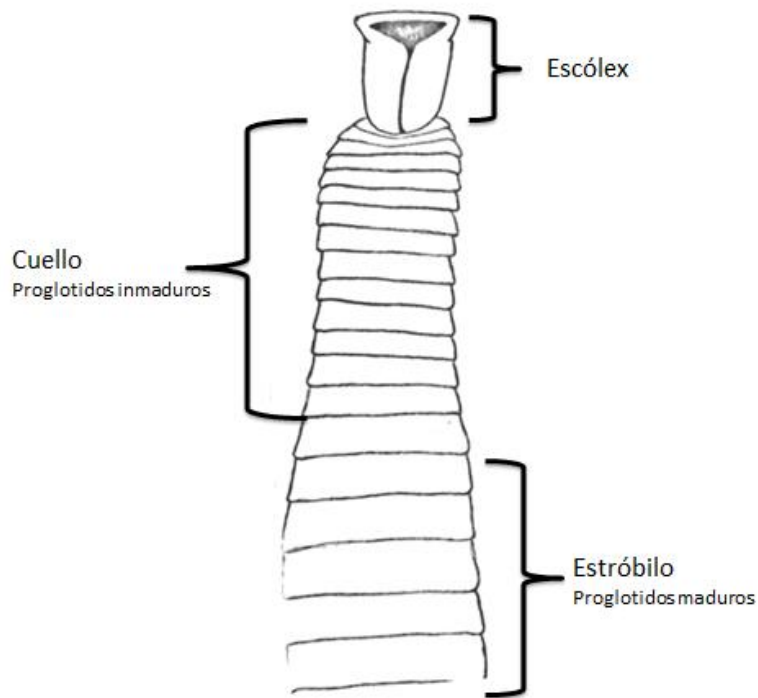


Figura 5 Partes principales del cuerpo de un cestodo

El género *Diphyllobothrium* perteneciente a la familia Diphylobothriidae, ocurre típicamente en mamíferos marinos incluyendo al lobo marino de California (Baer Jean 1969, Margolis y Dailey 1972, Gage et al 1993, Gerber et al 1993, Rausch et al 2010), sin embargo no muestra una alta especificidad a sus hospederos finales por lo que puede parasitar otros mamíferos (Rausch et al 2010). Este género infecta hospederos en tres niveles tróficos durante su ciclo de vida; en su primer estadio el parásito es un embrión ciliado de vida libre llamado coracidium el cual es ingerido un crustáceo, en el que penetra el intestino y se diferencia en procercoide. Cuando el crustáceo es ingerido por un pez, penetra el intestino y se enquistado o migra al músculo para diferenciarse en plerocercario, el pez es ingerido por un mamífero en el que el parásito entra al intestino delgado y termina de madurar (Vidal Martinez et al 2002, Dick 2007) (Figura 6). *Diphyllobothrium* posee una amplia distribución producto de la migración de peces y mamíferos (Hernan et al 2001, Dick 2007).

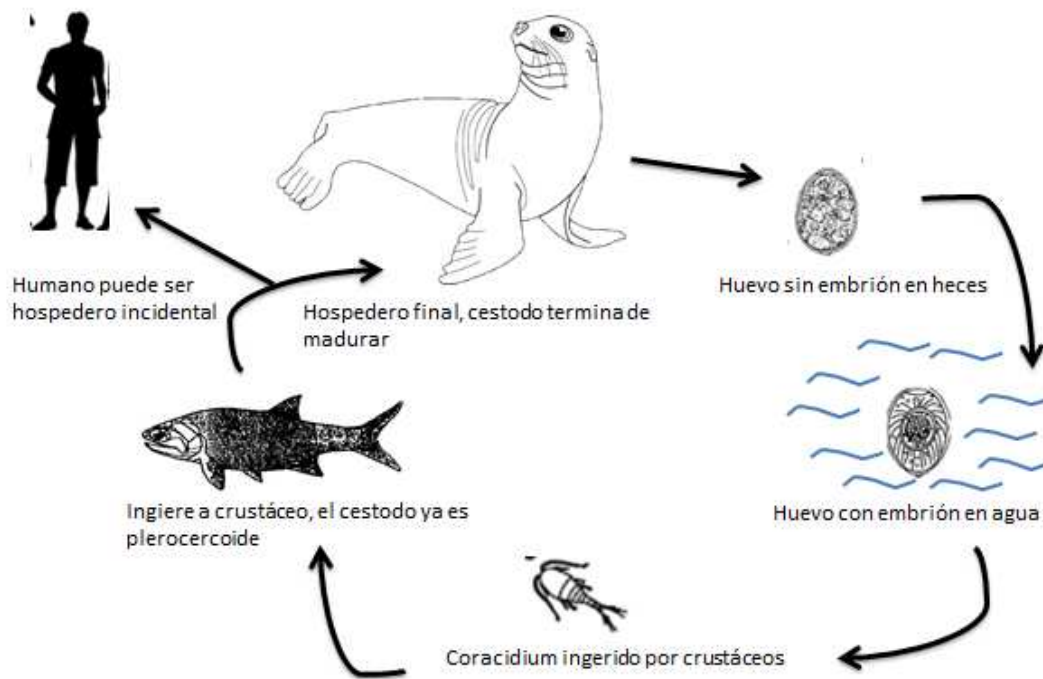


Figura 6 Diagrama que muestra el ciclo de vida de *Diphylobothrium*

#### 2.3.4 Ectoparásitos de los pinnípedos otáridos

Además de los endoparásitos encontrados en un organismo, los ectoparásitos también son una parte importante de la diversidad parasitaria que se puede registrar (Leonardi et al 2012). Los ectoparasatos en los pinnípedos muestran adaptaciones importantes ya que el estilo de vida anfibio que sus hospederos llevan representa un verdadero reto (Kim et al 1975). Los ácaros son algunos de los ectoparásitos que llegan a encontrarse parasitando pinnípedos, algunas especies de ácaros han migrado hacia tejidos u órganos internos. Las especies pertenecientes a la familia Halarachnidae son un ejemplo de ectoparásitos con comportamiento migratorio ya que son parásitos obligados del tracto respiratorio de los mamíferos, característica que los diferencia, en lo que respecta a sus adaptaciones y a su coevolución con el hospedero, de otros ácaros que son típicamente ectoparásitos (Alonso-

Farré et al 2012). Se ha propuesto que la familia Halarachnidae probablemente evolucionaron a partir de ácaros de vida libre (Furman, 1977). Los hospederos pinnípedos son parasitados por dos géneros de ácaros, *Orthohalarachne* (Newell 1947), que parasita a otáridos y odobénidos, y *Halarachne*, que parasita fócidos y nutrias marinas (Alonso-Farré et al., 2012). Para el lobo marino de California se han reportado tres especies de *Orthohalarachne* como parasitas del tracto respiratorio, *O. attenuata* en el tracto nasofaríngeo (Alaska, Oregón y California), *O. diminuata* en bronquios y tráquea (Alaska, Columbia Británica y California) y *O. zalophi* en tracto nasofaríngeo (California y Alemania)(Margolis and Dailey 1972)

Además de los ácaros podemos encontrar piojos como ectoparásitos, aquellos pertenecientes a la familia Echinophthiriidae, incluyen especies parasitas de pinnípedos y nutrias, entre los que se encuentra el lobo marino de California (Leonardi et al. 2012). Esta familia de artrópodos evolucionó a partir de ancestros terrestres (Aznar et al 2001) y pudo adaptarse a un modo de vida anfibio, gracias a lo cual presentan adaptaciones únicas al medio marino (Kim et al. 1975). Las especies dentro de este género se vieron sometidas a una presión de selección por el ambiente mismo que resulto en una morfología, fisiología, comportamiento y ecología sumamente especializada (Leonardi et al. 2011, 2012; Aznar et al. 2009). Por ejemplo el ciclo de vida de estos piojos se encuentra sincronizado con el de sus hospederos ya que su reproducción y transmisión solo se lleva a cabo cuando los pinnípedos están en tierra (Aznar et al. 2009). La especificidad en hospederos sugiere una evolución junto con los pinnípedos desde las focas ancestrales hasta los pinnípedos de hoy en día (Kim et al 1975).

En la familia Echinophthiridae se encuentra *Antarctophthirus microchir* (Trouessart y Neumann 1888), especie registrada para cinco géneros de otáridos: *Eumetopias*, *Zalophus*, *Otaria*, *Phocartus* y *Neophoca*; la presencia de *A. microchir* en ambos hemisferios sugiere

que esta especie a parasitado a los lobos marinos desde hace dos millones de años, lo cual respalda la teoría de un linaje monofilético tanto de los piojos como de los otáridos (Kim et al 1975; Aznar et al 2001). Esta especie de piojo ha sido registrada para el lobo marino de California en su distribución a lo largo de Alaska, Columbia Británica, California y el Golfo de California (Margoulis y Dailey, 1972; Aurioles y Zavala-González 2000; Godínez et al 1995; Durden y Musser 1994).

#### **2.4 Relevancia de los parásitos sobre la salud del lobo marino**

El lobo marino de California al igual que muchos pinnípedos es un depredador tope en la cadena alimenticia, lo cual además de regular las poblaciones de sus presas y tener un papel en el reciclamiento de nutrientes los hace especies centinelas de la salud en el ecosistema (Aurioles y Zaavala-González, 2000). Al estar en el tope de la cadena alimenticia los lobos marinos de California son útiles como especies indicadoras de la salud del hábitat pues bioacumulan sustancias tóxicas que pueden encontrarse en el ambiente, al estudiar la salud de estos pinnípedos nos puede proporcionar información acerca de niveles tróficos inferiores (Aurioles y Zaavala-González, 2000). La diversidad genética y las relaciones entre de lobos marinos y sus parásitos pueden ser utilizados como bioindicadores del ecosistema y nos pueden mostrar las adaptaciones que los dos grupos han tenido ante el medio ambiente (Mattiucci y Nascetti 2007).

Además de la importancia ecológica, los lobos marinos de California poseen una importancia social como especie carismática ante la cual la población responde. Estos organismos también poseen una importancia económica debido a que son utilizadas para el turismo lo cual deja una importante derrama económica al país (Aurioles y Zaavala-González, 2000)

A pesar de que los lobos marinos de California tienen una relación conflictiva con los pescadores debido a que constantemente estos realizan pesca artesanal en la misma zona en la que los lobos marinos se alimentan (Mellink y Romero Zaavedra, 2004), los lobos marinos son una especie vital en el ecosistema y el estudio en la salud de sus poblaciones es de suma importancia para comprender procesos ecológicos y la salud del ecosistema.



### **3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Actualmente se cuenta con reportes parasitológicos detallados para el lobo marino de California a lo largo de su distribución en las costas del Pacífico de los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá; sin embargo, es casi nula la información que existe sobre parásitos para la especie en el Golfo de California y el Pacífico Mexicano. Por este motivo resulta necesario incrementar nuestro acervo parasitológico para la especie en aguas nacionales.

#### **4. HIPÓTESIS**

Debido a su historia coevolutiva y a su relativo aislamiento en el Golfo de California, los parásitos del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, presentarán diferencias morfológicas y moleculares con parásitos semejantes reportados para la especie en otras regiones geográficas. El riesgo a la salud de las poblaciones del lobo marino de California, estimado con base en los caracteres morfológicos de los parásitos, se espera que sea bajo en términos de morbilidad y mortalidad.

## **5. OBJETIVO**

Caracterizar, mediante métodos microscópicos y moleculares, a los parásitos más comunes del lobo marino de California, *Zalophus californianus* en el Golfo de California, y determinar su relevancia poblacional.

### **5.1 Objetivos específicos**

- Describir la diversidad parasitaria individual de los lobos marinos de California.
- Determinar si existen diferencias moleculares y estructurales con las mismas especies parásitas reportadas para la especie en otras zonas de su distribución y en otros otáridos.
- Elucidar el efecto potencial sobre la salud del lobo marino de California a nivel individual y a nivel poblacional.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Área de estudio

El Golfo de California comprende alrededor de 1000 km de norte a sur y 150 km de ancho en promedio, lo que alberga una masa de agua bordeada por las costas de la península de Baja California y la costa continental hasta la línea que une Cabo Corrientes y Cabo San Lucas (Aurióles y Zavala, 1994). En invierno de 2012, durante un muestreo realizado como parte de un proyecto sobre la ontogenia del sistema inmune de *Zalophus californianus*, se realizaron exámenes *post mortem* de tres lobos marinos hembras adultas en las colonias reproductivas de Los Cantiles y Granito (29° 32' 21" N y 113° 32' 03" W), localizadas en las islas de Ángel de la Guarda y Granito, respectivamente (Figura 7). Estas dos islas están situadas en la Región de las Grandes Islas del Golfo de California, una zona que tiene una gran importancia para la biodiversidad marina al ser sitio de anidación, reproducción o descanso y alimentación para muchas especies migratorias o endémicas (INE, 2009).

Los Cantiles y Granito son colonias de reproducción para el lobo marino de California y en sus costas se encuentran hembras, crías y juveniles durante todo el año, mientras que durante la época de apareamiento se encuentran también machos adultos en las islas.

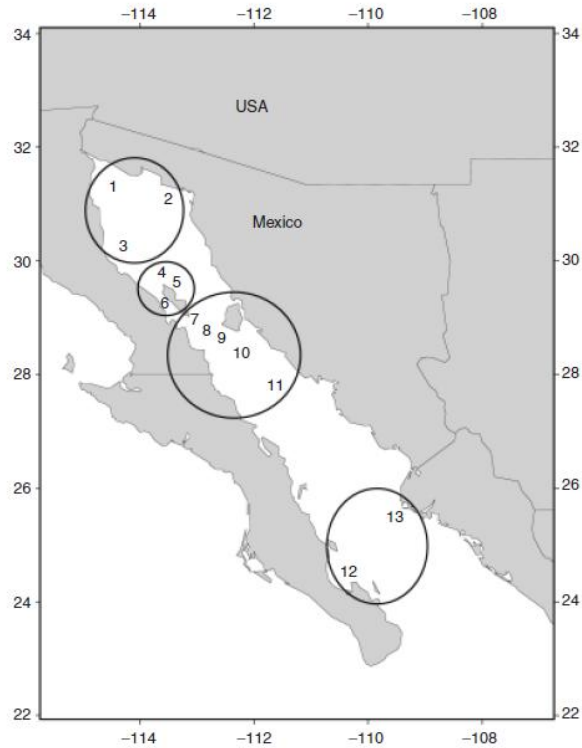


Figura 7 Se muestran las islas reproductivas de *Zalophus californianus* en el Golfo de California siendo el 4 Granito y el 5 Cantiles las áreas de estudio de este trabajo (Gonzalez-Suarez et al. 2006)

## 6.2 Colección de muestras

Se realizaron necropsias detalladas de acuerdo con protocolos establecidos (Acevedo-Whitehouse 1999; Dailey, 2001). Se colectaron muestras de ectoparásitos y endoparásitos de los cuales se conservó cuando menos un ejemplar de cada tipo en frascos estériles con uno de los conservadores etanol al 70%, etanol al 96% y glutaraldehído amortiguado con PBS.

Se colectaron especímenes correspondientes a cinco grupos parasitarios de diferentes órganos de los lobos marinos. Del tracto digestivo se colectaron cestodos, acantocéfalos, nematodos y un ácaro. Los piojos fueron colectados de la superficie perigenital de los lobos

marinos. Todos los ejemplares colectados se registraron en el archivo parasitológico del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **6.3 Análisis morfológico**

#### **6.3.1 Nematodos**

Los nematodos fijados en etanol al 70% fueron utilizados para la descripción morfológica. Para poder identificarlos correctamente y describirlos se sometieron a un tren de concentraciones de ácido láctico (25%-100%), dejando cada individuo de uno a tres días dependiendo de su talla. Las larvas y los machos adultos fueron dejados un día en cada concentración mientras que las hembras adultas permanecieron hasta tres días en cada concentración a fin de poder observar sus estructuras internas.

Una vez en el ácido láctico al 100% se realizó una preparación semipermanente para poder observar los especímenes al microscopio. Los nematodos fueron colocados en un portaobjetos con ácido láctico al 100%; se colocó un cubreobjetos sobre ellos y se analizaron a 4x y 10x en el microscopio compuesto. Se tomaron fotografías de los caracteres distintivos como las papilas, labios, dientes interlabiales, y espículas, entre otros, para determinar el género y de ser posible la especie a la que pertenecían los individuos. Posteriormente los especímenes se colocaron de manera individual en etanol 70% y se etiquetaron.

Los nematodos fueron identificados con ayuda de la guía de identificación de nematodos parásitos (Anderson et al 2009) y descripciones de Mattiucci y colaboradores (2003), y Pardo y colaboradores (2009) entre otras.

Una vez identificados los nematodos fueron comparados con los nematodos previamente reportados en el lobo marino de California en otras localidades y con los reportados en otros otáridos.

### 6.3.2 Acantocéfalos y cestodos

Los acantocéfalos y cestodos fueron analizados morfológicamente con base en una modificación de la técnica de tinción por carmín ácido de Mayer (Salgado Maldonado 2009). Los especímenes se pincharon con un alfiler entomológico con cuidado de no dañar las estructuras y se sumergieron en carmín ácido de Mayer durante toda una noche. Posteriormente se diferenciaron las estructuras en alcohol al 70% acidulado al 4% hasta que se tornaron rosa pálido. Se realizaron lavados con etanol al 75% hasta que los organismos dejaron de desprender colorante. A continuación los especímenes fueron deshidratados en etanol al 85% y 95% por 24hrs en cada concentración, siendo dos cambios en la última concentración. Para completar la deshidratación, se dejaron 24 hrs en etanol al 100%. Para aclarar a los especímenes se sumergieron en salicilato de metilo por dos días. Se substituyó el terpinol por el salicilato de metilo durante el proceso de aclaramiento. Los organismos no fueron montados en bálsamo de Canadá como se sugiere en el manual, sino que se utilizó permount.

### 6.3.3 Ácaros

El ácaro fue fijado en alcohol al 70%. Al llegar al laboratorio se le cortaron las extremidades del lado izquierdo y estas fueron preservadas en etanol al 96%. Esto se hizo debido a que solo se contaba con un ejemplar y sobre estas extremidades se realizaron pruebas genéticas. El resto del ejemplar se preservó en KOH al 10% durante 12 horas y se lavó en agua destilada durante diez minutos para después pasarlo por un tren de OH al 70%, 80% y 96% dejándolo en las primeras dos concentraciones durante 10 minutos y en la última durante 5 minutos. Posteriormente se sumergió en aceite de clavo durante dos minutos para aclararlo y observar sus estructuras internas. Una vez aclarado se colocó en bálsamo de Canadá sobre una laminilla y se dejó secar en un horno a 42°C durante 2 semanas.

El ejemplar fijado se fotografió bajo el microscopio compuesto utilizando los objetivos de 4x, 10x y 40x. Las fotografías se centraron en caracteres diagnósticos como los lóbulos hipiostomales, cheliceros, sedas adenales, entre otras características que nos pudieran indicar la especie. El ejemplar se identificó mediante las descripciones de Furman (1977) y de Alonso-Farré *et al.* (2012).

#### 6.3.4 Piojos

Los piojos fueron fijados en etanol al 70% al momento de su recolección. Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se colocaron en KOH al 10% durante 12 horas. Los ejemplares se lavaron con agua destilada durante diez minutos para después pasarlos por un tren de OH al 70%, 80% y 96% dejándolos en las primeras dos concentraciones durante 10 minutos y en la última durante 5 minutos. Posteriormente se sumergieron en aceite de clavo por durante dos minutos para aclararlo y observar sus estructuras internas. Una vez aclarados se colocaron en bálsamo de Canadá sobre una laminilla para ser preservados y se secaron en un horno a 42°C durante 2 semanas.

Los ejemplares fijados en laminilla se fotografiaron bajo el microscopio compuesto utilizando los objetivos de 4x, 10x y 40x. Las fotografías se centraron en caracteres como las escamas, setas, entre otras características que nos pudieran indicar la especie. Los ejemplares se identificaron mediante el uso de claves de Borrór *et al.* (1992), Stojanovich y Pratt (1965).

Una vez identificados los piojos se compararon nuestros registros con los previamente existentes en la literatura.

### 6.4 Análisis ultraestructural

Solo se pudieron someter a este procedimiento nematodos, cestodos y piojos debido al número de individuos con los que se contaba de cada grupo. Bajo el microscopio electrónico



de barrido se fotografiaron caracteres representativos de estos grupos a fin de poder observarlos con mucho mayor detalle que lo que se puede apreciar en el microscopio compuesto.

Para nematodos y cestodos se siguió el protocolo propuesto por Nieto- Lopez (2010). Se lavaron las muestras con Tween 0.05%, se sometieron a un tren de concentración de OH (10-100%) y se secaron en punto crítico. Las muestras fueron bañadas en oro y posteriormente observadas al microscopio electrónico de barrido.

Los piojos se limpiaron con ayuda de un pincel para retirar tejido y materia orgánica foránea adherida y se siguió el protocolo propuesto por Crovetto y colaboradores (2008). Se lavaron en buffer fosfato pH 7, 1 molar dos veces por cinco minutos, a continuación se deshidrataron en una serie de etanoles de 15% a 96% pasando dos veces por cada concentración cinco minutos. A continuación se metieron en una solución de 50% OH absoluto y 50% de acetona por un minuto, seguido de una solución de acetona al 100% por un minuto. Las muestras se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> y se bañaron en oro para posteriormente ser observadas al microscopio electrónico de barrido.

## **6.5 Análisis molecular**

### **6.5.1 Extracción de ADN**

Para nematodos, acantocéfalos y cestodos, el ADN se extrajo de acuerdo con los métodos utilizados por Benesh y colaboradores (2006). Para esto, se dejó evaporar el alcohol en el que se encontraba almacenado el individuo. Se le agregaron 400 µl de buffer TE, 40 µl de SDS 10% y 10 µl de proteinasa K (20mg/ml) (originalmente utilizada a 10mg/ml en el protocolo original)

Algunos de los nematodos se trataron de acuerdo al protocolo de pruebas morfológicas, sin embargo al resultar ser especímenes diferentes se extrajo el ADN de estos utilizando un

método diferente al mencionado anteriormente. Los especímenes fueron transferidos a un microtubo con 25 µl de agua destilada y 25 µl de buffer de lisis, se incubó la muestra por dos horas a 65°C, después se centrifugo a 750 rpm. Se incubó a 100°C por cinco minutos y finalmente se centrifugo a 750 rpm.

En el caso de los piojos se utilizó un protocolo diferente para la extracción de ADN. Las muestras fueron lavadas en 10mM Tris-HCl con 100mM NaCl y 1mM MgCl<sub>2</sub>. Después se homogeneizó la muestra en 400 µl de 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA y 1% SDS con 100 µg de proteinasa K (20mg/ml), se incubo durante 12 horas a temperatura ambiente (Castro et al 2002)

### 6.5.2 Purificación

El ADN de los parásitos se purificó por el método de fenol-cloroformo (Molina et al 2006). A las muestras de ADN se las agregó un volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamil (25:24:1), se colocaron agitaron durante 60 segundos y se centrifugaron a 13,000 rpm por cinco minutos. El sobrenadante de cada muestra fue trasladado a un microtubo nuevo al que se le agrego un cuarto del volumen inicial de acetato de amonio 8M, un volumen de etanol al 95% y se congeló a -20°C durante 30 minutos antes de centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos. El pellet se resuspendió en un volumen de etanol al 70%. Se volvieron a centrifugar las muestras a 13,000 rpm durante 2 minutos. Los tubos se vaciaron por decantación y se secaron a temperatura ambiente. Las muestras de ADN fueron resuspendidas en 50 µl de agua estéril y almacenadas a -20°C. Antes de congelarlas, su pureza y concentración fue determinada en el Nanodrop (Qiagen)

### 6.5.3 Amplificación de regiones genéticas

Con el fin de amplificar regiones seleccionadas de cada parasito se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno (Cuadro 1). Cada par de oligonucleotidos fue diseñado a partir de las secuencias disponibles en la base de datos de NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Los criterios para el diseño fueron seleccionar regiones reportadas para los géneros de los parásitos en diferentes hospederos, la secuencia a amplificar midiera entre 100 y 1000 pares de bases y la temperatura de derretimiento (Tm) estuviera entre 55 y 65°C.

Para amplificar las regiones seleccionadas para cada parásito se realizó PCR. Las condiciones de las reacciones fueron adaptadas para el fragmento deseado y la Tm de cada primer (Cuadro 2).

Cuadro 1.:Oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de los parásitos

Primers		Tm	Pares de bases
Nematodo (ITS)	Forward: TTGAACCGGGTAAAAGTCG	62	1200pb
	Reverse: TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	59	
Nematodos (SSU18A, SSU26R) (Floyd et al 2002)	Forward: AAAGATTAAGCCATGCATG	50	1000pb
	Reverse: CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	52	
Cestodo (18S ribosomal)	Forward: GGCTCGTGTGTCGATGAAGA	60	668pb
	Reverse: CAGCGGGTAATCACGACTGA	59	
Piojo (COI mitocondrial)	Forward: AATCCTACCGGGATTTGG	54	181pb
	Reverse: TGTAAGTAAGCCCGTCT	52	
Acantocéfalo (coxI mitocondrial)	Forward: CTGGTGGTCAGTGGTTGGG	60	545pb
	Reverse: CCCACCAGACGGGTCAAAAA	60	
Acaro (ribosomal)	Forward: TGAACCTGCGGAAGGATCAT	60	
	Reverse: CTGAAACAAATGTAGCATAG	54	

Cuadro 2: Se muestran las características utilizadas en el PCR para cada primer

Primers	Condiciones de PCR
Nematodo ITS	<p>94°C 3min   94°C 30seg   30 ciclos (54°C 30seg)   72°C 1.2min   72°C 10min   4°C ∞</p>
Nematodo SSU	<p>94°C 3min   94°C 30seg   30 ciclos (52°C 30seg)   72°C 2min   72°C 10min   4°C ∞</p>
Acantocéfalo coxl	<p>94°C 3min   94°C 30seg   30 ciclos (57°C 30seg)   72°C 30seg   72°C 10min   4°C ∞</p>
Cestodo ribosomal	<p>94°C 3min   94°C 30seg   30 ciclos (55°C 30seg)   72°C 30seg   72°C 10min   4°C ∞</p>
Piojo COI	<p>94°C 3min   94°C 30seg   30 ciclos (50°C 30seg)   72°C 15seg   72°C 10min   4°C ∞</p>

El éxito de la amplificación se comprobó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en el que se cargaron 4 µl de producto con 2 µl de buffer de carga y tenido con bromuro de etidio (BrEt). El gel se corrió por 30 minutos a 100 volts, y se analizó bajo luz ultravioleta.

Los fragmentos amplificados se mandaron secuenciar bidireccionalmente después de ser purificados (Anexo I)

## 7. RESULTADOS

### Nematodos

Los nematodos se encontraron agrupados en la luz del estómago y el intestino de los lobos marinos, en algunos casos adheridos a la mucosa, provocando hemorragias en la submucosa, y en otros casos se observaban libres en el lumen intestinal y gástrico (Figura 8) y se observaron en las tres hembras de lobo marino de California a las que se les realizó la necropsia. Los nematodos de las tres hembras pertenecían al género *Contraecaecum*. Se observó un dimorfismo sexual entre parásitos hembras y machos en lo que se refiere a estructuras presentadas; sin embargo, la diferencia entre sus longitudes no fue representativa ( $t=1.25$ ,  $p=0.22$ ,  $gl=27$ ). Todos presentaron una cutícula estriada transversalmente (Figura 9), tres labios con una muesca redondeada en la parte superior y dientes interlabiales ligeramente más cortos que los labios (labios  $0.13 \pm 0.03$  mm, dientes interlabiales  $0.12 \pm 0.16$  mm,  $t=4.719$ ,  $p=0.000015$ ,  $gl=57$ ). Su ciego intestinal ( $2.37 \pm 0.72$  mm) era ligeramente más corto que el esófago ( $3.30 \pm 0.87$  mm), que corría paralelo al ciego. Ambos se unían al ventrículo, el cual se observó como una estructura pequeña y redondeada (Figura 9), y su apéndice ventricular era corto ( $1.15 \pm 0.33$  mm). Presentaban cola cónica con un mucrón al final (Figura 9). La vulva se encontró en el primer tercio del cuerpo. Las hembras maduras presentaban huevos alargados desde la vulva hasta los ovarios que median  $0.05 \pm 0.01$  mm de ancho por  $0.06 \pm 0.01$  mm de largo. Como ocurre en la mayoría de nematodos, en ningún caso se observó un embrión dentro de los huevos. Los machos maduros presentaban 22 papilas y un par de espículas en la parte posterior (Figura 9). El tamaño de las espículas varió, siendo la más larga de  $5.27$  mm ( $\pm 1.33$ ) y la más corta de  $5.08$  mm ( $\pm 1.34$ ). Caudal al ano presentaban cuatro papilas claramente distinguibles, dos de cada lado, y alas cervicales (Figura 9).



Figura 8 Se muestra la agrupación que presentaban los nematodos en el tracto digestivo de los lobos marinos de California, así como el enrojecimiento de la mucosa ocasionado por los parásitos.

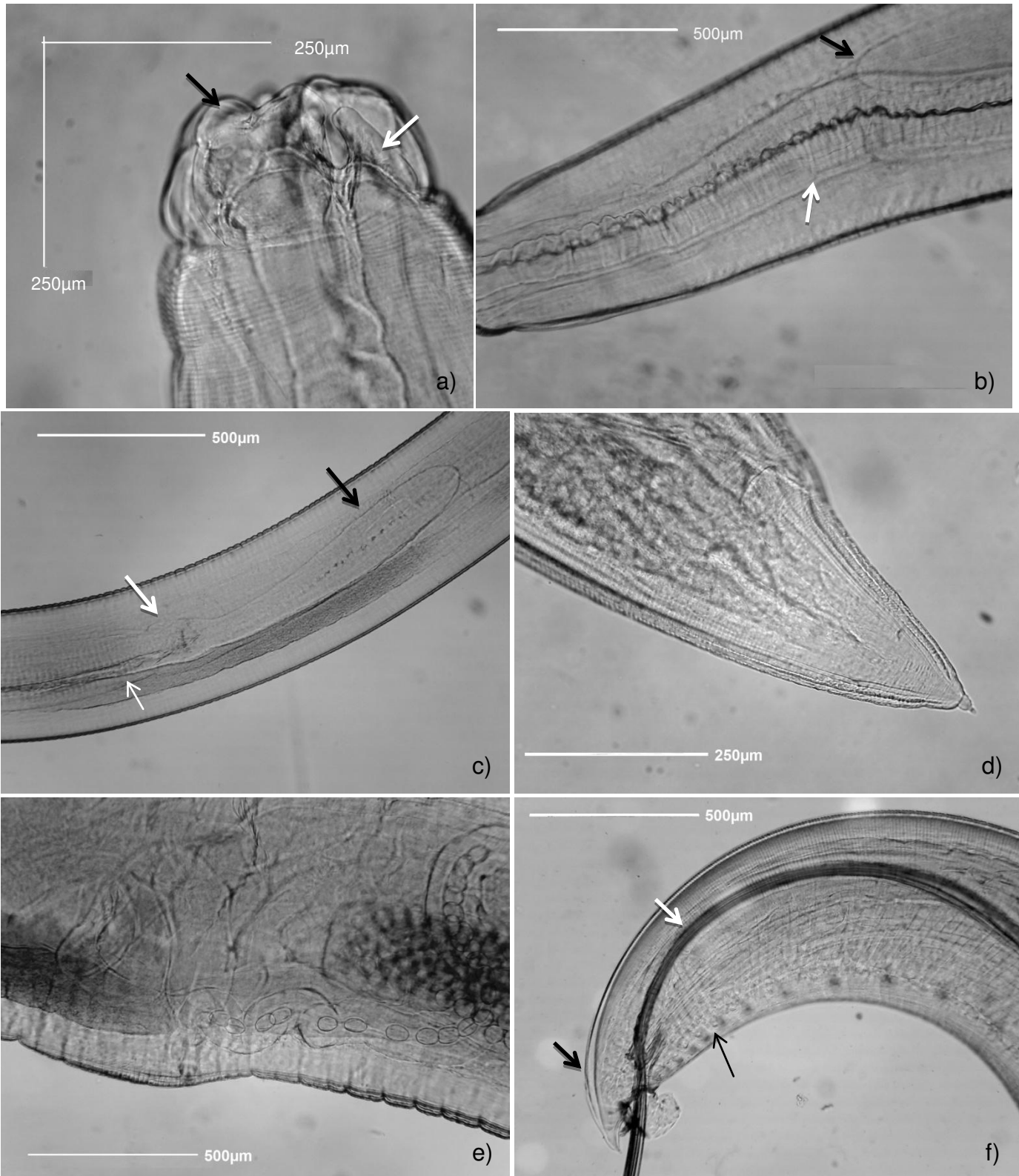


Figura 9 Microfotografías de *Contracaecum* a) Parte anterior, la flecha blanca señala los dientes, la flecha negra señala los labios de este nematodo b) La flecha negra indica el ciego intestinal y la blanca señala el esófago c) La flecha blanca delgada señala el final del esófago y ciego los cuales se unen al ventrículo señalado con la flecha blanca gruesa, la flecha negra señala el apéndice ventricular d) la parte posterior de una hembra donde se puede apreciar el mucrón e) la vulva de una hembra junto con los huevos maduros preparados para ser expulsados f) parte posterior de un macho donde la flecha blanca indica las espículas, la flecha negra delgada las papilas y la flecha negra gruesa las alas cervicales.

El lobo marino procedente de Granito también presentó nematodos pertenecientes al género *Anisakis*. Únicamente se encontraron dos ejemplares de este parásito, y en ambos casos se trató de hembras, las cuales estaban asociadas con los otros nematodos del género *Contraecum*. Los *Anisakis* encontrados presentaban tres labios y carecían de interlabios. En los labios se pudo apreciar la presencia de dos papilas en la parte inferior de los labios; su cutícula era transversalmente estriada a lo largo de todo el cuerpo. El esófago de estos parásitos descendía hasta el ventrículo para unirse con el intestino, no poseían ciego intestinal o apéndice ventricular. Su cola era redondeada, medían cerca de 2cm de largo y no se observaron huevos (Figura 10)

Cuadro 3: Medidas de características distintivas de *Contraecum* y *Anisakis*, todas las unidades son en mm a excepción del largo total el cual se midió en cm.

	<b>Machos <i>Contraecum</i></b>	<b>Hembras <i>Contraecum</i></b>	<b>Hembras <i>Anisakis</i></b>
<b>Ancho</b>	0.71 ( $\pm 0.17$ )	0.86 ( $\pm 0.37$ )	0.43 ( $\pm 0.08$ )
<b>Largo total (cm)</b>	1.87 ( $\pm 0.47$ )	2.23 ( $\pm 0.68$ )	1.95 ( $\pm 0.21$ )
<b>Largo de labios</b>	0.12 ( $\pm 0.01$ )	0.13 ( $\pm 0.04$ )	0.07 ( $\pm 0.01$ )
<b>Ancho de labios</b>	0.18 ( $\pm 0.05$ )	0.17 ( $\pm 0.09$ )	0.08 ( $\pm 0.002$ )
<b>Largo de dientes</b>	0.08 ( $\pm 0.01$ )	0.1 ( $\pm 0.02$ )	No presenta
<b>Ancho de dientes</b>	0.06 ( $\pm 0.01$ )	0.1 ( $\pm 0.15$ )	No presentan
<b>Ciego</b>	2.19 ( $\pm 0.48$ )	2.45 ( $\pm 0.78$ )	No presentan
<b>Esófago</b>	3.06 ( $\pm 0.59$ )	3.37 ( $\pm 0.94$ )	1.94 ( $\pm 0.83$ )
<b>Apéndice ventricular</b>	1.13 ( $\pm 0.18$ )	1.16 ( $\pm 0.37$ )	No presentan
<b>Ventrículo</b>	0.23 ( $\pm 0.05$ )	0.24 ( $\pm 0.1$ )	0.11 ( $\pm 0.02$ )
<b>Ano a final</b>	0.17 ( $\pm 0.04$ )	0.36 ( $\pm 0.08$ )	0.13 ( $\pm 0.01$ )



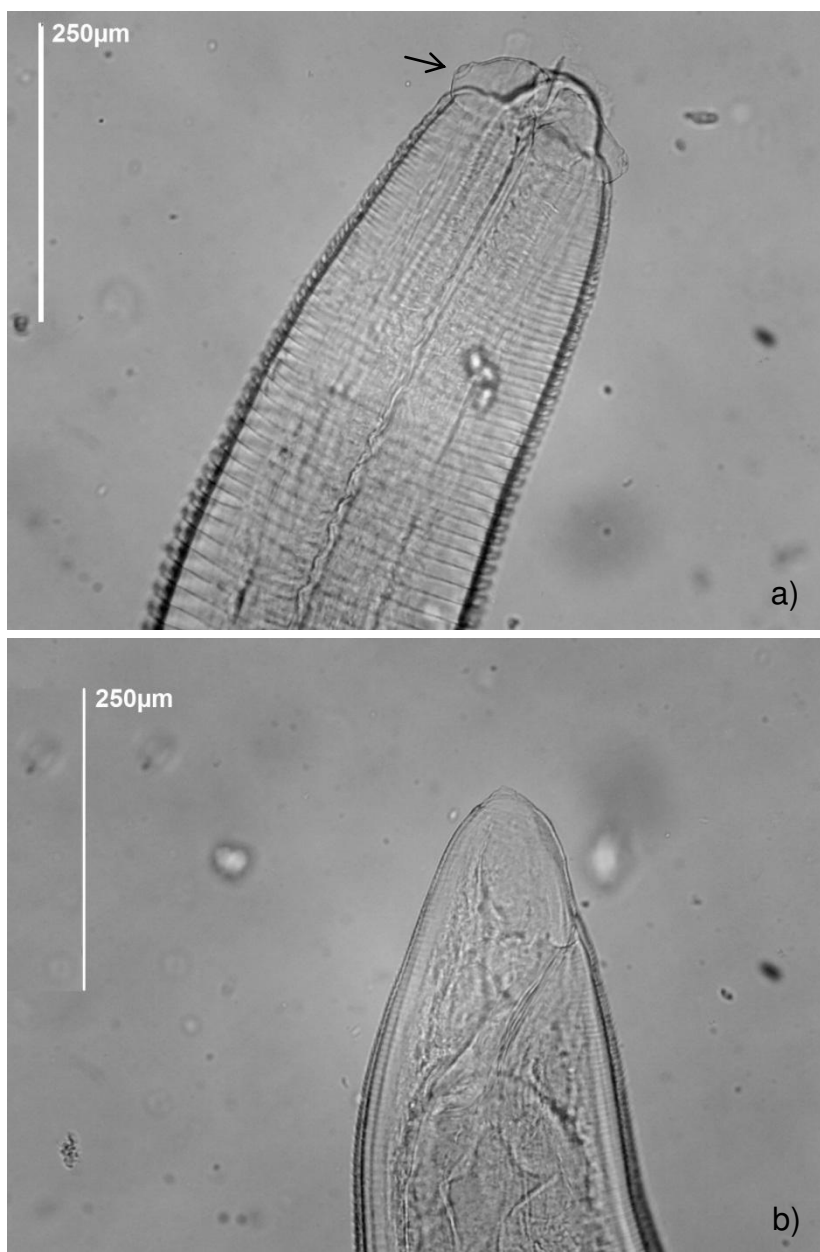


Figura 10 Características de *Anisakis* a) Se muestra la parte anterior, la flecha negra señala la papila que presentan los labios, no hay interlabios; b) se muestra la parte posterior, la cola es redondeada

En el análisis ultraestructural se observaron a mayor detalle las características distintivas de los nematodos. En la boca de *Contraecum* se observó una papila de sujeción en la parte superior de los labios. Las papilas posteriores de los machos pudieron apreciarse a mayor detalle. Por ejemplo, en el microscopio óptico se observaban con claridad cuatro papilas post cloacales, sin embargo el análisis ultraestructural demostró que eran en realidad 12 (Figura 11). Dos de ellas, laterales, estaban muy pegadas a la abertura de las espículas,

cuatro se encontraban en el centro un poco después del primer par y una papila de cada lado, seguida por el último par de papilas ubicadas lateralmente.

En su conjunto, el arreglo de las papilas y las dimensiones de los *Contraecum* aquí descritos fueron semejantes a los reportados por Mattiucci y colaboradores (2003) (Cuadro 4)

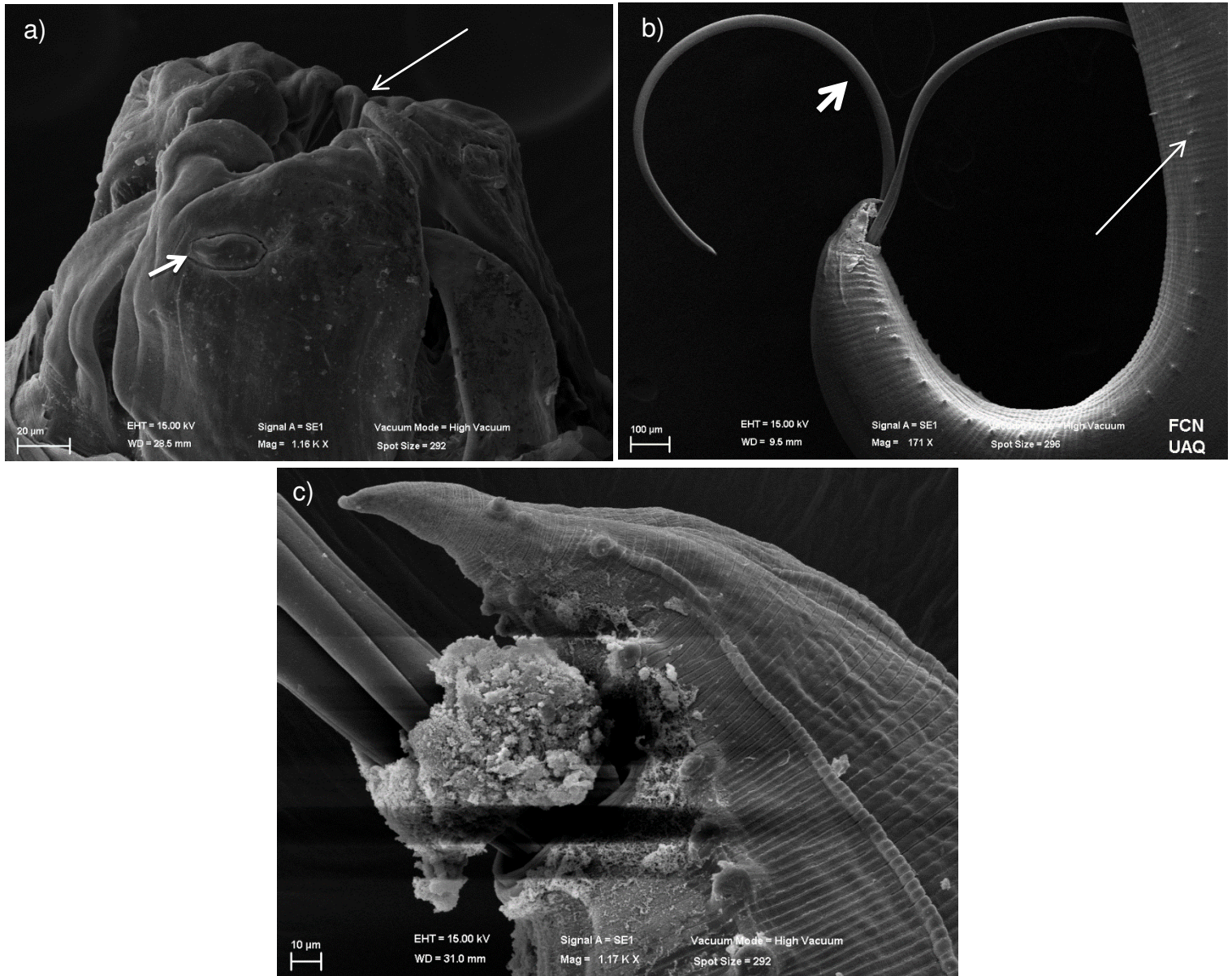


Figura 11 Características ultraestructurales de machos de *Contraecum* a) Parte anterior donde se aprecian los labios e interlabios a mayor detalle, la flecha blanca delgada señala la muesca que presentan los labios y la flecha gruesa blanca señala la papila de los labios; b) Parte posterior donde se aprecian las papilas (flecha blanca delgada) y las espículas (flecha gruesa); c) Parte posterior a mayor zoom, se aprecia el arreglo de las papilas postcloacales

Cuadro 4: Comparación de medidas de los machos encontrados en este estudio con respecto a las descritas por Mattiuci y colaboradores (2003) para *C. margolisi* y por Shamsi y colaboradores (2009) para *C. ogmorhini*. A.V se refiere al apéndice ventricular. P.p.c: papilas post cloacales (número de pares).V.e.a: vulva del extremo anterior. Tabla presentada en mm a excepción de donde se indican unidades.

Características	Machos	Mattiuci et al 2003 <i>C. margolisi</i>	Shamsi et al 2009 <i>C. ogmorhini</i>	Hembras	Shamsi et al 2009 <i>C. ogmorhini</i>
Largo total (cm)	1.87 ( $\pm 0.47$ )	2.4	5.39 (4.95-5.75)	2.23 ( $\pm 0.68$ )	7.2 (5.48-9.02)
Ciego	2.19 ( $\pm 0.48$ )	2.95	3.63 (2.93-4.39)	2.45 ( $\pm 0.78$ )	4.56 (3.74-5.20)
Esófago	3.06 ( $\pm 0.59$ )	3.85	5.39 (4.39-7.39)	3.37 ( $\pm 0.94$ )	6.2 (5.1-7.7)
Apéndice ventricular	1.13 ( $\pm 0.18$ )		1.06 (0.72-1.67)	1.16 ( $\pm 0.37$ )	1.81 (0.89-2.19)
A.V + ventrículo	1.72 ( $\pm 0.57$ )	1.64		1.25 ( $\pm 0.42$ )	
Espícula larga	5.27 ( $\pm 1.33$ )	6.3	12.9 (12.8-13)		
Espícula corta	5.08 ( $\pm 1.35$ )	6.1	12.61 (10.42-13.73)		
P.p.c	7	7	6		
V.e.a				6.35 ( $\pm 2.02$ )	22.1 (18.1-29.7)
Huevos				0.09 ( $\pm 0.14$ ) $\times$ 0.05 ( $\pm 0.01$ )	65 (52-81) $\times$ 75(65-98)

Se logró amplificar exitosamente el fragmento ITS de *Contraecum* y el fragmento SSU de *Contraecum* y de *Anisakis* (Figura 12)

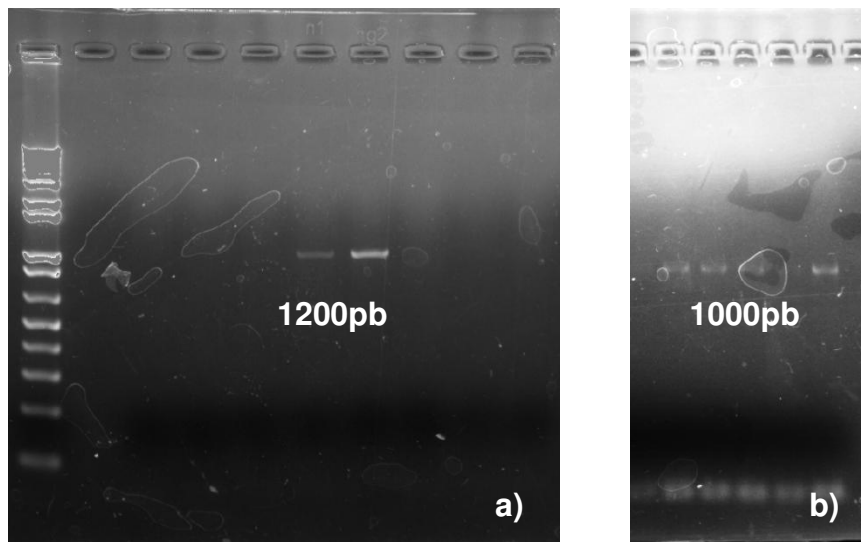


Figura 12 Amplificaciones de regiones genéticas de los parásitos a) Se observa una banda del tamaño esperado para el fragmento ITS en nematodos b) fragmentos SSU amplificados para nematodos

## **Acantocéfalos**

Los acantocéfalos fueron encontrados en alta intensidad, adheridos a la pared del tracto digestivo de las tres lobos hembras muestreadas (Figura 13). Los parásitos hembras presentaban un gran número de individuos en el tracto digestivo. Estos organismos, identificados como pertenecientes al género *Corynosoma* midieron 1.89 mm ( $\pm$  0.30) de largo y la parte anterior de su cuerpo era redondeada en forma de disco de fijación. La probóscide se observó de forma cilíndrica rodeada de ganchos acomodados en espiral; en algunas aclaraciones se logró apreciar los ligamentos que le permiten a la probóscide retráctil (Figura 14). El disco de fijación en el presoma presentó espinas al igual que la parte ventral del cuerpo. Estas espinas continúan sin interrupción hasta el final del tronco (Figura 14).

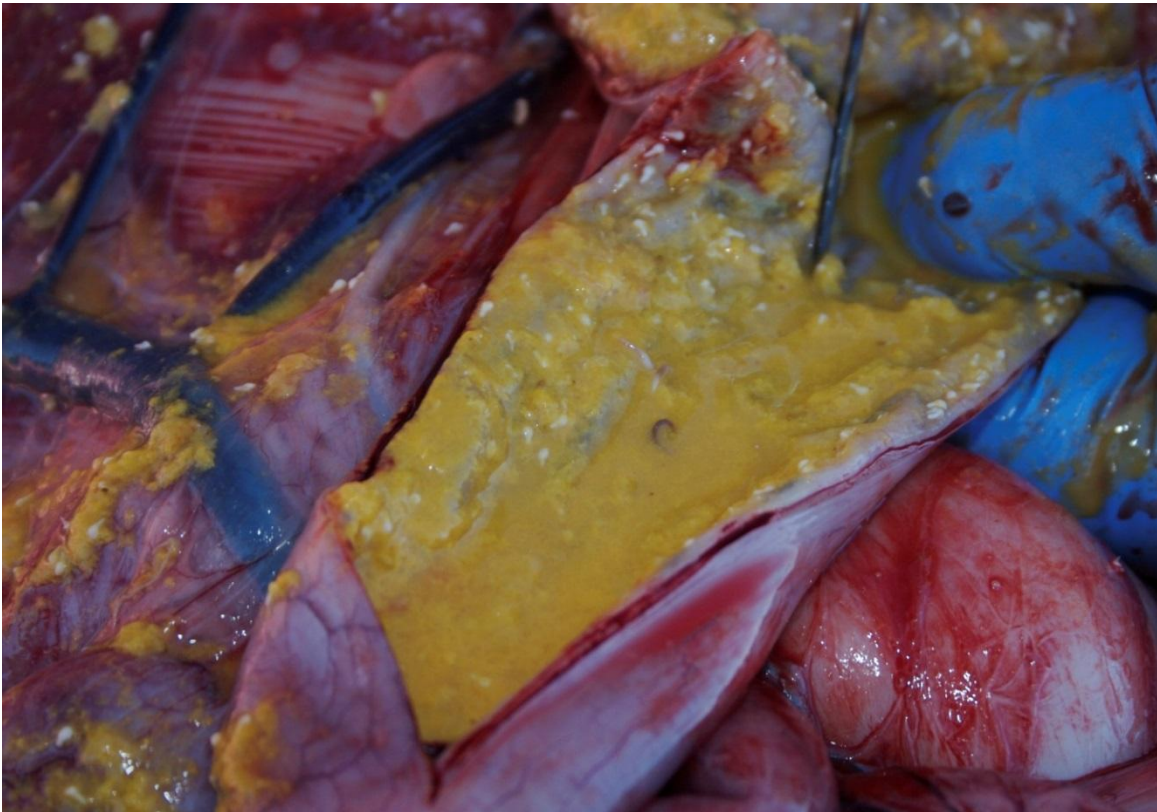


Figura 13: Mucosa y lumen intestinal. Se observan los acantocéfalos adheridos a la pared del sistema digestivo.

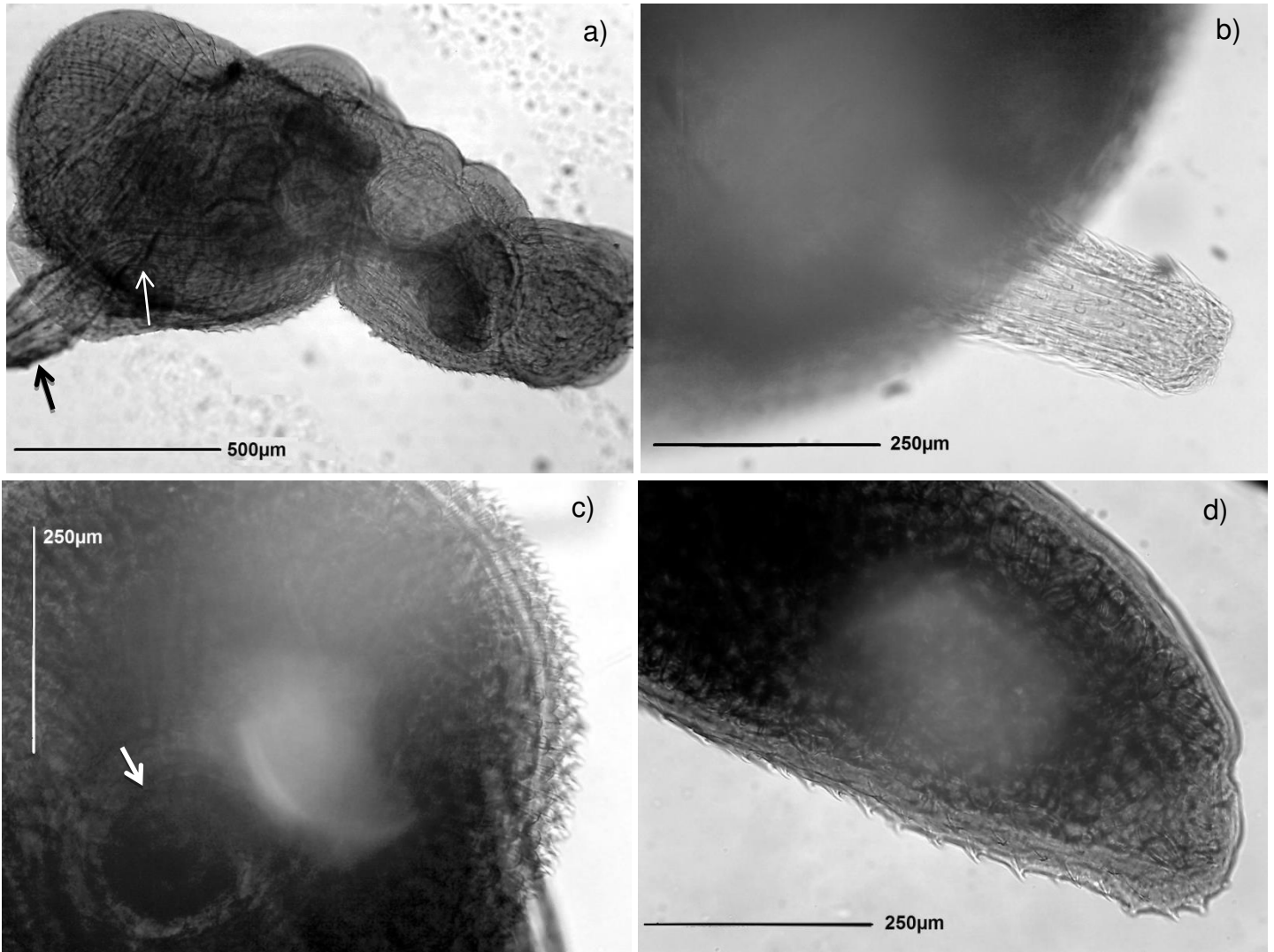


Figura 14 Características de *Corynosoma*. a) todo el cuerpo del Acantocéfalo, la flecha negra muestra la probóscide y la blanca los músculos que ayudan a la invaginación de esta; b) se muestra la probóscide con su arreglo de espinas; c) disco de fijación con espinas la flecha blanca señala por donde sale la probóscide, en este caso completamente invaginada; d) parte posterior mostrando espinas cervicales.

Se amplificó y secuenció la región mitocondrial COXI (Figura 15). Sin embargo, las secuencias obtenidas mostraban evidencia de contaminación por lo que no fue posible trabajar con ellas y obtener resultados comparativos con respecto a secuencias reportadas.

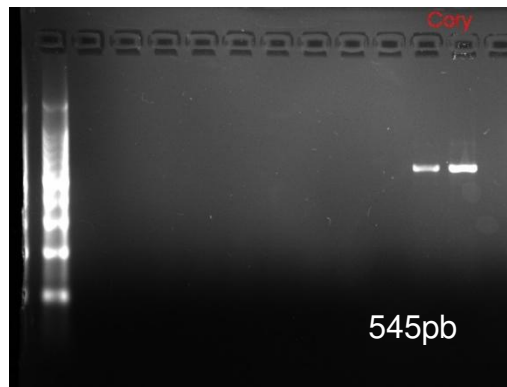


Figura 15 Fotografía de un gel de agarosa donde se observa el fragmento del tamaño esperado para la región de COXI amplificada en los *Corynosomas*.

### **Cestodos**

Los cestodos se encontraron en el intestino de los lobos marinos de California (Figura 16). Para realizar el diagnóstico, únicamente se contó con un pequeño segmento del parásito que constaba de proglótidos maduros e inmaduros. Posterior a la tinción se pudo observar que los cestodos contaban con un solo conjunto de órganos reproductores, y contenían una gran cantidad de huevos semiovalados con un ligero hundimiento en el centro (Figura 17). Únicamente solo se tuvo un escólex para observar bajo microscopía estereoscópica y electrónica.

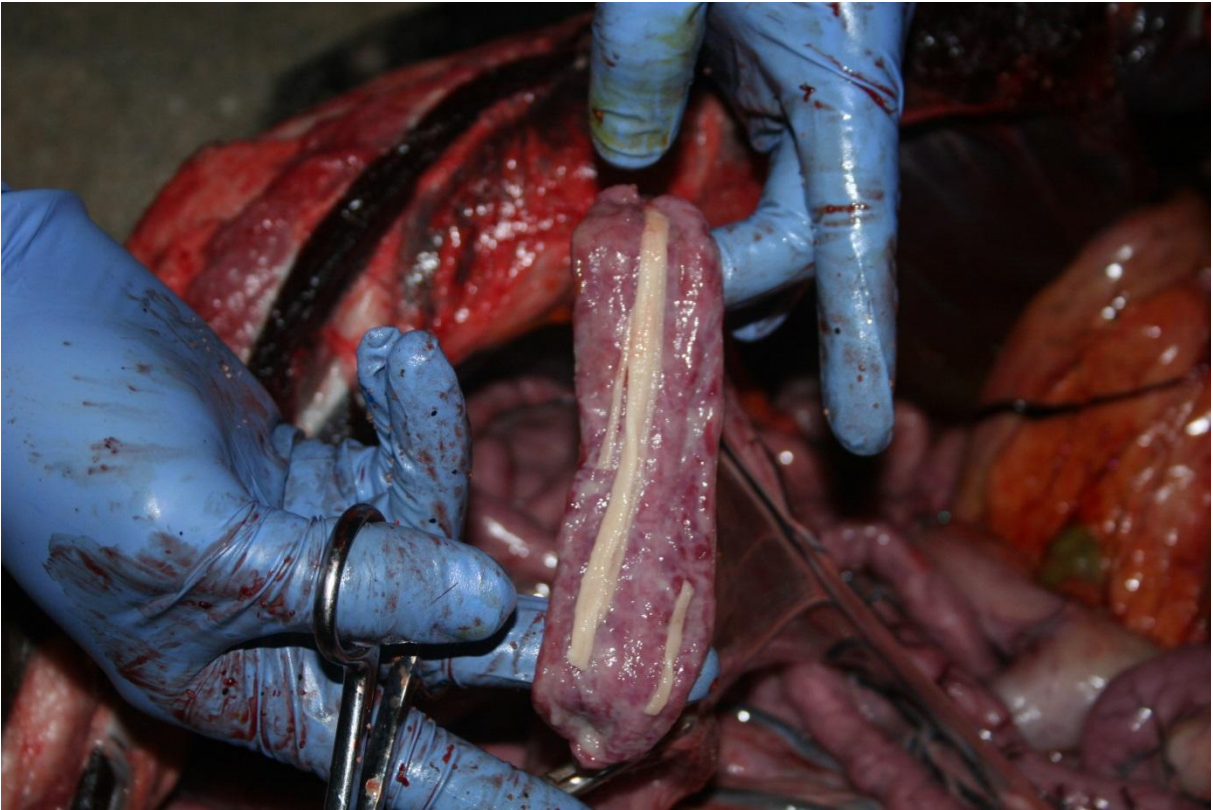


Figura 16 Se muestra un fragmento del cestodo que se encontró dentro del intestino de una de las hembras de Granito.

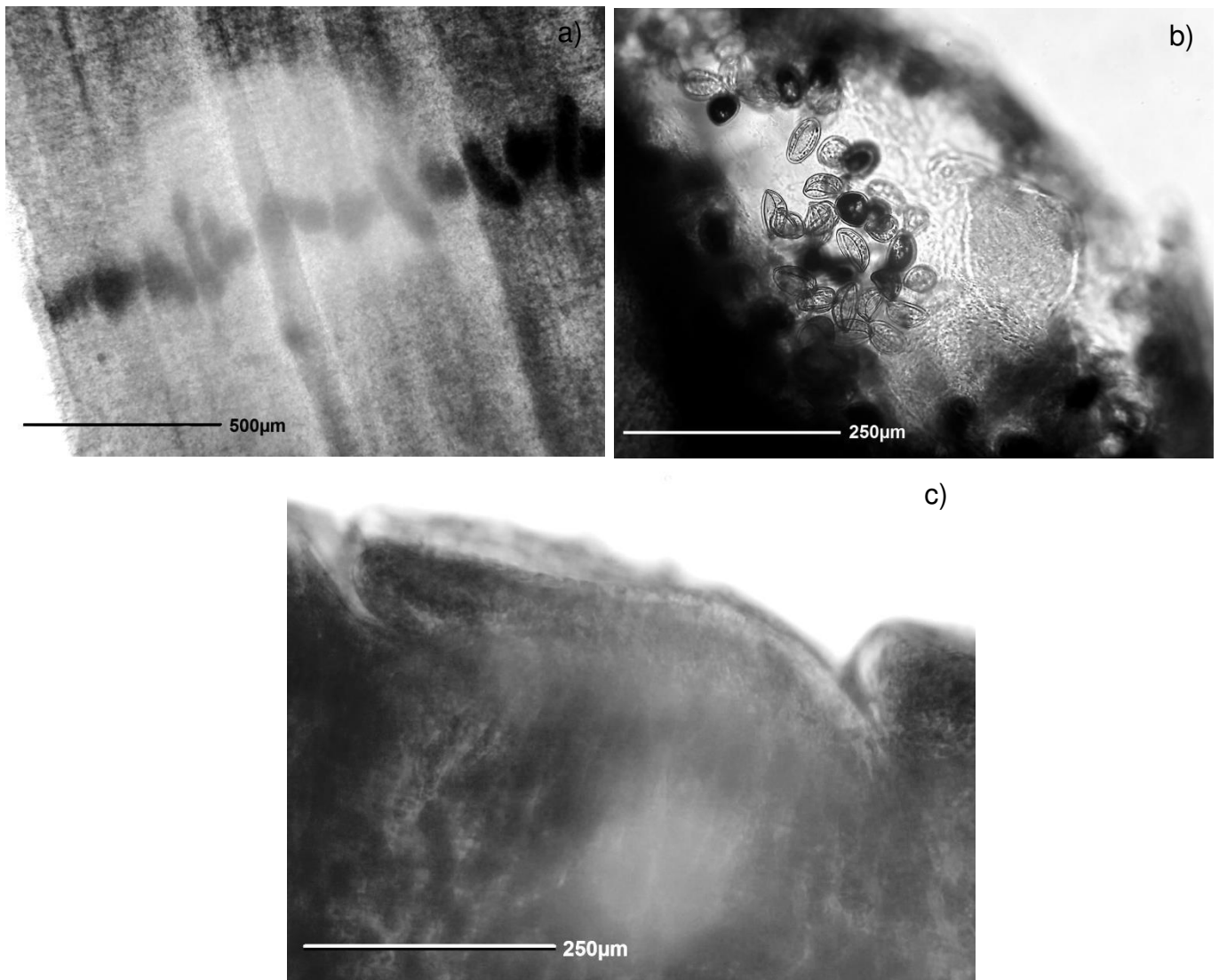


Figura 17 Características de *Diphyllbothrium* a) se observa el único set de órganos reproductivos a lo largo de varios proglótidos; b) se observa la forma de los huevos; c) se puede ver el acomodo de los proglótidos

El análisis ultraestructural demostró que el escólex no presentaba ganchos de fijación, y era sencillo y liso. Se observaron dos bothrias y el cuello no fue tan pronunciado como en otras especies debido al ancho de los proglótidos (Figura 18)





Figura 18 Se aprecia el escólex de *Diphyllbothrium* en microscopia electrónica de barrido

Los primers ribosomales amplificaron la secuencia deseada (Figura 19), una vez teniendo la secuencia consenso se comparó en la base de datos de NCBI. De manera sorprendente, las secuencias tuvieron un alto grado de similitud con el cestodo *Ligula intestinalis* y *Digramma interrumpa* con 85% y 84% de similitud, respectivamente. En comparación con las secuencias reportadas para *Diphyllbothrium* se obtuvo una similitud del 90% y pero solo compartían un 42% las secuencias obtenidas con las reportadas. Debido a esto se alinearon las secuencias en el programa ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para observar al sitio donde se alineaban; teniendo como resultado que las secuencias obtenidas coincidían con la parte final de las secuencias reportadas.

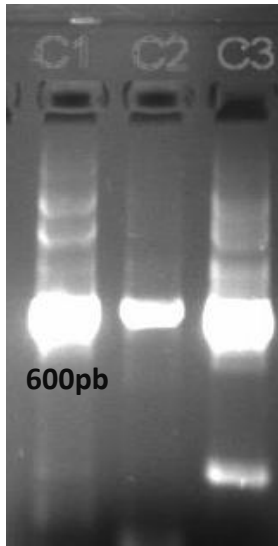


Figura 19 Fotografía de un gel de agarosa al 2% donde se observa una banda del tamaño esperado para el fragmento ribosomal (600pb) en un gel de agarosa al 2%

### Ácaros

Al examinar las vellosidades mucosas del estómago del lobo marino muerto en isla Granito, se encontró un ácaro asociado con nematodos, mismo que fue identificado como *Orthohalarachne sp.* en etapa larval. Debido a su etapa de desarrollo, no fue posible llegar a identificar la especie. Sin embargo, algunas características físicas sirvieron para su identificación. Las larvas presentaban seis patas, la tibia I presentaba el siguiente arreglo de sedas: 1-2/1,2/1-1. El gnatosoma no presentaba sedas y mostraba un pequeño par de quelíceros y un par de lóbulos hipostomales medios con respecto a la unión coxatrocánter del palpo. También presentaba dos sedas adanales elongadas en la parte posterior y una seda paranal más larga (Figura 20).

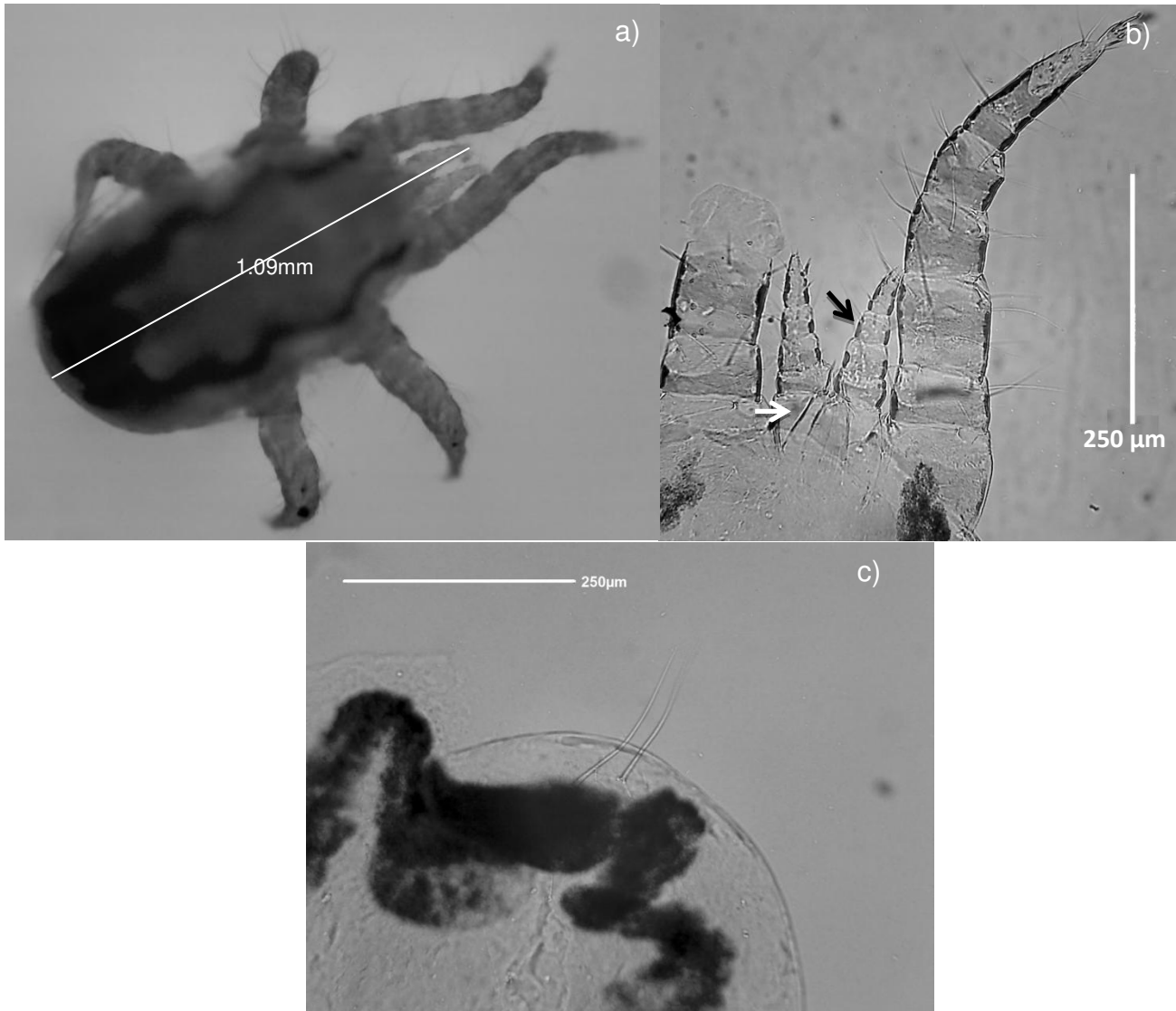


Figura 20 Ácaro encontrado en el tracto digestivo de un lobo marino de California. a) se observa la longitud de la larva de *Orthohalarachne* sp antes del aclaramiento; b) se observa el gnatostoma del ácaro con los cheliceros (flecha negra) y los lóbulos hipostomales (flecha blanca); c) se pueden observar las dos sedas adanales

### **Piojos**

Los ectoparásitos colectados de la piel en la región ventral perigenital de los tres lobos marinos se identificaron como *Antarctophthirus microchir*. Los ejemplares medían alrededor

de 2.22 mm ( $\pm 0.64$ ) de largo, su aparato bucal haustelado era característico (Leonardi et al 2012), la cabeza medía 0.49 mm ( $\pm 0.12$ ) de largo por 0.37 mm ( $\pm 0.06$ ) de ancho y era más estrecha que el tórax (0.54  $\pm$  0.18 mm de largo por 0.64  $\pm$  0.14mm de ancho), características típicas de especies hematófagas (Borror et al 1992). Su cuerpo se observó cubierto de pequeñas espinas gruesas, tórax y el abdomen estaba revestido por escamas; el primer par de patas estaba es pequeño en comparación con los otros dos pares y no presenta modificaciones (0.48  $\pm$  0.08 mm) mientras los otros dos pares de patas presentan uñas modificadas en forma de pinzas (0.62  $\pm$  0.12 y 0.65  $\pm$  0.14 mm); contaban con cinco segmentos en las antenas (0.28  $\pm$  0.04 mm de largo total), el último de ellos con apéndices sensoriales. En el metasternum se apreció una hilera transversal de setas más largas (0.18  $\pm$  0.05 mm), las hembras presentan una franja de setas largas alrededor de la abertura genital (0.18  $\pm$  0.03 mm) (Figura 21). Ninguno de los especímenes analizados en este estudio fue macho.

Esta especie de piojo se había reportado previamente por Leonardi y colaboradores (2009) en el lobo marino de Sudamérica, *Otaria flavescens*. En el cuadro 5 se presenta la comparación de las medidas obtenidas en el presente estudio con las reportadas por Leonardi y colaboradores.

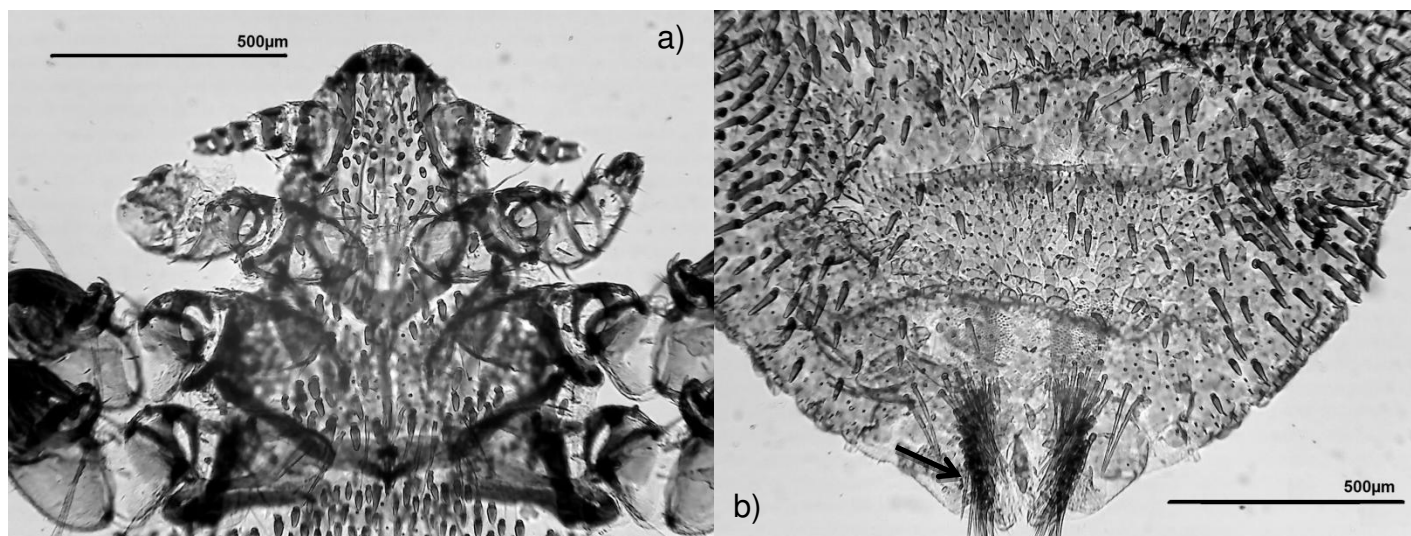


Figura 21 Microfotografías de un piojo colectado en el lobo marino de California. a) Se observa la cabeza y tórax de *A. microchir*, se pueden ver las características de las patas, antenas, cuerpo cubierto de setas y escamas; b) se observa el abdomen cubierto de escamas y setas, en este caso es un hembra y se aprecian las setas alrededor de la abertura genital (flecha)

Cuadro 5: Comparación de las medidas presentadas para *Antarctophthirus microchir* por Leonardi y colaboradores (2009) y las medidas obtenidas en este estudio (mm)

Características	<i>Otaria flavescens</i>	<i>Zalophus californianus</i>
<b>Largo</b>	2.78 ±0.34 (2.01-3.53)	2.22 ±0.64 (1.56-2.99)
<b>Cabeza largo</b>	0.55 ±0.04 (0.46-0.61)	0.49 ±0.12 (0.33-0.7)
<b>Cabeza ancho</b>	0.44 ±0.04 (0.37-0.5)	0.37 ±0.06 (0.3-0.47)
<b>Tórax ancho</b>	0.92 ±0.08 (0.81-1.06)	0.64 ±0.14 (0.45-0.86)
<b>Abdomen ancho</b>	1.64 ±0.3 (1.19-2.42)	1.37 ±0.56 (0.87-2.3)

Varias de las características que permiten identificar a *Antarctophthirus microchir* no se observan en el microscopio óptico por lo que el análisis bajo el microscopio electrónico fue una herramienta útil. El aparato bucal haustelado estaba rodeado de 12 setas, características de esta especie (Crovetto et al 2008; Leonardi et al 2009). Se observaron apéndices sensoriales en el quinto segmento de las antenas (Figura 22). En los últimos dos

pares de patas se observaron estructuras especializadas llamadas conchas, que son setas modificadas para sostenerse del pelo de su hospedero (Leonardi et al 2012). Mediante las imágenes de microscopía electrónica se aprecian con mayor claridad las setas, escamas y espinas presentadas a lo largo del cuerpo de *A. microchir*. En la unión del tórax y abdomen esta especie presentó setas más largas ( $0.18 \pm 0.05$  mm) que las ubicadas a lo largo del cuerpo (Figura 23).

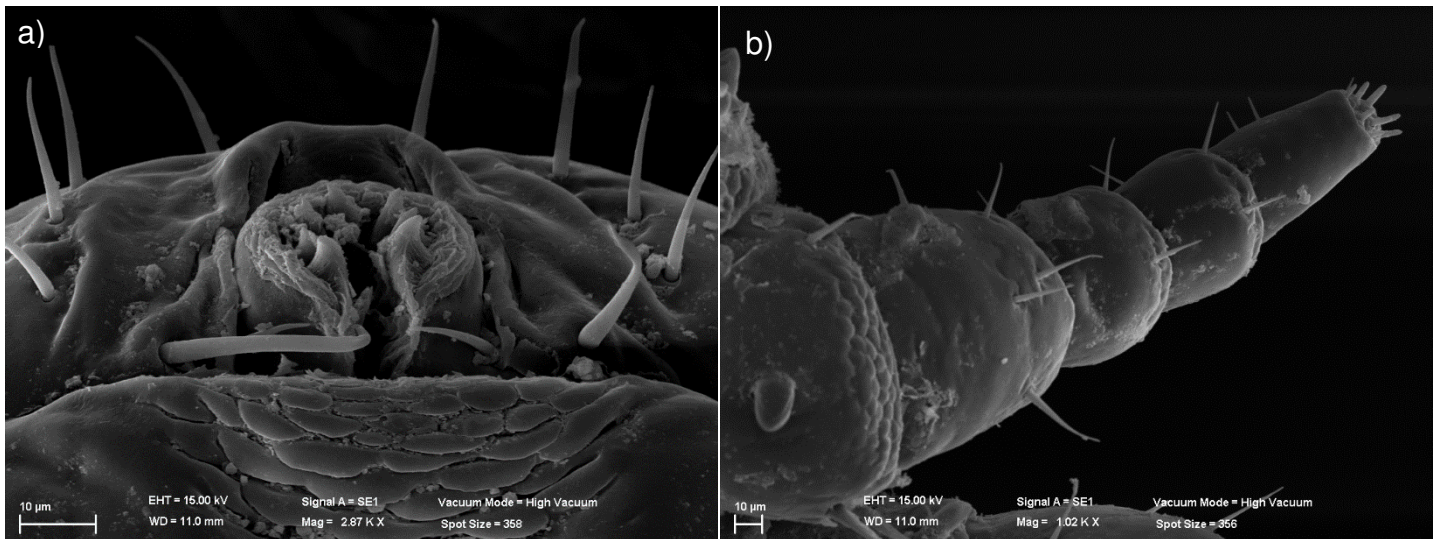


Figura 22 Microfotografías de *Antarctophthirus microchir*. a) Aparato bucal haustelado de *A. microchir* con 12 setas características alrededor. b) Los cinco segmentos de la antena derecha con los apéndices sensoriales al final de esta.

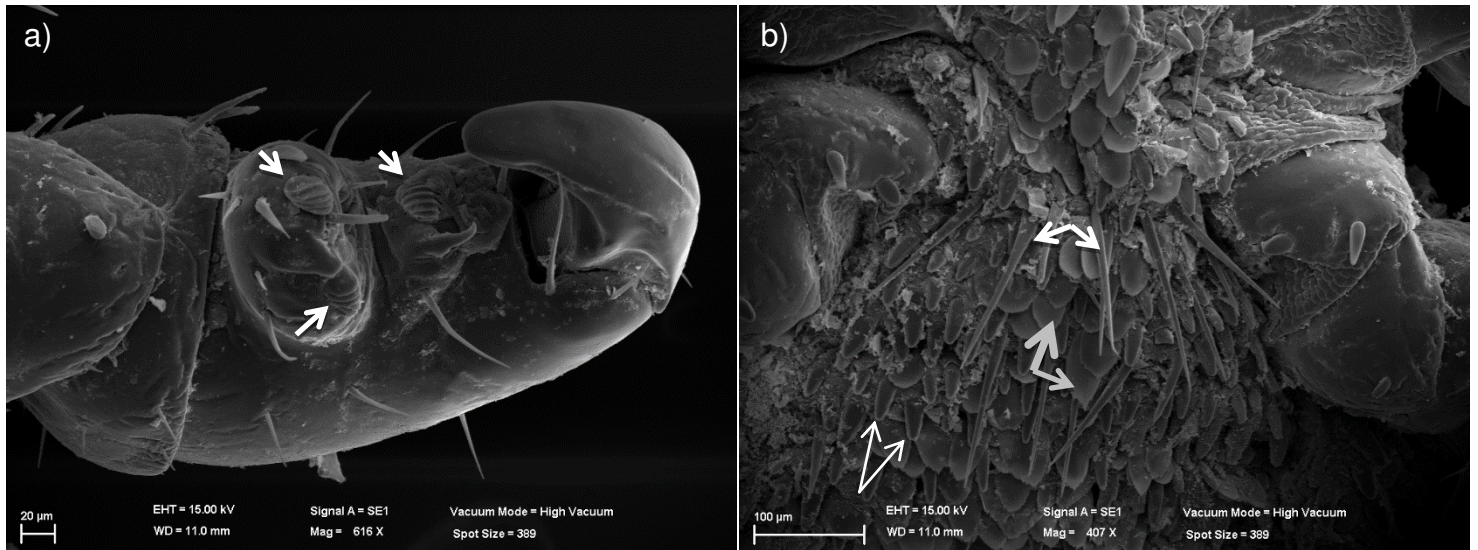


Figura 23 Microfotografías de *Antarctopthirus microchir* a) Se muestran las conchas (flechas) en una de las patas de una hembra adulta de *A. microchir*; b) Se aprecian las setas entre el torax y el abdomen largas (flechas blancas cortas), las escamas (flechas grises) y las espinas (flechas blancas largas) presentes en el cuerpo.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones diagnósticas de los piojos no amplificaron con las condiciones utilizadas, por lo que no pudo realizarse el análisis molecular para estos parásitos.

## 8. DISCUSIÓN

La diversidad de parásitos helmintos en los mamíferos marinos, incluyendo a *Zalophus californianus*, es alta y por lo general sus géneros están representados por una sola especie (Poulin 2000) aunque claramente existen sus excepciones. Para cada grupo de organismos aquí estudiado se obtuvieron resultados diversos, lo que nos da a pensar que las historias de vida de los diferentes parásitos, a pesar de habitar el mismo hospedero, son muy diversas. Esto debido a las diferentes características y ciclos de vida que presentan los parásitos.

Se encontraron dos géneros de nematodos en este estudio, *Contracaecum* y *Anisakis*. Para los organismos identificados como *Contracaecum*, las características observadas fueron parecidas a las descritas por Mattiuci y colaboradores (2003) para *C. margolisi* lo cual sugiere que estos especímenes pertenecen a esta especie. Esta especie es una de las pertenecientes al complejo de *C. ogmorhini*. El arreglo de papilas en la parte caudal al igual que varias características presentes en la boca, como son los labios con papilas e interlabios, concuerdan con esta descripción. Sin embargo se registraron diferencias en algunas características. Por ejemplo, Mattiuci y colaboradores (2003) describen a los interlabios del mismo largo de los labios, sin embargo en todos los organismos analizados los interlabios se observaron ligeramente más pequeños. En lo que concierne a las dimensiones del ciego intestinal, apéndice ventricular, espículas y esófago, estos fueron semejantes a los reportados previamente. Mattiuci y colaboradores caracterizaron a los nematodos aislados de un lobo marino de California en Canadá. Es posible que los individuos que se caracterizaron en esta tesis pertenezcan a esta especie. *C. margolisi* también ha sido reportada en lobos marinos de las costas de California (Mattiucci et al 2008) sin embargo no se encontraron reportes sobre las medidas de los parásitos para poder compararlas con lo obtenido en la presente tesis. Fuera de estas dos zonas geográficas, a la



fecha *C. margolisi* no ha sido reportado en otras zonas ni en otras especies hospederas, aunque otras especies dentro del complejo *Contracecum ogmorhini* se han reportado en pinnípedos como el lobo marino de Australia y Sudafrica (*A. pusillus pusillus* y *A. pusillus doriferus*), lobo fino de Australia (*A. australis*), foca leopardo (*H. leptonix*), lobo marino antártico (*A. gazella*), lobo marino subantártico (*A. tropicalis*), lobo marino de Steller (*E. jubatus*) y elefante marino del norte (*M. leonina*) (Mattiuci et al 2003, Mattiuci et al 2008). Con base en la información disponible, lo más parsimonioso es concluir que los nematodos encontrados pertenecen a *C. margolisi*; sin embargo, lo mejor sería respaldarlo con pruebas moleculares a fin de corroborar la identidad de los parásitos.

En lo que respecta a *Anisakis* este es un género común de cetáceos, aunque ha sido reportado en pinnípedos como lobo fino (*Arctocephalus australis*), lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*), foca gris (*Halichoerus grypus*), foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*), foca monje (*Monachus monachus*), elefante marino (*Mirounga* spp.), morsa (*Odobenus rosmarus*), lobo marino de Sudamérica (*Otaria byronia*), foca anillada (*Pusa hispida*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (Anderson, 2000). Debido a que los parásitos analizados para esta tesis aún no eran adultos, no fue posible realizar la caracterización completa de los especímenes, sin embargo es probable y plausible que este parásito encontrado pertenezca al complejo *Anisakis simplex* debido a las demás características previamente descritas y al hospedero en el que se encuentra.

Las características morfológicas que se pudieron apreciar en los acantocéfalos fueron pocas debido a que varios individuos presentaron problemas ante la tinción lo cual impidió observar estructuras. La fijación de acantocéfalos es complicada y laboriosa, las condiciones en campo no permitieron que se llevara a cabo el procedimiento correcto por lo que varios individuos fueron fijados con la probóscide dentro, lo cual obstruyó el análisis de las

probóscides e impidió la visualización de órganos internos. Otras características claves fueron imposibles de ver debido a la tinción. Debido a las características y al hospedero donde se encontró se propone que los organismos son pertenecientes al género *Corynosoma*, sin embargo averiguar la especie fue imposible. Este género de Acantocéfalos ha sido reportado en gran número de pinnípedos alrededor del mundo, y se sabe que algunas especies como *C. obtuscens* y *C. strumosum* han sido reportadas previamente en el lobo marino de California (Van Cleave 1953, Margolis y Dailey 1972, Shults 1982, Castillo et al 1998, Ionita et al 2008). Se podría suponer que los ejemplares son *C. obtuscens* debido a que las características externas que describe Van Cleave (1953) coinciden con las características externas que aquí observamos, como son el patrón de las espinas, y la forma del cuerpo y probóscide. En el estudio realizado por Ionita y colaboradores (2008) se describe a *C. obtuscens* y se aprecian características semejantes a las que presentaron los acantocéfalos de esta tesis. Van Cleave (1953) también menciona que los peces utilizados como hospederos intermediarios se encuentran en aguas mexicanas. Los acantocéfalos de este estudio coinciden con la descripción de *Corynosoma obtucens* realizada por Van Cleave (1953) y por Ionita y colaboradores (2008) sin embargo en ninguno de estos dos estudios se describen estructuras internas por lo que no se pudo comparar a cabalidad.

Para este grupo de organismos los resultados del análisis molecular no fueron los esperados. Los resultados de la secuenciación fueron imposibles de analizar debido a la presencia de más de una secuencia. Se piensa que fue debido a que no solo se amplificó la secuencia deseada sino que también se amplificaron numts. Estos son secuencias nucleares que exhiben gran similitud con secuencias mitocondriales, ya se ha reportado que al intentar amplificar regiones mitocondriales en acantocéfalos también se amplifica numts (Benesh et al 2006) por lo que al secuenciar el producto aparecen dos secuencias, lo cual no permite trabajar con las secuencias.

Solo se encontraron cestodos en dos de los lobos marinos examinados. Al igual que paso con los acantocéfalos estos necesitan un proceso de relajación antes de ser fijados, lo cual no se pudo realizar por lo que al venir mal fijados los órganos internos fueron muy difíciles de apreciar. Se logró observar el set de órganos reproductores sin embargo muchas características distintivas no se pudieron ver. El hospedero fue utilizado como una característica para averiguar la identidad del cestodo así como también el escólex y a las características observables presentadas. Con esta información concluimos que los cestodos pertenecían al género *Diphyllbothrium* sin embargo esto no es un resultado del todo seguro debido a las circunstancias explicadas con anterioridad.. Organismos pertenecientes a este género se han reportado en gran cantidad de hospederos, incluyendo al humano, por lo cual se considera un género de importancia clínica en la sociedad (Raush et al 2010)

Al realizar el análisis molecular se seleccionó una secuencia ribosomal para comprobar la identidad de estos organismos. Las secuencias de cestodos presentaron una alta similitud con *Ligula intestinalis* y *Digramma interrupta* lo cual no se esperaba, ya que debido a las pocas características morfológicas que se pudieron observar, los cestodos indicaban pertenecer al género *Diphyllbothrium*. Al comparar las secuencias obtenidas con aquellas publicadas para *Diphyllbothrium* obteníamos un alto grado de similitud (90%) sin embargo solo se compartía un 42% con la secuencia encontrada. A pesar de la similitud genética presentada con *L. intestinalis* y *D. interrupta* es claro que no pertenece a estas especies debido a que estos dos parasitan a peces de agua dulce (Pérez Ponce de León et al 1992, Logan et al 2004), lo cual hace muy poco probable que parasiten al lobo marino de California además de las diferencias morfológicas notables entre las especies de parásito. Las secuencias encontradas se alinean al final de las secuencias reportadas, lo que indica que probablemente el bajo porcentaje de secuencias compartido se deba a que los

fragmentos amplificadas en este estudio se encuentran en una región del gen que no ha sido amplificada en los otros estudios. En este sentido, la presente tesis ha aportado información genética que no se tenía previamente para esta especie de parásito.

El ácaro *Orthohalarachne* sp., se reporta como un parásito orofaríngeo (Dailey, 2001) en diversos pinnípedos como el lobo fino del norte (*Callorinus ursinus*), lobo fino de Australia (*Arctocephalus pusillus doriferus*), lobo marino de Australia (*Neophoca cinérea*), morsa (*Odobenus rosmarus*) y el lobo marino de Steller (*Eumatopias jubatus*) (Dunlap et al 1976; Ke Chung y Haas 1980). Se desconoce de algún reporte de este género en el tracto digestivo de hospederos mamíferos ya que en todos los reportes se ubica en el tracto orofaríngeo y en los pulmones (Ke Chung y Haas 1980; Dowling 2006). Debido a su localización estos ácaros pueden causar daños a sus hospederos en especial cuando están presentes en un gran número. Existen reportes en el lobo marino de California y en el lobo fino del Norte en donde la presencia de estos ácaros causan inflamación de las membranas mucosas, reacción de células mononucleares y eosinófilos y enfisemas secundarios que pueden resultar en bronquitis la cual termina por matar al hospedero (Ke Chung y Haas 1980). No se localizaron más ejemplares de *Orthohalarachne* sp. en la orofaringe ni pulmones de ninguno de los tres individuos analizados *post mortem*, y en el lobo marino del cual se aisló la larva, no se encontraron otros ejemplares semejantes en el tracto digestivo. Con base en la evidencia existente, la conclusión más parsimoniosa es que el ácaro fue deglutido por el lobo marino cercano a su muerte.

Este grupo de organismos fue el único que se pudo determinar la especie con toda seguridad simplemente utilizando claves y sus características morfológicas. *Antarctophthirus microchir* es uno de los pocos artrópodos en poderse adaptar al medio marítimo, esto lo hace muy interesante desde un punto de vista evolutivo. Presenta adaptaciones específicas al tipo de vida marino de su hospedero, es decir que éstos organismos lograron adaptarse a

una vida anfibia. Por esto tuvieron que desarrollar estructuras específicas que les permitieran sobrevivir a las inmersiones al igual que sincronizar su ciclo de vida con el de su hospedero. *A. microchir* se reproduce en la época en que el lobo de California sale a tierra a reproducirse y tener a sus crías, pues así tienen el suficiente tiempo para pasar de huevos a ninfa 2 o 3, o adultos, pues los huevos y el estadio ninfa 1 no sobreviven a las inmersiones (Leonardi *et al.*, 2011). Las especies de hospederos con altas densidades de poblaciones facilitan la transmisión de parásitos y la extinción de estos es menos probable (Poulin 2000), dado que en una colonia reproductiva como lo son Los Cantiles y Granito la densidad de hembras y crías es alta todo el año, se predice que la ocurrencia de estos parásitos sería marcada en las colonias.

Además de parasitar al lobo marino de California, *A. microchir* ha sido reportada en el lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*) en las costas de Chile (Crovetto *et al.*, 2008). Al comparar las medidas de estos dos reportes podemos observar que son ligeramente más pequeños los piojos que parasitan a *Zalophus californianus*, sin embargo no presentan más diferencias. Valdría la pena realizar estudios comparativos desde niveles moleculares hasta niveles conductuales a fin de ver si a pesar de ser considerados la misma especie, tienen diferencias.

El análisis molecular en los piojos no fue posible debido a que los oligonucleótidos utilizados no amplificaron productos. Los oligonucleótidos fueron diseñados con base en especies relacionadas filogenéticamente, sin embargo este par de oligonucleótidos no amplificó el ADN aislado para esta especie. Este resultado pudo ser debido a algún error en el diseño de los oligonucleótidos o a una alta variabilidad interespecie en la región seleccionada. Para estudios posteriores se recomienda utilizar otros oligonucleótidos.

Ninguno de los parásitos estudiados en este trabajo parece representar un riesgo de salud ante *Zalophus californianus*, si bien se observaron lesiones asociadas a los parásitos. Los

lobos marinos pueden vivir con alta carga parasitaria sin tener problemas de salud, pero si se encuentran inmunosuprimidos por mala nutrición, estrés o contaminantes los parásitos pueden tener un impacto significativo sobre su salud (Harris y Gordiner 2011). Debido a esto es importante incluir, en los planes de conservación, el estudio de la diversidad parasitaria de las poblaciones que se quiere conservar. Los parásitos pueden ser utilizados como marcadores de relaciones ecológicas para obtener información histórica, filogenética y ecológica acerca de sus hospederos (Aznar et al 2001). Esta tesis da pie a realizar más estudios sobre la fauna parasítica del lobo marino de California, ya que teniendo caracterizados la diversidad parasítica se pueden realizar estudios más detallados de virulencia, interacciones ecológicas y efectos sobre la salud de los lobos marinos de California.

La conservación del lobo marino de California es importante a nivel biológico, social y económico (Aurióles y Zaavala-González, 2000); conocer su fauna nos permite realizar programas de conservación más completos, elaborar mejores planes de manejo tanto para los lobos como para esta zona geográfica, al igual que entender mejor las relaciones ecológicas que estos otáridos tienen en su ecosistema.

## 9 CONCLUSIONES

La fauna macroparasítica del lobo marino de California es sumamente diversa. Se encontraron dos especies de nematodos *Contracaecum margolisi* y *Anisakis simplex*, estas ya habían sido registradas para el lobo marino de California en otras zonas geográficas por lo cual se esperaba encontrarlas en este estudio. El fenotipo de los nematodos *Contracaecum* encontrados en este estudio es muy semejante al fenotipo de *C. margolisi* reportado con anterioridad; se aprecian algunas variaciones como lo son la presencia de interlabios más cortos que los labios en los especímenes de este estudio y medidas en general más pequeñas en los especímenes de este estudio comparado con las medidas de los previamente reportados. Los resultados moleculares no fueron concluyentes debido a que las secuencias se encontraban contaminadas y fue imposible realizar una comparación.

Los acantocéfalos encontrados en estos lobos marinos de California pertenecen al género *Corynosoma*, a pesar de que sus características morfológicas son muy similares a las de la especie *Corynosoma obtuscens* no podemos asegurar que se trate de esta. Para los *Corynosoma* los genes mitocondriales no son una opción para hacer estudios genéticos de identificación, se prefieren otros genes debido a la presencia de numts los cuales hacen imposible el análisis de las secuencias.

Los cestodos de esta tesis fueron identificados como pertenecientes al género *Diphyllobothrium* sin embargo nos fue imposible llegar a especies. Las secuencias obtenidas no confirmaron que pertenecían a este género pues el fragmento amplificado es diferente a los reportados en otros estudios.

El ácaro encontrado fue identificado como *Orthohalarachne* sp. pues debido a que era una larva no se pudo identificar hasta especies. Suponemos que este ácaro fue encontrado en el

estómago debido a que fue deglutido accidentalmente por la hembra de lobo marino de California poco antes de morir ya que no presentaba una infección en tracto respiratorio.

Los piojos pertenecen a la especie *Antarctophthirus microchir*, al ser comparados con los registrados en el lobo marino Sudamericano se aprecia que son más pequeños. Estos especímenes presentan adaptaciones específicas al tipo de vida anfibio que llevan sus hospederos y una alta especificidad.

Ninguno de los parásitos encontrados representan una amenaza contra la salud del lobo marino de California en condiciones naturales, sin embargo de existir factores potencialmente inmunosupresores en el ambiente en el que cohabita el lobo marino de California, podría aumentar el número de los parásitos y llegar a causar complicaciones en la salud de los pinnípedos.



## 10 Referencias bibliográficas

- Acevedo-Whitehouse, K. 1999. Hallazgos patológicos a la necropsia de crías de lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus*, hallados muertos en loberas reproductivas del Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 105pp.
- Alonso-Farré J. M., J.I. Díaz D´Silva y C. Gestal. 2012. Naso-pharyngeal mites *Halarachne halichoeri* (Allman, 1847) in Grey seals stranded in the NW Spanish Atlantic Coast. *Veterinary Parasitology*. Vol 183 (3-4): 317-322
- Anderson R.C., A.G. Chabaud y S. Willmott. 2009. Key to the nematode parasites of vertebrates. Editorial Cabi Press
- Anderson R. 2000. Chapter 5 Order Ascaridida. En *Nematodes parasites of vertebrates*. Segunda edición por CABI Publishing. Nueva York.: 245-319
- Arnason U., A. Gullberg, A. Janke, M. Kullberg, N. Lehman, E. Petrov y R. Väinölä. 2006. Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol 41(2): 345-354
- Aurioles D y A. Zavala-González. 2000. Proyecto Para La Conservación, Recuperación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Los Pinnípedos. Primera Ed. Mexico DF.
- Aurioles D. y A. Zavala. 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*. Vol 20 (4): 535-553
- Aznar F J, M S Leonardi, B Berón Vera, D G Vales, S Ameghino, J Raga y E Crespo. 2009. Population Dynamics of *Antarctophthirus Microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) in Pups from South American Sea Lion, *Otaria Flavescens*, in Northern Patagonia. *Parasitology*. Vol 136 (3): 293–303.
- Aznar F.J., G. Pérez-Ponce de León y J.A. Raga. 2006. Status of *Corynosoma* (Acanthocephala: Polymorphidae) Based on anatomical, ecological, and phylogenetic evidence with the erection of *Pseudocorynosoma* n . gen . *Journal of Parasitology*. Vol. 92 (3):548-564
- Aznar F. J., J. A. Balbuena, M. Fernández y J. A. Raga. 2001. Living Together : the Parasites of Marine Mammals. En *Marine Mammals: Biology and Conservation*. Editores G. H. Petter Evans y J. A. Raga. New York: 385–421.
- Baer Jean G. 1969. *Diphyllobotrium pacificum* a tapeworm from sea lion endemic in man along the coastal area of Peru. *Journal of the fisheries research board of Canada*. Vol 26(4):717-723
- Barson M.y B. E Marshall. 2004. First Record of *Contraecum* Spp. (Nematoda : Anisakidae) in Fish-Eating Birds from Zimbabwe. *Tydskr. S. Afr. vet. Ver.* Vol 75: 74–78.
- Benesh D. P., T. Hasu, L-R. Suomalainen, E Tellervo Valtonen y M. Tirola. 2006. Reliability of Mitochondrial DNA in an Acanthocephalan: The Problem of Pseudogenes. *International Journal for Parasitology*. Vol 36 (2): 247–254.
- Borror D. J., C. A. Triplehorn y N. F. Johnson. 1992. An introduction to the study of insects. 6<sup>th</sup> edición. Saunders College Publishing: 271-282.

- Bush A. O, K. D. Lafferty, J. M. Lotz y A. W. Shostak. Parasitology meets ecology on its own terms. *Journal of Parasitology*. Vol 83 (4): 575-583
- Castillo E., J. A. Rosales y G. Perez. 1998. Helminths parasites of *Paralichthys californicus* (Osteichthyes:Paralichthyidae) en el estero de Punta Banda, Bahía de Todos Santos y Bahía de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. Vol 24(4). Pp 443-446.
- Castro L.R, Austin A.D y Downton M. 2002. Contrasting rates of mitochondrial molecular evolution in parasitic díptera and hymenoptera. *Mol. Biol. Evol.* Vol 19 (7): 1100-1113
- Colón-Llavina M. M, A. A Mignucci-Giannoni, S. Mattiucci, M. Paoletti, G. Nascetti y E. H Williams. 2009. Additional Records of Metazoan Parasites from Caribbean Marine Mammals, Including Genetically Identified Anisakid Nematodes. *Parasitology Research* 105 (5): 1239–1252.
- Crovetto A., R. Franjola y R. Silva. 2008. Primer registro en Chile de *Antarctophthirus microchir* (Anoplura) en lobo marino común (*Otaria flavescens*). *Arch. Med. Vet.* Vol 40: 305-308.
- Dailey M. D. 2001. Parasitic diseases. En *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Dierauf L. A. y M. D. Gulland (Ed). CRC. Segunda Edición. CRC Press. Boca Raton, New York, Washington DC.
- Dick T.A. 2007. Diphyllobothriasis: The *Diphyllobothrium latum* human infection conudrum and reconciliation with a worldwide zoonosis. En *World Class Parasites, Food-borne parasites*. Editores: D. Murrell y B. Fried, Edición por Springer S
- Dowling A.P.G. 2006. Mesostigmatid mites as parasites of small mammals: systematics, ecology and the evolution of parasitic associations. *Micromammals and Macroparasites*.
- Dunlap J.S, R.C Piper y M.C Keyes. 1976. Lesions associated with *Orthohalarachne attenuate* (Halarachnidae) in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *Journal of Wildlife Disease*. Vol 12: 42-44
- Durden L y G G Musser. 1994. The Mammalian Hosts of the Sucking Line (Anoplura) of the World: A Host-Parasite List. *Bulletin Society Vector Ecology* 19 (2): 130–168.
- Ebert D. y E.A. Herre. 1996. The Evolution of Parasitic Diseases. *Parasitology Today* 12 (3): 96–101.
- Furman D. P. 1977. Observations on the ontogeny of Halarchnid mites (Acarina: Halarachnidae). *The Journal of Parasitology*. Vol 63 (4):748-755.
- Gage L.J., J.A. Gerber, D.M. Smith y L.E. Morgan. 1993. Rehabilitation and treatment success rate of California sea lions (*Z. californianus*) and northern fur seals (*C. ursinus*) stranded along the central and northern California coast. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. Vol. 24: 41-47
- García-Varela, M. et al., 2013. Phylogenetic relationship among genera of Polymorphidae (Acanthocephala), inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, pp.176–184.
- García-Varela, M. et al., 2005. Molecular phylogeny of Corynosoma based on 5.8S and internal transcribed spacer sequences. *Journal of Parasitology*. Vol 91(2):345–352.

- Gerber J. A, J. Roletto, L. E. Morgan, D. M. Smith y L. J. Gage. 1993. Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol 29(3). Pp 423-433.
- Godínez C., A. Lazo de la Vega, R. M. García, y P. Martínez. 1995: Presence of *Antarctophthirus microchir* lice (Anaplura) in California sea lion neonates in the Gulf of California, Mexico. Eleventh Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, 14-18 December, 1995, Orlando, Florida, USA (p.44).
- Gonzalez-Suarez M., K. E. McCluney, D. Auriol y L. R. Gerber. 2006. Incorporating Uncertainty in Spatial Structure for Viability Predictions: a Case Study of California Sea Lions (*Zalophus Californianus Californianus*). *Animal Conservation*. Vol 9 (2): 219–227.
- Guégan J, S Morand, y R Poulin. 2005. Are There General Laws in Parasite Community Ecology ? The Emergence of Spatial Parasitology and Epidemiology. En *Parasitism and Ecology*: 22–42
- Harington C.R. 2008. The evolution of Arctic marine mammals. *Ecological applications*: Ecological Society of America. Vol 18 (2): 23-40
- Harris K. y C. H. Gordiner. 2011. Slide conference case IV. Armed Forces Institute of Pathology department of Veterinary pathology. Contributor: College of Veterinary Medicine. Western University of Health.
- Hernan S., I. Neira, J. Araya y J. Gonzalez. 2001. Nuevos casos de infección humana por *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin 1931, Margolis 1956) en Chile y su probable relación con el fenómeno de El Niño 1975-2000. *Boletín Chileno de Parasitología*. Vol 56
- Hernández-Orts J.S, F.E Montero, A. Juan-García, N. García, E. Crespo, J. Raga y F. J Aznar. 2012. Intestinal Helminth Fauna of the South American Sea Lion Otaria Flavescens and Fur Seal Arctocephalus Australis from Northern Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology*. Vol 12: 1–12
- Heyning J.E. y G.M. Lento. 2002. The evolution of marine mammals. En *Marine mammal biology*. Ed. A. Rus Hoelzel. Blackwell Science: 38
- Hober P. E. 1996. Chapter 17. Phylogeny and historical reconstruction: host parasite systems as keystone in biogeography and ecology. En *Biodiversity II Understanding and protecting our biological resources*. Editores M. Reaka-Kudla, Don E. Wilson y E. O. Wilson. Libro de Joseph Henry Press.
- Hober P.E. 1992. Congruent and synchronic patterns in biogeography and speciation among sea birds, pinnipeds and cestodes. *The Journal of Parasitology*. Vol. 78(4): 601-615
- Huyse T., R. Poulin y A. Théron. 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in parasitology*. Vol 10 (21): 469-475
- INE. 2009. Conservación de hábitat y comunidades. (Consultado el 5/11/2012 <http://www.ine.gob.mx/con-eco-ch/384-hc-islas>)
- Ionita M., M.G. Varela, E.T. Lyons, T.R. Spraker y S.C. Tolliver. 2008. Hookworms (*Uncinaria lucasi*) and acanthocephalans (*Corynosoma* spp. and *Bolbosoma* spp.) found in dead northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska in 2007. *Parasitology Research*. Vol 103 (5): 1025-1029

- Ke Chung K. y V.L. Haas. 1980. Populations, microhabitat preference and effects of infestation of two species of *Orthohalarachne* (Halarachnidae: Acarina) in the northern fur seal. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol 18:45-51
- Kijewska A., J. Rokicki, J. Sitko y G. Wegrzyn. 2002. Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 spp infecting marine and freshwater fish, mammals and birds. *Experimental Parasitology*. Vol 101: 35-39
- Korallo N. P., M. V. Vinarski, B. R. Krasnov, G. I. Shenbrot, D. Mouillot y R. Poulin. 2007. Are There General Rules Governing Parasite Diversity? Small Mammalian Hosts and Gamasid Mite Assemblages. *Diversity and Distributions* 13 (3): 353–360
- Kuzmina T.A., O.I. Lisitsyna, E.T. Lyons, T.R. Spraker y S.C. Tolliver. 2012. Acanthocephalans in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and a harbor seal (*Phoca vitulina*) on St. Paul Island, Alaska: species, prevalence, and biodiversity in four fur seal subpopulations. *Parasitology Research*. Vol 111 (3): 1049-1058
- Lambrechts L., S. Fellous y J. C Koella. 2006. Coevolutionary Interactions Between Host and Parasite Genotypes. *Trends in Parasitology*. Vol 22 (1): 12–16.
- Leidenberger S., K. Harding y T. Harkonen. 2007. Phocid seals, sea lice and heartworms: a terrestrial host-parasite system conveyed to the marine environment. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol 77. Pp 235-253
- Leonardi M S, E Crespo, D G Vales, M B Feijoo, J C Raga y F J C Aznar. 2012. Life Begins When the Sea Lion Is Ashore: Microhabitat Use by a Louse Living on a Diving Mammal Host. *Bulletin of Entomological Research*. Vol 102 (4): 444–452.
- Leonardi M. S., E. A. Crespo, J. A. Raga y F. J. Aznar. 2011. Insectos oceánicos: los piojos buceadores. *CH*. Vol 21 (123). Pp 58-63.
- Li L., T. Shan, C. Wang, C. Côté, J. Kolman, D. Onions, F. M. D. Gulland y E. Delwart. 2011. The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. *Journal of Virology*. Vol. 85 (19): 9909–9917.
- Logan F., A. Horák, J. Stefka, A. Aydodgu y T. Scholz. 2004. The phylogeny of diphyllbothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. *Parasitology research*. Vol 94: 10-15
- Lorenzo Iglesias, Sonia. 2000. *Anisakis* y Alergia. Edición Florencio M. Ubeira. Santiago de Comportela. Servicio de Publicación e intercambio científico.
- Luque S. y C. Godínez. 2000. Proyecto para la conservación, recuperación, manejo y aprovechamiento sustentable de los pinnípedos. Subcomité, técnico para la conservación, recuperación, investigación, manejo y aprovechamiento sustentable de los pinnípedos en México y aguas de jurisdicción nacional. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. SEMARNAT:26-28
- Lymbery A.J. y F.Y. Cheah. 2007. Anisakid nematodes and anisakiasis. En *World Class Parasites, Food-borne parasites*. Editores: D. Murrell y B. Fried, Edición por Springer S.:185-202.
- Margolis L. y M. D. Dailey. 1972. Technical Report Revised Annotated List of Parasites from Sea Mammals Caught Off the West Coast of North America.
- Mattiucci S., M. Paoletti, S. C. Webb, N. Sardella, J. T. Timi, B. Berland y G. Nascetti. 2008. Genetic Relationships among Species of the *Contracecum* Ralliet and Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from Pinniped Inferred

from Mitochondrial COX2 Sequences, and Congruence with Allozyme Data. Vol 15: 408–419

- Mattiucci S. y G. Nascetti. 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemisphere. *Veterinary Parasitology*. Vol 148: 43-57
- Mattiucci S., R. Cianchi, G. Nascetti, L. Paggi, N. Sardella, J Timi, S. C. Webb, R. Bastida, D. Rodríguez y L. Bullini. 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contraecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology*. Vol 54 (1): 13-23
- Mellink E. A. Romero Saavedra. 2005. Dieta del lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828), en la isla de San Jorge, en el norte del Golfo de California, México, 1998-1999. *Ciencias Marinas*. Vol 31(2): 369-377
- Molina N.B, D. Polverino, M.C Minvielle, M. Apezteguía, M. Aguilar y J.A Basualdo. 2006. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitología latinoamericana*. Vol 61: 133-137
- Nadler S. A., S. D'Amelio, M.D. Dailey, L. Paggi, S. Siu y J. A. Sakanari. 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of anisakis, pseudoterranova and contraecum from northern Pacific marine mammals. *The Journal of Parasitology*. Vol 91 (6): 1413-1429
- Nieto- Lopez M.G. 2010. Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido. EcoSur. Tapachula, Chiapas, México: 10-21.
- Odell D.K. 1981. California sea lion, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828). En: Ridgway, S.H. y R.J Harrison (eds). *Handbook of Marine Mammals: The walrus, sea lions, fur seals and sea otter*. Acad. Press. London: 67-97.
- Paggi L, Mattiucci S, Gibson D. I, Berland B, Nascetti G, Cianchi R y Bullini L. 2000. *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Systematic Parasitology*. Vol 45. Pp 185-197
- Pardo S., A. Zumaque, H. Noble y H. Suárez. 2008. *Contraecum* sp (Anisakidae) en el pez *Hoplias malabaricus*, capturado en la ciénega grande de Lorica, Córdoba. *MVZ Córdoba*. 13 (2): 1304-1314
- Pardo S. C., M. Núñez D., R. Barrios de A, M. Prieto G y V. Atencio G. 2009. Índices parasitarios y descripción morfológica de *Contraecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) en blanquillo *Sorubim cuspicaudus* (Pimelodidae) de río Sinú. *Rev. MVZ Córdoba*. Vol 14 (2): 1712-1722
- Pérez Ponce de León G., L. García Prieto y B. Mendoza Garfias. 1992. Priemr registro de la forma adulta de *Ligula intestinalis* en aves de México. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoológica*. Vol 63 (2): 259-263.
- Poulin R. 2011. "The Many Roads to Parasitism: a Tale of Convergence." In *Advances in Parasitology*. Primera ed., 74:1–40.
- Poulin R. 2000. Speciation and Diversification of Parasite Lineages : an Analysis of Congeneric Parasite Species in Vertebrates. *Evolutionary Ecology* 13: 455–467.

- Poulin R. y E. Valtonen. 2001. Interspecific associations among larval helminths in fish. *International Journal for Parasitology*. Vol 31(14): 1589-1596
- Rausch R. L., A. M. Adams y L. Margolis. 2010. Identity of *Diphyllobothrium* spp (Cestoda: Diphylobothriidae) from sea lions and people along the Pacific coast of South America. *Journal of parasitology*. Vol 96 (2):359-365
- Reijnders P, S. Brasseur, J.P Vandern, Vander-Wolf, L. Boyd, J. Harwood, D. Lavigne y L. Lowry .1994. Seals, fur seals, sea lions and walrus. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Seal specialist Group, Gland, Switzerland: 88.
- Salgado Maldonado G. 2009. Manual de prácticas de parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua dulce y otros animales silvestres de México. Instituto de Biología. UNAM:37-38
- Santos K., C. Godínez, H. Zepeda, D. W. Anderson, A. Parás y A. Zavala. 2009. Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en islas de norte del Golfo de California, México. *Instituto Nacional de Ecología*:1-12
- Schipper J., J. Chason, F. Chiozza, N. A. Cox, M. Hoffmann, V. Katariya, J. Lamoreux, A.S.L Rodrigues, S. N. Simon, H. J Temple, J. Baillie, L. Boitani, T.E. Lacher Jr, R.A. Mittermeier, A.T. Smith, D. Absolon, J.M. Aguiar, G. Amori, N. Bakkour, R. Baldi, R.J. Berridge, J. Bielby, P.A. Black, J.J. Blanc, T.M. Brooks, J.A. Burton, T.M. Butynski, G. Catullo, D.L. Garshelis, C. Gates, M. Gimenez-dixon, S. Gonzalez, J.F. Gonzalez-Maya, T.C. Good, G. Hammerson, P.S. Hammond, D. Happold, M. Happold, J. Hare, R.B. Harris, C.E. Hawkins, M. Haywood, L.R. Heaney, S. Hedges, K.M. Helgen, C. Hilton-Taylor, S.A. Hussain, N. Ishii, T.A. Jefferson, R.K.B. Jenkins, C.H. Johnston, M. Keith, J. Kingdon, D.H. Knox, K.M. Kovacs, P. Langhammer, K. Leus, R. Lewison, G. Lichtenstein, L.F. Lowry, Z. Macavoy, R.A. Medellín, P. Medici, G. Mills, P.D. Moehlman, S. Molur, A. Mora, K. Nowell, J.F. Oates, W. Olech, W.R.L Oliver, M. Oprea, B.D. Patterson, W.F. Perrin, B.A. Polidoro, C. Pollock, A. Powel, Y. Protas, P. Racey, J. Ragle, P. Ramani, G. Rathbun, R.R. Reeves, S.B. Reilly, J. E. Reynolds Iii, C. Rondinini, R.G. Rosell-Ambal, M. Rulli, A.B. Rylands, S. Savini, C.J. Schank, W. Secrest, C. Self-Sullivan, A. Shoemaker, C. Sillero-Zubiri, N.D. Silva, D.E. Smith, B.L. Taylor, R. Timmins, D.G. Tirira, M.F. Tognelli, K. Tsytulina, L.M. Veiga, J.C. Vié, E.A. Williamson, S.A. Wyatt, Y. Xie y B.E. Young. 2008. Status of the world land and marine mammals. Diversity, threats and knowledge. *Science*. Vol 322: 225:230
- Schmidt G. D y L. S. Roberts. 1984. Fundamentos de parasitología. C.E.C.S.A. Primera edición en español: 9-13 y 415-452
- Sea World Education. 2001. Sea World Education Department Publication. Sea World Inc.
- Shamsi S., R. Norman, R. Gasser y I. Beveridge. 2009. Redescription and Genetic Characterization of Selected *Contracecum* Spp. (Nematoda: Anisakidae) from Various Hosts in Australia. *Parasitology Research*. Vol 104 (6): 1507–1525.
- Shults L. M. 1982. Helminths of spotted seal, *Phoca largha*, from the Bering sea. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol 8(1). Pp 59-62

- Sinisalo T., R. Poulin, H. Högmander, T. Juuti y E.T. Valtonen. 2004. The impact of sexual selection on *Corynosoma magdalenii* (Acanthocephala) infrapopulations in Saimaa ringed seals (*Phoca hispida saimensis*). *Parasitology*. 128(2):179–185.
- Smith K. F., K. Acevedo y A. B. Pedersen. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal conservation*. Vol 12 (1): 1-12
- Smyth J.D. y D.P. Mcmanus. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Editorial Cambridge University Press, Nueva York: 1-4.
- Stojanovich C. J. y H. D. Pratt. 1965. Anoplura: Key to North American species. Centre for Disease Control, Public Health Service, U.S.: 69-71
- Szteren D. y D. Auriolos-Gamboa. 2011. Ecological Regionalization of *Zalophus Californianus* Rookeries, as a Tool for Conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*. Vol 37 (3): 349–368
- Szteren D., D. Auriolos y L. R. Gerber. 2006. Population Status and Trends of the California Sea Lion ( *Zalophus Californianus Californianus* ) in the Gulf of California , Mexico. *Sea Lions of the World*.
- Thompson R. M., K. N. Mouritsen y R. Poulin. 2005. Importance of parasites and their life cycle characteristics in determining the structure of a large marine food web. *Journal of Animal Ecology*. Vol 74 (1): 77-85
- Uhen M. 2007. Evolution of marine mammals: back to the sea after 300million years. *Anatomical record*. Vol 290 (6):514-522
- Van Cleave, H.J. 1953. A preliminary analysis of the Acanthocephalan genus *Corynosoma* in mammals of North America. *The Journal of Parasitology*. Vol 39: 1-13.
- Van Valen L. 1974. Molecular Evolution as Predicted by Natural Selection. *Journal of Molecular Evolution*. Vol 3 (2):89–101.
- Vidal Martínez V. M., M. L. Aguirre Macedo, T. Scholz, D. González Solís y E. F. Mendoza Franco. 2002. Atlas de los helmintos parásitos de cíclidos de México. Primera Edición. Instituto Politécnico Nacional. ISBN. Pp 23-28
- Wilford Olsen O. 1974. Animal parasites: their life cycles and ecology. Tercera edición. Editores University Park Press: 279-282
- Yáñez F., I. Fernández, V. Campos, M. Mansilla, A. Valenzuela, H. González, C. Rodríguez, M. Rivas, K. Alveal y C. Oyarzún. 2012. Primera descripción patológica de úlceras gástricas parasitarias en el pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) en la costa centro-sur de Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res*. Vol 40(2): 448-452

## Anexo 1 (Protocolos)

### Protocolo de purificación de PCR

- 1.-Por cada 20µl de producto de PCR se preparó un coctel de 2µl de acetato de sodio (NaOAc) 3M pH 4.5 y 40µl de etanol absoluto frio.
- 2.-Transferir el producto de PCR al microtubo con el coctel
- 3.-Colocar en vortex y guardar a -20°C por una hora
- 4.-Centrifugar a 14000rpm por tres minutos
- 5.-Quitar el sobrenadante con cuidado para no mover el pellet de ADN
- 6.- Lavar el pellet con etanol 70% y centrifugar a 14000rpm por cinco minutos
- 7.- Quitar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente
- 8.-Resuspender el pellet en 30µl de agua esteril grado molecular
- 9.- Almacenar hasta secuenciar