



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

**Epidemiología de infecciones por microfilarias en el
lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de
California, México**

**Tesis para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas**

Presenta:

Biol. Mónica Farriols Pérez

Dirigido por:

Dra. Karina Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse
Presidente

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez
Secretario

Dra. Mónica Eugenia Figueroa Cabañas
Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Suplente

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Suplente

Dra. C.S. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias
Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2018
México

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



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

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

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

Bajo los siguientes términos:



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



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



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

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

Avisos:

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

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

Declaratoria de autoría

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

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

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

Resumen

Los nemátodos son organismos pseudocelomados, comúnmente conocidos como gusanos redondos. Dentro de la familia Onchocercidae existen alrededor de 75 géneros que son, en su mayoría, parásitos de vertebrados. Las etapas larvarias de Onchocercidae, también llamadas microfilarias, circulan en la sangre del hospedero y utilizan vectores como medio de transmisión entre hospederos. Al menos tres especies de nemátodos filariales, *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema (Acanthocheilonema) spirocauda* y *D. odendhali* afectan el sistema circulatorio y respiratorio de los pinnípedos. El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) es una de las especies de pinnípedos en la que se han observado infecciones por nemátodos filariales. Sin embargo, a la fecha solo se cuenta con evidencia de infección en animales muertos o mantenidos en cautiverio, por lo que se conoce poco sobre la epidemiología de estas infecciones en poblaciones de vida libre. El objetivo de esta tesis fue identificar y analizar la prevalencia e intensidad de los dos géneros de nemátodos filariales en sangre de lobos marinos de California (LMC) crías y adultas muestreadas en las 13 colonias reproductivas de la especie dentro del Golfo de California. Se utilizaron métodos morfológicos para identificar a los géneros y se calcularon prevalencias para las colonias y las regiones ecológicas. Se realizaron análisis epidemiológicos para determinar los sitios de mayor riesgo de infección para la especie. Se encontraron microfilarias en 35 de las 45 hembras adultas y solamente en una cría de las 235 muestreadas. Se detectó la presencia de microfilarias en todas las colonias excepto en San Pedro Nolasco. La prevalencia de microfilarias varió significativamente entre regiones y colonias. Las infecciones por nematodos del género *Dipetalonema* fueron las que presentaron la mayor intensidad en comparación con las infecciones por *Dirofilaria immitis*. Sin embargo, la prevalencia entre ambos géneros de nematodos no varió entre colonias y ni entre regiones. Esta tesis constituye una primera exploración de las infecciones filariales y su potencial relevancia para la salud de las poblaciones.

Palabras clave: microfilarias, *Acanthocheilonema* *Dipetalonema*, *Dirofilaria*, lobo marino de California, infección, prevalencia, intensidad

Abstract

Nematodes are pseudocoelomate organisms, commonly known as roundworms. Within the nematode classification, the Onchocercidae family has around 75 genera that are mostly vertebrate parasites. The larvae of the Onchocercidae, also called microfilariae, circulate in the host's blood and use vectors as a means of transmission between hosts. At least three species of filarial worms, *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema (Acanthocheilonema) spirocauda*, and *D. odendhali* are known to affect the circulatory and respiratory system of pinnipeds. The California sea lion (*Zalophus californianus*) is one of the species of pinnipeds in which infections by nematodes have been observed. However, to date, the evidence of infection comes from dead or captive animals. Thus, little is known about the epidemiology of these infections in free-living populations. The objective of this thesis was to identify the presence of filarial nematodes in the blood and calculate the prevalence and intensity of the two genera in adult and pup California sea lions sampled at the 13 breeding colonies of the Gulf of California. Using morphological analysis, we identified the filaria and conducted epidemiological analyses to calculate the risk of infection for the species within the region. Microfilaria were detected in 35 of the 45 adult females sampled and in a single pup of the 235 sampled. Microfilariae were found in all the colonies except in San Pedro Nolasco. The prevalence of microfilariae differed significantly among regions and colonies. The infections by *Dipetalonema spp.* had the highest intensity compared to those by *Dirofilaria immitis*. However, the prevalence between both genera of nematodes did not differ significantly among colonies and regions. This is a first approximation to investigate the ecology of filarial infections in the California sea lion and to examine their potential relevance for the population.

Key words: Microfilarias, *Acanthocheilonema*, *Dipetalonema*, *Dirofilaria*, California sea lion, prevalence, intensity

Agradecimientos

A CONACYT por el otorgamiento de la beca (781009) como estudiante para hacer posible realizar este proyecto de maestría.

A CONACYT por el apoyo en el financiamiento para la realización del programa Fronteras de la Ciencia 446, otorgada a Karina A. Acevedo Whitehouse.

A todos los que participaron en el proceso de toma y preparación de muestras utilizadas en esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y los maestros que imparten las distintas clases, por brindar las herramientas necesarias para lograr esta tesis.

A mis sinodales Karina, Toño, Talina, Roberto y Mónica por su paciencia y aportaciones en el desarrollo de esta tesis y en mi formación académica y personal.

Al grupo de Laboratorio de Plasticidad Inmune y Ecoepidemiología Molecular.

A mi familia por ser la porra oficial, el soporte y el motor que me lleva adelante para lograr mis metas y pasiones.

A Paulina y Marcela por ser apoyos incondicionales en el proceso de esta maestría.

A Karina por todo su esfuerzo y paciencia para fortalecer y mejorar mi formación académica y por ser una persona que contagia el amor por la ciencia que hace hasta lo imposible por sacar lo mejor de sus estudiantes.

Indice

1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1 Filarias	12
2.2.1. <i>Dirofilaria immitis</i>	13
2.2.2. <i>Dipetalonema (Acanthocheilonema) odendhali</i>	17
2.2.3. <i>Dipetalonema (Acanthocheilonema) spirocauda</i>	19
2.2 El efecto de las filariasis sobre la salud de los carnívoros	20
2.3 La emergencia de las filariasis en el contexto del cambio climático	22
2.4 Conceptos centrales de epidemiología y ecología de enfermedades infecciosas	25
2.5 El lobo marino de California, <i>Zalophus californianus</i>	27
2.6 El Golfo de California	29
2.6.1. Regionalización del Golfo de California	30
3. Justificación	31
4. Hipótesis	32
5. Objetivos	33
5.1 Objetivo general	33
5.2 Objetivos particulares	33
6. Materiales y métodos	34
6.1 Obtención de muestras	34
6.2 Tinción de las laminillas	34
6.3 Identificación y conteo de microfilarias	35
6.4 Características morfométricas y clasificación de morfotipos	36
6.5 Estimación de densidad poblacional	36
6.6 Estimación de parámetros de salud	36
6.7 Análisis estadísticos	37
6. Resultados	38
6.1 Prevalencia de microfilarias	38
6.2 Intensidad de microfilarias	41
6.3 Las infecciones por microfilarias en función de la densidad poblacional	48
6.4 El impacto de las microfilarias en la salud	49

7. Discusión	50
8. Conclusiones.....	59
9. Referencias.....	60

1. Introducción

Actualmente nuestro planeta está sufriendo cambios climáticos drásticos sin precedentes. Estos cambios alteran los componentes físicos y biológicos del ambiente, causando cambios de los intervalos de temperatura e índices de precipitación, y alterando la abundancia y distribución de las especies presa y depredador, así como los patógenos y sus hospederos (MacLeod et al., 2007; Patz et al., 2008; Tibbetts, 2007). Además, los ecosistemas están cada vez más sujetos a los efectos del impacto antrópico (Jackson et al., 2001) ya sea en forma de pérdida o alteración del ambiente, la introducción de especies invasivas, brotes de patógenos, entre otros.

Las alteraciones ambientales han conducido al incremento de enfermedades infecciosas, incluso en poblaciones de vida silvestre (Jones et al., 2008; Smith et al., 2009). Algunas de estas enfermedades pueden ser utilizadas como un indicador de que una población, comunidad o ecosistema se aproxima a un estado máximo de tolerancia (Acevedo-Whitehouse y Duffus, 2009). Sin embargo, para esto, es necesario primero tener información basal sobre la prevalencia de enfermedades comunes en una población dada, para así poder detectar cambios atípicos que sean informativos.

En los últimos años, el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) ha sido propuesto como un modelo no tradicional para comprender procesos complejos a una escala ecológica (Browning et al., 2015; Vera-Massieu et al., 2015) ya que se conoce mucho sobre su ecología e historia de vida. Por ejemplo, se sabe que las hembras de esta especie presentan una alta filopatría (Hernández-Camacho et al., 2008), es decir, permanecen y/o vuelven a la isla donde nacieron para reproducirse, mientras que los machos suelen migrar al norte después del periodo de reproducción (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonell et al., 1978). Las crías permanecen en tierra hasta los 5 meses, cuando comienzan sus primeros buceos y búsquedas de alimento. Además, tienen una amplia distribución (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonell et al.,

1978), por lo que es posible utilizar a la especie como un modelo para el estudio de la ecología de infecciones.

Recientemente se reportó que la especie es susceptible a infecciones por microfilarias (Alho et al., 2017), y existen reportes de que éstas son comunes en lobos marinos varados (Cara Fields, comunicación personal). A la fecha, su presencia y prevalencia se desconoce en la población en vida libre, aunque se sabe que puede provocar problemas clínicos en carnívoros terrestres. Tomando en cuenta que es un parásito transmitido por vectores, resulta interesante como modelo para estudiar variaciones espaciales en su prevalencia, particularmente porque en la última década se han reportado cambios oceanográficos y climáticos en el Golfo de California y Pacífico Mexicano que generan bajas en la productividad primaria que, a su vez, impactan a toda la red trófica, con consecuencias ecológicas (Elorriaga-Verplancken et al., 2016) y de salud de los animales (Banuet-Martínez et al., 2017). En este contexto, resulta relevante determinar la prevalencia de las microfilarias a lo largo de la distribución de la especie en el Golfo de California. Esta tesis exploró los patrones espaciales y demográficos de la microfilariasis en el lobo marino de California, e investigó su relevancia para la salud de los animales.

2. Antecedentes

2.1 Filarias

El filo Nematoda pertenece al superfilum Ecdysozoa. Este grupo taxonómico fue definido a través de marcadores moleculares (Aguinaldo et al., 1997; Blaxter y Koutsovoulos 2015), ya que los análisis morfológicos no aportaban suficiente evidencia de su distinción de otros grupos (Nielsen 2001). Dentro de la clasificación genética y molecular de nematodos, la clase Chromadoria es la más amplia y contiene un gran número de nematodos, tanto de origen marino como terrestres, parasitarios de plantas y animales (Blaxter y Koutsovoulos 2015). En el clado III la subclase Spirurina son en su mayoría parásitos de vertebrados que utilizan vectores como medio de transmisión de un hospedero a otro (Nadler et al., 2007; Laetsch et al., 2012). Una de las familias de nematodos parásitos es Onchocercidae (Chabaud y Anderson 1959) en la cual existen alrededor de 75 géneros, cuyas larvas, también llamadas microfilarias, circulan en la sangre del hospedero como parte de su ciclo de vida (Soulsby 1965; Genchi et al., 2011; Magnis et al. 2013).

Las filarias son parásitos comunes de carnívoros, quienes son sus hospederos naturales (Mehlorn 2015), y su ciclo es desarrollado en ellos y en los vectores (Fig. 1). Se encuentran en diferentes órganos y tejidos, según el hospedero y la especie de filaria de la que se trate. Al encontrarse en sangre son transferidos a insectos hematófagos cuando estos se alimentan del hospedero. En pinnípedos se han descrito tres especies de filarias a la fecha. Estos son *Dipetalonema* (*Acanthocheilonema*) *odendhali*, *D. spirocauda* y *Dirofilaria immitis* (Measures 2001). Estos parásitos afectan al sistema respiratorio y circulatorio de la foca común, *Phoca vitulina*, y el lobo fino de Sudáfrica, *Arctocephalus pusilis* (Alho et al., 2017).

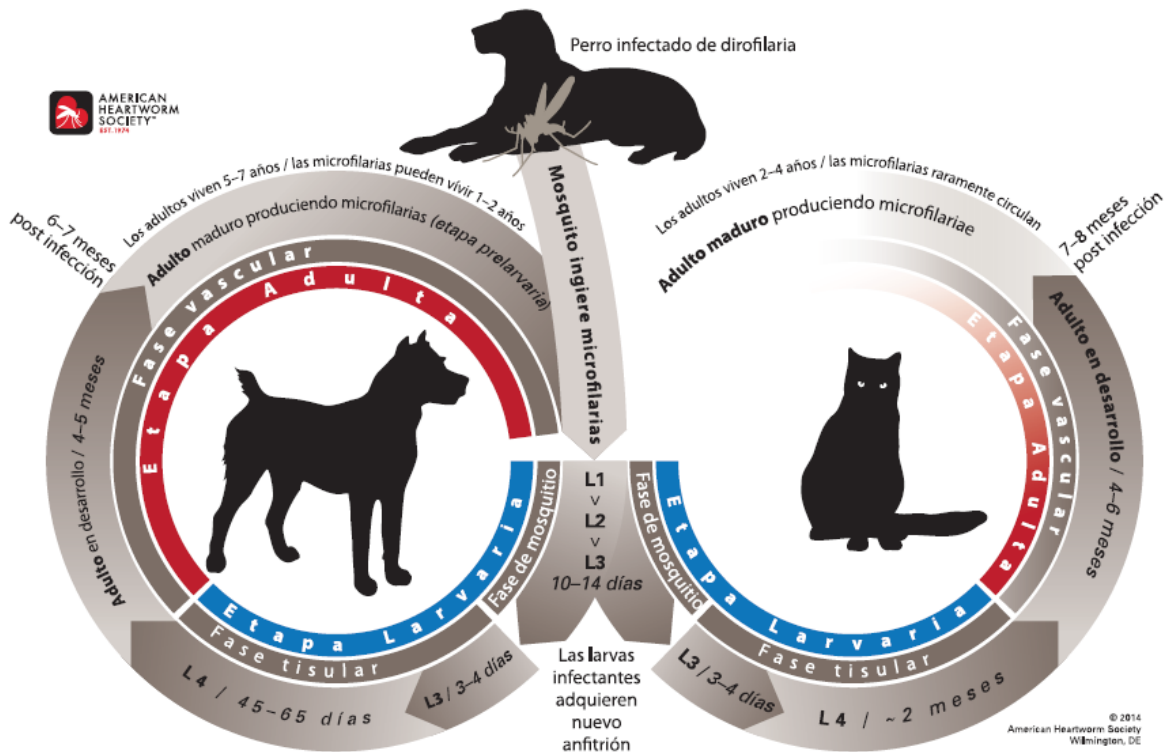


Figura 1. Ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* en perros y gatos domesticos (Tomado de American Heartworm Society, 2014).

2.2.1. *Dirofilaria immitis*

Dirofilaria immitis, también conocido como el gusano del corazón, se originó en Asia y ha tenido una larga historia en zonas del mediterráneo, lo más probable es que haya llegado a América en perros traídos por inmigrantes y exploradores (Bowman y Atkins 2009). En Norte América, el primer caso de *Dirofilaria immitis* se identificó en 1847 y desde entonces es considerado un parásito común de perros domésticos y cánidos silvestres (Bowman y Atkins 2009).

Las infecciones por *D. immitis* se han estudiado sobre todo en perros. Sin embargo, se ha aislado este parásito en perro doméstico, lobo gris, lobo de crin, coyote, zorra roja, zorra gris, zorro cangrejero, dingo, chacal, mapache japonés, perro salvaje asiático y perro salvaje africano (McCall et al., 2008; Trotti et al., 1997). Además, ha sido reportado en diversos felinos (incluyendo el gato doméstico), lobos marinos, focas de puerto, mustélidos, osos, pandas, castores,

coatis, liebres, venados, caballos, primates y humanos (Abraham et al., 1988). La mayoría de las infecciones de fauna silvestre son esporádicas y solo en algunos casos se ha reportado microfilaremia (McCall et al., 2008; Trotti et al., 1997; Abraham et al., 1988). Sin embargo, parece ser que todos los miembros de la familia de los canidos tienen la capacidad de albergar y permitir el desarrollo de la infección patente de *D. immitis* y sirven también como reservorios naturales (McCall et al., 2008).

El gusano del corazón es generalmente transmitido por mosquitos. Sin embargo, a diferencia de enfermedades como la malaria, ocasionada por especies de *Plasmodium*, que solo puede ser transmitida de manera efectiva por el género de *Anopheles*, *D. immitis* es capaz de desarrollarse en mosquitos de diversas familias (Bowman y Atkins 2009). Existen diversos reportes que identifican diversas especies de mosquitos en los que puede desarrollarse la etapa larvaria de *D. immitis* hasta llegar a la etapa infectiva, siendo los principales generos *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y *Mansonia* (Kartma 1957; Lok et al., 1988). Sin embargo a pesar de que se han realizado experimentos para conocer cuáles son las especies de mosquitos que actúan como principales vectores de transmisión de *D. immitis*, a la fecha no se ha esclarecido toda la diversidad de vectores que la transmiten en condiciones naturales en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, en Oceania se reportó que *Culex annulirostris* y *Aedes polynesiensis* son vectores naturales de transmisión las especies (Rosen et al., 1954). En Fiji *A. fijiensis*, *A. polynesiensis*, *A. pseudoscutellaris* y *Culex annulirostris* son infectados de manera natural por este parásito (Symes 1960), y en Estados Unidos de América, *Aedes trivittatus* y 12 especies adicionales parecen ser el vector natural del parásito (Christenson 1977; Lok, 2018). En México, no existen estudios sistemáticos sobre los vectores de especies de *Dirofilaria*; sin embargo, en 1986 se realizó un reporte de las especies de mosquitos que habitan la península de Baja California en la que se encontraron ocho especies del genero *Aedes*, cinco de *Anopheles*, trece de *Culex*, cuatro de *Culiseta* y tres de *Psorophora*, entre otras (Martínez-Palacios 1983), Dado que las especies de mosquitos pueden variar de acuerdo a la región, especies diferentes pueden ser los principales vectores en diferentes regiones.

Hasta ahora, más de 60 especies de mosquito han demostrado ser susceptibles de ser vectores de *D. immitis*. Resulta interesante que la ingesta de un número excesivo de microfilarias por parte del mosquito puede ser fatal para él (Abraham et al., 1988).

En cuanto al ciclo de vida de *D. immitis*, en infecciones experimentales de perros cachorros se vió que las microfilarias aparecen en la sangre nueve meses después de la infección y que migran, luego de volverse parásitos adultos, hacia al corazón (Bancroft 1904; Webber y Hawking 1955; Newton 1957; Orihel 1961). El periodo prepatente dura ocho meses en promedio (Feng 1930). El tiempo de maduración de las microfilarias dentro de los misquitos vector depende tanto de las especies de mosquito (Tolbert y Johnson, 1982) como de las condiciones ambientales como temperatura y humedad. Se sabe que entre los 25 y 32 °C, con condiciones de humedad relativa de 60 a 90%, el tiempo de desarrollo de las microfilarias es de 10-14 días (Barriga 2002; Gómez et al., 1999); mientras que si la temperatura es de 18°C puede demorar hasta 30 días, y si la temperatura ambiental media es inferior a los 14° C las larvas no maduran, aunque pueden sobrevivir en el mosquito hibernante y completar su desarrollo cuando las temperaturas superan ese umbral crítico (Atkins 1994; Wu et al., 1995).

El vector también juega un papel en el desarrollo. Por ejemplo, en *Aedes aegypti*, las microfilarias tienen un periodo prepatente de tres a cuatro días, con una primera muda a los 10 días y una segunda muda a los 13 días (Taylor 1960) mientras que en *A. trivitattus* la primera muda se observó a los 7-8 días y la segunda muda a los 10-11 días postinfección (Christenson 1977). Las microfilarias se desarrollan en los tubulos de Malphigi en especies como *Anopheles maculipennis* (Grassi y Noé 1900) y emergen en estado infectivo a través de la probóscide del mosquito cuando succionan la sangre (Bancroft 1899, 1901; Fülleborn 1908). Cuando el mosquito se vuelve a alimentar, las larvas ingresan al hospedero vertebrado migrando por los tejidos a localizaciones intermedias como membranas submusculares, tejido subcutáneo, subserosas, tejido adiposo y, ocasionalmente, a los músculos (Barriga 2002; Georgi y Georgi, 1994; Kittleson y Kienle, 2000; Winter 1959). La muda a etapa larvaria L4 ocurre entre 2 y 12 días

postinfección y en ocasiones puede demorar hasta 70 días (Hayasaki 1996; Kotani y Powers, 1982). Las L4 pueden permanecer en los tejidos anteriormente mencionados hasta 4 meses antes de mudar a adultos juveniles (L5) y entrar en la circulación venosa (Goggin et al., 1997). El proceso de muda de L4 a L5 ocurre 50 a 70 días después de la infección (Atkins 1994; Kotani y Powers, 1982). La larva L5 tiene una gran movilidad y capacidad de penetración en los tejidos. De 70 a 120 días posteriores a la infección penetra la pared de una vena principal y es transportada por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares para ingresar en el sistema cardiopulmonar, donde maduran por alrededor de tres meses (Atkins, 1994; Hayasaki, 1996; Kume e Itagaki, 1995).

Se sabe que el número de microfilarias varía diariamente en la sangre de los perros (Abraham et al., 1988). Según Webber y Hawkings (1955) la mayor cantidad de microfilarias se encuentran en circulación sanguínea por la tarde y la menor carga se encuentra en la mañana, y este patrón parece que se repite en la mayoría de las ubicaciones geográficas estudiadas. Incluso cuando la microfilaremia es baja, estas pueden detectarse, ya que la sangre periférica contiene 5% a 20% de las microfilarias totales (Bowman y Atkins 2009; McCall et al., 2008). También hay variaciones estacionales en la carga parasitaria. Por ejemplo, el número de microfilarias en la sangre de los perros infectados incrementa en primavera y verano en comparación con otoño e invierno (Lovis et al., 2017). Las fluctuaciones diarias y estacionales en el número de microfilarias probablemente se correlacionan con la presencia del vector, y parece que la disponibilidad temporal de vectores dentro de una región geográfica puede seleccionar la periodicidad local de las microfilarias (Apiwathnasorn et al., 2006).

Un perro infectado con *D. immitis* en estado adulto puede contraer la enfermedad y mantenerla por hasta siete años y medio (Abraham et al., 1988). La larva adulta vive en la arteria pulmonar del hospedero y en el ventrículo derecho del corazón (Wilcox 1960). Los huevos fertilizados pasan a través de varias etapas de desarrollo dentro del útero: específicamente estas son pre-larva, embrión en desarrollo, pretzel y microfilaria estirada (Lok et al., 1988). La microfilaria estirada

se encuentra libre de la membrana del huevo, de modo que las microfilarias que salen de la abertura vulvar y entran a la sangre no se enfundan (Lok et al., 1988).

Las microfilarias transfundidas en perros son capaces de sobrevivir hasta por dos años y medio y son capaces de desarrollar la etapa infecciosa en los mosquitos durante al menos tres meses después de la transfusión (Abraham et al., 1988). Existen dinámicas de las interacciones microfilarias con perros y mosquitos que son muy importantes para la transmisión del parásito. No hay una correlación demostrada entre el número de microfilarias circulantes por ml de sangre y el número de adultos presentes en las arterias pulmonares (Abraham et al., 1988). Es probable que exista algún control homeostático sobre el número total de microfilarias presentes en la sangre periférica, ya que las microfilarias no aumentan incontrolablemente durante la infección crónica (Abraham et al., 1988).

La longitud de las microfilarias varía según los autores. Webber y Hawking (1955) indican una longitud promedio de $258 \pm 7 \mu\text{m}$ mientras que Taylor (1960) la refiere a $300 \pm 15 \mu\text{m}$. Más recientemente, Dailey (2001) reporta un intervalo de longitud de 285 a 290 μm y un ancho de 5 a 7.5 μm . Morfológicamente son de cuerpo ancho, fusiformes, con extremo cefálico ahusado y extremo caudal puntiagudo y recto y carecen de vaina (Blagburn, 1994; Gómez y col., 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Urquhart y col., 2001).

2.2.2. *Dipetalonema (Acanthocheilonema) odendhali*

Dipetalonema (Acanthocheilonema) odendhali es un nematodo parasitario de la familia Onchocercidae, que se encuentra circulando en sangre de manera común en el lobo marino de California (Dailey 2001). Fue identificada por primera vez en esta especie en 1965 (Perry 1967). A partir de 1969 se identificó *D. odendhali* en otros otaridos, como el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) y en el lobo fino del norte (*Callorhinus ursinus*) (Nikolskij 1969; Dailey y Hill 1970; Perry y Forrester 1971; Forrester et al. 1973; Kagei y Oda 1975; Machida 1977; Kovalenko 1978; Stroud y Dailey 1978; Eley 1981).

Dentro del hospedero, las larvas adultas de *D. odendhali* se alojan en la fascia muscular del tórax (Davis et al., 1971; Lauckner 1985; Dailey 2001) mientras que las microfilarias circulan en la sangre, lo que permite su identificación morfológica (Perry 1967; Perry y Forrester 1971; Davis et al., 1971; Dailey 1980; Dailey 2001; Kuzmina et al. 2013; Krucik et al. 2016) y molecular (Kuzmina et al., 2013; Krucik et al., 2016). Unas de las principales características morfológicas para la identificación de microfilarias de *D. odendhali* son su longitud y ancho, los cuales corresponden a 231 a 249 x 3.5 μm (Davis et al., 1971; Dailey 1980; Dailey 2001). A nivel morfológico, las microfilarias de este parásito se caracterizan por no tener vaina cuticular, el gancho cefálico se encuentra doblado y la cola tiene terminación recta o ligeramente ondulada (Perry y Forrester 1971).

A pesar de que hasta la fecha no se ha reportado que la infección por este parásito tenga una patogenicidad relevante en poblaciones de otaridos (Lauckner 1985; Anderson 2000), se han realizado estudios de prevalencia en el lobo marino de California y lobo fino del norte (*Callorhinus ursinus*), reportando 22.6% y de 12.5% a 22.5%, respectivamente en Estados Unidos (Krucik et al., 2016; Kuzmina et al., 2013). Sin embargo, la prevalencia obtenida para lobo marino de California podría estar sesgada ya que los individuos que fueron muestreados, eran pacientes del centro de rehabilitación, The Marine Mammal Center, por lo que generalmente llegan con otro tipo de afecciones como desnutrición, heridas mecánicas o alguna enfermedad, lo cual puede comprometer su sistema inmune (Krucik et al., 2016), lo que a su vez podría incrementar su susceptibilidad a presentar filariasis.

Con respecto a su transmisión, anteriormente se descartó la posibilidad de que la infección por *D. odendhai* se diera de manera denso-dependiente en la población pues la prevalencia de la infección no parecía depender del número de individuos en la población (Kuzmina et al., 2013) lo que implica que requiere uno o varios vectores como intermediarios para su transmisión. A la fecha, se conoce poco sobre su ciclo de vida (Dailey 2001; Kuzmina et al., 2013) y se cree que los posibles vectores sean piojos o moscas (NWAFC Processed Report 1981; Dailey 2001). Sin embargo, esto se vio únicamente para el lobo fino del norte en su

distribución en Alaska (NWAFC Processed Report 1981) y las especies de vectores propuestos no fueron identificadas. La propuesta de estos vectores se sustenta porque se ha reportado que otra especie de *Dipetalonema* que afecta perros, *D. reconditum*, puede desarrollarse en pulgas (Rosen et al., 1954; Newton y Wright 1956).

2.2.3. *Dipetalonema (Acanthocheilonema) spirocauda*

Dipetalonema (Acanthocheilonema) spirocauda es un nematodo filaroide largo y delgado con extremidades suavemente afiladas (Anderson 1959) que se encuentra comúnmente en fócidos holárticos. (Anderson 1959; Chabaud y Bain 1976; Delyamure 1955; Dunn y Wolke 1976). Su terminación anterior se encuentra redondeada, presenta estructuras cuticulares y cuatro pares de papilas submedianas y laterales con anffidos bien definidos. Su longitud total promedio es de 225 a 250 μm de longitud por 4.4 μm de ancho. Se desconoce de manera específica su ciclo de vida pero se ha propuesto como medio de transmisión una especie de piojo (*Echinophthirius horridus*) (Geraci et al., 1981; Dailey 2001). Se ha encontrado el parásito en el sistema cardiovascular de la foca común de puerto (*Phoca vitulina*) (Delyamure 1955; Taylor et al., 1961; MacDonald y Gilchrist 1969; Dunn y Wolke 1976), foca anillada (*Phoca hispida*) (Delyamure 1955) y foca capuchina (*Cystophora cristata*) (Helle y Blix 1973). La mayoría de los registros provienen de animales que se encontraban varados o en cautiverio (Dunn y Wolke 1976; MacDonald y Gilchrist 1969; Taylor et al., 1961). Es por esto que se conoce poco sobre la prevalencia y distribución de este nematodo en poblaciones de vida libre (Eley 1981).

En 1981, Eley, se enfocó en conocer la prevalencia y distribución de *D. spirocauda* en fócidos de vida libre en Alaska. Se reportó una prevalencia de 4.6% en foca anillada, (8.5% en foca moteada (*Phoca vitulina largha*), 17.2% en foca de puerto, 5.3% en foca listada (*Phoca fasciata*), y 3.9% en foca barbuda (*Erignathus barbatus*) (Eley 1981). A pesar de la relativa baja prevalencia, esta especie sí parece ser patogénica para los pinnípedos fócidos (Dailey 2001), no se

ha reportado en pinnípedos otáridos. Sin embargo, dada su estrecha relación filogenética con *D. odendhali*, no puede descartarse que *D. spirocauda* pueda infectar otáridos, ni que *D. odendhali* pueda tener un impacto en la salud de los animales.

2.2 El efecto de las filarias sobre la salud de los carnívoros

La enfermedad del gusano del corazón, causada por *Dirofilaria immitis*, afecta a perros y gatos domésticos como ferales así como algunas especies de carnívoros de vida salvaje como los zorrillos, en quienes ocasiona una atrofia cardíaca y taponeo mecánico (Fig. 2; Simon et al., 2012). La infección se desarrolla de manera progresiva llegando a ser crónica, con afectaciones al sistema respiratorio y cardíaco, ya que los parásitos se alojan en la arteria pulmonar y el ventrículo derecho del corazón (Venco et al., 2004). La primera lesión de relevancia ocurre en el endotelio de las arterias pulmonares, lo que ocasiona el desarrollo de patologías pulmonares y cardíacas (Forrester et al., 197; White 1975; Simon et al., 2012).

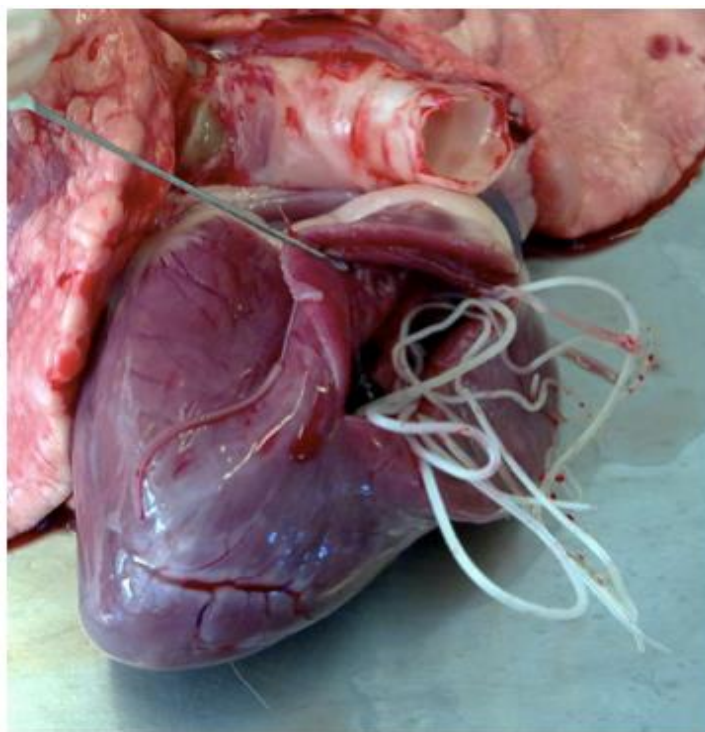


Figura 2. Ejemplares adultos de *Dirofilaria* en el corazón de un perro (Tomada de Simon et al., 2012).

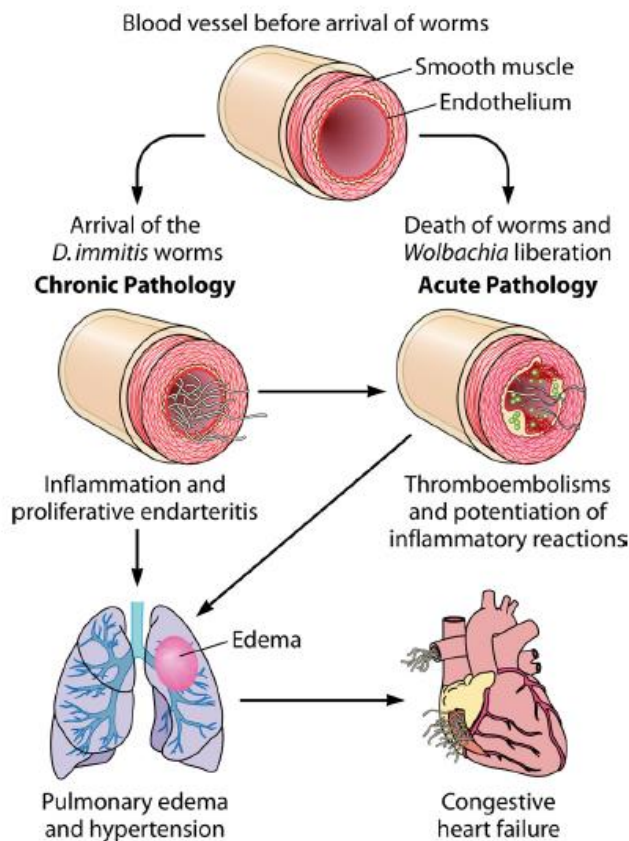


Figura 3. Desarrollo general de patologías pulmonares, vasculares y cardíacas causadas por la infección por microfilarias y larvas adultas de *D. immitis* (Tomada de Simon et al., 2012).

En las arterias pulmonares causa estrechamiento del lumen areterial, lo que es proporcional al grado de avance de la infección, la carga parasitaria y la fuerza de la respuesta inmunitaria del hospedero (Venco y Venzoni 2001; Venzoni y Venco 1998; Simon et al., 2012). Esto genera que haya cambios a nivel vascular, aparición de edemas y respuestas de inflamación en el parénquima pulmonar, lo que puede llevar a desarrollar hipertensión pulmonar y por consecuencia insuficiencia y fallo ventricular derecho (Simon et al., 2012; Fig. 3). Por otra parte, las infecciones por *D. immitis* también pueden causar fallos renales (Abramowsky et al., 1981; Grauer et al., 1987; Klei et al., 1971; Ludders et al., 1988).

En la mayoría de los casos la infección se presenta de manera asintomática (Forrester et al., 1973; White 1975; Sato et al., 2002; Alho et al., 2017) por meses

o años, sin embargo, depende de la carga parasitaria, la reactividad individual y el esfuerzo del animal (i.e. el daño arterial es mayor en animales que hacen actividad física vigorosa) (Simon et al., 2012). A pesar de esto, existen ciertos signos clínicos identificables en perros infectados como tos crónica, persistente que aumenta con el ejercicio y puede causar disnea (Forrester et al., 1973; White 1975). Pueden presentar epistaxis, hemoptisis o hemorragia pulmonar y en el caso de ser severo el cuadro clínico puede causar un shock hipovolémico. De manera general, los perros infectados muestran debilidad e intolerancia al ejercicio, falta de apetito y anorexia, causados por la acumulación de larvas adultas en el corazón y en el flujo sanguíneo (Forrester et al. 1973; White 1975; Venco et al., 2011) y pueden llevar a un shock cardiogenico (Simon et al., 2012).

Por otra parte, en animales de vida silvestre como el lobo marino de California, se cree que las infecciones por microfilarias, tanto de *D. immitis* como las del género *Dipetalonema* generan patologías menos agresivas y que la presencia de la infección en raros casos es fatal (Dailey 2001; Cara comunicación personal The Marine Mammal Center).

2.3 La emergencia de las filarias en el contexto del cambio climático

Las enfermedades infecciosas emergentes (EID, por sus siglas en inglés) se definen como aquellas que han incrementado en su incidencia o rango geográfico, que han colonizado nuevos hospederos, que se han descubierto recientemente o que son causadas por patógenos que han evolucionado (Lederberg et al., 1992; Morse, 1993; Daszak et al., 2000). Estas enfermedades ocurren principalmente por un cambio en la ecología de la interacción patógeno-hospedero (Schrag y Wiener 1995), incluyendo variaciones demográficas, de la estructura social y del comportamiento humano (Garnett y Holmes 1996; Dobson y Carper 1996).

Las EID también se relacionan con el cambio climático que actualmente experimenta nuestro planeta. El cambio climático, entre otros fenómenos, es un factor de influencia fuerte sobre la emergencia y resurgencia de muchas enfermedades infecciosas, especialmente aquellas que requieren de un vehículo

(e.g. agua o comida) o vector (e.g. artrópodos como mosquitos, pulgas, piojos o garrapatas, en donde generalmente cumplen los patógenos asociados a las EID una parte del ciclo de vida) para transmitirse de un hospedero a otro (Patz et al., 2008). Los artrópodos son poiquilotermos y ectotermos, por lo que cambios en la temperatura, por pequeños que sean, pueden tener un efecto biológico importante en la dinámica de transmisión de las enfermedades infecciosas (Patz et al., 2008). Es por esto que el cambio climático puede alterar la incidencia, la temporalidad de la transmisión y el rango geográfico de las enfermedades infecciosas, tanto las emergentes como las comunes (McMichael et al., 2003; Patz et al., 2008).

Desde hace más de una década, los científicos han tratado de comprender el papel del cambio climático en la dinámica de la propagación de las enfermedades infecciosas (Sohn 2017). Por ejemplo, enfermedades infecciosas del humano, como la malaria, el cólera y el dengue, se han propagado en el mundo en regiones donde la temperatura promedio ha subido (Patz et al., 2014). Este mismo fenómeno se ha observado para algunas especies de aves de vida libre (Liao et al., 2017). Se han propuesto modelos matemáticos y mapas de riesgo para predecir cómo y cuándo una enfermedad infecciosa puede ocurrir en un sitio determinado (Sohn 2017). Sin embargo, estos modelos no suelen considerar el cambio climático como único factor para identificar los cambios en la dinámica de las infecciones, sino que lo modelan como uno de muchos factores que participan en la relación patógeno-hospedero. Esto es porque el cambio climático puede afectar de diferente manera a los patógenos, hospederos, vectores y las interacciones que existen entre ellos, por lo tanto estos pueden reaccionar de manera diferente frente a una misma temperatura. Por ejemplo, las temperaturas muy altas y la falta de humedad generan una baja actividad y reproducción en mosquitos (Patz et al., 2014). Sin embargo, los patógenos que transmiten los mosquitos pueden ser más resistentes que sus hospederos a dichas condiciones (Shocket et al., 2018). Conocer más acerca de las características ecológicas, biológicas e historia de vida de los organismos que participan en la interacción parasito-hospedero en conjunto con conocimientos acerca de conservación, microbiología y del cambio climático puede acercarnos a

comprender la dinámica de las infecciones frente a escenarios cambiantes (Daszak et al., 2001).

Dirofilaria immitis es un parásito capaz de adaptarse a un intervalo relativamente amplio de temperaturas (Rossi et al., 1996; Sassnau et al., 2014) y por esto tiene una distribución amplia en el planeta (McCall et al., 2008), tanto en humanos como en animales domésticos (Fig. 4).

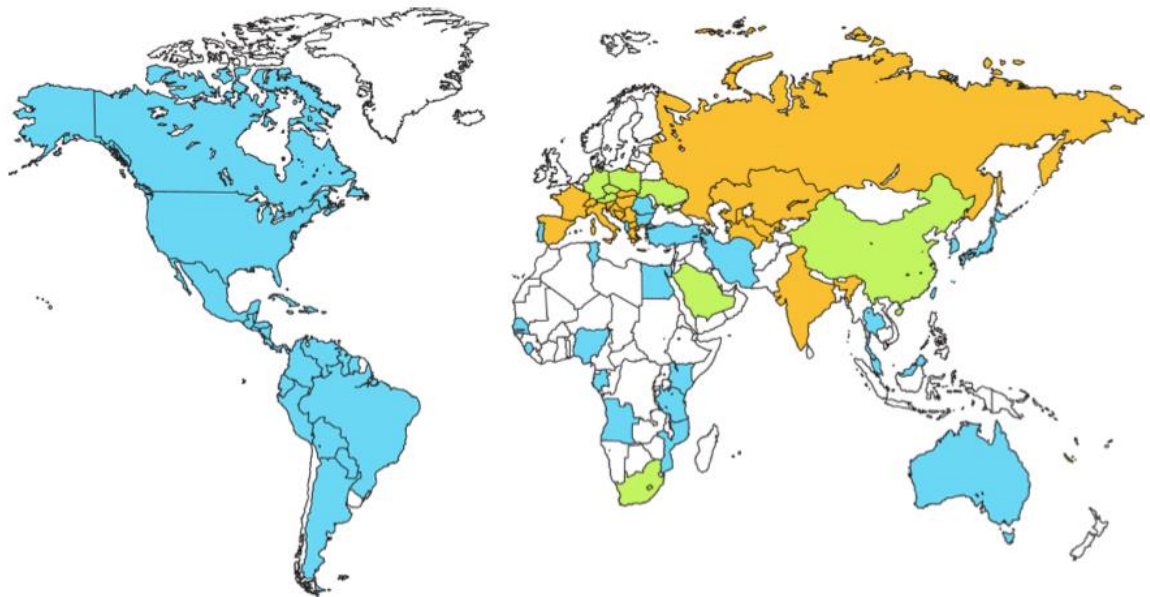


Figura 4. Mapa que muestra la prevalencia de Dirofilariasis en perros domésticos en el mundo. En azul se marcan las infecciones por *D. immitis*, en verde las infecciones por *D. repens*, y en naranja las infecciones simultáneas (Tomado de Simon et al., 2012).

En países como EUA, Italia y Alemania, las infecciones filaroides se han extendido más allá de sus zonas endémicas en los últimos años (Rossi et al., 1996; Ermakova et al., 2014; Levy et al., 2011; Pantchev et al., 2011; Osinska et al., 2014; Sassnau et al., 2014), principalmente por la capacidad de los vectores, como *Culex pipiens*, de resistir estresores ambientales, como la contaminación (Lori et al., 1990) o por que la temperatura ha cambiado de modo que permite el desarrollo de microfilarias a larvas L3 en los vectores de transmisión (Genchi et

al., 2011; Sassnau et al., 2014). Por otra parte, cuando la temperatura del agua sube, las larvas de los mosquitos se desarrollan más rápido, por lo que los adultos tienen un menor tamaño y necesitan alimentarse de manera más frecuente y en consecuencia obtenemos un mayor número de vectores de transmisión (Sohn 2017). Además, si la temperatura ambiental es lo suficientemente caliente, los mosquitos se mantienen en un estado infectivo durante la mayor parte del año (Sohn 2017).

La falta de diagnóstico de dirofilariasis en perros que habitan en zonas donde la infección no es endémica, permite que estos sean reservorios para los parásitos y por ende, la continua exposición a los vectores en conjunto con las temperaturas adecuadas, permite el rápido crecimiento de la infección en zonas no endémicas (Sassnau et al., 2014).

2.4 Conceptos centrales de epidemiología y ecología de enfermedades infecciosas

El entendimiento de que las enfermedades infecciosas no se comportan de manera estocástica en las poblaciones naturales, y que juegan un papel central como reguladores de la dinámica poblacional provocó un gran interés en el estudio de la ecología de enfermedades en humanos (Anderson y May 1991). Sin embargo, los estudios para conocer la dinámica y ecología de enfermedades infecciosas en poblaciones animales de vida libre no han tenido el mismo auge y se han visto limitados por la falta de información basal sobre la prevalencia y la intensidad de infecciones comunes de poblaciones silvestres (Grenfell y Dobson 1995).

Para abordar cualquier estudio sobre epidemiología y ecología de enfermedades es indispensable tener claros diversos conceptos que, en conjunto, explican el comportamiento de enfermedades infecciosas en las poblaciones. En esta sección se presentarán dichos conceptos.

La **incidencia** se define como la frecuencia de nuevas infecciones dentro de un intervalo de tiempo y se expresa como tasa de incidencia, mientras que la **prevalencia** se refiere al porcentaje de individuos infectados dentro de una

población en un momento de tiempo definido (Loftus 2004). La incidencia y la prevalencia en conjunto con factores demográficos como la edad, el género, la raza y la región geográfica forman parte de la epidemiología descriptiva y permiten conocer el comportamiento de las enfermedades o al menos identificar áreas de investigación para comprender esta (Loftus 2004).

La **intensidad de infección** (o carga parasitaria) se define como la cantidad de parásitos dentro del hospedero en un evento de infección. Generalmente, los parásitos tienen una diferente agregación, es decir, hay diferencias en la intensidad de infección en diferentes hospederos dentro de una misma población (Beldomenico y Begon 2010). Otros dos conceptos claves para los estudios epidemiológicos son la susceptibilidad y la tolerancia. La **susceptibilidad** puede ser definida como la tendencia de un organismo a desarrollar una enfermedad una vez que fue infectado. Esta definición va de la mano con la de **inmunocompetencia** que indica la capacidad que tiene el hospedero de reconocer al agente infeccioso y responder ante la infección (Beldomenico y Begon 2010). Por otro lado, la **tolerancia** se define como la capacidad de evitar o limitar los daños al organismos a pesar de estar infectados por un patógeno dado (Scheinder y Ayres 2008).

Un concepto particularmente importante para comprender la dinámica de infecciones transmitidas por vectores, como es el caso de las microfilarias, es el tipo de transmisión. A diferencia de las enfermedades de transmisión denso-dependiente, las enfermedades transmitidas por vector son frecuencia-dependientes. Esto quiere decir que la transmisión de la infección no depende de la densidad poblacional, como ocurre para enfermedades como el sarampión o la viruela, sino de la probabilidad de encuentros entre un hospedero infectado y un hospedero susceptible (McCallum et al., 2001). Sin embargo, podría haber un efecto de dilución relacionado con la densidad, en particular si una mayor densidad de hospederos disminuye el riesgo de ser mordido por el vector en algunos hospederos, en particular si este riesgo no es homogéneo, lo que ocurre cuando hay heterogeneidad en características del hospedero asociadas con el comportamiento de alimentación del vector (Simpson et al., 2012).

Un ejemplo clásico de enfermedades frecuentio-dependientes están las infecciones por transmisión sexual, ya que no dependen de cuantos individuos estén presentes en una población, sino en los encuentros sexuales entre individuos infectados y susceptibles (McCallum et al., 2001). En el caso de las enfermedades transmitidas por vectores, la transmisión depende de la frecuencia de contactos entre el vector y los hospederos, independientemente de la densidad poblacional de hospederos. Esta transmisión se puede describir con la siguiente ecuación general:

$$\frac{\beta SI}{N}$$

Donde β es la tasa de transmisión, S corresponde a la densidad de hospederos susceptibles, I es la densidad de hospederos infectados y N es la densidad total de hospederos (McCallum et al., 2001).

2.5 El lobo marino de California, *Zalophus californianus*

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) es una especie que habita de manera permanente el Golfo de California (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonell 1980; Bonell et al., 1978) y su distribución abarca desde Columbia Británica, Canadá, hasta la costa sudoeste de México (Jalisco) (Ortega-Ortiz *et al.*, 2013). En México, el lobo marino de California (LMC), se encuentra listado como una especie bajo “Protección especial” según la NOM-059-ECOL-2010.

El lobo marino de California es una especie costera que se alimenta de más de 50 especies de peces y cefalópodos, pudiendo ser un oportunista ocasional. Su longevidad en vida libre se calcula entre 15 y 25 años (King 1964). La especie presenta un marcado dimorfismo sexual, ya que los machos son visiblemente más grandes y pesados, miden de 2 a 3.5 m y pesan de 200 a 400 kg y presentan una cresta sagital que llega a medir 4cm que se desarrolla en la etapa adulta, mientras que las hembras suelen ser más pequeñas y livianas; miden de 1.5 a 2 m y pesan

de 50 a 110 kg. Tanto machos como hembras alcanzan la madurez entre los 4 y 5 años (Odell 1975). A pesar de ser una especie marina, pasa una gran parte del tiempo en islas rocosas descansando y reproduciéndose (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonnell et al., 1978). Las hembras de esta especie presentan una alta filopatría (Peterson y Bartholomew 1967; Hernández-Camacho et al., 2008), es decir, permanecen y/o vuelven constantemente a la isla donde nacieron y generalmente es el sitio donde se reproducen, mientras que los machos suelen migrar al norte después del periodo de reproducción (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonnell et al., 1978).

Recientemente, el lobo marino de California ha sido propuesto como un modelo no-tradicional para comprender procesos complejos como el cáncer (Browning et al., 2015). Debido a que se conoce mucho respecto a su ecología e historia evolutiva, además de que su parecido con el perro permite utilizar herramientas diagnósticas comerciales, esta especie puede considerarse un modelo ideal para estudiar enfermedades. Además, a pesar de ser una especie marina, se agrupan en tierra, generalmente en costas rocosas, para reproducirse y descansar la mayor parte del día (Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980), lo que facilita la obtención de muestras.

Dentro del Golfo de California existen 13 colonias de reproducción (De Norte a Sur: Roca Consag, Isla San Jorge, Isla Lobos, Isla Granito, Los Cantiles, Los Machos, El Partido, El Rasito, San Esteban, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco, Farallón de San Ignacio y Los Islotes; Fig. 5) y se estima que la población total de LMC es de 24,000 a 31,000 individuos (Szteren et al. 2006).

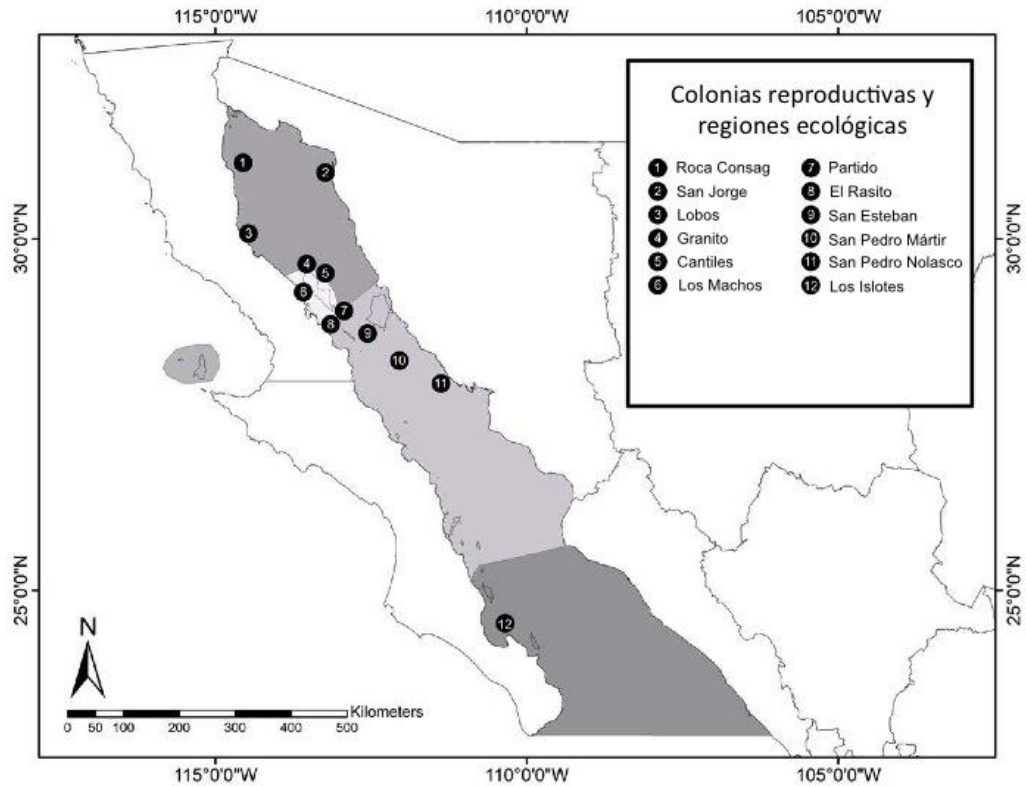


Figura 5. Mapa que muestra las colonias reproductivas del lobo marino de California de acuerdo a regiones ecológicas en el Golfo de California. Mapa elaborado por Luis Alberto Soto García.

2.6 El Golfo de California

El Golfo de California, localizado al noroeste de México, se encuentra dentro de la región subtropical con climas desérticos/áridos, los vientos dominantes en invierno son del noroeste, generando bajas temperaturas en la parte norte del golfo, y en verano dominan los vientos del sureste, los cuales son cálido-húmedos y traen consigo las tormentas tropicales que afectan generalmente Sonora, Sinaloa y la parte sur de la península.

La temperatura promedio de las aguas del Golfo de California es de 24°C, aunque éstas varían por regiones según la profundidad, las surgencias estacionales y las corrientes marinas, por lo que es una zona rica en nutrientes (Case y Cody 1983) dando lugar al albergue del 25% de las especies de mamíferos marinos a nivel mundial y al 80% en el país (Niño-Torres et al., 2011).

2.6.1. Regionalización del Golfo de California

En 1983, Case y Cody identificaron cuatro regiones oceanográficas en el Golfo de California: El alto Golfo, la Región de las Grandes Islas, el Golfo Central y la Región Sur. Actualmente, existen muchos estudios que intentan proveer un mejor contexto ecológico y filogeográfico del LMC en el Golfo de California; dentro de estos, se han hecho análisis genéticos (Schramm et al., 2009), análisis de elementos traza (Szteren y Auriolles-Gamboa 2013), isotopos estables (Porrás-Peters et al., 2008), censos poblacionales (González-Suárez y Gerber 2006), análisis de niveles de clorofila-alfa (Le Boeuf y Crocker 2005), hábitos alimenticios (García-Rodríguez y Auriolles-Gamboa 2004) y prevalencia de anticuerpos contra enfermedades como *Leptospira interrogans* (Acevedo-Whitehouse et al., 2003), en los que se identifican de tres a cuatro regiones a lo largo del Golfo de California.

Recientemente, se propuso un análisis multivariado de varios parámetros ecológicos y biológicos en el que se combinan todos los parámetros mencionados anteriormente dando como resultado cuatro regiones (Szteren y Auriolles-Gamboa 2011) muy similares a las identificadas por Case y Cody en 1983. Sin embargo, para este último estudio (Szteren y Auriolles-Gamboa 2011), no había datos de las 13 colonias reproductivas para todos los parámetros, como es el caso de la prevalencia de anticuerpos contra enfermedades comunes de esta especie, por lo que es posible que la regionalización actual no refleje tan precisamente los factores ecológicos relevantes para la especie.

3. Justificación

El incremento en las tasas de enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas, en animales de vida silvestre es de gran preocupación, debido a que las enfermedades pueden ser un indicador de que una población se aproxima a un estado de estrés que afecta de manera negativa las funciones inmunitarias (Acevedo-Whitehouse y Duffus 2009). El estudiar una enfermedad infecciosa emergente, como la filariasis, en una población de vida libre de una especie centinela, como es el lobo marino de California, puede proveer información útil para los planes de manejo y conservación de la especie y del ecosistema.

4. Hipótesis

La prevalencia e intensidad de microfilarias varía espacialmente.

La prevalencia e intensidad de microfilarias cambia de acuerdo a la densidad poblacional de las colonias.

La prevalencia e intensidad de microfilarias varía entre crías y adultos.

La microfilariasis impacta la salud de los lobos marinos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Realizar un análisis ecológico, demográfico y filogeográfico de la prevalencia de microfilariasis en el lobo marino de California a lo largo de su distribución en el Golfo de California.

5.2 Objetivos particulares

Identificar la estructura geográfica y ecológica de la microfilariasis en el lobo marino de California en el Golfo de California.

Determinar el impacto de la infección en la salud del lobo marino de California.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de muestras

Como parte de un estudio más grande sobre ecología del sistema inmunitario, se realizó un crucero científico a las 13 loberas reproductivas del Golfo de California, en el que se obtuvieron muestras de suero de 45 hembras adultas y de 235 crías. Se obtuvieron muestras de 7 a 9 ml de sangre de la vena glútea caudal con un sistema de extracción al vacío (Vacutainer) con tubos con EDTA. Con estas muestras, se realizaron frotis sanguíneos de capa delgada a partir de un volumen controlado de 3 μ l. Para cada individuo se realizaron al menos dos frotis sanguíneos.

6.2 Tinción de las laminillas

Se utilizó un kit de colorantes para tinción policromática manual rápida. Los componentes utilizados fueron eosina amarillenta en amortiguador de fosfatos, Azur-azul de metileno en amortiguador de fosfatos y solución fijadora. En conjunto, se logra una tinción clásica del tipo Romanowsky que permite diferenciar las células sanguíneas en 30 segundos. El proceso se realizó en frascos Coplin, en secuencia, es decir, sumergiendo cada laminilla de un colorante a otro de manera inmediata para evitar que la laminilla se seque hasta terminar el proceso de tinción. Primero se sumergieron las muestras ocho veces, cada vez con una duración de 1 s en solución fijadora (Hycel), después se sumergieron de la misma manera en eosina amarillenta (Hemocolorante I, Hycel) antes de sumergirlas en colorante Azur-azul de metileno (Hemocolorante II, Hycel) ocho veces durante 1 s cada vez. Cada laminilla se enjuagaba con agua destilada y se dejaba secar al aire libre. Una vez que se secaron las muestras, se fijaron mediante el uso de resina sintética en xilol al 60% (Hycel) cubriendo en la mayoría la superficie del frotis y cubriéndola con un cubreobjetos y dejando secar por 24 h.

6.3 Identificación y conteo de microfilarias

Se observaron las laminillas teñidas en su extensión total desde el origen hasta la cola (pluma) en dirección de zigzag (Fig. 6) en el objetivo 40X, mediante el uso de un microscopio de luz (AMSCOPE).

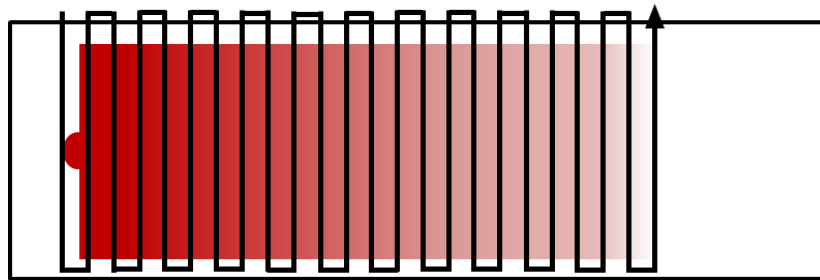


Figura 6. Conteo de frotis sanguíneos.

Se contaron y tomaron fotografías de cada microfilaria encontrada mediante el uso de contadores y el software ScopelImage que permite tomar imágenes de lo observado al microscopio. Posteriormente, se realizó la identificación de las microfilarias (*Dirofilaria* spp. y *Dipetalonema* spp) con base en caracteres diagnósticos morfológicos y morfométricos anteriormente descritos por Dailey (1980) (Fig. 7) presentados en la sección de antecedentes de la presente tesis.

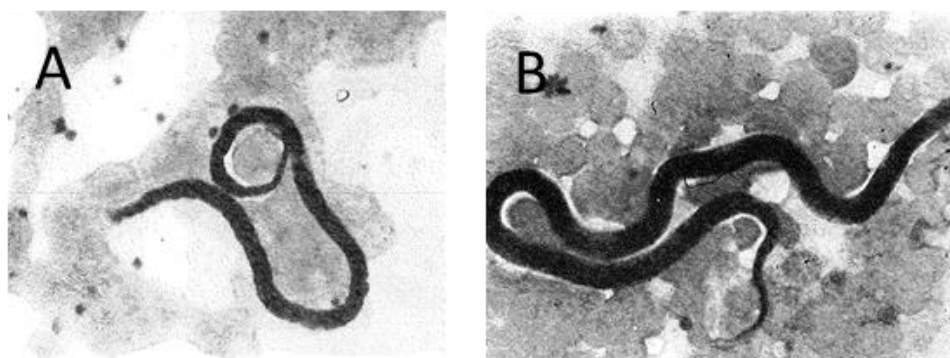


Figura 6. Morfología de microfilarias observadas en lobo marino de California. A) *Dipetalonema odendhali*. B) *Dirofilaria immitis*. Dailey 1980

6.4 Características morfométricas y clasificación de morfotipos

Se calculó la longitud y el ancho de cada microfilaria mediante el uso de ImageJ 9.0. Con base en los caracteres diagnósticos morfológicos y morfométricos (Cuadro 1) se identificó la especie de la que se trataba.

Cuadro 1. Caracteres diagnósticos morfológicos y morfométricos de *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema spirocauda* y *Dipetalonema odhendali*.

Caracter	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dipetalonema spirocauda</i>	<i>Dipetalonema odhendali</i>
Longitud	285 a 290 μm	225 a 250 μm	231 a 249 μm
Ancho	5.5 μm	4.4 μm	3.5 μm
Vaina cuticular	Ausente	Presente	Ausente
Morfología de tinción	Uniforme y lisa	No identificada	Uniforme y rugosa
Terminación anterior	Redondeada	No identificada	Achatada

6.5 Estimación de densidad poblacional

Para la realización de la tesis, se contaba con datos sobre la abundancia de lobos marinos en cada una de las colonias incluidas en el estudio. Estos datos fueron colectados por Karen Adame Fernández como parte del proyecto más grande en el que se inscribe la presente tesis. Con base en estos datos, se estimó la densidad poblacional de cada colonia. Para esto, se estimó el área de cada lopera usando mapas previamente generados (Soto-García 2017) para 5 colonias y generando mapas nuevos para las 7 restantes a partir de los datos obtenidos por Karen Adame Fernández.

6.6 Estimación de parámetros de salud

Para la realización de la tesis, se contaba con datos sobre valores hematológicos pertinentes a la salud de los animales. Específicamente se tuvo acceso a conteos leucocitarios totales y diferenciales, hematocrito, proteínas plasmáticas, plaquetas y número de eritrocitos para cada lobo marino. Estos análisis fueron realizados por

Adriana Flores Morán como parte del proyecto más grande en el que se inscribe la presente tesis.

6.7 Análisis estadísticos

Se calcularon las prevalencias generales, por colonia y por región para cada morfotipo de microfilaria. Se analizaron diferencias en la prevalencia entre colonias y regiones, usando tablas de contingencia y pruebas de Fisher exactas. También se calcularon las cargas parasitarias (intensidad) por colonia y por región. Para esto, se calculó la media aritmética (promedio) y la media geométrica (Alexander, 2012) conforme a la siguiente ecuación:

$$\left(\prod_{i=1}^n p_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

, donde p era el conteo de filarias en la sangre de cada lobo marino de una colonia o región determinada, y n era el número de muestras para esa colonia o región. Se analizaron diferencias en la intensidad de las infecciones entre colonias y regiones mediante modelos generalizados lineales indicando una familia binomial negativa, ya que se trataba de conteos parasitarios (Alexander, 2012).

Se analizó la relación entre la intensidad de las infecciones y los parámetros de salud (condición corporal y valores hematológicos clínicos) mediante modelos generalizados lineales. Finalmente, se construyeron mapas epidemiológicos mediante el programa ArcMap | ArcGis para describir la estructuración geográfica y ecológica de las microfilarias e identificar zonas de mayor riesgo a la salud de la población. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (v3.3.2).

6. Resultados

6.1 Prevalencia de microfilarias

Se encontraron microfilarias en los frotis sanguíneos de hembras adultas en 11 colonias reproductivas (Roca Consag, San Jorge, Lobos, Granito, Cantiles, Machos, Partido, Rasito, San Esteban, San Pedro Mártir e Islotes) de las 12 observadas (en San Pedro Nolasco no se encontraron) (Cuadro 2; Fig. 8). La prevalencia global de microfilarias en sangre de hembras adultas fue de 75.56%, mientras que en crías fue de 0.43%, con solamente un individuo mostrando evidencias de infección.

Cuadro 2. Número de hembras adultas de lobo marino de California en las que se detectó la presencia de microfilarias en sangre.

	Colonia												Total
	RC	SJ	LO	GR	CA	MA	PA	RA	SE	SPM	SPN	IS	
<i>Aus</i>	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	2	4	11
<i>Pre</i>	3	6	4	3	3	5	2	1	3	3	0	1	34
Total	4	7	4	3	3	5	3	3	3	3	2	5	45

Aus, ausencia; Pre, presencia.

Prueba de Fisher exacta, $\chi^2 = 29.963$, $df = 11$, $p = 0.002$

La prevalencia en las hembras adultas varió significativamente entre regiones ($\chi^2 = 19.7$, $df = 3$, $p = 0.0002$) y entre colonias ($\chi^2 = 29.963$, $df = 11$, $p = 0.002$). Las colonias Lobos, Cantiles, Granito, Machos, San Esteban y San Pedro Mártir tuvieron 100% de prevalencia de microfilarias en sangre de las hembras adultas. En orden decreciente, estas fueron seguidas por San Jorge (85.71%), Rocas Consag (75%), Partido (66.67%), Rasito (33.33%), Islotes (20%) y San Pedro Nolasco (0%) (Fig. 9A). En cuanto a la prevalencia de microfilarias en sangre de hembras adultas por región, la región de las Grandes Islas tuvo la mayor prevalencia (GI, 92.86 %) seguido del alto Golfo (AG, 86.67%), el Golfo central (GC, 63.63%) y el Golfo sur (GS, 20%) (Fig. 9B).

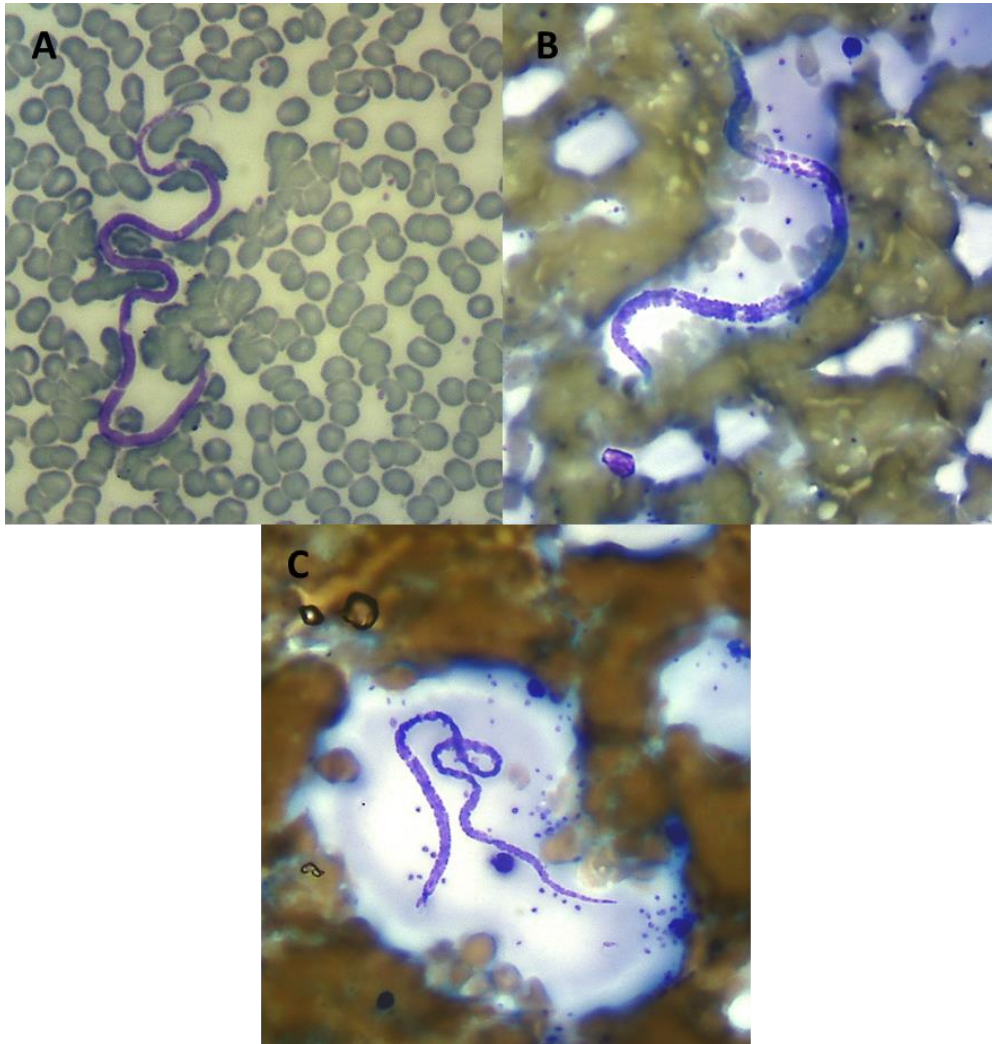


Figura 8. Microfotografía (40X) de morfotipos de microfilarias en la sangre de una hembra adulta de lobo marino de California capturada en la colonia Granito. A) *Dirfilaria immitis*, B) *Dipetalonema spirocauda*, C) *Dipetalonema odendhali*.

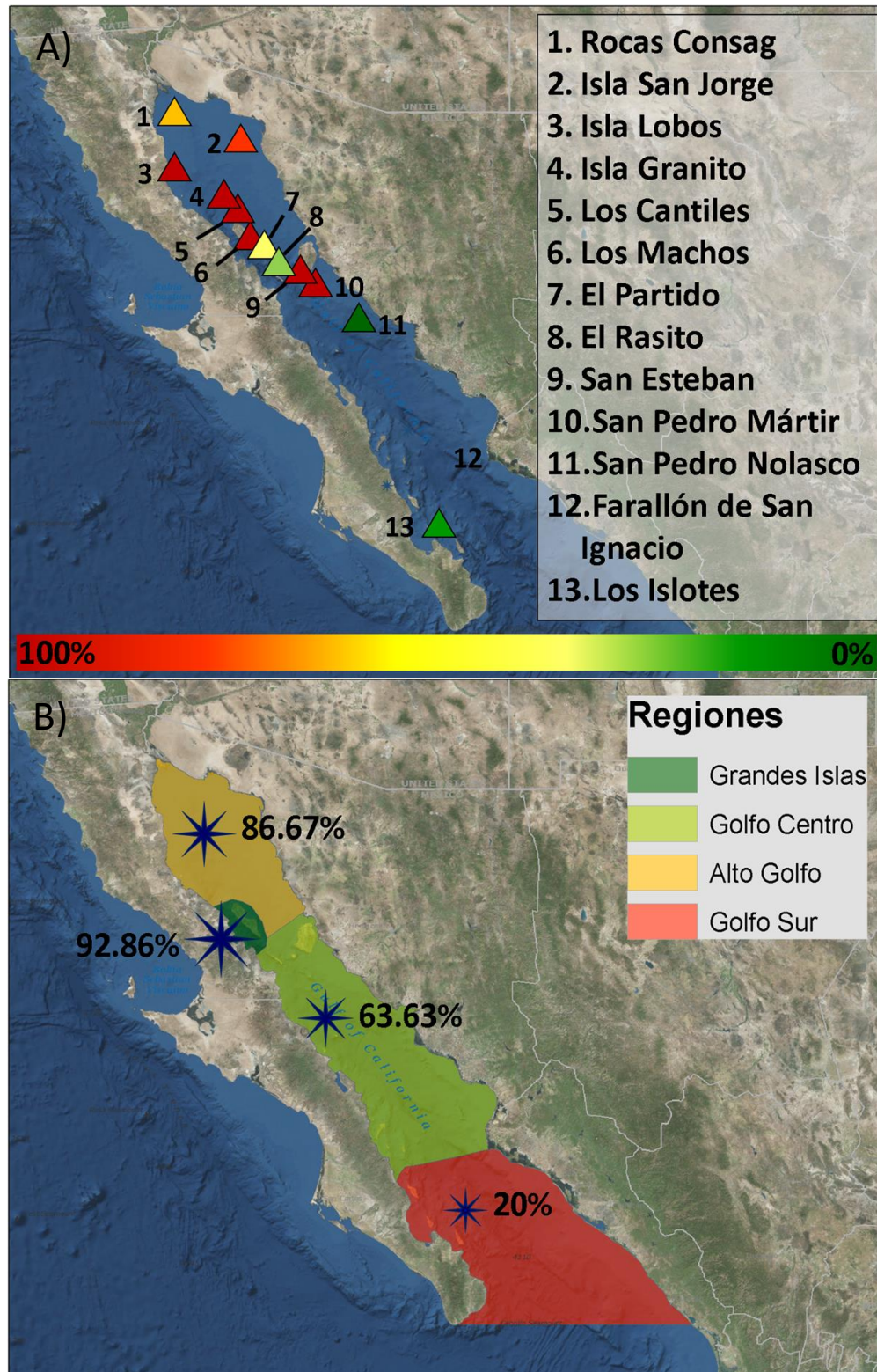


Figura 9. Prevalencia de microfilariasis en sangre de hembras adultas de lobo marino de California en el Golfo de California. A) Se muestra la prevalencia por colonias reproductivas. B) Se muestra la prevalencia por regiones ecológicas.

En términos de la prevalencia de ambos géneros de microfilarias identificados (*Dirofilaria* y *Dipetalonema*) no se encontraron diferencias entre colonias ni entre regiones (Colonias: Chi² Pearson= 0.071, gl=12, p=0.999); Regiones: Chi² Pearson= 0.117, gl=3, p=0.965 ; Cuadro 3).

Cuadro 3. Prevalencia por colonias y por regiones de los dos géneros de microfilarias, *Dipetalonema* y *Dirofilaria*, observados en la sangre de hembras adulta de lobo marino de California.

Colonia	Prevalencia (%)		Región	Prevalencia (%)	
	<i>Dirofilaria</i>	<i>Dipetalonema</i>		<i>Dirofilaria</i>	<i>Dipetalonema</i>
Islotes	20	20	Sur	20	20
Sn. Pedro Nolasco	0	0	Centro	58.33	58.33
Sn. Pedro Mártir	100	100			
Sn. Esteban	100	100			
Rasito	33.33	33.33			
Partido	33.33	33.33	Grandes	83.33	83.33
Machos	100	100	islas		
Cantiles	100	100			
Granito	100	100			
Lobos	100	100	Alto Golfo	82.14	86.90
Sn. Jorge	71.43	85.71			
Rocas Consag	75	75			

6.2 Intensidad de microfilarias

La intensidad global de microfilarias en sangre de hembras adultas fue en promedio de 99.08 (Rango: 0-724). De todas las crías analizadas, solamente una presentó microfilarias en sangre, con una intensidad de 2 microfilarias, siendo el promedio global de 0.0085 (Rango: 0-2). El número de microfilarias en sangre de hembras adultas varió entre las colonias (GLM; *Desv. Resid*=52.13, *df* = 11, *p* = 2.62×10^{-14}). Cantiles fue la colonia en la que sus habitantes presentaron el mayor número de microfilarias en sangre, seguido por las colonias Machos, San Esteban, Lobos y Granito (Cuadro 3; Fig. 10).

También se encontraron diferencias significativas en el número de microfilarias en frotis sanguíneo de hembras adultas por región (GLM; *Desv. Resid*=52.51, *df* = 3, *p*=0.001). La región de las grandes Islas fue la que presentó

la mayor intensidad promedio de microfilarias, seguida por el Golfo central, el alto Golfo y por último el Golfo sur (Cuadro 4; Fig. 11).

Cuadro 4. Intensidad de la infección por microfilarias en hembras adultas de lobo marino de California con base en la región ecológica donde fueron muestreadas. Entre paréntesis se presenta el intervalo de la intensidad de la infección.

Colonia	Intensidad		Región	Intensidad	
	Media aritmética	Media geométrica		Media aritmética	Media geométrica
Islotes	1	0	Sur	1	0
	(0-5)			(0-5)	
Sn. Pedro Nolasco	0	0			
	(0-0)		Centro		
Sn. Pedro Mártir	36	34.05		54.67	0
	(23-52)				
Sn. Esteban	159.67	156.64			
	(126-202)				
Rasito	10.67	0	Grandes islas		
	(0-32)			(0-202)	
Partido	4.33	0			
	(0-10)				
Machos	277.80	120.34		205.21	0
	(17-724)				
Cantiles	275.33	273.53			
	(237-314)		Alto Golfo		
Granito	215	212.19			
	(184-266)			(0-314)	
Lobos	135.5	92.87			
	(14-196)				
Sn. Jorge	25	0		64.33	0
	(0-83)				
Rocas Consag	61.25	0			
	(0-160)			(0-196)	

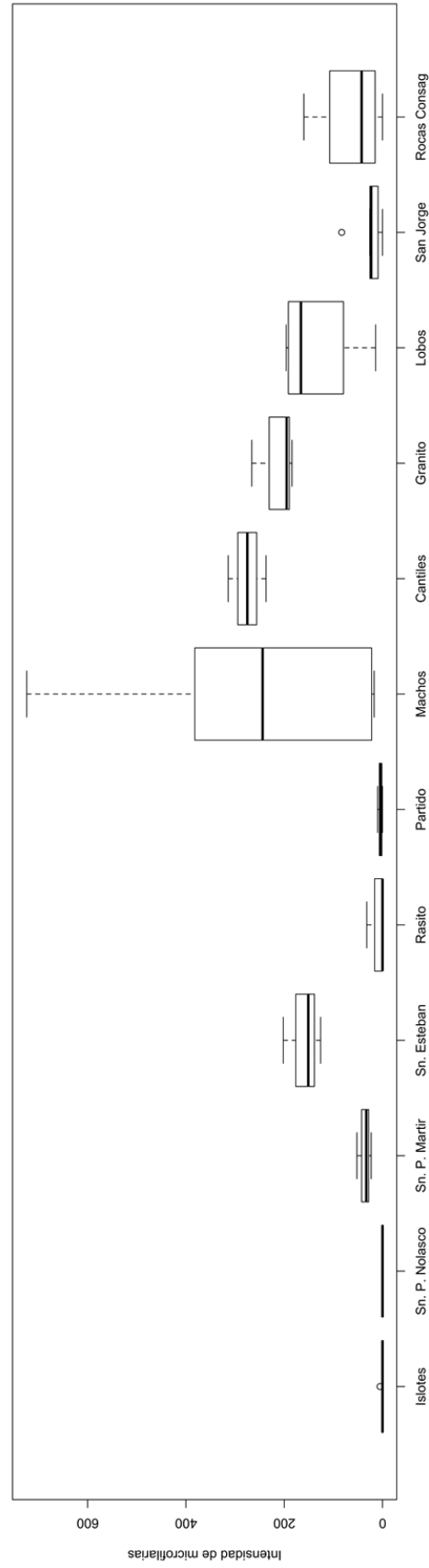


Figura 10. Número de microfilarias en frotis sanguíneo en hembras adultas por colonia. Las colonias están indicadas en orden latitudinal, de sur a norte, dentro del Golfo de California.

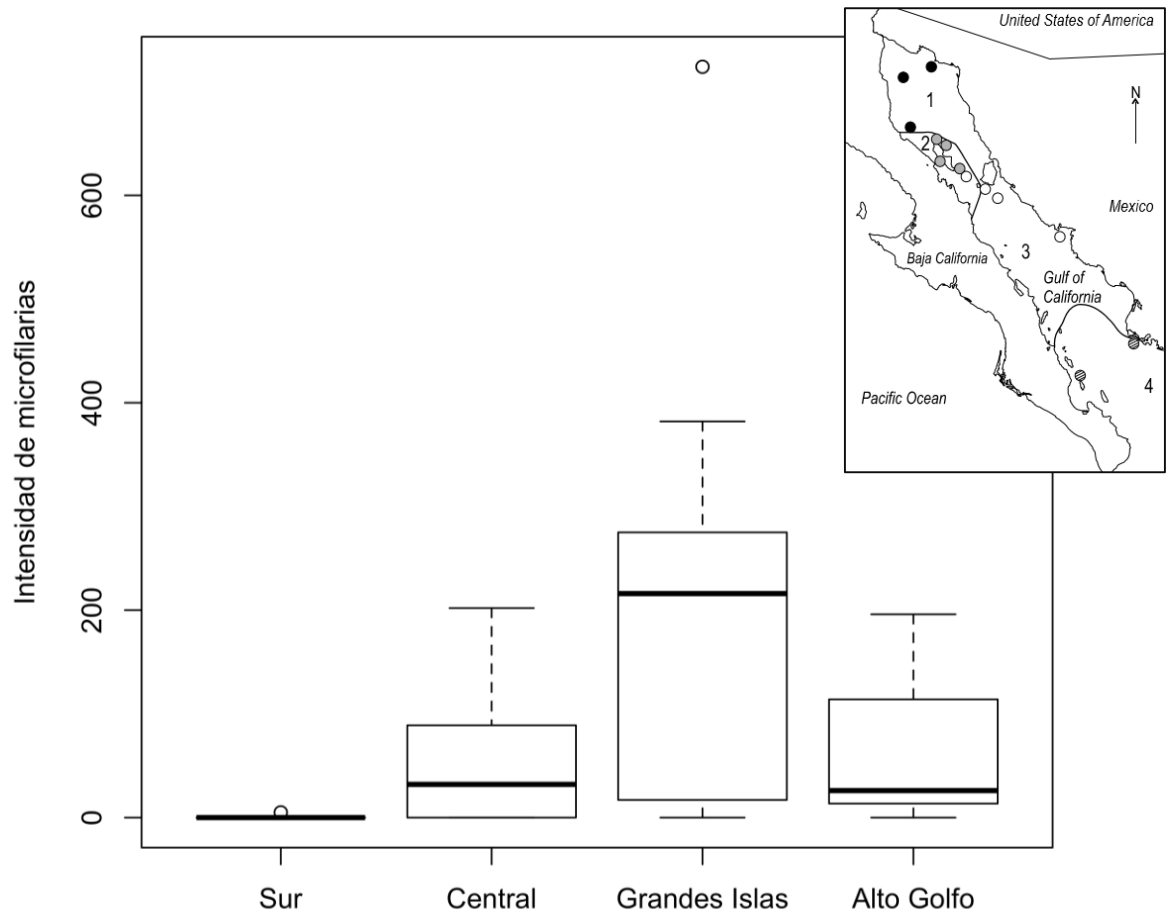


Figura 11. Número de microfilarias en hembras adultas por región. En el inserto se aprecia el mapa de la localización de las 12 colonias reproductivas (Tomada de Szteren y Auriolles-Gamboa 2011).

El número de microfilarias asignadas al género *Dirofilaria* en sangre de hembras adultas varió entre las colonias (GLM; *Desv. Resid*=49.57, *df* = 11, *p* = 2.2×10^{-16}). Los animales de las colonias Cantiles, Granito y Machos presentaron el mayor número de ejemplares de *Dirofilaria* en sangre (Cuadro 4; Fig. 12A). También se encontraron diferencias en el número de microfilarias asignadas al género *Dipetalonema* entre colonias (GLM; *Desv. Resid*=49.78, *df* = 11, *p* = 6.53×10^{-15}), siendo mayores en animales provenientes de las colonias Cantiles, Machos, Granito y Lobos (Cuadro 4; Fig. 12B).

Al analizar diferencias entre regiones (Cuadro 4), la intensidad de *Dirofilaria* en sangre de hembras adultas varió por región (GLM; *Desv. Resid*=50.18, *df* = 3, *p*=0.0005), al igual que la intensidad de *Dipetalonema* (GLM; *Desv. Resid*=50.69, *df* = 3, *p* = 2.51×10^{-05}). En ambos casos, la región de las grandes Islas fue la que presentó la mayor intensidad promedio de estos géneros (Fig. 13).

Cuadro 5. Intensidad promedio de los dos géneros de microfilarias, *Dipetalonema* y *Dirofilaria*, en sangre de hembras adultas de lobo marino de California, por colonias y por regiones. En negritas se presenta la media aritmética y entre paréntesis se presenta la media geométrica.

Colonia	<i>Dirofilaria</i>	<i>Dipetalonema</i>	Región	<i>Dirofilaria</i>	<i>Dipetalonema</i>
Islotes	0.8 (0)	0.2 (0)	Sur	0.8 (0)	0.2 (0)
Sn. Pedro Nolasco	0 (0)	0 (0)	Centro	20.45 (0)	35.64 (0)
Sn. Pedro Mártir	6.33 (6.21)	28.67 (26.31)			
Sn. Esteban	67.33 (66.22)	92.33 (90.38)			
Rasito	1.33 (0)	9.67 (0)			
Partido	1 (0)	2.33 (0)	Grandes	73.86 (0)	124 (0)
Machos	110.6 (37.01)	167.20 (81.33)	islas		
Cantiles	67.33 (46.47)	174.67 (170.36)			
Granito	92 (90.87)	123 (121.13)			
Lobos	36 (17.62)	99.5 (71.66)	Alto	13.53 (0)	50.6 (0)
San Jorge	2.86 (0)	22.14 (0)	Golfo		
Rocas Consag	9.75 (0)	51.5 (0)			

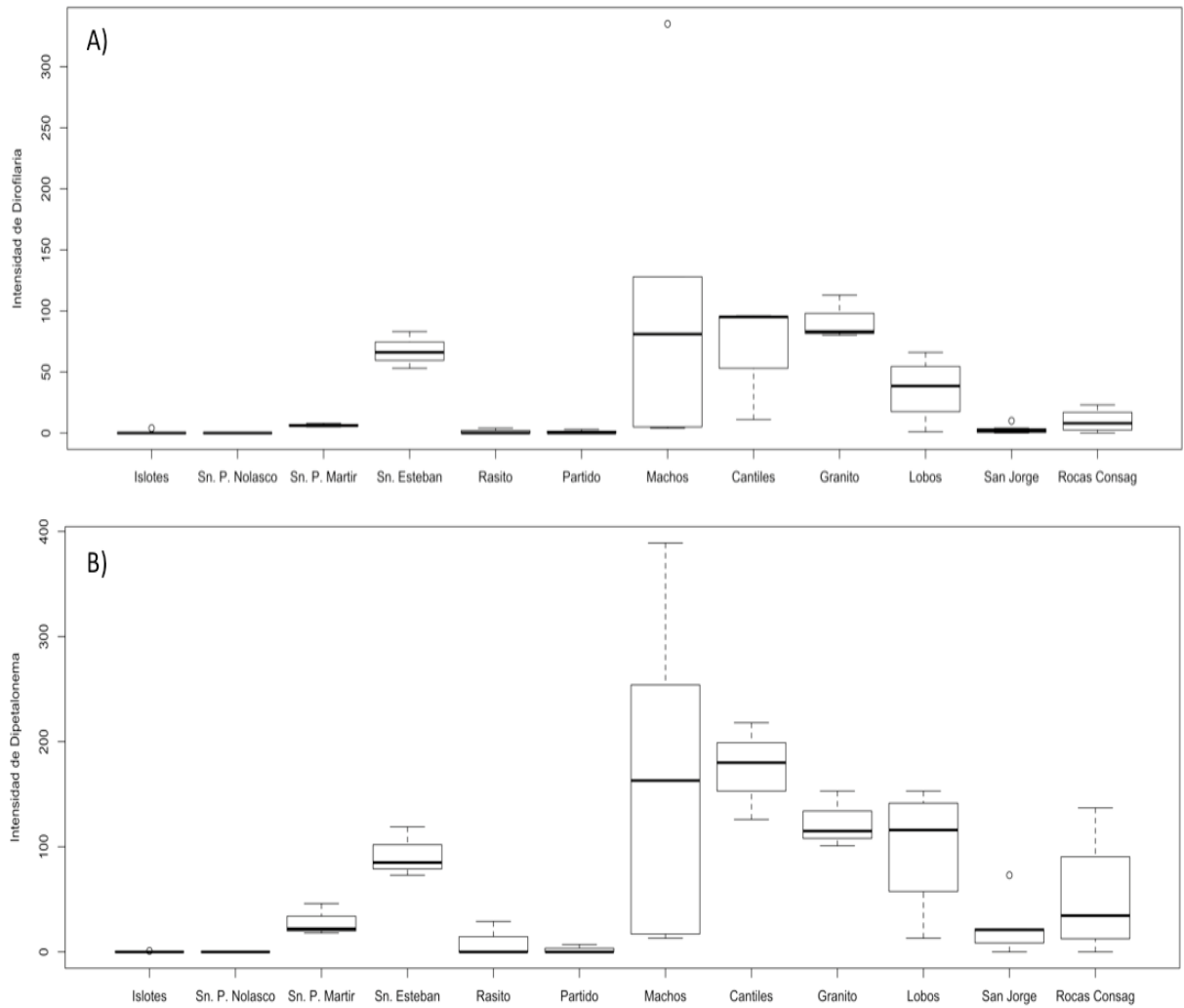


Figura 12. Variación inter-colonia en la intensidad de filarias observados en sangre de hembras adultas de lobo marino de California A) *Dirofilaria*; B) *Dipetalonema*. Las colonias están indicadas en orden latitudinal, de sur a norte, dentro del Golfo de California.

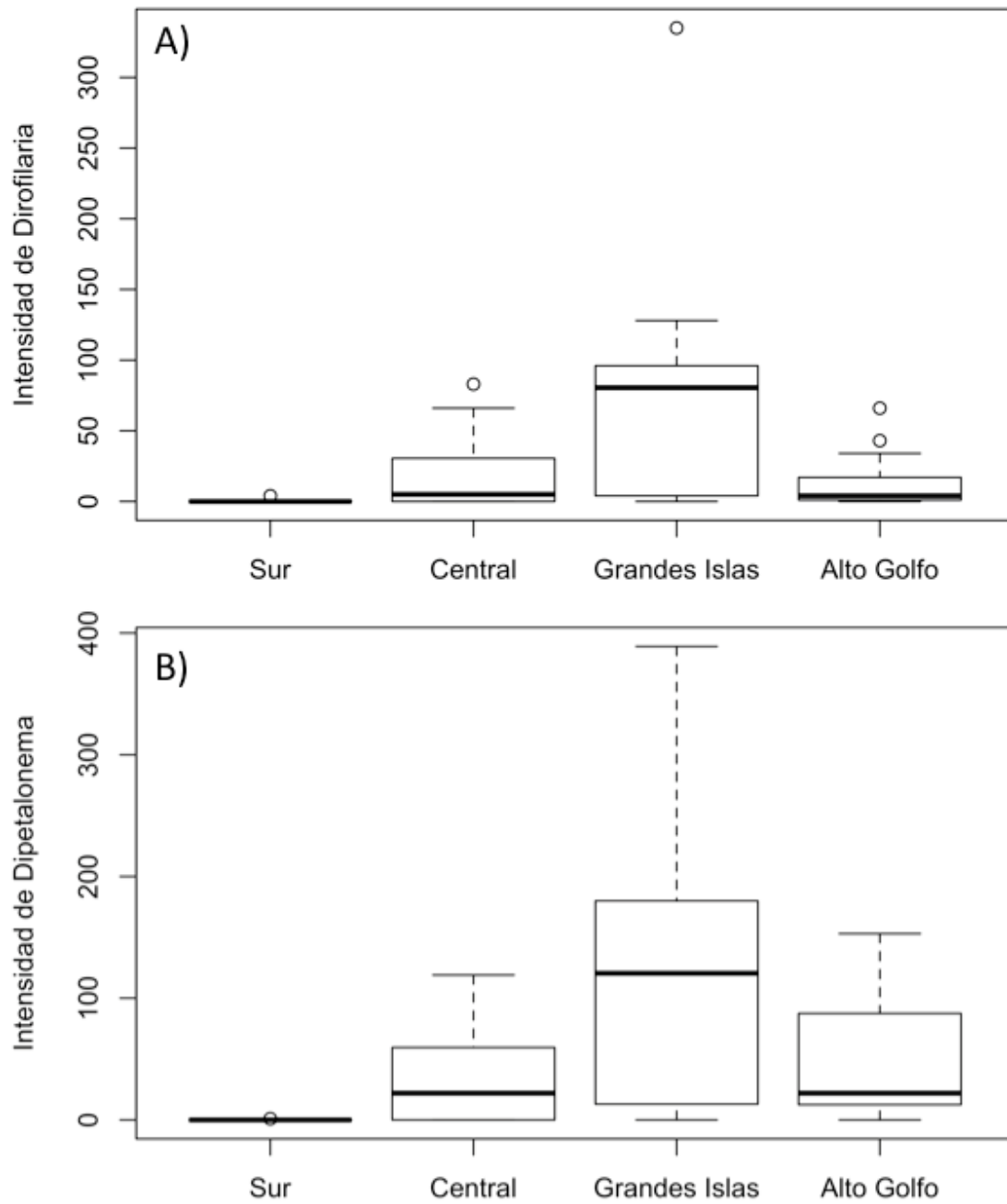


Figura 13. Variación inter-región en la intensidad de filarias observados en sangre de hembras adultas de lobo marino de California A) *Dirofilaria*; B) *Dipetalonema*.

6.3 Las infecciones por microfilarias en función de la densidad poblacional

La densidad colonial de lobos marinos influyó negativamente en la prevalencia de microfilarias (Fig. 14), explicando el 40% de la variación de la prevalencia (R^2 adj=0.40, gl=11, $p=0.016$). La intensidad de las infecciones también fue impactada por la densidad colonial (Fig. 15), que explicó el 42% de la variación en los conteos parasitarios (R^2 adj=0.42, gl=11, $p=0.013$).

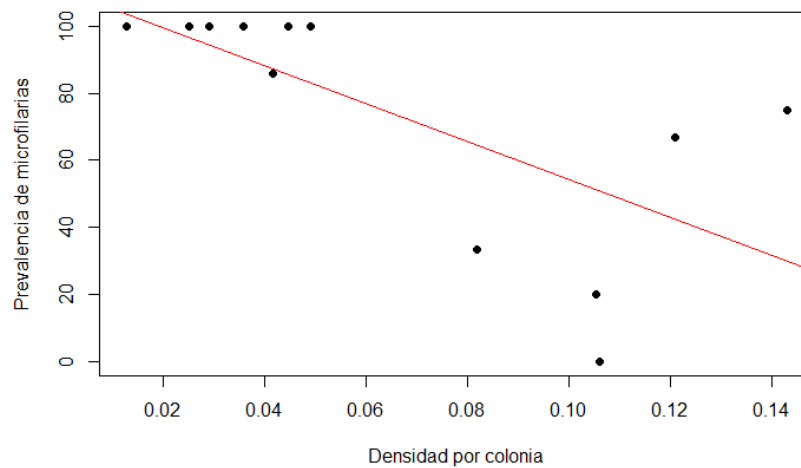


Figura 14. Prevalencia de microfilarias en sangre de hembras adultas de lobo marino de California en función de la densidad de la colonia.

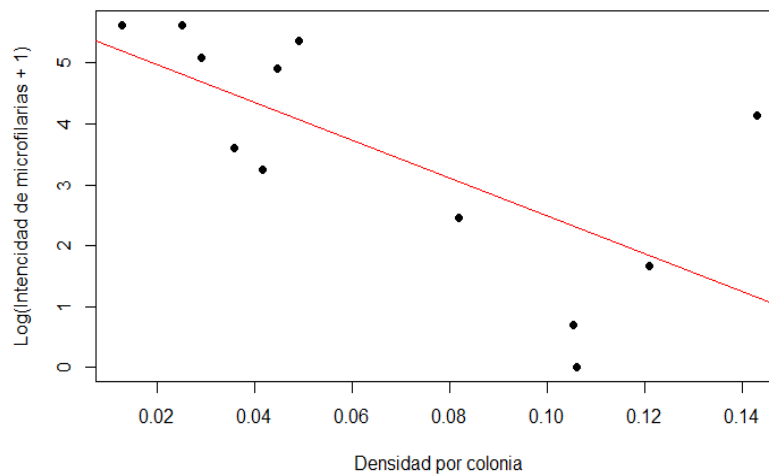


Figura 15. Intensidad de microfilarias en sangre de hembras adultas de lobo marino de California en función de la densidad de la colonia.

6.4 El impacto de las microfilarias en la salud

No se encontró ninguna correlación entre los valores leucocitarios y la prevalencia e intensidad de microfilarias para hembras adultas de LMC (Cuadro 6).

Cuadro 6. Relación entre conteos celulares de valores leucocitarios e intensidad de microfilarias en hembras adultas de lobo marino de California.

Conteo celular	Análisis Modelos Lineales			
	R^2	Error estándar	gl	$p < 0.01$
Hematocrito	0.1005	155.2	23	0.0676
GE	0.06657	156.9	24	0.1083
WBC	-0.03612	160.5	26	0.8104
Neutrófilos	-0.01993	159.2	26	0.4979
Linfocitos	-0.03229	160.2	26	0.6967
Monocitos	0.103	149.3	26	0.05323
Eosinófilos	-0.01857	159.1	26	0.4824
Basófilos	-0.03329	160.3	26	0.7212
LT	-0.03271	154.3	30	0.8942

GE: Gravedad específica

WBC: Leucocitos totales

LT: Longitud total

gl: Grados de libertad

7. Discusión

Esta tesis constituye la primera investigación sobre la prevalencia e intensidad de las infecciones por microfilarias en un mamífero marino, el lobo marino de California, considerado centinela del ecosistema costero (Bossart, 2006). Se encontró que la infección por microfilarias es prevalente entre hembras adultas pero, a excepción de una cría, no se encontraron microfilarias en este grupo etario. Este resultado se podría explicar en el contexto del ciclo de vida de las microfilarias. Por ejemplo, *Dirofilaria immitis* requiere de por lo menos seis meses para que la larva adulta llegue a la arteria pulmonar y al ventrículo derecho del corazón, donde comienza su reproducción y la liberación de microfilarias no infectivas (L1) al torrente sanguíneo (American Heartworm Society, 2014).

En perros, la detección de la infección por microfilarias o microfilaremia es detectable a partir de los cinco y seis meses post-infección (American Heartworm Society, 2014) y las microfilarias pueden permanecer en circulación hasta por dos años (Abrahams, 1988). El tiempo de desarrollo se cumple para las hembras adultas de lobo marino de California; sin embargo, las crías de este estudio fueron muestreadas cuando tenían menos de dos meses de edad, por lo que si su ciclo es semejante al descrito por el perro, es improbable que pudieran haberse desarrollado hasta liberar las microfilarias. A pesar de esto, una de las 235 crías aquí estudiadas, nacida en la colonia norteña de Rocas Consag, presentó dos microfilarias a la exploración de su sangre. Una explicación posible podría ser el paso transplacentario de las microfilarias, la cual se ha reportado para perros recién nacidos (Soulsby 1987; Cordero et al., 1999; Barriga 2002; Gómez et al., 1999). Si este escenario fuera posible, es necesario recordar que el ciclo de vida del parásito muda de microfilaria no infectiva (L1) a microfilaria infectiva (L3) dentro de sus vectores de transmisión (American Heartworm Society, 2014) por lo que las microfilarias detectadas en la cría no serían patogénicas, aunque serían reservorios para la infección (Soulsby 1987; Cordero et al., 1999). Este escenario está poco estudiado, y aunque podría jugar un papel en la dinámica de la

transmisión de microfilarias, el hecho de haberlo observado solamente en un cría, implica que su relevancia es baja.

Debido a la ausencia de investigaciones sobre los tiempos de desarrollo de las microfilarias en el lobo marino de California y otros pinnípedos, se utiliza el conocimiento sobre las infecciones en perros domésticos. Sin embargo, es posible considerar que los tiempos de desarrollo sean semejantes entre estos taxones. Si los tiempos de desarrollo de las filarias fueran menores en los pinnípedos que en los perros, entonces la marcada disparidad de la prevalencia de microfilarias entre hembras adultas y crías podría explicarse en función de diferencias en la exposición a los vectores. Durante los primeros meses de su vida, las crías de lobo marino de California permanecen en las colonias de reproducción. Ahí están mayormente en tierra y pozas de marea, ya que su nado aún es precario y todavía no tienen desarrollada la capacidad de buceo, lo que limita su movimiento (Odell 1975; Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonnell et al., 1978). Por otra parte, las hembras adultas realizan constantemente viajes en busca de alimento en un radio de 50 km aproximadamente (Odell 1975; Orr y Poulter 1965; Le Boeuf y Bonnell 1980; Bonnell et al., 1978) por lo que estos viajes aumentarían la exposición a vectores potenciales si llegan a visitar o descansar en colonias diferentes a su zona de reproducción donde estos vectores se encontraran. Sin embargo, a la fecha no existen estudios sistemáticos de seguimiento de las rutas de las hembras de lobo marino de California entre colonias de reproducción e islas o islotes de descanso. Tampoco se tiene información sobre la presencia y abundancia de vectores artrópodos a lo largo de las islas del Golfo de California, por lo que no se puede ir más allá de plantear esta posibilidad. Sin embargo, es poco parsimonioso considerar que la exposición diferencial a vectores fuera lo que explicara la diferencia en la prevalencia entre hembras adultas y crías, ya que ese escenario exigiría que un artrópodo con una distribución muy limitada, y que no fuera capaz de sobrevivir en otra isla al ser transportado ahí sobre las hembras adultas, fuera el único vector de las microfilarias.

Se observaron diferencias significativas de la prevalencia e intensidad de microfilarias en las hembras adultas, tanto por colonia como por región. Esto quiere decir que la dinámica de la infección varía a lo largo del Golfo de California. Estas diferencias podrían ser debidas al vector de las microfilarias. Para carnívoros terrestres se sabe que el tiempo de desarrollo de *D. immitis* – y por ende, la presencia de microfilarias en los hospederos – varía según el género y especie del mosquito que actúe como vector de estos parásitos (Christensen 1977; Taylor 1960; Tolbert y Johnson, 1982). Desafortunadamente, no existe información publicada sobre las especies de mosquitos encontrados en las islas del Golfo de California, y la única información disponible hace referencia a especies de mosquitos presentes en la península de Baja California, Sonora y Sinaloa (Martínez-Palacios 1983). No sería correcto suponer que estas especies se encuentran en las colonias reproductivas del Golfo de California, ni que su distribución refleja la distribución en estados cercanos, ya que las islas del Golfo de California tienen condiciones climáticas y ecológicas muy específicas (Case y Cody 1983) que pueden influir en la presencia de especies. Precisamente, la temperatura y la humedad de las islas también podría afectar el desarrollo de los vectores artrópodos y sus parásitos, ya que estas condiciones climáticas juegan un papel importante en la maduración de las microfilarias (Atkins 1994; Barriga 2002; Gómez et al., 1999; Wu et al., 1995). Estas diferencias climáticas podrían entonces explicar las diferencias en la prevalencia e intensidad de las microfilarias en las hembras adultas de lobo marino de California a lo largo del Golfo de California.

No debe de descartarse que, además de los mosquitos, podría haber otros vectores artrópodos de las microfilarias en el lobo marino de California. El piojo de la familia Echinophthiriidae *Antarctophthirius microchir*, común en pinnípedos otáridos (Geraci et al., 1981; Chermett et al. 1998), y encontrado en el lobo marino de California en colonias reproductivas del Golfo de California (Izquierdo Suzán, 2014), fue propuesto hace tiempo como vector de transmisión de *Dipetalonema spirocauda*, (Geraci et al., 1981; Chermett et al. 1998), aunque su relevancia en la ecología de las microfilarias no se ha determinado a la fecha. En este contexto,

resulta interesante mencionar que se detectó DNA de nematodos filariales en piojos colectados de crías de lobo marino de California (datos no publicados derivados de análisis realizados por Alejandra Herbert Marinero y Luis Soto García, integrantes del laboratorio de Plasticidad Inmune y Ecoepidemiología Molecular en el que se realizó la presente tesis). A la fecha no se cuenta con muestras de piojos colectados de hembras adultas, por lo que no se cuenta con información sobre la presencia de las filarias en estos piojos y su papel potencial en la transmisión; sin embargo, se sabe que los piojos son comunes en animales adultos (Anzar et al., 2009; Leonardi et al., 2009; Leonardi y Lazzari 2014). El desarrollo de los piojos también es influido por la temperatura y la humedad, además de la salinidad (Murray y Nichols 1965; Kim 1975) ya que estos determinan varios de los caracteres de historia de vida de los nematodos filariales, como su supervivencia, reproducción y tiempo de incubación de los huevos (Murray 1987). Estudios futuros podrán identificar molecularmente a las filarias encontradas en los piojos, para así determinar si estos insectos artrópodos participan en la transmisión de las tres especies de filarias, o si están especializados hacia una especie.

Si los vectores de transmisión de las microfilarias del lobo marino de California incluyeran a los piojos, y estos se distribuyen de manera diferencial en el Golfo de California (Izquierdo-Suzán 2014), en conjunto con lo que se conoce del ciclo de vida de las filarias en carnívoros terrestres, podría ayudar a explicar tanto las diferencias en prevalencia entre colonias y regiones, como el que las crías no presentaran microfilarias, en comparación con las hembras adultas. Esto es porque los piojos que se encuentran en las crías de pinnípedo otárido son poco resistentes a la salinidad y la presión del agua por lo que cuando las crías comienzan a bucear, se desprenden para pasar a otro hospedero. Por el contrario, los piojos que viven sobre las hembras adultas de pinnípedos otáridos son capaces de resistir la salinidad y las altas presiones del agua que implican los buceos de alimentación, por lo que estos pueden quedarse aferrados a una hembra adulta durante más tiempo (Leonardi et al., 2014), y así, permitir que se completen los ciclos de las microfilarias en la misma interacción individual piojo-

lobo marino de California. De acuerdo a lo anterior, se podría explicar la infección de la cría si uno de los piojos (infectados por microfilarias durante la alimentación de una hembra adulta infectada) se hubiera trasladado de manera accidental hacia una cría durante la lactancia o cuidado materno, ya que si se alimentara de su sangre, podría haberle transmitido las microfilarias. El hecho de haber encontrado solamente dos, en vez de los cientos encontrados en las hembras adultas sería porque, en ellas, las microfilarias son el resultado de la reproducción del nematodo adulto en el corazón o venas pulmonares, mientras que en la cría serían solamente la transferencia de esa etapa larvaria. Es decir, en esta etapa temprana de la vida del lobo marino, aún no podrían tener filarias adultas.

En la colonia San Pedro Nolasco, se encontró una prevalencia de 0% ya que no se encontraron microfilarias en los individuos muestreados. Dos posibles escenarios podrían estar jugando un papel para determinar esto: 1) el aislamiento de la colonia de reproducción, ya que geográficamente es la colonia más aislada dentro del golfo de California (101.5 Km aproximadamente a Isla San Pedro Mártir; 385 Km aproximadamente a Islotes; distancias calculadas con Google Earth) y, además en esta isla, la zona donde se encuentran los LMC es pequeña (Karen Adame Fernandez, datos no publicados), 2) el número de muestras en esta colonia se podría aumentar para poder comprender a mayor detalle la dinámica de las infecciones por microfilarias en el Golfo de California. Por otro lado, la colonia reproductiva de Los Islotes, ubicada al norte del Parque Nacional Archipiélago del Espíritu Santo, tuvo una baja prevalencia e intensidad de microfilarias sanguíneas en las hembras adultas muestreadas. Esto podría reflejar tres escenarios que nos son mutuamente excluyentes: 1) la abundancia de vectores en esta zona de la distribución del lobo marino de California es menor por las restricciones climáticas antes mencionadas, 2) al ubicarse en la parte más sureña del Golfo de California, el desplazamiento de las hembras adultas que ahí habitan varía en comparación con las de las demás colonias (ver Porras-Peters et al., 2008), y 3) los animales de esta colonia tienen una inmunocompetencia óptima que les permite detectar y eliminar a las filarias. Se sabe que los hospederos sí detectan a las filarias y generan respuestas inmunes contra ellas. Sin embargo, estas respuestas y la

patología que ocasionan las filarias varía entre especies. Por ejemplo, en felinos, *Dirofilaria* ocasiona respuestas severas inflamatorias vasculares, además de tromboembolismos frecuentes e involucramiento del sistema nervioso central (Atkins et al., 2000), mientras que en cánidos, *Dirofilaria* ocasiona problemas cardíacos y respiratorios, pero también puede ser subclínico (Simón et al., 2007). No existe información detallada sobre las respuestas inmunes de los pinnípedos hacia las filarias, pero se han detectado anticuerpos en el lobo marino de California (Alho et al., 2017), lo que implica reconocimiento de moléculas asociadas al parásito por parte de células fagocitarias con su presentación subsecuente a los linfocitos B para sintetizar anticuerpos (Janeway, 2009). Sin embargo, el estudio que reporta variación en efectores inmunes del lobo marino de California en el Golfo de California (Peñín et al., 2008) no se centró en la capacidad de síntesis de anticuerpos, y no se conoce si todos los efectores inmunes adaptativos son afectados de la misma manera por variaciones ecológicas (Acevedo-Whitehouse y Duffus, 2009), por lo que no es posible inferir si los resultados aquí observados se deben a diferencias en este proceso.

En cuanto a las colonias Rasito y El Partido, estas están cercanas (a 10 km de distancia aproximadamente) y ambas tuvieron prevalencias e intensidades medias. Ambas están aledañas a La Isla Rasa, caracterizada por su abundancia y riqueza de aves marinas como el charrán elegante (*Sterna elegans*) y la gaviota ploma (*Larus hermanni*) que anidan cada año entre abril y junio (Velarde y Anderson, 1994). Es posible que la presencia de aves en la colonia reduzca la abundancia de vectores artrópodos en estas colonias, lo que podría explicar la baja prevalencia e intensidad de microfilarias pues las aves podrían estar realizando un papel de regulador natural de las poblaciones de posibles vectores. Estudios futuros podrían enfocarse en investigar la relación entre la presencia de aves y la abundancia de artrópodos, conocimiento que actualmente no existe.

Por otra parte, en las colonias Lobos, Granito, Cantiles, Machos, San Esteban y San Pedro Mártir la prevalencia de microfilarias fue del 100%. Esto podría indicar que la dinámica de la infección se está comportando de manera similar entre ellas en función de los vectores y, por ende, de las condiciones

climáticas que presentan. Además, las colonias Granito, Cantiles y Machos (que comprenden la región de las grandes Islas, junto con Isla Rasito), se encuentran ubicadas dentro de un rango de 50 km de radio aproximadamente (distancias calculadas en Google Earth), lo que implica que las hembras adultas de estas colonias podrían estar en contacto cercano y estar expuestas a los mismos vectores artrópodos de las microfilarias.

Para las colonias encontradas en la región más norteña del Golfo de California (Rocas Consag y San Jorge), las prevalencias e intensidad de microfilarias también fueron relativamente altas. Esta región del golfo de California se caracteriza por tener los climas más extremos; durante el invierno las temperaturas son más bajas y durante el verano las temperaturas son más altas que en el resto del Golfo de California (Case y Cody 1983). Estudios recientes han sugerido que el funcionamiento inmune de los lobos marinos adultos de esta región son subóptimos (Peñín et al., enviado), por lo que podría explicarse una alta intensidad de microfilarias si sus respuestas inmunes antiparasitarias son ineficientes. El impacto de tener respuestas inmunes subóptimas ya se ha reportado. Por ejemplo se han observado casos de cáncer vulvar en hembras adultas de estas colonias que no ocurren en otras colonias, y que se propone se debe a exposición a contaminantes orgánicos en esta región (Barragán-Vargas et al., enviado). Si este estado subóptimo de competencia inmune afecta también a las respuestas antiparasitarias, podría explicar la alta intensidad de infección observada para los animales de esta región.

No se encontraron diferencias significativas en las prevalencia por colonia y región entre los dos géneros de filarias identificados en la sangre de los lobos marinos (*Dirofilaria* y *Dipetalonema*), pero sí en la intensidad de estos géneros, que fue mayor en las colonias de la región de las grandes islas. La semejanza en la prevalencia entre géneros se puede explicar si asumimos que los vectores de transmisión para ambos géneros son los mismos. Es decir, a) el mismo vector pudiera transmitir ambos géneros, o b) las microfilarias sean transmitidas por diferentes especies de vectores pero estos comparten características de historia de vida (i.e. tiempos de desarrollo larvario de los vectores, cantidad de huevos por

puesta, temperaturas de desarrollo) y ecología por lo que co-ocurren en las colonias de lobos marinos. Evidentemente, no puede descartarse que la ausencia de evidencia de diferencias en la prevalencia entre géneros podría deberse a errores potenciales en la diferenciación morfológica debido a traslape de caracteres. Por esto, el uso de técnicas moleculares en el futuro ayudaría a dilucidar mejor los resultados aquí observados.

Una de las contribuciones al conocimiento más inesperadas de esta tesis fue el haber encontrado una correlación negativa entre la densidad poblacional del lobo marino de California y la prevalencia de la microfilariasis. Esta relación fue significativa y explicó el 40% de la variación en la prevalencia. La relación fue semejante para la intensidad, donde la densidad explicó el 42% de la variación en la intensidad de la infección, donde a mayor densidad poblacional, menor intensidad de microfilarias. Dado que la microfilariasis se transmite por medio de un vector (Mehlorn 2015), se considera de transmisión dependiente de la frecuencia, por lo que la densidad poblacional típicamente no es tomada en cuenta en el modelaje de la dinámica de la infección (McCallum et al., 2001). Sin embargo, con base en los resultados aquí obtenidos, se propone que la densidad sí está relacionada con la infección, y que los efectos se deben a un efecto de “dilución del riesgo” para los hospederos. Es decir, al aumentar la densidad poblacional, aumenta el número de hospederos potenciales para el parásito, lo que disminuye la probabilidad individual de ser mordido por el vector, y por consecuencia la prevalencia de microfilarias disminuye en la colonia. Esta propuesta encuentra sustento en el hecho de que se sabe que en las poblaciones naturales hay variación en la selección de individuos como fuente de alimento por vectores hematófagos (Simpson et al., 2012), y que los parásitos suelen tener diferente agregación en los individuos de una población (Beldomenico y Begon, 2010). Esta heterogeneidad en las preferencias de alimentación y parasitismo podrían dar lugar a la relación inversa entre densidad e infección aquí observada.

Finalmente, en cuanto a los efectos de las microfilarias en la salud del lobo marino de California, en este estudio no se encontró evidencia de que ninguno de los valores clínicos registrados para los lobos marinos estuviera relacionado con la

presencia de las microfilarias ni con su intensidad. Estos resultados concurren en parte con lo reportado previamente, ya que aunque se ha propuesto que *Dirofilaria immitis* tiene potencial patogénico para los otáridos, las infecciones por microfilarias en carnívoros comúnmente son asintomáticas (Forrester et al., 1973; White 1975; Sato et al., 2002; Alho et al., 2017) y las infecciones por *Dipetalonema odendhali* parecen no ser patógenas para el lobo marino de California (Dailey 2001; Cara Field, comunicación personal). En este sentido, tomando en cuenta las altas prevalencias de microfilariasis encontradas en el Golfo de California, se propone que existe tolerancia por parte del lobo marino de California a las microfilarias. A la fecha no existe ningún estudio publicado sobre tolerancia inmune en el lobo marino de California, y resultaría interesante realizar un seguimiento de los resultados aquí observados para determinar si los efectos de la infección son subclínicos y el impacto se observa a nivel de una disminución relativa en el éxito reproductivo, o si son tolerantes estos hospederos a las microfilarias.

Para terminar, a pesar de que la distribución de microfilariasis en el Golfo de California presenta un patrón latitudinal, lo que sugiere posibles variaciones espaciales en la distribución de los vectores, la demografía del hospedero, y su capacidad inmune, hace falta realizar más investigación para identificar las especies de artópodos que están actuando como vectores de transmisión, e identificar su éxito como vectores en función de las fluctuaciones de temperatura y humedad entre colonias y entre regiones, así como explorar a mpara poder, en el futuro, determinar si es posible que la microfilariasis se vuelva un problema a las poblaciones si estas cambian en términos de su capacidad inmune por otros factores ajenos a la microfilariasis.

8. Conclusiones

1. Las microfilarias son prevalentes en las hembras adultas de lobo marino de California en el Golfo de California pero no en las crías de esta especie.
2. Dos géneros de microfilarias – *Dirofilaria* y *Dipetalonema* – están presentes en las hembras adultas de lobo marino de California en el Golfo de California.
3. La prevalencia e intensidad de la microfilariasis varía entre colonias y regiones, lo que sugiere variación en la ecología de la infección, ya sea en la distribución diferencial de los vectores potenciales, en factores climáticos que afectan los ciclos de vida de los vectores y los parásitos, o en diferencias en la respuesta inmune de los hospederos.
4. A nivel poblacional, las infecciones por microfilarias está relacionadas de manera inversa a la densidad poblacional del lobo marino de California, sugeriendo una heterogeneidad en la preferencia por hospederos por parte de los vectores.
5. La microfilariasis no parece ocasionar problemas a la salud de las hembras de lobo marino de California.

9. Referencias

- Abraham D, Grieve RB, Mika-Grieve M. 1988. *Dirofilaria immitis*: surface properties of third- and fourth stage larvae. *Exp. Parasitol.* 65:157-167.
- Abramowsky CR, Powers KG, Aikawa M, Swinehart G. 1981. *Dirofilaria immitis*. 5. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. *Am. J. Pathol.* 104:1-12.
- Acevedo-Whitehouse K, De la Cueva H, Gulland FMD, Auriolles-Gamboa D, Arellano Carvajal F, Suárez-Güemes F. 2003 Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wild. Dis.* 39(1):145-151.
- Acevedo-Withehouse K, Duffus ALJ. 2009 Effects of environmental change on wildlife health. *Phil. Trans. R. Soc.* 364:3429-3438 (doi:10.1098/rstb.2009.0128)
- Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature.* 387:489-493.
- Alexander N. 2012. Analysis of Parasite and Other Skewed Counts. *Trop Med Int Health.* 17: 684-693. (doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.02987.x)
- Alho AM, Marcelino I, Colella V, Flanagan C, Silva N, Correia JJ, Latrofa MS, Otranto D, Madeira de Carvalho L. 2017 *Dirofilaria immitis* in pinnipeds and a new host record. *Parasites & Vectors.* 10:142 (doi: 10.1186/s13071-017-2073-0)
- Anderson RC. 2000 Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 2nd ed. Ed. CABI Pub, Wallingford, Oxon, UK; New York, NY.
- Anderson, RC. 1959. The taxonomy of *Dipetalonema spirocauda* (Leidy, 1858) n. Comb. (= *Skrjabinaria spirocauda*) and *Dirofilaria roemeri* (Linstow, 1905) n. Comb. (= *Dipetalonema roemeri*). *Can. J. Zool.* 37, 481-493. (doi: 10.1139/z59-057)
- Atkins CE, De Francesco TC, Coats JR, Sidley JA, Keene BW. 2000. Heartworm infection in cats: 50 cases. *Journal of the American Medical Association*, 217, 355-358
- Aznar FJ, Leonardi MS, Berón-Vera B, Vales DG, Ameghino S, Raga JA, Crespo EA. 2009 Population dynamics of *Antarctophthirus microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) in pups from South American sea lion, *Otaria flavescens*, in Northern Patagonia. *Parasitology* 136, 293-303.
- Apiwathnasorn, C., Samung, Y., Prummongkol, S., Asavanich, A., Komalamisra, N., McCall, P., 2006. Bionomics studies of *Mansonia* mosquitoes inhabiting the peat swamp forest. *Southeast Asian J Trop. Med. Public Health* 37: 8.
- Atkins CE. 1994 Síndrome de dirofilariosis de la cava. En: KIRK, R. W., J. D. BONAGURA. 1994. *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. 11^a ed., Interamericana McGraw-Hill, Madrid. España.
- Barriga OO. 2002 Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Editorial Germinal, Santiago. Chile.
- Bancroft TL. 1899. Filarial metamorphosis in the mosquito. *Aust. Med. Gaz.* 18: 120.
- Bancroft TL. 1901. Notes on filaria in Queensland. *Aust. Med. Gaz.* 29: 233-234.
- Bancroft TL. 1904 On some further observations on the life history of *Filaria immitis* Leidy. *Brit. Med. J.* 1: 822-823.

- Banuet-Martínez M, Espinosa-de Aquino W, Elorriaga-Verplancken FR, Flores-Moran A, García OP, Camacho M, Acevedo-Whitehouse K. 2017. Climatic anomaly affects the immune competence of California sea lions. *PLoS One* 12(6): e0179359. (doi: 10.1371/journal.pone.0179359)
- Barragán-Vargas C, Silva-Rosales G, Colegrove K, Guerrero-de la Rosa F, Acevedo-Whitehouse K. Enviado. Vulvar verrucous epidermoid carcinoma in California sea lions from the Sea of Cortez.
- Beldomenico PM, Begon M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends Ecol. Evol.* 25: 21–27. (doi: 10.1016/j.tree.2009.06.015)
- Blagburn BL. 1994 Microfilaricidal therapy: Review and update. *Vet. Med.* 89: 630- 638.
- Blaxter M, Koutsovoulos G. 2015. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitol.* 142: S26–S39. (doi: 10.1017/S0031182014000791)
- Bonnell ML, Le Boeuf BJ, Pierson MO, Dettman DH, Farrens GD. 1978 Pinnipeds of the southern California Bight. En: Marine mammal and seabird surveys of the southern California Bight area, 1975-1978. Pp 1-535.
- Bossart GS. 2006. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet. Pathol.* 48: 676-690. (doi: 10.1177/0300985810388525)
- Bowman DD, Atkins CE. 2009. Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 39: 1127–1158. (doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.003)
- Browning HM, Gulland FMD, Hammond JA, Colegrove KM, Hall AJ. 2015 Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140228. (doi: 10.1098/rstb.2014.0228)
- Case TJ, Cody ML. 1983 Island Biogeography in the Sea of Cortes. University of California Press, Berkeley.
- Chabaud AG, Anderson RC. 1959. Nouvel essai de classification des Filaires (superfamille Filarioidea). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 34: 64-87. (doi:10.1051/parasite/1959341064)
- Chabaud AG, Bain O. 1976. *Dipetalonema* lineage. New attempt at classification. *Ann Parasitol. Hum. Comp.* 51:365-397.
- Chermett R, Guillot J, Petit T, Degorce-Rubiales F, Guého E. 1998 Dermatitis caused by *Malassezia pachydermatis* in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Vet. Record.* 142, 311-312.
- Christensen BM. 1977 Laboratory studies on the development and transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes trivittatus*. *Mosq News* 37(3):36772.
- Cordero M, Rojo F, Martínez A, Sánchez M, Hernández S, Navarrete I, Diez P, Quiroz H, Navarro M. 1999 Parasitología Veterinaria.1ra edición. Editorial Me Graw - Hill Interamericana. Madrid - España. Pag.679- 689
- Dailey MD. 2001 Parasitic Diseases. CRC Handbook on Marine Mammal Med. 23.
- Dailey MD. 1980 Diagnostic key to the parasites of some marine mammals. Naval Ocean Systems Center. San Diego, California. 92152.

- Dailey MD, Hill BL. 1970. A survey of metazoan parasites infecting the California (*Zalophus californianus*) and Steller (*Eumetopias jubatus*) sea lion. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.* 69: 126-132.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443–449.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001 Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta. Trop.* 78, 103-116. (doi: 10.1016/S0001-706X(00)00179-0)
- Davis GB, McKenna PB, Kyle MG. 1971 *Dipetalonema odendhali* in a sea lion. *N. Z. Vet. J.* 13: 78-79. (doi: 10.1080/00480169.1971.33936)
- Delyamure SL. 1955. Helminthofauna of Marine Mammals. Academy of Science USSR, Moscow. (Traducido del ruso) U.S. Dept. Interior and Natl. Sci. Found. Washington, D.C., 1968.
- Dobson AP, Carper ER. 1996 Infectious diseases and human population history. *Biosci.* 46: 115–126.
- Dunn JL, Wolke RE. 1976. *Dipetalonema spirocauda* infection in the Atlantic harbor seal (*Phoca vitulina concolor*). *J. Wildl. Dis.* 12: 531–538.
- Eley TJ. 1981. *Dipetalonema spirocauda* in Alaskan marine mammals. *J. Wildl. Dis.* 17: 65–67. (doi: 10.7589/0090-3558-17.1.65)
- Eley TJ. 1981. *Dipetalonema spirocauda* in Alaskan marine mammals. *J. Wildl. Dis.* 17: 65-67. (doi: 10.7589/0090-3558-17.1.65)
- Elorriaga-Verplancken FR, Sierra-Rodriguez GE, Rosales-Nanduca H, Acevedo-Whitehouse K, Sandoval-Sierra J. 2016. Impact of the 2015 El Niño-Southern Oscillation on the abundance and foraging habits of Guadalupe fur seals and California sea lions from the San Benito Archipelago, Mexico. *Plos One.* 1:16. (doi:10.1371/journal.pone.0155034)
- Ermakova LA, Nagorny SA, Krivorotova EY, Pshenichnaya NY, Matina ON. 2014 *Dirofilaria repens* in the Russian Federation: current epidemiology, diagnosis, and treatment from a federal reference center perspective. *Int. J. Infect. Dis.* 23: 47–52. (doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.008)
- Feng LC. 1930. Experiments with *Dirofilaria Immitis* and local species of mosquitoes in Peiping, North China, with a note on *Lankesteria culicis* found in *Aedes koreicus*. *Ann. Trop. Med.* 24: 347-366.
- Fiilleborn F. 1908. Untersuchungen an menschlichen Filarien und deren Übertragung auf Stechmücken. *Archiv fiir Schiffsus und Tropenhygiene*, 12: 353-388.
- Forrester DJ, Jackson RF, Miller JF, Townsend BC. 1973 Heartworms in captive California sea lions. *J Am Vet Med Assoc.* 163: 568–70.
- García-Rodríguez FJ, Aurióles-Gamboa D. 2004 Spatial and temporal variation in the diet of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Fishery Bulletin.* 102: 47–62.
- Garnett GP, Holmes EC. 1996 The ecology of emergent infectious disease. *Biosci.* 46: 127–135.

- Genchi C, Mortarino M, Rinaldi L, Cingoli G, Traldi G, Genchi M. 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet. Parasitol.* 176 (4): 259–295.
- Genchi C, Mortarino M, Rinaldi L, Cringoli G, Traldi G, Genchi M. 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet. Parasitol.* 176: 295–299. (doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.012)
- Georgi JR, Georgi ME. 1994 Parasitología en clínica canina. McGraw-Hill Interamericana, Atlampa. México.
- Goggin JM, Biller DS, Rost CM, Debey BM, Ludlow CL. 1997 Ultrasonographic identification of *Dirofilaria immitis* in the aorta and liver of a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1635-1637.
- Gomez MF, Rojo FA, Guerrero J. 1999 Filariasis. En: Cordero M, Rojo Fa, Sánchez Mc, Hernandez S, Navarrete I, Diez P, Quiroz H, Carvalho M. 1999 Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- González-Suárez M, Gerber L. 2006. Habitat preferences of California sea lions: Implications for conservation. *J. Mammal.* 89: 1521-1528.
- Grassi B, Noé G. 1900. The propagation of the filariae of the blood exclusively by means of the puncture of peculiar mosquitoes. *Brit. Med. J.* 2: 1306-130.
- Grauer GF, et al. 1987. Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37:588 –596.
- Grenfell BT, Dobson AP. 1995 Ecology of infectious diseases in natural populations. *Publ. Newton Institute.* 7: 52. (doi:10.1016/0169-4758(96)80821-0)
- Hayasaki M. 1996 Re-Migration of Fifth-Stage Juvenile *Dirofilaria immitis* into Pulmonary Arteries after Subcutaneous Transplantation in Dogs, Cats and Rabbits. *J. Parasitol.* 82: 835-837.
- Helle O, Blix AS. 1973. Some morphological characteristics of *Dipetalonema spirocauda* Leidy, 1858, isolated from the Hooded seal, *Cystophora cristata* Erxleben 1777. *J. Parasitol.* 59: 217. (doi: 10.2307/3278614)
- Hernández-Camacho CJ, Auriolos-Gamboa D, Gerber LR. 2008 Age-specific birth rates of California sea lions, *Zalophus californianus*, in the Gulf of California, Mexico. *Mar. Mamm. Sci.* 24: 664–676.
- Iori A, Cancrini G, Vezzoni A, Del Ninno G, Tassi P, Genchi C, Della Torre, Coluzzi M. 1990 Osservazioni sul ruolo di *Culex pipiens* nella trasmissione della filariosi de1 cane in Italia. *Parasit*, 32(supplment 1): 151-152.
- Izquierdo Suzan M. 2014. Caracterización estructural y genética de parásitos de lobo marino de California, *Zalophus californianus* en Ángel de la Guarda y Granito, Golfo de California”. Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.
- Jackson JB, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR. 2001 Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-637. (doi:10.1126/science.1059199)
- Janeway C, Murphy KP, Travers P. Walport M. 2009. Inmunobiología de Janeway. McGraw-Hill, México.

- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008 Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993. (doi:10.1038/nature06536)
- Kagei N, Oda T. 1975 *Dipetalonema odendhali* Perry, 1967 found from Fur Seal, *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758). *Bull Inst Publ Health* 24: 203–205.
- Kartma L. 1957 The vector of canine filariasis: a review with special reference to factors influencing susceptibility. *Rev. Bras. Malariol. E Doencas.* 9: 3-47.
- Kim KC. 1975 Ecology and morphological adaptation of the sucking lice (Anoplura, Echinophthiriidae) on the Northern fur seal. *Rapports et Proces Verbaux des Reunions du Conseil Permanent International pour la Exploration de la Mer* 169, 504–515.
- King JE. 1964. *Seals of the World*. British Museum (Natural History), London.
- Kittleson MD, Kienle RD. 2000 *Medicina cardiovascular de pequeños animales*. 2a ed., Multimédica, Barcelona. España.
- Klei TR, Crowell WA, Thompson PE. 1974. Ultrastructural glomerular changes associated with filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23:608–618.
- Kotani TK, Powers KG. 1982 Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2199-2206.
- Kovalenko LM. 1978 To the fauna of marine mammal parasites of region of Kurilskie Islands. In: *Marine Mammals. Proceedings of the 7th All-Union Conference on Marine Mammal study*. Moscow. pp154–156
- Krucik DDR, Van Bonn W, Johnson SP. 2016. Association between positive canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) antigen results and presence of *Acanthocheilonema odendhali* microfilaria in California sea lions (*Zalophus californianus*). *J. Zoo Wildl Med.* 47: 25-28.
- Kume S, Itagaki S 1995. On the life-cycle of *Dirofilaria immitis* in the dogs as the final host. *Br. Vet. J.* 111: 16-24.
- Kuzmina TA, Kuzmin, YI, Tkach VV, Spraker TR, Lyons ET. 2013. Ecological, morphological, and molecular studies of *Acanthocheilonema odendhali* (Nematoda: Filarioidea) in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska. *Parasitol. Res.* 112: 3091–3100. (doi: 10.1007/s00436-013-3483-3)
- Laetsch DR, Heitlinger EG, Taraschewski H, Nadler SA, Blaxter ML. 2012. The phylogenetics of Anguillicolidae (Nematoda: Anguilliculoidea), swimbladder parasites of eels. *MC Evol Biol.* 12: 60. (doi: 10.1186/1471-2148-12-60)
- Le Boeuf BJ, Bonnell ML. 1980 Pinnipeds of the California islands: abundance and distribution. Pages 475-493 in D. Power, ed. *The California islands*. Santa Barbara *Mus. Nat. Hist.* 787pp.
- Le Boeuf BJ, Crocker DE. 2005 Ocean climate and seal condition. *BMC Biol.* 10: 3-9. (doi:10.1186/1741-7007-3-9)
- Lederberg J, Shope RE, Oakes SC. 1992 *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Institute of Medicine. National Academy Press, Washington

- Leonardi MS, Crespo EA, Raga JA, Fernández M. 2009 Redescription of *Antarctophthirus microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) from the South American Sea Lion, *Otaria flavescens*, from Patagonia, Argentina. *J. Parasitol.* Vol. 95, No. 5, pp. 1086-1092
- Leonardi MS, Lazzari CR. 2014 Undercovering deep mysteries: The underwater life of an amphibious louse. *J. Insect. Physiol.* 71, 164-169.
- Levy JK, Lappin MR, Glaser AL, Birkenheuer AJ, Anderson TC, Edinboro CH. 2011 Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 238: 311–317. (doi:10.2460/javma.238.3.311)
- Liao W, Atkinson CT, LaPointe DA, Samuel MD. 2017. Mitigating Future Avian Malaria Threats to Hawaiian Forest Birds from Climate Change. *PLoS One.* 6: 12(1):e0168880. (doi: 10.1371/journal.pone.0168880).
- Loftus EV Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterol.* 126: 1504-1517.
- .Lok JB, 2018. *Dirofilaria* Sp.: Taxonomy and Distribution [WWW Document]. Dirofilariasis. <https://doi.org/10.1201/9781351071420-1>
- Lok JB, Harpaz T, Knight DH, 1988. Abnormal patterns of embryogenesis in *Dirofilaria immitis* treated with ivermectin. *J. Helminthol.* 62: 175–180.
- Lovis L, Grandjean M, Overney L, Seewald W, Sager H. 2017. Seasonality and circadian variation of microfilaremia in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 243: 235-241. (doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.010)
- Ludders JW, Grauer GF, Dubielzig RR, Ribble GA, Wilson JW. 1988. Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilariasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 49:826–830.
- MacDonald DW, Gilchrist EW. 1969. *Dipetalonema spirocauda* and *Pseudomonas aeruginosa* infection in harbor seal (*Phoca vitulina*). *Can. Vet. J.* 10: 220–221.
- Machida M. 1977 Two species of *Dipetalonema* from pinnipeds caught off northern Japan. *Bull Nat Sci Mus Tokyo Ser A Zool* 3: 67–71
- MacLeod CD, Santos MB, Reid RJ, Scott BE, Pierce GJ. 2007 Linking sandeel consumption and the likelihood of starvation in harbour porpoises in the Scottish North Sea: could climate change mean more starving porpoises? *Biol. Lett.* 3: 185–188. (doi:10.1098/rsbl. 2006.0588)
- Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. 2013 Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit. Vectors* 6: 48. (doi: 10.1186/1756-3305-6-489)
- Martínez-Palacios A. 1983 Notas sobre los mosquitos de Baja California, México (Diptera: Culicidae). *Folia Entomol. Mex.* 69: 99-116
- McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. 2008 Heart-worm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66: 193–285.
- McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. 2008. Chapter 4 Heartworm Disease in Animals and Humans. En: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 193–285. (doi: 10.1016/S0065-308X(08)00204-2)

- McCallum H, Barlow N, Hone J., 2001. Should pathogen transmission be modelled? *Trends Ecol. Evol.* 16: 295-300.
- McMichael A, Campbell-Lendrum D, Ebi K, 2003 Climate change and human health: risks and responses. *World Health Organization*. Ginebra (Suiza)
- Measures LN, Gosselin JF, Bergeron E. 1997 Heartworm, *Acanthocheilonema spirocauda* (Leidy, 1858), infections in Canadian phocid seals. *Can J Fish Aquat Sci* 54: 842–846.
- Mehlhorn H. 2015. Filarial Worms of Animals. Encyclopedia of Parasitology. Mehlhorn H (Ed). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Morse SS. 1993 Examining the origins of emerging viruses. In: Morse, S.S. (Ed.), *Emerging Viruses*. Oxford University Press, New York, pp. 10–28.
- Murray MD. 1987 Arthropods. The pelage of mammals as an environment. *International Journal for Parasitology* 17, 191–195.
- Murray MD. 1976 Insect parasites of Antarctic seals and birds. In *Marine Insects* (ed. Cheng, L.), pp. 79–96. North Holland Publishing Company, Amsterdam
- Murray MD. 1964 Ecology of the ectoparasites of seals and penguins. In *Antarctic Biology. Proceedings of the 1st S.C.A.R. Symposium on Antarctic Biology*. (ed. Carrick, R., Holdgate, M and Prevost, J.), pp. 241–245. Paris, France.
- Murray MD, Nicholls DG. 1965 Studies on the ectoparasites of seals and penguins I. The ecology of the louse *Lepidophthirus macrorhini* Enderlein on the Southern Elephant seal, *Mirounga leonina* (L.). *Australian Journal of Zoology* 13, 437–454.
- Nadler SA, Carreno RA, Mejía-Madrid H, Ullberg J, Pagan C, Houston R, Hugot JP. 2007. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitol.* 134(Pt 10): 1421-1442.
- Newton WL. 1957 Experimental transmission of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, by *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Parasit.* 43: 589.
- Newton WL, Wright WH. 1956. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *J. Parasit.* 42: 246-258.
- Nielsen C. 2001. *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Nikolskij OR. 1969 On the parasite fauna of fur seals in pelagic period of their life. In: *Problemy Parazitologii. Proceedings of the 6th Scientific Conference of Parasitologists of the USSR*, part 1, Kiev, Naukova Dumka. Pp. 179–184
- Niño-Torres CA, Urbán Ramírez J, Vidal O, Gorter U. 2011 Mamíferos marinos del Golfo de California: guía ilustrada, 1 ed. Ed, Especies. Publicación especial. Alianza WWF-Telcel, México, D.F.
- NWAFRC Processed Report 81-2 (1981) Fur Seal Investigations, 1980. National Marine Mammal Laboratory, Northwest and Alaska Fisheries Center, National Marine Fisheries Service, NOAA, Seattle, Washington
- Ohba S, Nogami S, Shirai W, et al. 2002 Lingual squamous cell carcinoma in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 33: 367–70.
- Orihel TC. 1961 Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J Parasitol.* 47(2): 251–62.

- Ortega-Ortiz CD, Elorriaga-Verplancken F, Rodríguez-Téllez L, Olivos-Ortiz A, Gaviño-Rodríguez JH. 2013. Primer registro de un lobo marino de California (*Zalophus californianus*) neonato en Manzanillo, Colima, México. *Rev. Mex. Biodiv.* 84: 705-708. (doi: 10.7550/rmb.2873085).
- Odell DK. 1975. Breeding biology of the California sea lion *Zalophus californianus*. *Rapp. P. V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 169: 374-378.
- Orr RT, Poulter TC. 1965 The pinniped population of Año Nuevo Island, California. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 32: 377-404.
- Osinska B, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Dolka I. 2014 Prevalence of *Dirofilaria repens* in dogs in central-eastern Poland and histopathological changes caused by this infection. *Bull. Veter. Instit. Pulawy* 58: 35–39. (doi:10.2478/bvip-2014-0006)
- Pantchev N, Etzold M, Daugschies A, Dyachenko V. 2011 Diagnosis of imported canine filarial infections in Germany 2008-2010. *Parasitol. Res.* 109 (Suppl. 1): 61–76.
- Patz JA, Olson SH, Uejio CK, Gibbs HK. 2008 Disease emergence from global climate and land use change. *Med. Clin. North Am.* 92: 1473–1491. xii. (doi:10.1016/j.mcna.2008.07.007)
- Patz JA, Olson SH, Uejio CK, Gibbs HK. 2008 Disease Emergence from Global Climate and Land Use Change. *Med. Clin. North Am.* 92: 1473-1491. (doi:10.1016/j.mcna.2008.07.007)
- Patz JA, Grabow ML, Limaye VS. 2014. When it rains, it pours: future climate extremes and health. *Ann Glob Health.* 80: 332-344. (doi: 10.1016/j.aogh.2014.09.007)
- Peñín I, Figueroa-Cabañas ME, Guerrero-de la Rosa F, Soto-García LA, Álvarez-Martínez R, Flores-Morán AE, Acevedo-Whitehouse. Enviado. Transcriptional Profiles of California Sea Lion Peripheral NK and CD +8 T Cells Reflect Ecological Regionalization and Infection by Oncogenic Viruses.
- Perry ML, Forrester DJ. 1971. *Dipetalonema odendhali* (Nematoda: Filarioidea) from the northern fur seal, with a description of the microfilaria. *J. Parasitol.* 57: 469-472.
- Perry ML. 1967. A new species of *Dipetalonema* from the California seal lion and a report of microfilariae from a Steller sea lion (Nematoda: Filarioidea). *J. Parasitol.* 53: 1076-1081.
- Peterson R, Bartholomew G. 1967. The Natural History and Behavior of California Sea Lion. American Society of Mammalogists, Special Publication. 1:79.
- Porrás-Peters H, Aurióles-Gamboa D, Cruz-Escalona VH, Koch PL. 2008. Trophic level and overlap of sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Mar. Mamm. Sci.* 24:554–576.
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. 1954. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 3:878–882.
- Rossi L, Pollono F, Meneguz PG, Gribaudo L, Balbo T. 1996. An epidemiological study of canine filarioses in north-west Italy, what is changed in 25 years? *Vet. Res. Commun.* 20: 308–315. (doi: 10.1007/BF00366536)
- Sassnau R, Daugschies A, Lendner M, Genchi C, Sato T, Higuchi T, Shibuya H. 2014. Climate suitability for the transmission of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Germany. *Vet. Parasitol.* 205: 239-245. (doi: 10.1016/j.vetpar.2014.06.034).

- Schrag SJ, Wiener P. 1995 Emerging infectious diseases: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends Ecol. Evol.* 10: 319–324.
- Schramm Y, Mesnick SL, de la Rosa J, Palacios DM, Lowry MS, Aurióles-Gamboa D, et al. 2009. Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Mar. Biol.* 156: 1375. (doi: 10.1007/s00227-009-1178-1)
- Schneider DS, Ayres JS. 2008 Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature Rev. Immunol.* 8: 889–895. doi:10.1038/nri2432
- Shocket MS, Ryan SJ, Mordecai EA. 2018. Temperature explains broad patterns of Ross River virus transmission. *Elife.* 28: 7. pii: e37762. (doi: 10.7554/eLife.37762)
- Simon F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA. 2012. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clin Microbiol Rev* 25: 507-544.
- Simon F, Kramer LH, Román A, Blasini W, Morchón R, Marcos-Atxutegi C, Grandi G, Genchi C. 2007. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. *Vet. Res. Comm.* 31: 161–171.
- Simpson JE, Hurtado PJ, Medlock J, Molaei G, Andreadis TG, Galvani AP, Diuk-Wasser MA. 2012. Vector host-feeding preferences drive transmission of multi-host pathogens: West Nile virus as a model system. *Proc Biol Sci.* 7;279(1730):925-33. doi: 10.1098/rspb.2011.1282.
- Smith KF, Acevedo-Whitehouse K, Pedersen AB. 2009 The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv.* 12: 1-12. (doi:10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x)
- Sohn E. 2017 Hothouse of Disease. *Nature.* 543: S44-S46.
- Soto-García LA. 2017. Distribución especial de Adenovirus entérico en el lobo marino de California y su relación con variables fisicoquímicas, geográficas y ecológicas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp 104.
- Soulsby E.J.L. 1965. Textbook of Veterinary Clinical Parasitology, Vol. 1, Helminths. Blackwell Scientific, Oxford, Pp. 113-114.
- Soulsby, E.J.L. 1987. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos VII Edición. Ed. Interamericana. México p. 308-311.
- Stroud RK, Dailey MD. 1978. Parasites and associated pathologies observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast. *J. Wildl. Dis.* 14: 292-298.
- Symes CB. 1960. A note on *Dirofilaria immitis* and its vectors in Fiji. *J. Helminthol.* 34:39-42.
- Szteren D, Aurióles Gamboa D. 2011. Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Cienc. Marinas.* 37: 349-368.
- Szteren D, Aurióles D, Gerber LR. (2006) Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. Sea Lions of the World Alaska Sea Grant College Program, Fairbanks. Pp. 369–384

- Szteren D, Auriolles-Gamboa D. (2013) Trace elements in bone of *Zalophus californianus* from the Gulf of California: A comparative assessment of potentially polluted areas. *Cienc. Mar.* 39: 303–315.
- Taylor AER. 1990. Studies on the microfilariae of *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *D. aethiops*. *J. Helminthol.* 34: 13-26.
- Taylor AER, Brown DH, Heyneman D, McIntyre RW. 1961. Biology of Filarioid Nematode *Dipetalonema spirocauda* (Leidy, 1858) from the Heart of Captive Harbor Seals and Sea Lions, Together with Pathology of the Hosts. *J. Parasitol.* 47: 971. (doi: 10.2307/3275035)
- Tibbetts J. 2007 Driven to extremes: health effects of climate change. *Environ. Health Perspect.* 115: A196 –A203.
- Trotti G, Canestri S, Pampiglione S, Rivasi F. 1997. The species of the genus *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911. *Parasitol.* Rome Dec.
<https://eurekamag.com/research/003/315/003315254.php> (accessed 10.6.18).
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. 2001 *Parasitología Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.
- Vera-Massieu C, Brock PM, Godínez-Reyes C, Acevedo-Whitehouse K. 2015 Activation of an inflammatory response is context-dependent during early development of the California sea lion. *Roy. Soc. Open sci.* 2: 150108.
(<http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150108>)
- Velarde E, Anderson DW. 1994. Conservation and management of seabird islands in the Gulf of California: setbacks and successes. En: *Seabirds on islands: treats, case studies and action plans*. D. N. Nettleship, J. Burger y M. Gochfeld (Eds.). Technical publication. ICPB, Cambridge. Pp: 229–243.
- Venco L, Vezzoni A. 2001. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats, p 161–177. In Simón F, Genchi C (ed), *Heartworm infection in humans and animals*. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
- Venco L, McCall JW, Guerrero J, Genchi C. 2004. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 124:259 –268.
- Vezzoni A, Venco L. 1998. Patogenesi, p 85–112. In Genchi C, Venco L, Vezzoni A (ed), *La filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto*, Editorial Scivac, Cremona, Italy.
- Webber WAF, Hawking F. 1955. Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. *Exp. Parasitol.* 4:143-164.
- White GL. 1975. *Dirofilaria immitis* and heartworm disease in the California sea lion. *J Zoo Anim Med.* 6: 23–24.
- Wilcox HS. 1960. Pulmonary arteriotomy for removal of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 136: 328–338.
- Winter H. 1959 The Pathology of Canine *Dirofilaria* immitis. *Am. J. Vet. Res.* 20: 366-371.
- Wu CC, Fan PC, Chang GN. 1995 Experimental infection and microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in dogs. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 23: 117-127.