



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EXPLORACIÓN DE LAS CAUSAS DE  
MORTALIDAD DEL LOBO MARINO DE  
CALIFORNIA *Zalophus californianus* EN ISLA  
MAGDALENA, B.C.S., MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**DANIELA BÁRCENAS DE LA CRUZ**

**LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2013**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"EXPLORACIÓN DE LAS CAUSAS DE MORTALIDAD DEL LOBO MARINO DE CALIFORNIA *Zalophus californianus* EN ISLA MAGDALENA, B.C.S., MÉXICO**

Presentada por el alumno:

**BÁRCENAS**

**DE LA CRUZ**

**DANIELA**

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro: 

B	1	1	0	3	0	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

**DR. DAVID AURIOL GAMBOA**  
Director de Tesis

**MC. CARLOS RAFAEL SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ**  
2º. Director de Tesis

**DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ**

**DRA. CLAUDIA JANETL HERNÁNDEZ CAMACHO**

**DR. FRANCISCO ALEJANDRO UZAL**

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

**DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ**



**IPN  
CICIMAR  
DIRECCION**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 22 del mes Noviembre del año 2013  
el (la) que suscribe MVZ. DANIELA BÁRCENAS DE LA CRUZ alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro B110303 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. DAVID AURIOLES GAMBOA Y MC. CARLOS RAFAEL SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"EXPLORACIÓN DE LAS CAUSAS DE MORTALIDAD DEL LOBO MARINO DE CALIFORNIA

*Zalophus californianus* EN ISLA MAGDALENA, B.C.S., MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: barcenasdaniela@gmail.mx - daurioles@gmail.com - csanchez@fortworthzoo.org

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MVZ. DANIELA BÁRCENAS DE LA CRUZ

*nombre y firma*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) por contribuir de manera tan importante en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por los apoyos económicos otorgados durante mi periodo como estudiante de posgrado.

:

A los proyectos de red del IPN. Estado de salud, uso sustentable y conservación del Golfo de California.2010-2012. Estudios isotópicos en mamíferos marinos. Fase II: Variabilidad regional de valores isotópicos del Golfo e California.2011. SIP-20110297.

Valores isotópicos de carbono y nitrógeno y estimación de niveles tróficos de organismos marinos frente a Bahía Magdalena. 2012. SIP-20120061.

Al proyecto CONACyT 132415, titulado Estudio integral sobre la lactancia del lobo marino de California: periodo crítico de la supervivencia de crías

Al Laboratorio de Morfofisiología de CICIMAR-IPN, por su colaboración en el procesamientos de muestras.

Al California Animal Health and Food Safety Laboratory, San Bernardino Branch y a la UC DAVIS por su apoyo durante las dos estancias realizadas que fueron cruciales para la realización de este trabajo.

Al departamento de Investigación del Hospital Dr. Gea González, en particular al Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Al Laboratorio de Brucelosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

Al Dr. David Auriolés por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio y brindarme su confianza y apoyo en este proyecto.

A mis maestros y miembros del comité, al Dr. Francisco Uzal, al Dr. Carlos Sánchez, al Dr. Sergio Martínez, a la Dra. Claudia Hernández Camacho y a la Dra. Isabel Ochoa, por todas sus enseñanzas, su orientación y aportaciones en mi formación, fueron todas muy valiosas.

Al Dr. René Torres, al cDr. Marcial Villalejo, y a Nancy por su paciencia y apoyo.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento y a la M.C. Liliana Suárez, a la Dra. Beatriz Arellano y a la cDra. Rosalía Ávalos, por su colaboración y apoyo.

A la Dra. Erika Carrillo, al Dr. Efrén Díaz y al Dr. Clemente Leyva, por su confianza y colaboración.

Además quiero agradecer a Dios por darme vida y salud.

A mis padres Chela y Daniel, y mi hermana Brenda por su incondicional apoyo y amor, sin ellos no hubiera podido realizar esta meta.

A mis amigos, las de toda la vida Pau, Norma y Maritza, y a los más recientes, porque han hecho este proceso mucho más divertido.

A mis tíos, que me recibieron y apoyaron en distintos lugares y que hicieron mucho más fáciles y divertidas mis estancias fuera.

A los integrantes del laboratorio, porque me dieron la oportunidad de conocer a personas maravillosas y hacer amistades invaluable. Especialmente a mis compañeras de las que aprendí grandes cosas.

A mis ángeles que siempre me han brindado apoyo y mucho cariño, Maty Agudelo, Lupita Salgado y Marlen Márquez, porque me han recibido en sus familias cuando estoy lejos de la mía.

A la familia De la Toba y a la familia Cahill por su hospitalidad y cariño.

Y de manera muy especial a Juan Carlos por todo su apoyo y sobre todo cariño a lo largo de esta etapa tan importante de mi vida.

## ÍNDICE

Lista de Figuras	iv
Lista de Tablas	viii
Glosario	ix
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1) Causas naturales	2
2) Antropogénicas	4
2. Antecedentes	6
3. Justificación	9
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	11
1) Objetivos particulares	11
6. Área de estudio	12
7. Metodología	13
1) Análisis retrospectivo	13
2) Estudio prospectivo	14
3) Registro	14
a) Escala de descomposición	15
4) Necropsia	15
Toma de muestras	17
5) Composición específica de los varamientos	18
6) Histopatología	18
7) Determinación de causa de muerte	18
8) Diagnóstico de <i>Leptospira</i> sp. mediante PCR	19
a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira</i> spp.	20
b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira biflexa</i> sensu lato (saprófitas)	20
c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato (patógenas)	21

9)	Diagnóstico de <i>Brucella</i> sp. mediante PCR	21
a)	Reacción en cadena de la polimerasa PCR para diagnóstico de <i>Brucella</i> sp.	22
10)	Diagnóstico de Morbillivirus mediante R-PCR	22
a)	Reacción reversa de la cadena de la polimerasa R-PCR para el diagnóstico de Morbillivirus	23
11)	Descripción de casos	23
8.	Resultados	24
1)	Análisis retrospectivo	24
2)	Estudio prospectivo	27
3)	Muestreo	27
4)	Necropsias	30
5)	Diagnóstico de <i>Leptospira</i> sp. mediante PCR	35
a.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira</i> spp	35
b.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira biflexa</i> sensu lato (saprófitas)	35
c.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato (patógenas)	36
6)	Diagnóstico de <i>Brucella</i> sp. mediante PCR	38
7)	Diagnóstico de Morbillivirus mediante R-PCR	38
8)	Casos relevantes	39
a.	Carcinoma colangiocelular	39
b.	Neumonía mixta	43
c.	Traumatismo craneal	46
9.	Discusión	50
1)	Aspectos generales de los varamientos de mamíferos marinos	50
2)	Análisis de las causas de muerte de lobos marinos	52
10.	Conclusiones	64
11.	Literatura citada	65
	ANEXO 1. Método histológico	80

ANEXO 2. Extracción de ADN y ARN	83
ANEXO 3. Protocolos de PCR para diagnóstico de <i>Leptospira</i> spp. <i>Brucella</i> spp. y Morbillivirus	86

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Composición de especies de mamíferos marinos varados (n = 602) en la playa occidental de Isla Magdalena B.C.S. de julio 2003 a julio 2006. (Tomado de Mercuri, 2007) 6
- Figura 2. Promedio de la frecuencia mensual de animales muertos en Isla Magdalena B.C.S., basado en registros semanales realizados en el periodo 2003-2010 (Ascencio, 2011) 7
- Figura 3. Playa occidental en Isla Magdalena B.C.S. (Ascencio, 2011). 12
- Figura 4. A) Incisiones primarias para acceder a las cavidades, B) cavidad abdominal expuesta, C) cavidad torácica expuesta después de retirar la parrilla costal (Geraci y Lounsbury, 1993). 16
- Figura 5. Procedimiento a seguir para llegar al diagnóstico. 17
- Figura 6. Hallazgos incidentales reportados en lobo marino de California durante los muestreos de 2003 a 2011. 24
- Figura 7. Distribución de los varamientos de lobo marino de California en la playa occidental de Isla Magdalena en el periodo comprendido de junio de 2003 a abril de 2011. 25
- Figura 8. Porcentajes por especie, de mamíferos marinos varados con evidencia de interacción antropogénica. 26

Figura 9. Promedios mensuales de varamientos de lobo marino y promedios mensuales de cetáceos y pinnípedos con evidencia de interacciones antropogénicas de 2003 a 2012. 26

Figura 10. Proporción de cetáceos y pinnípedos de varamientos en Isla Magdalena durante el periodo mayo-junio 2012. 27

Figura 11. Composición de animales varados por categoría de edad y sexo de lobo marino de California. 28

Figura 12. Mapa de distribución de varamientos de lobo marinos de California en Isla Magdalena durante el periodo mayo-junio 2012. 28

Figura 13. Frecuencia de animales muertos con distinto grado de descomposición encontrados en el periodo mayo-junio de 2012 en Isla Magdalena, lobo marino de California. 29

Figura 14. Categoría de causa de muerte de lobo marino de California. 30

Figura 15. Se muestra la banda blanca a la altura de las 482 pb en las muestras positivas, que representa la región amplificada del ADN de la bacteria. 35

Figura 16. Se muestra la ausencia de bandas a la altura de las 240pb, por lo que todas las muestras son consideradas negativas a la presencia de ADN de *Leptospira biflexa*. 36

Figura 17. Se muestra la banda esperada a la altura de las 660pb, en las primeras 7 líneas, (positivas), y la ausencia de bandas de este peso en las ultimas 4 líneas (negativas).	37
Figura 18. . Hígado invadido de masas tumorales.	39
Figura. 19 A) Se muestran pequeños nódulos en la capsula del riñón derecho. B) se muestra una úlcera en la mucosa gástrica así como el contenido hemorrágico.	40
Figura. 20. Células neoplásicas formando estructuras tubulares en el hígado del lobo marino. Tinción H/E.	41
Figura 21. Huevos de tremátodo dentro del lumen de un ducto biliar. Tinción H/E.	41
Figura 22. A) Émbolos neoplásicos en vasos sanguíneos de pulmón. B) Nemátodos y edema en los espacios alveolares. Tinción H/E.	42
Figura 23. Nódulo neoplásico ubicado en la capsula del riñón izquierdo. Tinción H/E.	42
Figura 24. A) Pulmón con áreas de consolidación y nódulos. B) Material espumoso en el lumen de la tráquea.	43
Figura 25. A) Congestión del músculo cardiaco y engrosamiento del saco pericárdico. B) Parásitos y restos de alimento en estómago.	44

Figura 26. Hígado incompleto por mordedura de coyote.	44
Figura 27.- A) Pulmón, se muestra presencia de células inflamatorias y bacterias rodeándola capsula del nódulo, así como edema. B) Nemátodos pulmonares y células inflamatorias.	45
Figura 28. Tinción de Gram en pulmón, tiñendo a las bacterias como cocobacilos Gram positivas.	45
Figura 29. Ejemplar juvenil de <i>Zalophus californianus</i> con severa inflamación del rostro.	46
Figura 30.A) Área desprendida de tejido sobre el hueso parietal. B) Gastritis parasitaria.	47
Figura 31. Se muestra la coloración eosinofílica de algunas neuronas afectadas por isquemia. Tinción H/E.	47
Figura 32. A) Fractura de mandíbula y exoftalmía. B) Pobre condición corporal del animal.	48
Figura 33. Pulmón con presencia de múltiples nódulos.	48
Figura 34. Masas alargadas de color amarillo en la porción caudal del bazo.	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Lesiones macroscópicas	31
Tabla II.- Lesiones microscópicas	32
Tabla III.- Causa de muerte y grado de descomposición	33
Tabla IV.- Prevalencia de causas de muerte de acuerdo a categoría de edad y sexo.	34
Tabla V.- Resumen de resultados PCR diagnóstico de <i>Leptospira</i> .	37

## GLOSARIO

**Ácido domoico:** Aminoácido hidrosoluble tóxico producido por algunas algas, relacionado con la disponibilidad y captación ambiental de sílice, fósforo nitrógeno y trazas de hierro.

**Anisocariosis:** Se refiere al distinto tamaño nuclear entre células de la misma estirpe en la muestra y especialmente significativa entre los núcleos de células multinucleadas.

**Anisocitosis:** Excesiva variación del tamaño de los glóbulos rojos.

**Bacteremia:** Presencia de bacterias en la sangre.

**Carcinoma:** Tumor maligno de origen en células epiteliales o glandulares.

**Carcinoma colangiocelular:** Tipo de cáncer que se desarrolla a partir de las células de las vías biliares.

**Cardiomegalia:** Agrandamiento anormal del corazón o hipertrofia cardíaca.

**Colestasis:** Estado patológico que consiste en la reducción o interrupción del flujo de bilis.

**Congestión:** Exceso de sangre en los vasos de un órgano o de una parte del órgano.

**Diagnóstico:** Determinación o identificación de una enfermedad o estado mediante el examen de los síntomas que presenta.

**Edema:** Acumulación de líquido en los tejidos del cuerpo.

**Emaciación:** Adelgazamiento patológico.

**Enteritis:** Inflamación en el intestino delgado.

**Eosinofílico:** Tendencia de una célula, tejido u organismo a teñirse fácilmente con la eosina.

**Esplenomegalia:** Agrandamiento anormal del bazo.

**Exoftalmia:** Propulsión notable del globo ocular de la cavidad orbitaria que lo contiene.

**Etiología:** Describe la causa o causas de una enfermedad.

**Fócidos:** Miembros de la familia *Phocidae*, también llamadas focas verdaderas.

**Geriatra:** Individuo de edad avanzada.

**Hábitat:** Lugar de condiciones apropiadas para que viva un organismo, especie o comunidad animal o vegetal.

**Hallazgos patológicos:** Cualquier lesión o cambio identificado en un organismo distinto de lo normal encontrado al examinar un individuo.

**Hepatomegalia:** Inflamación del hígado más allá de su tamaño normal.

**Hipotermia:** Condición de temperatura corporal peligrosamente baja.

**Histopatología:** Rama de la patología que estudia el diagnóstico de enfermedades a través de los tejidos.

**Ictericia:** Cambio de color a amarillo pálido de la piel y ojos, causado por un exceso de bilirrubina.

**Inanición:** Reducción grave de nutrientes, vitaminas e ingesta de energía.

**Índice mitótico:** Número de células en mitosis dividido por el número total de células encontradas.

**Macroparásitos:** Endoparásitos y ectoparásitos de mayor tamaño que los microparásitos, y con tendencia a producir generaciones por las tiempo. Por lo general no se multiplican directamente dentro de sus hospedadores.

**Microparásitos:** Microorganismos que se caracterizan por su tamaño pequeño y rápida capacidad de multiplicarse dentro de un organismo hospedero.

**Metástasis:** Movimiento o diseminación de células cancerosas de un órgano o tejido a otro.

**Migración:** Desplazamiento de un individuo o grupos de individuos de un lugar de origen a otro, llevando consigo un cambio de hábitat o residencia.

**Meningoencefalitis:** Proceso inflamatorio e infeccioso ubicado a nivel de las leptomeninges, y que compromete meninges, espacio subaracnoideo y parénquima cerebral.

**Necropsia:** Procedimiento de disección anatómica sistemática de un animal o humano para determinar la causa de su muerte.

**Necrosis:** Muerte de tejido corporal, que ocurre cuando no está llegando suficiente sangre al tejido, ya sea por lesión, radiación o por sustancias químicas.

**Neoplasia:** Alteración de la proliferación o diferenciación celular que se manifiesta por la formación de una masa o tumor.

**Neumonía:** Afección respiratoria en la cual hay una infección del pulmón.

**Nódulo:** Protuberancia elevada y sólida en la piel o debajo de esta que mide más de medio centímetro de ancho.

**Otáridos:** Miembros de la familia *Otariidae*, también llamadas falsas focas.

**Parénquima:** Tejido que hace de un órgano algo funcional.

**Patógeno:** Agente que puede producir enfermedad o daño a la biología del huésped.

**Patología:** Rama de la medicina encargada del estudio de las enfermedades.

**PCR:** Siglas de Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

**Pericarditis:** Afección en la cual la cubierta similar a un saco alrededor del corazón (pericardio) resulta inflamada.

**Pinnípedos:** Superfamilia *Pinnipedia*, junto con los cetáceos y sirenios son los únicos mamíferos marinos adaptados a la vida acuática. Incluye a las focas falsas y a las focas verdaderas.

**Poliartritis:** Artritis simultánea que afecta varias articulaciones.

**Prevalencia:** Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un periodo determinado.

**Supurativo:** Se dice de lo que activa la formación de pus.

**Surgencias:** Movimientos ascendentes mediante los cuales las aguas de los niveles subsuperficiales del océano son llevadas hasta la superficie, produciéndose así un aporte de nutrientes a las aguas superficiales.

**Varamiento:** Encallamiento de animales acuáticos en la arena de la playa o en la orilla del mar.

## RESUMEN

La mortalidad de mamíferos marinos, especialmente la del lobo marino de California (*Zalophus californianus*), puede deberse a diversas causas tanto naturales como antropogénicas (inanición, depredación, enfermedad, traumatismos, enmalles, etc.). Actualmente, se sabe que en la costa occidental de Isla Magdalena, B.C.S., gran cantidad de mamíferos marinos muertos son arrojados a la playa como consecuencia de corrientes superficiales y vientos. El objetivo de este trabajo es explorar las posibles causas de muerte así como otros hallazgos patológicos en lobos marinos encontrados muertos en la playa occidental de Isla Magdalena. Durante el año 2012 se continuó el monitoreo semanal de mamíferos marinos que se ha realizado desde 2003; adicionalmente se realizó un monitoreo intensivo de 32 días continuos en los meses de mayo y junio. Se realizaron necropsias y toma de muestras de tejidos para estudios patológicos y microbiológicos que permitieron junto con la inspección del cadáver, conocer la causa de muerte de los individuos. Se practicó necropsia a 19 animales, 11 machos, 7 hembras y 1 indeterminado. La clase de edad de estos organismos estuvo compuesta por 14 juveniles, 1 subadultos y 4 adultos. Las causas de muerte encontradas durante este periodo fueron: traumatismo craneal (TC) 42%, cáncer 5.2%, neumonía 5.2%, e indeterminada 47% debido al alto grado de descomposición. Además, se realizaron pruebas moleculares para el diagnóstico de *Leptospira* spp., *Brucella* spp. y Morbillivirus a los 4 ejemplares que se encontraron en condiciones óptimas para este tipo de pruebas, de los cuales el 75% fueron positivos a *Leptospira interrogans* y ninguno a *Brucella* spp. y Morbillivirus. El alto grado de descomposición jugó un papel determinante en el fallo del diagnóstico de las causas de muerte en algunos animales. Sin embargo, este estudio nos muestra que existe una alta incidencia de TC presuntamente de origen antropogénico, así como patologías que pudieran llegar a ser de importancia ecológica y epidemiológica como son el cáncer y la leptospirosis, por lo que es necesario mantener un monitoreo constante de las condiciones de salud así como las causas de muerte de las poblaciones mexicanas de *Z. californianus*.

**Palabras clave:** Patología, varamientos, pinnípedos, histopatología, cáncer.

## ABSTRACT

The mortality of marine mammals, specially the California sea lion (*Zalophus californianus*), may be caused to a variety of natural and anthropogenic causes such as, malnutrition, predation, illness, trauma, entanglement in fishing nets, etc. It is known that in the west coast of Isla Magdalena B.C.S., Mexico, a large amount of marine mammals are washed ashore, as a consequence of the coast configuration, winds and sea currents. The main object of this study, is to explore the possible causes of death, as well as some other pathological findings in sea lions found dead in the west beach of Isla Magdalena. During 2012, the weekly monitoring of deaths of marine mammals, which has been done since 2003, was continued. Additionally a continuous 32 day intensive monitoring was made during the months of May and June. Necropsies were performed, as well as sample collection for pathological and microbiological analysis, which together with the inspection of the carcasses, gave us information about the cause of death. Necropsies were performed on 19 animals of which, 11 were males, 7 were females, and 1 indeterminate, 14 were juveniles, 1 subadults, and 4 adults. The causes of death found in this period were: cranial trauma 42%, cancer 5.2%, pneumonia 5.2% and indeterminate cause 47% due to the poor carcass condition. Molecular analysis by PCR were made in order to diagnose *Leptospira* spp., *Brucella* spp. and Morbillivirus on the 4 animals with optimal carcass condition, of which 75% were positive to *Leptospira* spp., none to *Brucella* spp. and Morbillivirus. The high degree of decomposition played an important role in the miss diagnosis of the cause of death, in many of the animals found. However, this research reveals a high incidence of cranial trauma, probably of anthropogenic cause, as well as pathologies of epidemiological and ecological importance, such as leptospirosis and cancer. Therefore, the continuous monitoring of health condition and causes of death of the mexican population of *Z. californianus* is necessary.

**Key words:** Pathology, strandings, pinnipeds, histopathology, cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mortalidad de mamíferos marinos como consecuencia de factores como inanición, depredación, traumatismos o enfermedades puede registrarse en algunas costas del mundo, donde la incidencia de animales arrojados a la playa es alta por efecto de corrientes superficiales y la configuración de la costa (Geraci & Lounsbury, 1993). Los resultados de estudios de población en distintas especies de mamíferos en las últimas décadas, nos permiten hacer algunas generalizaciones acerca de los niveles normales de mortalidad. De manera típica, en los pinnípedos la tasa de mortalidad es más alta en los ejemplares más jóvenes así como en los geriatras, además, en especies poligínicas, los machos tienen tasas de mortalidad más altas que las hembras (Caughley, 1966; Ralls *et al.*, 1980).

Alrededor del 25% de las crías de lobo marino de California *Zalophus californianus* en ciertas poblaciones no sobreviven al primer año de vida (Hernández-Camacho *et al.*, 2008). Los episodios de mortalidad, afectan más comúnmente a uno o más segmentos de la población, en los que influyen factores como la distribución de los individuos por edad y sexo dentro de las colonias, las diferencias en el comportamiento, la alimentación o la preferencia de hábitat, o incluso las cargas contaminantes ambientales presentes (Ralls *et al.*, 1980). De tal modo que la comprensión de las causas y patrones normales de mortalidad permite detectar sucesos inusuales y determinar su impacto sobre una población.

Podemos dividir las causas de mortalidad en dos grupos: 1) causas naturales y 2) antropogénicas.

### 1) Causas naturales

La inanición es una de las causas de muerte más comunes en ejemplares jóvenes de mamíferos marinos, los cuales dependen de sus madres para su

alimentación, y es la causa aislada más importante de mortalidad en crías de muchas especies de pinnípedos (Keyes, 1965; Le Boeuf *et al.*, 1972). Los animales desnutridos pueden no vivir el suficiente tiempo para alcanzar un estado de inanición, pero morir de causas asociadas a esta, como hipotermia, pérdida de electrolitos o enfermedad. Al conjunto de síntomas asociados a la desnutrición y enfermedades se le denomina Síndrome de Malnutrición-debilitamiento-enfermedad (Keyes, 1965).

Cuando las poblaciones gradualmente alcanzan la capacidad de carga de su hábitat, los efectos del estrés por desnutrición son notables en su tasa de nacimientos y de supervivencia de juveniles, llevándolos a una lenta disminución de su número. Por el contrario, en un evento episódico, como la repentina desaparición de las presas, se esperaría que se presentaran consecuencias inmediatas y más dramáticas, incluso en todos los segmentos de la población (Aurioles & Le Boeuf, 1991; Trillmich & Limberger, 1985).

Los mamíferos marinos se han adaptado a variables y comúnmente extremas condiciones climáticas. Aun así muchos individuos mueren como consecuencia directa de estos factores. Condiciones climáticas inusuales como las generadas por El Niño, fuertes tormentas, rupturas tempranas de hielo, o bajas temperaturas prolongadas, pueden tener un impacto en sus poblaciones (Geraci *et al.*, 1999).

Las crías de pinnípedos en colonias muy pobladas pueden sufrir traumatismos al ser aplastadas por los adultos, mordidas o ahogadas durante tormentas (Keyes, 1965, Le Boeuf *et al.*, 1972). Los animales jóvenes, enfermos o debilitados son los más susceptibles a la depredación por una gran variedad de carnívoros. Las crías de pinnípedos son especialmente vulnerables ya que nacen en lugares y tiempos predecibles. De igual manera lo son los individuos que migran o se dispersan, que en el caso de los mamíferos, suelen ser los machos de distintas edades (Riedman, 1990; Geraci *et al.*, 1999).

Varios artículos publicados en la última década, indican que las enfermedades más comúnmente reportadas para el lobo marino de California son principalmente de carácter infeccioso, neoplásico y tóxico (Gulland *et al.*, 2002; Nollens *et al.*, 2006; Colgrove *et al.*, 2009).

Los mamíferos marinos tienen un amplio rango de enfermedades producidas por parásitos, las cuales son frecuentemente predecibles en cuanto a su ocurrencia y severidad (Geraci & St. Aubin, 1987). Diversos microorganismos se desarrollan en hábitats marinos, pero rara vez representan riesgo para los ejemplares sanos. Las bacterias oportunistas como el *Streptococcus spp.*, *Vibrio spp.*, y *Corynebacterium spp.*, pueden invadir a aquellos ejemplares débiles, heridos, o con infecciones causadas por otros agentes parasitarios o infecciosos (Stroud & Roffe, 1979; Baker, 1987; Baker & McCann, 1989).

En el lobo marino de California se han reportado infecciones parasitarias graves causadas por *Otostrongylus circumlitus* (Terra *et al.*, 2005), el complejo enteritis/bacteremia que consiste en enteritis causada por el parásito *Uncinaria spp.*, la cual está asociada de manera secundaria a bacteremia, y de la cual se han aislado principalmente *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, y *Escherichia coli*, (Spraker *et al.*, 2007). Se han aislado también otras bacterias como *Mycoplasma spp.* como agente causal de neumonía y poliartritis, (Haulena *et al.*, 2006), y *Archanobacterium phocae* de lesiones supurativas (Johnson *et al.*, 2003).

Existen también algunos casos reportados de meningo-encefalitis por migración aberrante de parásitos como *Zalophotrema hepaticum* (Fauquier *et al.*, 2004). La leptospirosis causada por la espiroqueta *Leptospira sp.*, se ha presentado de manera frecuente en el lobo marino de California en localidades de la costa occidental de E.U.A. así como en el Golfo de California (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Se pensaba que algunos agentes bacterianos incluyendo *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* y *Brucella spp.*, solo se encontraban en mamíferos terrestres, pero ahora también se han encontrado en cetáceos (*Brucella ceti*) y en pinnípedos (*Brucella pinnipedialis*) (Foster *et al.*, 2007).

A finales de 1970, muy pocos virus se habían aislado de mamíferos marinos, (Smith & Skilling, 1979) y no se consideraban de importancia como causa de mortalidad. A partir de 1990 la lista de virus ha crecido rápidamente; probablemente debido a la mayor disponibilidad de herramientas para su estudio, y de la misma manera lo ha hecho nuestra comprensión sobre su importancia tanto en los individuos como en las poblaciones (Geraci *et al.*, 1999). Existen reportes de algunos agentes virales como responsables de enfermedad y muerte, como es el caso de Herpesvirus (King *et al.*, 2002), Morbillivirus (Stone *et al.*, 2012) Parapoxvirus (Nollens *et al.*, 2006), Calicivirus (Van Bonn *et al.*, 2000) y Adenovirus (Goldstein *et al.*, 2011).

Se han encontrado neoplasias con relativa frecuencia en el lobo marino de California. Casos de carcinoma hepático (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 1999), carcinoma de glándula mamaria (Matsuda *et al.*, 2003), carcinoma urogenital (Colegrove *et al.*, 2009; Lipscomb *et al.*, 2000) y carcinoma de células escamosas (Sato *et al.*, 2002) han sido reportados en esta especie.

Dentro de las enfermedades de origen toxicológico que se ha presentado de manera importante en los últimos años, están principalmente las causadas por biotoxinas, como es el caso del ácido domoico (Goldstein *et al.*, 2009) y las ocasionadas por contaminantes, pesticidas y residuos industriales (Kajiwara *et al.*, 2002; Stapleton *et al.*, 2006) en las costas de California.

## **2) Antropogénicas**

Estas pueden ser directas, como la caza comercial, la cual ha disminuido en gran medida durante el siglo XX y el presente siglo, interacciones con pesquerías, como la captura incidental y enmalle, colisiones con embarcaciones, derrames y fugas. O indirectas como lo son descargas de sustancias y materiales contaminantes, destrucción y modificación del hábitat, sobre explotación pesquera, etc. (Kovacs *et al.*, 2012; SEMARNAT, 2013 ).;

En la costa occidental de Isla Magdalena B.C.S., se presenta anualmente una cantidad considerable de animales muertos arrojados a la playa por efecto de corrientes superficiales y vientos, la cual se incrementa de manera estacional durante los meses de mayo a junio, por lo que se decidió aprovechar estos ejemplares para tratar de obtener la mayor información posible sobre las causas de muerte. Esto a través del monitoreo intensivo, realización de necropsias, histopatología y diagnóstico de algunos agentes microbiológicos.

## 2. ANTECEDENTES

Desde junio de 2003 a la fecha, se ha realizado un monitoreo constante de los varamientos de mamíferos marinos en la playa occidental de Isla Magdalena B.C.S., México. A partir de estos registros se sabe que la mayoría de los varamientos de mamíferos marinos corresponden al lobo marino de California (Fig. 1) (Mercuri, 2007).

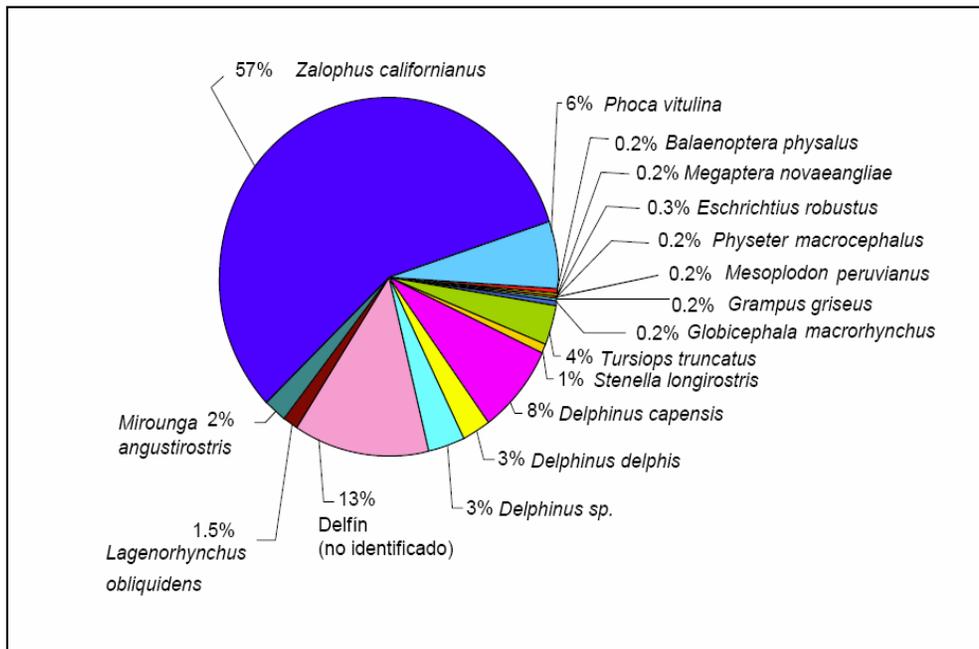


Figura 1.- Composición de especies de mamíferos marinos varados (n = 602) en la playa occidental de Isla Magdalena B.C.S. de julio 2003 a julio 2006 (tomado de Mercuri, 2007).

Recientemente, Ascencio (2010) confirmó que el lobo marino de California fue la especie más abundante en los varamientos a lo largo del periodo de estudio que comprendió de julio del 2003 a junio del 2009, así como que estos se encontraron con mayor frecuencia entre abril y julio de cada año (Fig. 2) (Ascencio, 2010).

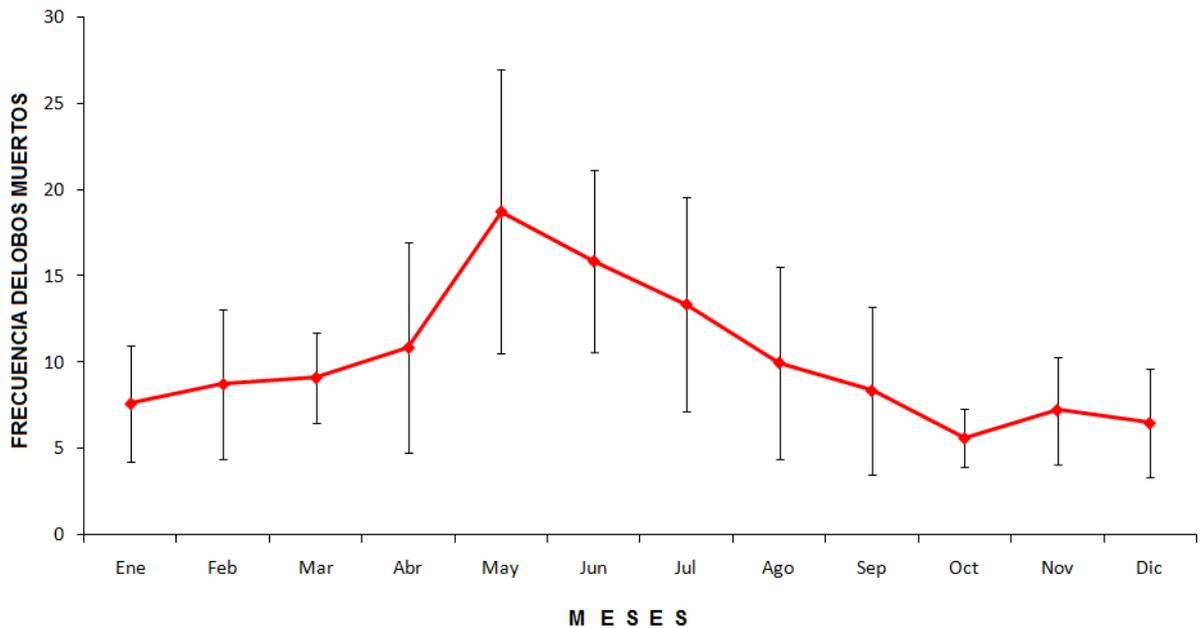


Figura 2.- Promedio de la frecuencia mensual de animales muertos en Isla Magdalena B.C.S., basado en registros semanales realizados en el periodo 2003-2010 (Ascencio, 2011).

También que la abundancia mensual de los lobos marinos muertos en Isla Magdalena estuvo positivamente asociada a la abundancia de lobos marinos vivos en Isla Santa Margarita (80 km al sur).

Además realizó una comparación entre la estructura de edad y sexo de los animales muertos en Isla Magdalena y la estructura de edad y sexo esperada de acuerdo al patrón de mortalidad de la población de lobos marinos de Isla Santa Margarita, esto reflejó que la cantidad de animales encontrados varados es baja respecto a lo proyectado en la tabla de vida. Los machos fueron la categoría con mayor índice de varamientos lo cual era lo esperado de acuerdo a las tasas de supervivencia en la tabla de vida (Hernández- Camacho *et al.*, 2008).

Encontró también que los animales que mueren en el mar a partir de 15 millas, tienen una nula probabilidad de regresar a la orilla, por lo que no podrán ser registrados.

Sin embargo, aún no se han establecido las causas de muerte de la mayoría de los animales que arriban a esa playa, y solo un pequeño porcentaje (4%) parece haber muerto por causas antropogénicas (ahogamiento en redes, golpes, herida de bala, etc.).

Existen pocos reportes sobre mortalidad del lobo marino en el Golfo de California, sin embargo se han realizado algunos estudios diagnósticos en los que se ha encontrado evidencia de la presencia de algunos microorganismos como *Leptospira interrogans*, *Moraxella*, *Micrococcus*, and *Corynebacterium* en algunas colonias (Acevedo- Whitehouse *et al.*, 2003; Hernández-Castro *et al.*, 2005). Así como algunos reportes aislados de enfermedades neoplásicas como carcinoma hepático (Acevedo- Whitehouse *et al.*, 1999).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Se conoce que los varamientos de lobo marino en Isla Magdalena B.C.S., se incrementan de manera estacional (primavera-verano), probablemente porque es la época de mayor concentración de animales en la zona, pero se desconoce en gran medida cuales son las causas de muerte de esta especie en esta región, por lo que estos varamientos representan una buena oportunidad para investigarlas.

Conocer las causas de mortalidad permitirá definir qué enfermedades son las más comunes en esta especie, identificar enfermedades emergentes y si estas representan algún riesgo de transmisión para otros mamíferos marinos y terrestres.

La estacionalidad de los varamientos y muertes de lobos marinos en Isla Magdalena, el bajo registro de causas antropogénicas y la relativa alta frecuencia de casos en que la desnutrición es visible en los animales, sugiere que las causas de muerte pudieran relacionar a la malnutrición y distintas enfermedades.

#### **4. HIPOTESIS**

La mayor parte de los varamientos de lobos marinos en Isla Magdalena se presenta al inicio del periodo reproductivo (mayo-junio), época en la que incrementa la densidad de animales. La mayoría de los animales varados en años anteriores eran juveniles (quienes aún no son muy hábiles para obtener su alimento) y presentaron pobre condición corporal y ausencia de contenido estomacal.

Esta evidencia sugiere que las principales causas de muerte podrían explicarse dentro del síndrome de malnutrición (desnutrición-debilitamiento-enfermedad).

## **5. OBJETIVO**

Evaluar las causas de muerte de lobos marinos encontrados en la costa occidental de Isla Magdalena B.C.S., a través de necropsias y estudios clínicos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar las lesiones presentes en lobos marinos varados en la Isla Magdalena
- 2.- Definir la etiología de las lesiones encontradas
- 3.- Determinar la prevalencia de las lesiones en las diferentes categorías de edad y sexo
- 4.- Analizar los registros de varamientos y comparar con datos de años anteriores y de otras especies

## 6. ÁREA DE ESTUDIO

Isla Magdalena se localiza al norte de la Isla Santa Margarita (Fig. 3); es una isla angosta mayormente arenosa situada en el litoral oeste del municipio de Comondú, en el Estado de Baja California Sur. A partir de la punta rocosa denominada Cabo San Lázaro y hacia el norte se extiende una playa arenosa de 52 km de extensión en la que es frecuente encontrar varamientos de múltiples especies incluyendo mamíferos marinos (Ascencio, 2010).

En ISM (Isla Santa Margarita) se encuentra la colonia reproductora que origina a la mayoría de los animales que habitan la región de Bahía Magdalena y cuyo número varía alrededor de 3,000 individuos (Aurioles, datos no publicados<sup>1</sup>).

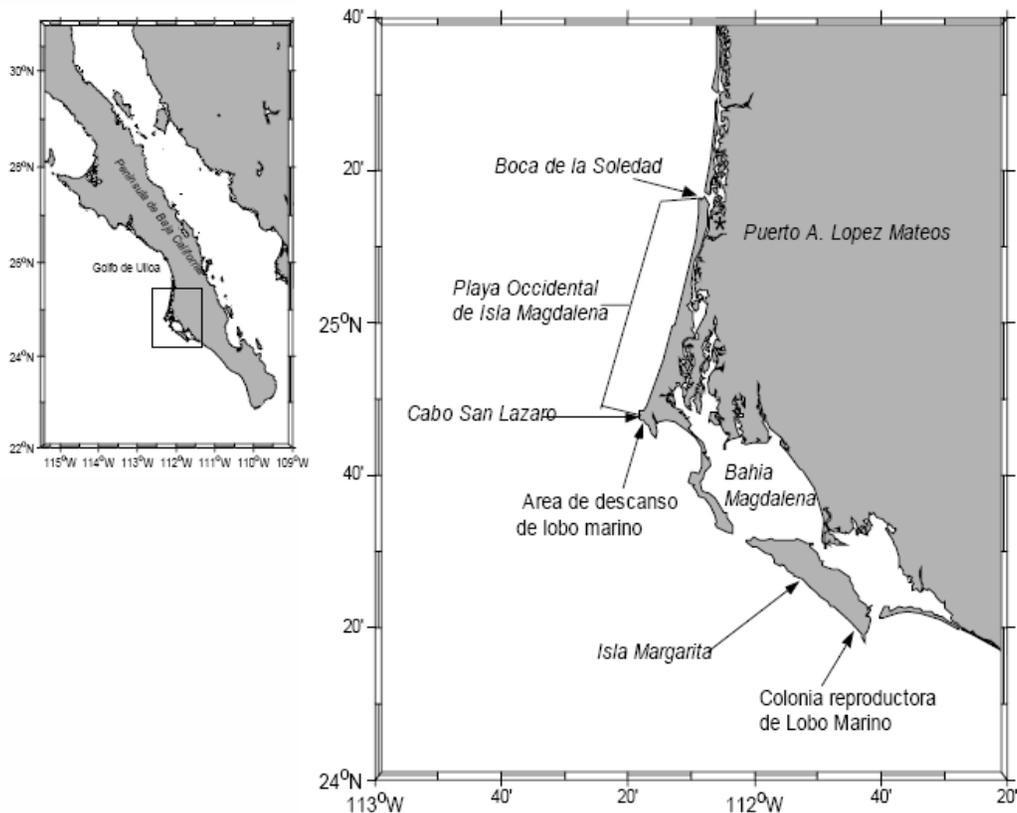


Figura 3. Playa occidental en Isla Magdalena B.C.S. (Tomado de Ascencio, 2011).

(1) Aurioles-Gamboa, D. 2011. Datos no publicados. Laboratorio de Ecología de Pinnípedos. CICIMAR-IPN. La Paz. México.

## 7. METODOLOGÍA

### 1) Análisis retrospectivo (2003-2010)

Se revisaron las observaciones en la base de datos de varamientos de lobo marino de California en Isla Magdalena, desde 2003, y se encontró que algunos registros contaban con información que pudo ser relacionada con la causa de muerte en años anteriores a este muestreo. De acuerdo a esto la información se clasificó en 4 diferentes categorías:

**Antropogénicas:** Se refiere a cualquier tipo de herida o lesión ocasionada o relacionada con el ser humano, como enmalles en redes de pesca, heridas de bala, ingesta de objetos extraños, golpes con embarcaciones, etc.

**Traumáticas no antropogénicas:** Cualquier herida o lesión que no fue originada por el ser humano como mordidas de tiburón, heridas adquiridas durante peleas, etc.

**De salud:** Son lesiones ocasionadas por la presencia de alguna enfermedad, ya sea infecciosa o no, por ejemplo cargas parasitarias elevadas, neoplasias, nódulos, abscesos, cataratas, entre otras.

**Nutricionales:** Son observaciones que tienen que ver con el estado nutricional del animal, como emaciación, presencia o ausencia de alimento en estómago.

Se graficaron los puntos de ubicación geográfica de los varamientos de *Z. Californianus* de todos los años por medio del programa Surfer v8, los cuales fueron obtenidos mediante un geo posicionador satelital y que han sido registrados en la base de datos. Esto para saber si se concentran en alguna

parte de la isla o si se distribuían al azar, y por lo tanto saber si era necesario concentrar el esfuerzo en algún área en particular.

Además, se revisó la base de datos de varamientos de mamíferos marinos (cetáceos y pinnípedos) con la que cuenta el laboratorio desde 2003 a 2010, buscando registros de evidencia de interacción antropogénica, posteriormente se agregaron los datos del muestreo más reciente (2011-2012) y se obtuvieron los promedios mensuales de todos los años.

## **2) Estudio prospectivo (2011-2012)**

Se recorrió la playa occidental de Isla Magdalena una vez a la semana en busca de los cuerpos de lobo marino de California varados a lo largo de un año.

Adicionalmente a este esfuerzo semanal, se hizo un muestreo intensivo durante la temporada de mayor incidencia de varamientos, del 3 de mayo al 2 de junio del 2012, donde se realizaron recorridos diarios a lo largo de la playa occidental de Isla Magdalena, y un muestreo posterior el día 23 de julio. Adicionalmente se realizó un muestreo en Isla Santa Margarita el día 24 de junio del mismo año. Durante este muestreo se realizaron los recorridos al bajar la marea, con la finalidad de encontrar cuerpos frescos varados arrastrados por la última marea alta y proceder a la necropsia

## **3) Registro**

Para el registro de los varamientos se consideraron algunos datos básicos como fecha, ubicación geográfica, especie, sexo, categoría de edad, medidas morfométricas, grado de descomposición, presencia de marcas, heridas o redes, etc., Con base a estos datos se asignó una clave de identificación a cada uno de los animales examinados, la cual consta de 15 dígitos, donde los primeros dos números representan el año en el que se colectó el ejemplar, seguido de las iniciales de la región donde se colectó, la fecha de acuerdo al

calendario juliano, las iniciales de la especie, sexo, categoría de edad, el grado de descomposición y finalmente el número de caso.

Por ejemplo la siguiente clave: 12 CSL 125 ZC H J 4 01 indica que el ejemplar fue colectado en el año 2012, en la localidad de Cabo San Lázaro, , el día 125 de acuerdo a la fecha en el calendario juliano, que la especie fue *Z. californianus*, que era una hembra, juvenil, en grado de descomposición 4 y era el caso número 01.

### **Escala de descomposición**

Para medir el grado de descomposición en el que se encontraron los animales, y determinar si eran aptos para la necropsia y qué tipo de muestras era posible tomar, se utilizó la escala propuesta por Geraci & Lounsbury (1993), la cual va del 1 al 5, donde:

**Grado 1:** Animal vivo.

**Grado 2:** Apariencia normal, sin mal olor, poca desecación de la piel, poca o nula producción de gas, órganos de apariencia normal, sin hinchar, lengua y pene sin protruir, grasa subcutánea firme y blanca, músculos firmes y color rojo oscuro, células sanguíneas intactas, vísceras intactas y bien definidas, poco gas en intestinos, cerebro firme, sin decoloración, fácil de remover

**Grado 3:** Cadáver intacto, hinchamiento evidente, piel cuarteada, daño por carroñeros, olor moderado, membranas mucosas secas, ojos hundidos o sin ojos, grasa subcutánea teñida de sangre y grasosa, músculos suaves y poco definidos, sangre hemolizada de color oscuro, vísceras suaves, friables, pero intactas, intestinos dilatados por el gas; cerebro suave, se distinguen las superficies, coloración rojiza oscura, frágil , pero puede ser removido.

**Grado 4:** El cadáver puede estar intacto pero colapsado, la piel se desprende, daño importante por carroñeros, olor fuerte; grasa subcutánea suave, a menudo con huecos hechos por burbujas de gas; músculos casi licuados y se rompen fácilmente; desprendimiento de huesos fácilmente, sangre delgada y oscura; viseras identificables pero friables, difíciles de diseccionar; intestinos llenos de gas; cerebro suave, rojo oscuro, con agujeros por burbujas de gas. .

**Grado 5:** La piel puede desprenderse fácilmente, restos secos, esqueleto expuesto.

#### 4) Necropsia

El procedimiento de necropsia en mamíferos marinos se realizó según la técnica descrita por Geraci & Lounsbury (1993) (Figs. 4 y 5).

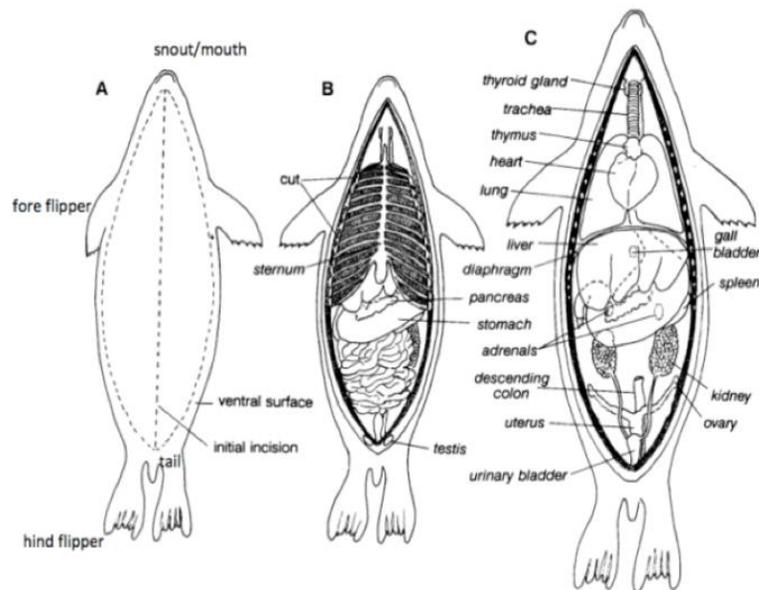


Figura 4. A) Incisiones primarias para acceder a las cavidades, B) cavidad abdominal expuesta, C) cavidad torácica expuesta después de retirar la parrilla costal (Geraci y Lounsbury, 1993).

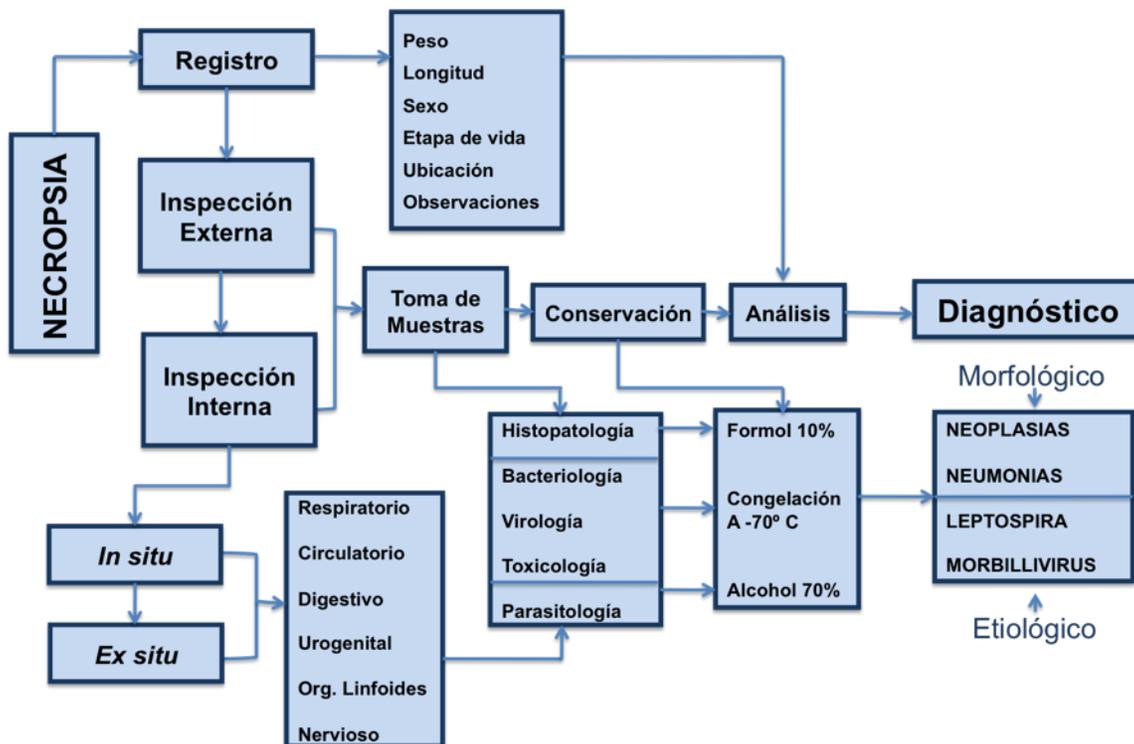


Figura 5.-Procedimiento a seguir para llegar al diagnóstico.

Durante la realización de cada necropsia, se tomó el registro de los hallazgos macroscópicos en un formato previamente diseñado, posteriormente se realizó una tabla donde se muestran las lesiones encontradas para cada organismo examinado

#### a. Toma de muestras

De igual manera, se realizó la toma de muestras para pruebas microbiológicas e histopatológicas de acuerdo a las técnicas descritas por Dierauf (1990) y Geraci & Launsbury (1993).

Para histopatología, se tomaron piezas de 1 cm de espesor, de los órganos de interés y se colocaron en frascos previamente identificados, con formol amortiguado al 10% a un volumen de 1:10.

Para microbiología se tomaron piezas de 1cm<sup>3</sup> y se colocaron en crioviales, se etiquetaron y colocaron en una hielera para su transporte, al llegar a la estación se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

## **5) Composición específica de los varamientos**

De los datos obtenidos durante el muestreo, se realizó el análisis de la composición de los varamientos.

## **6) Histopatología**

Las muestras previamente fijadas en formol se procesaron para su deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol en un procesador de tejidos, posteriormente fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes de 5µm los cuales se tiñeron con Hematoxilina y Eosina y se les aplicó un cubreobjeto (Anexo I). En los casos en los que se consideró necesario de acuerdo a lo observado mediante la técnica de Hematoxilina y eosina, se aplicaron técnicas de tinción adicionales, como la tinción de Gram para la clasificación de bacterias y la tinción de plata para identificación de espiroquetas.

La observación e interpretación fue realizada en el California Animal Health and Food Safety Laboratory, de la Universidad de California, Davis en San Bernardino, California, E.U.A. Con los resultados obtenidos de todas las laminillas analizadas se realizó una tabla, donde se indican las lesiones encontradas para cada ejemplar examinado.

## **7) Determinación de causa de muerte**

La causa de muerte se asignó de acuerdo a las lesiones encontradas en cada animal, considerando tanto las lesiones macroscópicas y microscópicas así

como los resultados microbiológicos en los casos en los que fue posible realizarlas. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudieron agrupar las causas de muerte en cuatro categorías:

### **Traumatismo**

Se atribuyó esta causa de muerte a aquellos organismos que presentaron evidencia de algún tipo de golpe o herida en la cabeza, muchos de estos presentaban fracturas importantes de los huesos del cráneo principalmente de maxilares, mandíbulas, hueso nasal, frontal y parietal, así como a otras lesiones traumáticas en diferentes áreas del cuerpo.

### **Neoplásicas**

La muerte fue originada por un proceso neoplásico, en este caso carcinoma colangiocelular, que derivó en falla hepática.

### **Infecciosas**

La muerte fue ocasionada por un agente infeccioso, en este caso neumonía bacteriana y parasitaria, que derivó en insuficiencia respiratoria.

### **Indeterminadas**

Aquellos casos en los cuales no se ha podido determinar hasta el momento, si existía presencia de enfermedad o lesiones patológicas debido al alto grado de descomposición, y donde es necesario hacer análisis más específicos posteriores para llegar a un diagnóstico, y aun así existe la posibilidad de no poder determinar la causa.

## **8) Diagnóstico de *Leptospira* sp. mediante PCR**

Se procesaron 10 muestras de tejidos (ver más abajo) de lobo marino de California, las cuales se preservaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultra congelador y se transportaron nuevamente

en nitrógeno líquido al laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la Cd. de México, D.F.

Se identificaron las muestras de la siguiente manera:

04H1 Hígado	17H6 Riñón
04R2 Riñón	24P7 Pulmón
16H3 Hígado	24H9 Hígado
16R4 Riñón	24R8 Riñón
17H5 Hígado	24C10Cordón umbilical

#### **a. Extracción de ADN**

La extracción del material genético de interés, se realizó mediante el método clásico de fenol-cloroformo (Anexo 2).

#### **b. Verificación de la viabilidad del ADN**

Se realizó electroforesis de 1µg de ADN de cada muestra en agarosa al 1.6%, con el objetivo de verificar la integridad del DNA.

#### **c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira* spp.**

Esta se realizó de acuerdo a lo descrito por Woo *et al.* (1997), adaptado a las condiciones de la Cd. de México, D.F. (Anexo 3)

#### **d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira biflexa* sensu lato (saprófitas)**

Esta se realizó de acuerdo a lo descrito por León *et al.* (2006). (Anexo 3)

**e. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira interrogans* sensu lato (patógenas)**

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Zuerner (1997).(Anexo 3)

**9) Diagnóstico de *Brucella* sp. mediante PCR**

Se procesaron nueve muestras de tejidos de cuatro individuos de lobo marino de California, las cuales se preservaron desde su colecta en Nitrógeno líquido a -196°C, posteriormente se almacenaron a -80°C en un ultracongelador y se transportaron nuevamente en nitrógeno líquido al laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la Cd. de México, D.F., donde se realizó la extracción de ADN. Posteriormente se realizaron las reacciones en el Laboratorio de *Brucella* y Tuberculosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se identificaron las muestras de la siguiente manera:

04H1 Hígado (F-C)	24C10 Cordón umbilical (F-C)
16H3 Hígado (F-C)	04T11 Testículo(QUIAGEN)
17H5 Hígado (F-C)	04L12 Linfonódulo (QUIAGEN)
24P7 Pulmón(F-C)	16Cb13 Cerebro(QUIAGEN)
24H9 Hígado (F-C)	

**a. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de los tejidos de lobo marino de California *Z. californianus*. A seis de las muestras se les realizó la extracción por

medio de la técnica fenol-cloroformo. Al resto utilizando un kit comercial QUIAGEN (Anexo II).

#### **b. Verificación de la viabilidad del ADN**

Se verificó que el ADN obtenido fuera apto para continuar con el análisis mediante electroforesis en agarosa al 1% para verificar la viabilidad del material genético.

#### **c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Brucella* sp.**

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Cloeckert *et al.* (2000). (Anexo 3)

### **10) Diagnóstico de Morbillivirus mediante R-PCR**

Se procesaron cuatro muestras de tejidos de tres individuos de lobo marino de California, las cuales se preservaron desde su colecta en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultra congelador y se transportaron nuevamente en nitrógeno líquido al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se identificaron las muestras de la siguiente manera:

04P14	Pulmón
16P15	Pulmón
16Cr16	Cerebro
17P17	Pulmón

#### **a. Extracción de ARN**

Se realizó la extracción de ARN de los tejidos de lobo marino de California.

## **b. Reacción reversa de la cadena de la polimerasa R-PCR para el diagnóstico de Morbillivirus**

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Farooq *et al* (2008) y consistió en la transcripción reversa del material genético viral para la obtención de cDNA y posteriormente la amplificación del fragmento. (Anexo IV)

### **11) Descripción de casos relevantes**

Finalmente se realizó una descripción detallada de los casos más relevantes encontrados durante el muestreo mostrando las lesiones macroscópicas y microscópicas más importantes para la realización del diagnóstico.

## 8. RESULTADOS

### 1) Análisis retrospectivo

A través de la base de datos de varamientos de *Z. californianus* en la playa occidental de Isla Magdalena B.C.S., la cual cuenta con el registro de 854 ejemplares desde junio de 2003 a abril de 2011, se encontraron 126 registros que cuentan con notas sobre hallazgos incidentales que podrían ser relacionados con la causa de muerte, donde destacan cuatro categorías: “Antrópicas”, “Traumáticas”, “De salud” y “Nutricionales.”(Fig. 6).

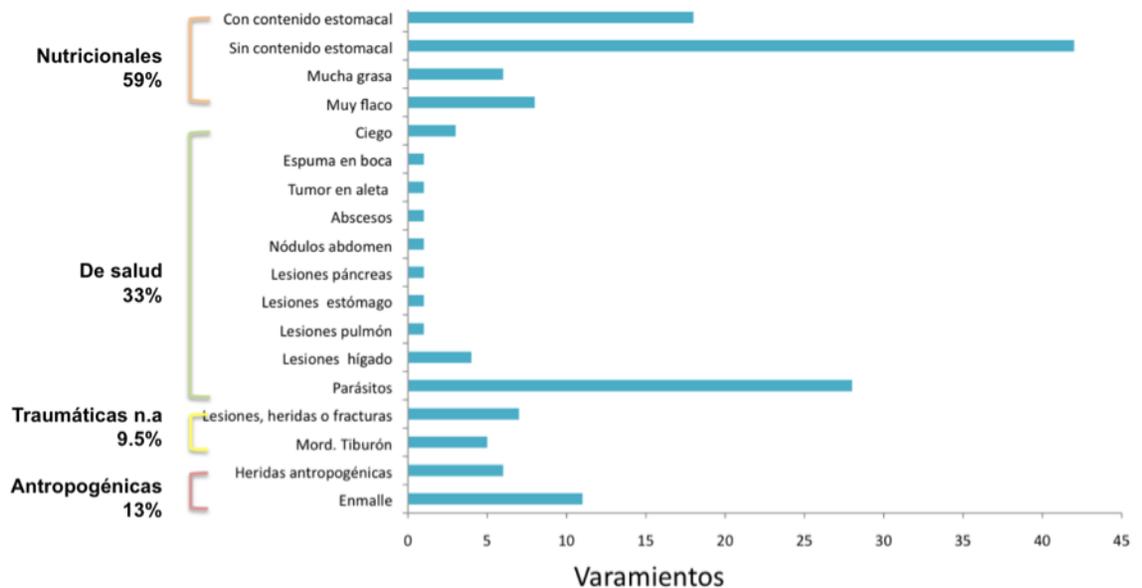


Figura 6.- Hallazgos incidentales reportados en lobo marino de California durante los muestreos de 2003 a 2011.

Los varamientos del lobo marino de California registrados de junio de 2003 a abril de 2011, se distribuyeron a lo largo de toda la playa occidental de la isla, aunque se concentraron más en el extremo sur (Fig. 7).

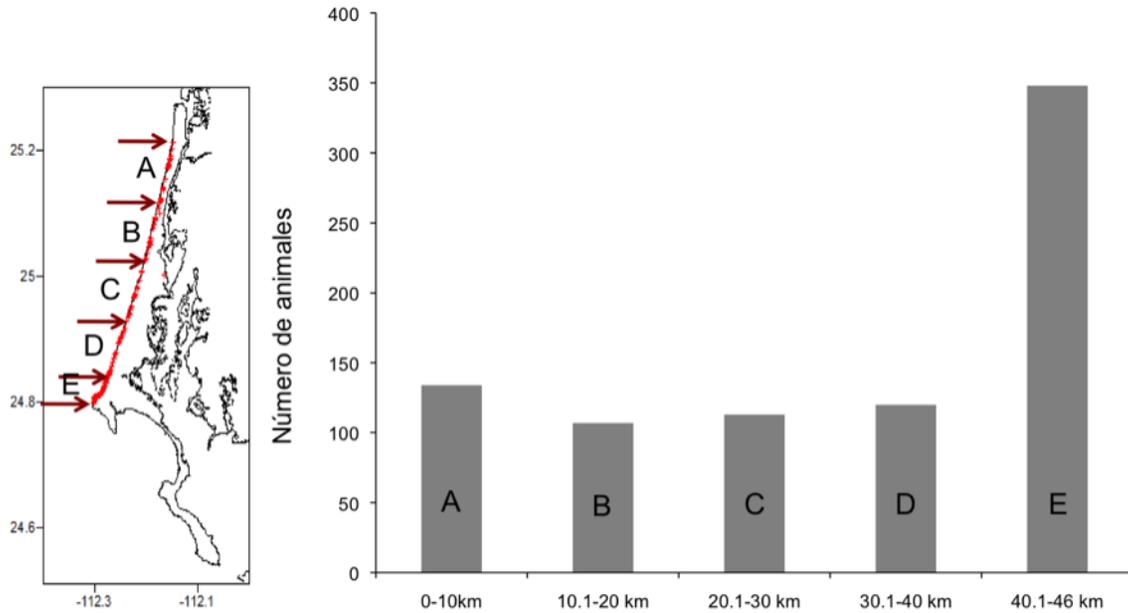


Figura 7.- Distribución de los varamientos de lobo marino de California en la playa occidental de Isla Magdalena en el periodo comprendido de junio de 2003 a abril de 2011, n= 822.

De un total de 117 registros de mamíferos marinos encontrados con evidencia de interacción antropogénica, fueron las dos especies de delfín común *Delphinus delphis* y *Delphinus capensis* los que más frecuentemente se encontraron con evidencia de interacción antropogénica, seguido de *Z. californianus* y *Tursiops truncatus* (Fig. 8).

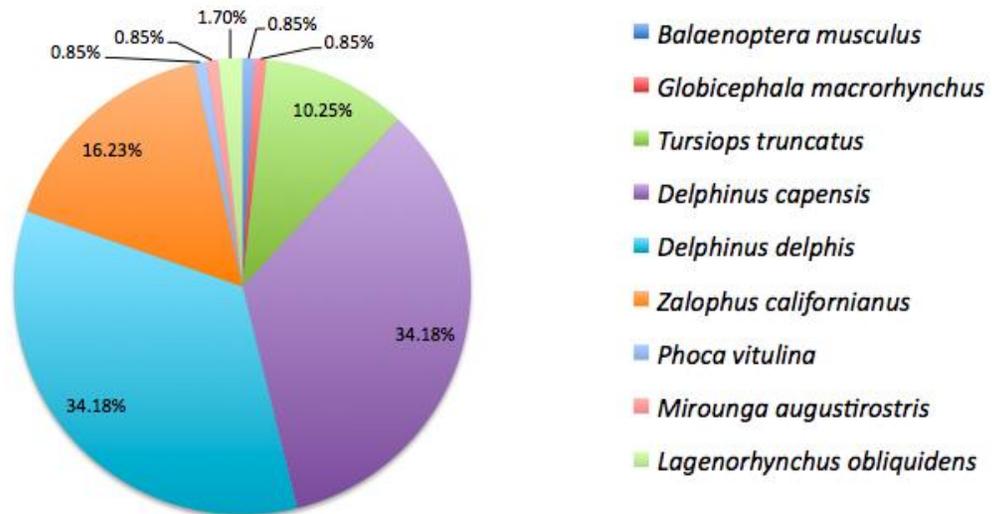


Figura 8. Porcentajes por especie, de mamíferos marinos varados con evidencia de interacción antropogénica.

Los promedios mensuales de varamientos y de animales con señales de interacción antropogénica mostraron tendencias similares a las de los promedios mensuales de varamientos, incrementándose de abril a junio (Fig. 9).

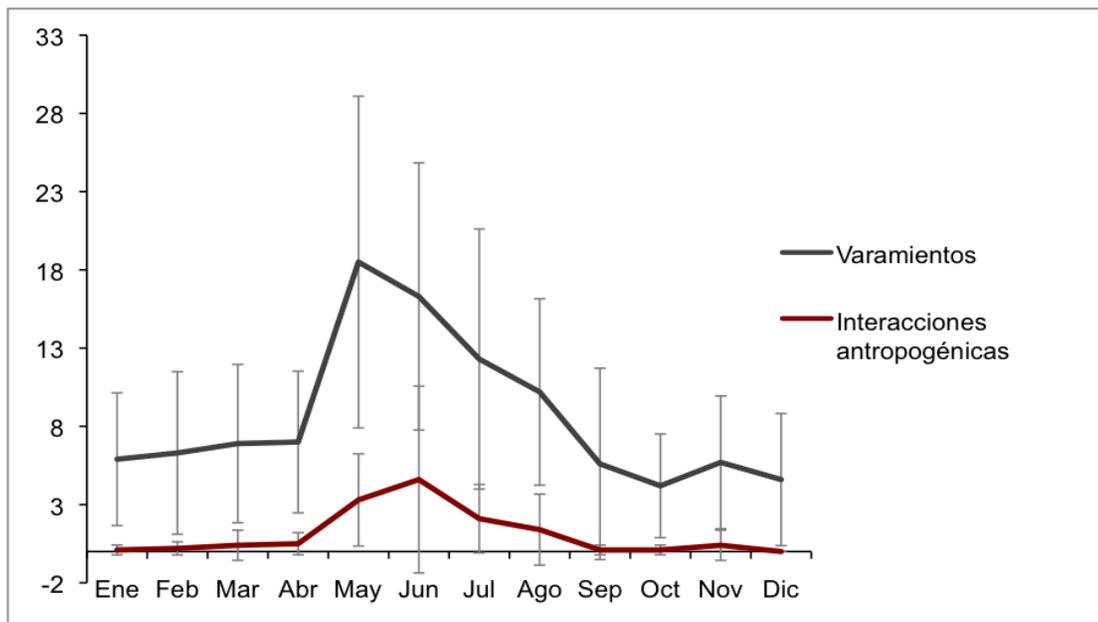


Figura 9. Promedios mensuales de varamientos de lobo marino y promedios mensuales de cetáceos y pinnípedos con evidencia de interacciones antropogénicas de 2003 a 2012.

## 2) Estudio prospectivo 2011-2012

A lo largo del año de muestreo se registró un total de 102 varamientos de mamíferos marinos, de los cuales 40 fueron cetáceos y 62 pinnípedos.

Durante el muestreo intensivo de mayo a junio se registró un total de 34 varamientos entre especies de cetáceos (10) y pinnípedos (24) (Fig. 10).

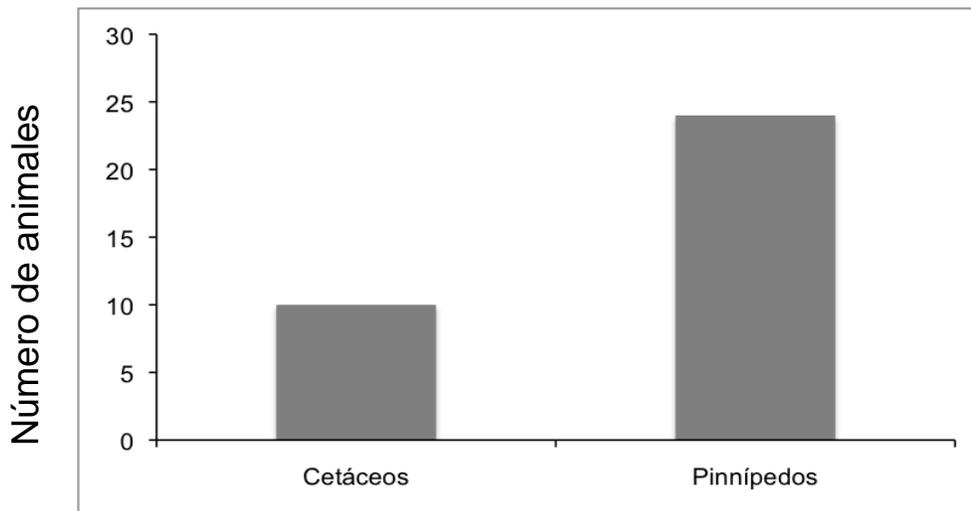


Figura 10. Proporción de cetáceos y pinnípedos de varamientos en Isla Magdalena durante el periodo mayo-junio 2012.

## 3) Muestreo intensivo

Durante los 32 días de muestreo consecutivos y dos muestreos cortos adicionales, se examinó a total de 19 animales. Los juveniles de ambos sexos y los machos adultos fueron las categoría de edad y sexo que se varó con mayor frecuencia (Fig. 11 ).

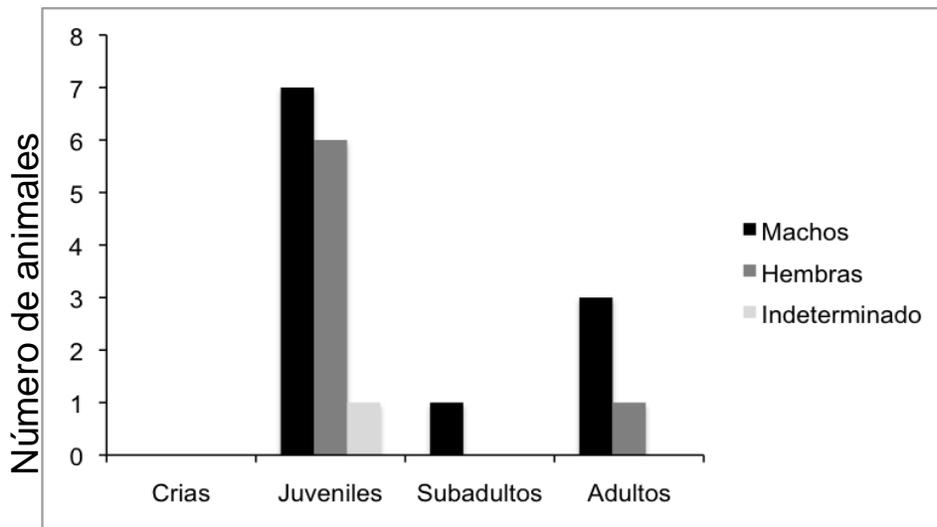


Figura 11.- Composición de animales varados por categoría de edad y sexo de lobo marino de California.

La distribución espacial de los varamientos en este periodo (mayo-junio) se concentró más en los extremos de la isla, principalmente en el extremo sur, figura 12.

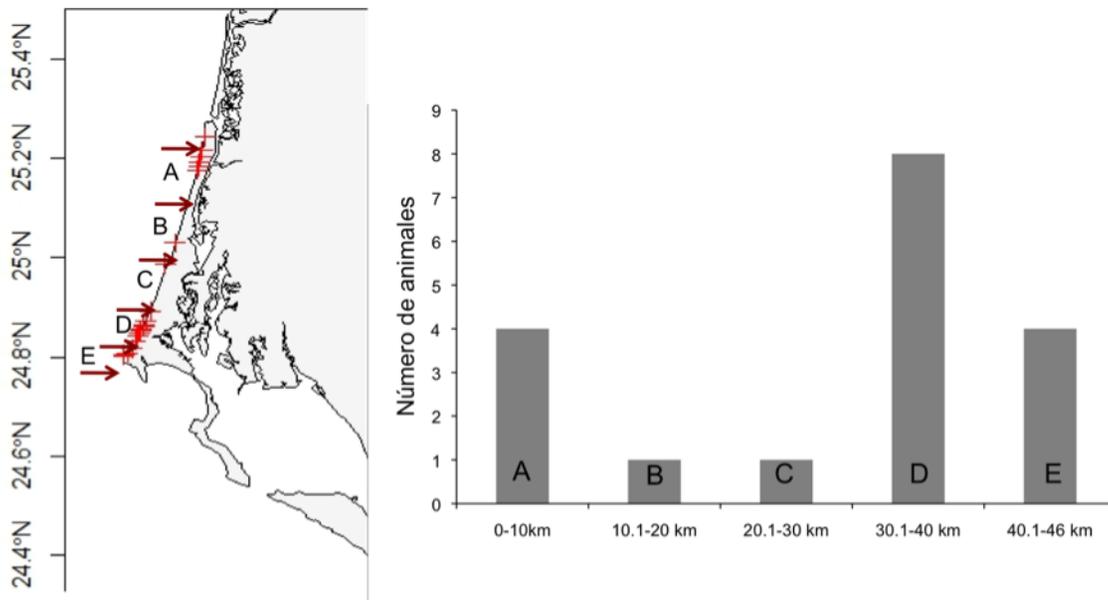


Figura 12.-Mapa de distribución de varamientos de lobo marino de California en Isla Magdalena durante el periodo mayo-junio 2012, n=19.

Durante este muestreo hubo una gran incidencia de animales altamente descompuestos (Fig. 13), sin embargo se realizaron las necropsias con el fin de obtener información valiosa de la mayoría de los casos.

Particularmente para el lobo marino de California, se registró un total de 23 animales varados en la costa occidental de Isla Magdalena de los cuales se examinaron 19.

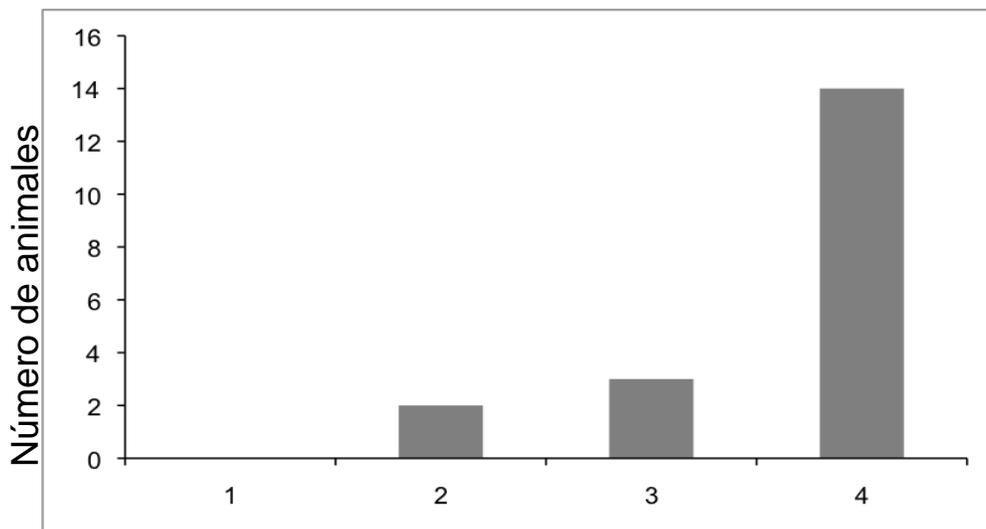


Figura 13.- Frecuencia de animales muertos con distinto grado de descomposición encontrados en el periodo mayo-junio de 2012 en Isla Magdalena, lobo marino de California.

De acuerdo a lo encontrado en los 19 animales a los que se les realizó la necropsia, podemos clasificar las causas de muerte en cuatro categorías generales: Traumatismo, neoplásicas, infecciosas e indeterminadas (Fig. 14).

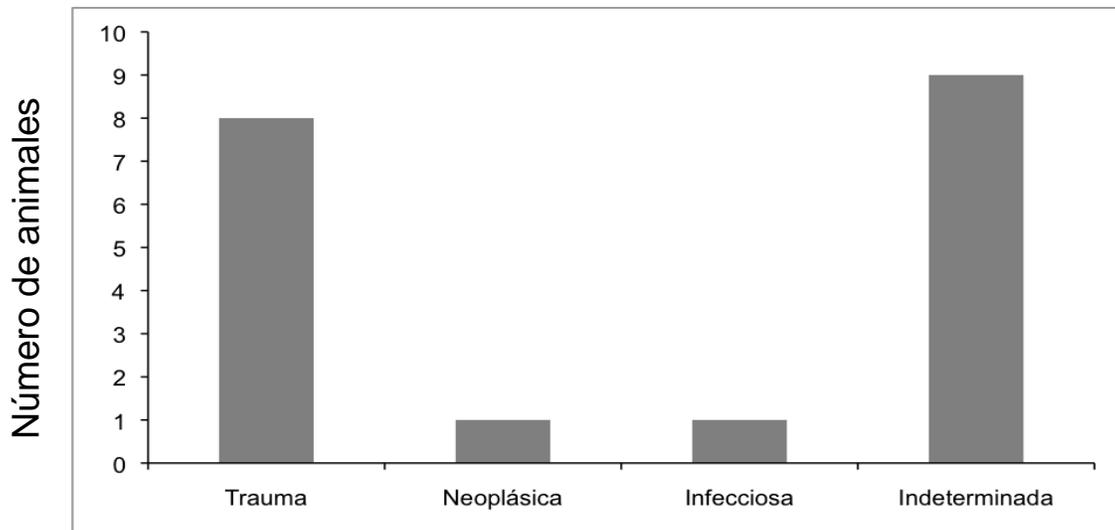


Figura 14.- Categoría de causa de muerte de lobo marino de California.

#### 4) Necropsias

Se realizó un total de 19 necropsias durante todo el periodo de estudio, de las cuales 18 fueron realizadas en Isla Magdalena y una en Isla Santa Margarita B.C.S., México, ya que se sabe que pertenecen a la misma población. En todas se realizó colecta de datos y toma de muestras.

En las Tablas I y II, se muestran las lesiones macroscópicas y microscópicas respectivamente, encontradas en cada uno de los animales a los que se les practicó necropsia. Los animales con alto grado de descomposición presentan pocas lesiones macroscópicas y microscópicas. Algunas de las lesiones más frecuentes fueron, parasitosis, traumatismo craneal y edema

En la Tabla III, se muestra cada uno de los organismos examinados, la causa de muerte y el estado de descomposición en que se encontraron. Se puede ver que en la mayoría de los animales en los que la causa de muerte no pudo ser determinada ya que presentaron un grado de descomposición avanzado.

La prevalencia de acuerdo a categoría de edad y sexo de las causas de muerte registradas, se muestra en la tabla IV.

Tabla I. Lesiones macroscópicas

	<b>Aspecto</b>	<b>Pulmón</b>	<b>Corazón</b>	<b>Bazo</b>	<b>Hígado</b>	<b>Riñón</b>	<b>Estómago</b>	<b>Cavidades</b>	<b>Vejiga</b>	<b>Laringe</b>	<b>Traquea</b>	<b>Esófago</b>	<b>Ojos</b>
01	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
02*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
04	Emaciación, ictericia, parásitos externos	NL	Cardiomegalia	NL	Nódulos, hepato- megalia	Nódulos	Úlceras, parásitos	Nódulos	Orina densa, material purulen- to	NL	NL	NL	NL
05	TC	NL	NL	NL	NL	NL	Piedras	NL	NL	NL	NL	NL	NL
06	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
07	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	Alimento	NL
08	Trauma	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
09	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
11	TC	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
13	Trauma	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
14	TC	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
15	TC	NL	NL	NL	NL	NL	NL	Fibrina	NL	NL	NL	NL	NL
16	TC	NL	NL	NL	NL	NL	NL	Parásitos	Lipomas	NL	NL	Moco	NL
17	Orificios cuello	Neumonía multifocal	Pericarditis, congestión, cardiomegalia	NL	NL	NL	Úlceras, parásitos	NL	NL	NL	Espuma	NL	NL
18	NL	NL	Cardiomegalia	NL	NL	NL	Úlceras	NL	NL	NL	NL	NL	Hemorragia, exoftalmia
19	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
20	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
21	NL	Congestión	Cardiomegalia	Esplenome- galia	Gas	Adherencias	Piedras, úlceras, parásitos	NL	NL	Laringitis	NL	NL	NL
22	NL	NL	NL	NL	NL	NL	Úlceras	NL	NL	NL	NL	NL	NL
23	TC, fx mandíbula, emaciación	Nódulos	NL	Adherencias	NL	NL	Contenido hemorrágico, parásitos	NL	NL	NL	NL	NL	Exoftalmia

Se usaron los últimos dos números de la clave de identificación

NL: No lesiones

ND: No disponible

TC: Traumatismo craneal

Tabla II.- Lesiones microscópicas

ID	Hígado	Pulmón	Riñón	Corazón	Bazo	Intestino	Cerebro	Linfonódulo	Músculo	Estómago	Testículo	Aorta	Cerebelo
01	NL	ND	ND	ND	ND	NL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
04	<i>Carcinoma colangiocelular(CC)</i>	CC metastásico, Edema, Parásitos*	CC metastásico, Nefritis intersticial	NL	*	NL	NL	ND	ND	ND	ND	ND	ND
05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
06	ND	ND	NL	NL	NL	NL	ND	NL	NL	ND	NL	ND	ND
07	ND	Edema	ND	NL	NL	ND	NL	NL	ND	NL	ND	ND	ND
08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
09	ND	NL	NL	NL	NL	NL	ND	NL	ND	NL	ND	ND	ND
11	ND	ND	NL	NL	ND	NL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13			NL	NL			ND		NL	NL			
14	NL	Edema	NL	NL	NL	NL	ND	NL	ND	ND	ND	NL	ND
15	ND	Edema	NL	NL	NL	ND	ND	NL	ND	NL	ND	ND	ND
16	ND	Parásitos	NL	ND	NL	NL	Neurona roja	NL	ND	ND	ND	ND	ND
17	NL	Neumonía bacteriana*, Edema	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	Gastritis parasitaria**	NL	NL	NL
18	NL	Edema	ND	ND	NL	ND	NL	ND	ND	NL	ND	ND	ND
19	NL	ND	ND	ND	NL	NL	ND	ND	ND	NL	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	NL	Edema	NL	Endocarditis	NL	NL	ND	ND	ND	NL	ND	ND	ND
22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Se usaron los últimos dos números de la clave de identificación

NL: No lesiones

ND: No disponible

Tabla III.- Causa de muerte y grado de descomposición.

<b>Caso</b>	<b>Causa de muerte</b>	<b>Grado descomp.</b>
12CSL125ZCHJ401	Traumatismo C	4
12CSL126ZCMA304	Carcinoma colangiocelular	3
12CSL127ZCMJ405	Traumatismo C	4
12CSL128ZCMJ406	Traumatismo C	4
12CSL132ZCHJ307	Indeterminada	4
12CSL133ZCHJ408	Traumatismo C	4
12CSL133ZCMJ409	Traumatismo C	4
12CSL137ZCMJ411	Indeterminada	4
12CSL139ZCMJ313	Indeterminada	4
12CSL140ZCHJ314	Indeterminada	4
12CSL140ZCHJ415	Traumatismo C	4
12CSL142ZCMJ216	Traumatismo C	2
12CSL145ZCMS317	Neumonía mixta	3
12CSL147ZCMA418	Indeterminada	4
12CSL152ZCIJ419	Indeterminada	4
12CSL153ZCMJ420	Indeterminada	4
12ISM---ZCMA321	Indeterminada	3
12CSL205ZCHA422	Indeterminada	4
12CSL205ZCHJ223	Traumatismo C	2

**Tabla IV. Prevalencia de causas de muerte de acuerdo a categoría de edad y sexo.**

CAUSA	CAT. EDAD	AMBOS	MACHOS	HEMBRAS
INDETERMINADA	Cría	0	0	0
	Juvenil	<b>0.31</b>	<b>0.15</b>	<b>0.1</b>
	Sudadulto	0	0	
	Adulto	<b>0.15</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>
TRAUMATISMO CRANEAL	Cría	0	0	0
	Juvenil	<b>0.42</b>	<b>0.21</b>	<b>0.21</b>
	Sudadulto	0	0	0
	Adulto	0	0	0
CARCINOMA	Cría	0	0	0
	Juvenil	0	0	0
	Sudadulto	0	0	0
	Adulto	0	<b>.05</b>	0
NEUMONÍA	Cría	0	0	0
	Juvenil	0	0	0
	Sudadulto	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	0
	Adulto	0	0	0
POSITIVOS A <i>L. interrogans</i>	Cría	0	0	0
	Juvenil	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	0
	Subadulto	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	0
	Adulto	<b>0.05</b>	0	<b>0.05</b>

## 6) Diagnóstico de *Leptospira spp.* mediante PCR

### a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira spp*

Se buscaba amplificar la 23S rDNA presente en todas las leptospiras (*L. interrogans* y *L. Biflexa*). Seis de 10 muestras resultaron positivas para *Leptospira spp.*, las cuales representan a tres animales positivos a la presencia del ADN de la bacteria, estos fueron los ejemplares con terminación 16, 17,24.

Esto indica que los tejidos contenían la bacteria, aunque hasta esta parte, el análisis no distingue entre las cepas patógenas y saprófitas (Fig. 16).

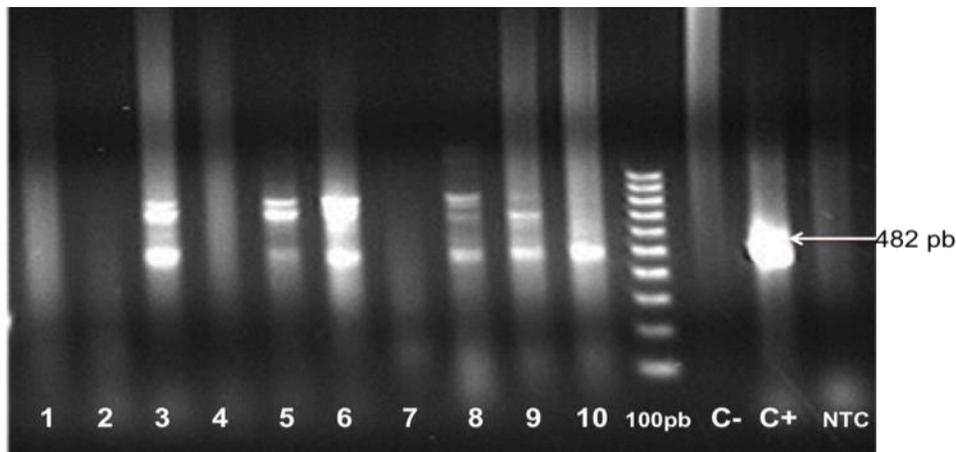


Figura 15. Se muestra la banda blanca a la altura de las 482 pb en las muestras positivas, que representa la región amplificada del ADN de la bacteria.

### b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira biflexa sensu lato* (saprófitas)

Para distinguir entre las cepas saprófitas y patógenas se realizó la amplificación del gen *hap1*, como resultado obtuvimos que todas las muestras fueron negativas a la presencia de *Leptospira biflexa*, ya que no se observó la presencia de bandas a la altura de las 240 pb esperadas para esta región.

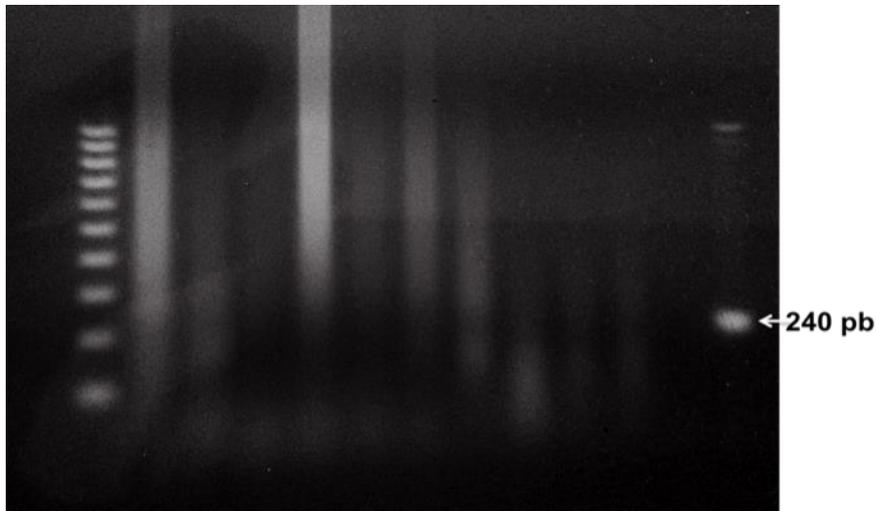


Figura 16. Se muestra la ausencia de bandas a la altura de las 240pb, por lo que todas las muestras son consideradas negativas a la presencia de ADN de *Leptospira biflexa*.

**c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira interrogans sensu lato* (patógenas)**

Para confirmar que las bacterias presentes en los tejidos analizados son del tipo patógena, se realizó a amplificación de la IS1500 presente en todas las variedades de patógenas de *Leptospira*. Los resultados obtenidos confirmaron lo esperado con base a los resultados anteriores, confirmando que las muestras positivas están dadas por la presencia de las variedades patogénicas de la bacteria *Leptospira interrogans*.

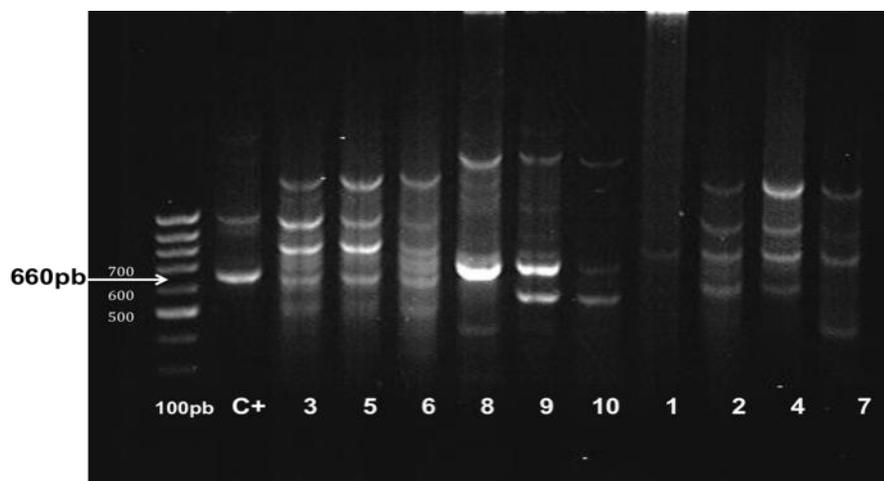


Figura 17. Se muestra la banda esperada a la altura de las 660pb, en las primeras 7 líneas, (positivas), y la ausencia de bandas de este peso en las ultimas 4 líneas (negativas).

Tabla V.- Resumen de resultados PCR diagnóstico de *Leptospira*.

MUESTRA	<i>Leptospira</i> <i>spp</i>	<i>Leptospira</i> <i>biflexa</i>	<i>Leptospira</i> <i>interrogans</i>
04H1	-	-	-
04R2*	-	-	-
16H3	+	-	+
16R4*	-	-	-
17H5	+	-	+
17R6	+	-	+
MP7	-	-	-
MR8	+	-	+
FP9	+	-	+
FC10	+	-	+

\*Se realizó tinción de plata, con resultado negativo.

## **7) Diagnóstico de *Brucella* sp. mediante PCR**

### **a. Reacción en cadena de la polimerasa PCR para diagnóstico de *Brucella* spp.**

Los resultados obtenidos del PCR para diagnóstico de *Brucella* spp., fueron negativos para todas las muestras analizadas como se observa en la figura 23 con la ausencia de bandas a la altura de las 1024 pb, donde se buscaba amplificar la IS711.

## **8) Diagnóstico de Morbillivirus mediante RT-PCR**

Se realizó mediante la técnica RT-PCR, con la intención de amplificar un fragmento de la fosfoproteína del virus con un peso de 429pb. Todos los tejidos analizados fueron negativos.

## 9) Casos relevantes

### a. Carcinoma colangiocelular

El carcinoma colangiocelular es una neoplasia maligna originada en los conductos biliares. Un macho adulto fue encontrado muerto en el área de la lobera de descanso ubicada en Cabo San Lázaro. Se encontró aislado del resto de los animales. Su condición corporal era muy pobre.

#### **Hallazgos macroscópicos.**

Este animal se encontró notablemente emaciado, presentaba severa ictericia, sobre todo en la grasa subcutánea y superficies serosas. Presentaba hepatomegalia y el hígado contenía numerosas masas tumorales aproximadamente esféricas que iban de los 0.5-5.0 cm de diámetro, las cuales eran de color amarillo, muchos de estas presentaban una superficie cóncava. (Fig. 18) La consistencia al corte era firme.



Figura 18. Hígado invadido de masas tumorales.

La vejiga se encontraba llena de un material denso de color amarillo lechoso y purulento, así como pequeños nódulos amarillos, de aprox. 0.3 cm de diámetro en la mucosa.

Varios nódulos pequeños, de 0.3-0.5 cm, de color amarillo, se encontraron sobre la cápsula del riñón derecho y mesenterio adyacente (Fig.

19A). También se presentó cardiomegalia. Los pulmones se encontraron congestionados y edematosos. En el estómago se encontró contenido hemorrágico así como algunas úlceras de 0.3-1.0 cm en la mucosa (Fig. 23B)

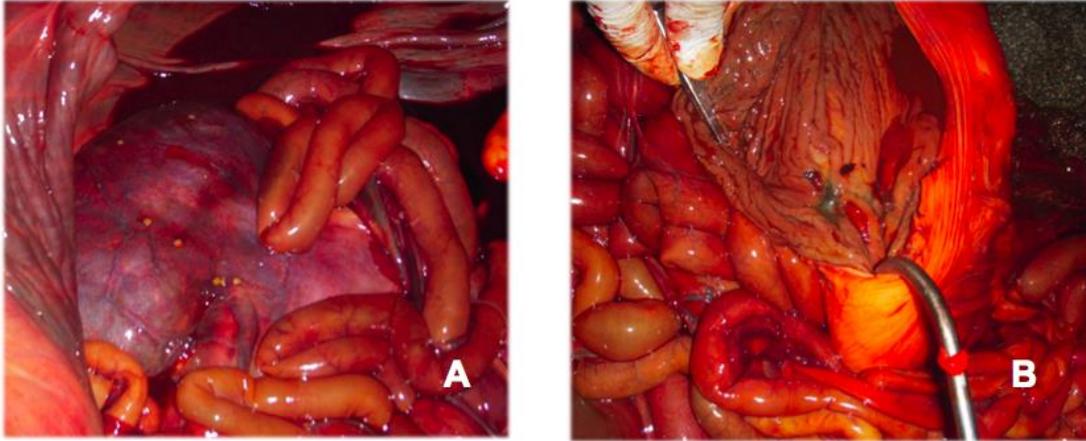


Figura 19.-A) Se muestran pequeños nódulos en la capsula del riñón derecho. B) se muestra una úlcera en la mucosa gástrica así como el contenido hemorrágico.

### **Hallazgos microscópicos**

Hígado: La arquitectura normal de este tejido se encontró remplazada por masas tumorales, las cuales eran moderadamente celulares, no demarcadas no infiltrativas y sin cápsula. La mayoría de las células neoplásicas formaban estructuras tubulares de diferentes tamaños y formas, con abundante colágeno. Las células eran de tamaño variable e iban de forma columnar o cúbica, con bordes celulares indefinidos y de citoplasma eosinofílico, el núcleo era redondo u ovalado, comúnmente ubicado en el ápice, con nucléolo prominente, y presentaba moderada anisocariosis y anisocitosis. El índice mitótico fue de 1 (0 a 3) figuras mitóticas por campo de alto aumento (Fig. 20). Múltiples focos de necrosis cubrían una amplia área de las masas tumorales y presentaban calcificación multifocal.

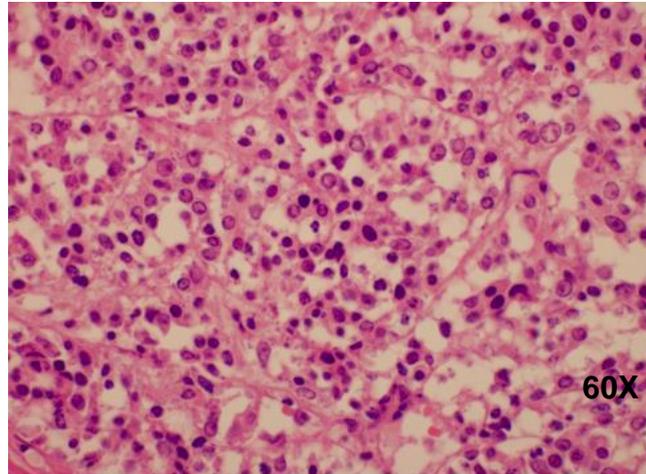


Figura 20.-Células neoplásicas formando estructuras tubulares en el hígado del lobo marino. Tinción H/E

También se encontró fibrosis periportal, así como émbolos neoplásicos en las venas portales y otros vasos sanguíneos menores, colestasis y huevos de trematodos ligeramente operculados, de forma ligeramente ovalada, con 50.00-82.88 $\mu$ m de largo y 44.47-51.36 $\mu$ m de ancho, cubierta externa gruesa (4.3 $\mu$ m) conteniendo un conjunto sólido de células, en el lumen de algunos conductos biliares, los cuales son morfológicamente compatibles con *Zalophotrema hepaticum* (Stunkard & Alvey, 1930)(Fig. 21).

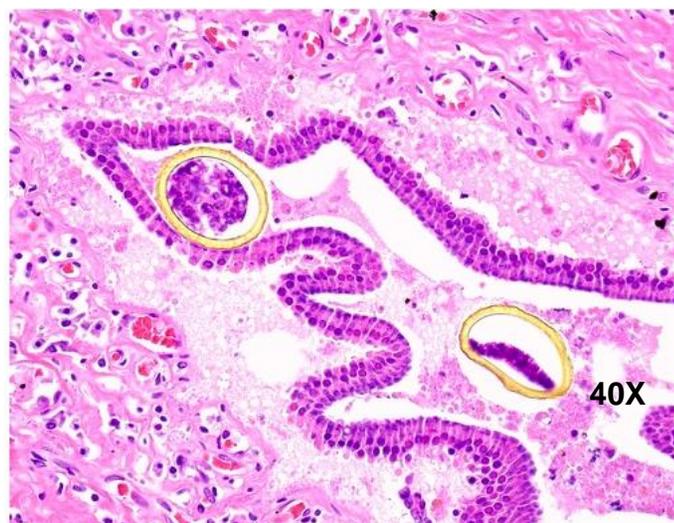


Figura 21.- Huevos de trematodo dentro del lumen de un ducto biliar. Tinción H/E.

Pulmón: Presentó congestión y edema, así como émbolos de células neoplásicas en numerosos vasos sanguíneos (Figura 22 A). También se encontraron algunos nematodos, los cuales no parecieron estar provocando reacción inflamatoria y se consideran un hallazgo incidental (figura 22 B).

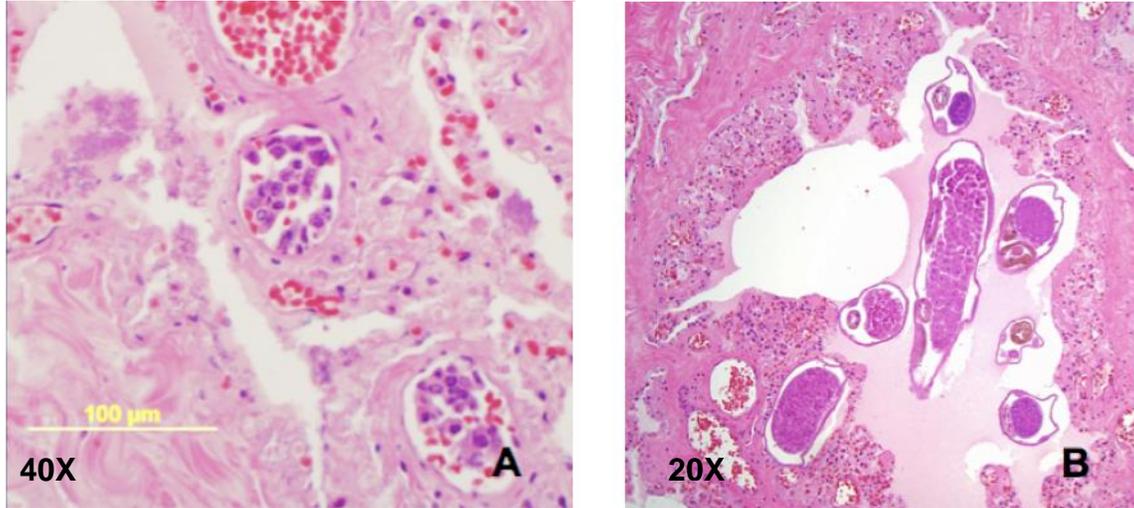


Figura 22.-A) Émbolos neoplásicos en vasos sanguíneos de pulmón. B) Nematodos y edema en los espacios alveolares. Tinción H/E.

Riñón: Se encontró una ligera nefritis intersticial, así como algunas zonas de calcificación. Además se encontró sobre la capsula, un nódulo con características celulares muy similares a las descritas en las masas tumorales encontradas en el hígado, este nódulo se encontraba bien circunscrito (Fig. 23).

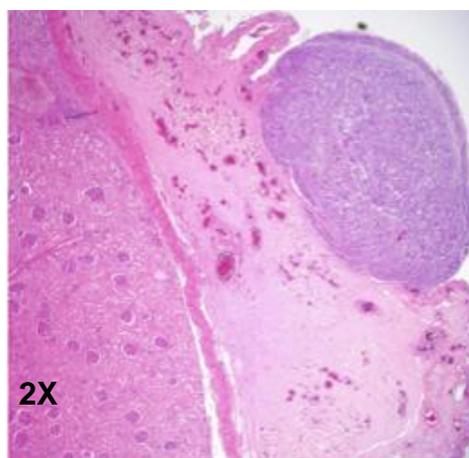


Figura 23-Nódulo neoplásico ubicado en la capsula del riñón izquierdo. Tinción H/E.

## b) Neumonía

Un macho subadulto fue encontrado en la playa occidental de Isla Magdalena. Se encontró parcialmente eviscerado por coyotes y con un par de heridas perforantes en la región cervical, de 0.4 cm de diámetro.

### Hallazgos macroscópicos

Los pulmones se encontraron con áreas de consolidación y edema, distribuidas a lo largo de la zona ventral de ambos pulmones, presentando pequeñas nodulaciones de 0.5 a 1.0 cm (Fig. 24A). La tráquea contenía una gran cantidad de espuma estable blanquecina (Fig. 24B).



Figura 24.-A) Pulmón con áreas de consolidación y nódulos. B) Material espumoso en el lumen de la tráquea.

El corazón se encontraba congestionado, y el saco pericárdico ligeramente engrosado (Fig.25A). El estómago se encontró incompleto, solo la porción pilórica estaba disponible para examinar, pocos restos de alimento y algunos nematodos gástricos, probablemente anisákidos, estaban presentes (Fig.25B).

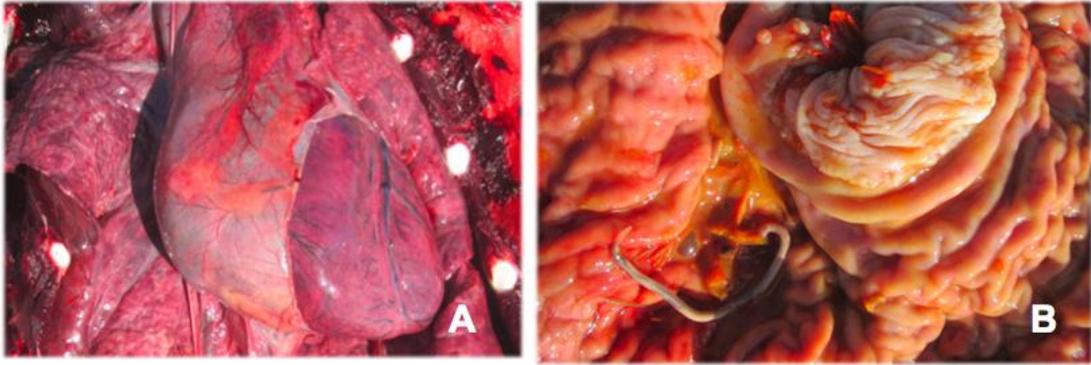


Figura 25-A) Congestión del músculo cardíaco y engrosamiento del saco pericárdico. B) Parásitos y restos de alimento en estómago.

El hígado se encontró incompleto en la porción terminal de los lóbulos medial derecho e izquierdo así como en el lóbulo cuadrado, no presentaba hemorragia, los bordes del órgano estaban redondeados, con consistencia friable (Fig.26). El resto de los órganos no presentó cambios importantes.



Figura 26.-Hígado incompleto por mordedura de coyote.

## Hallazgos microscópicos

Pulmón: Se observó bronconeumonía, con abundantes células inflamatorias, principalmente neutrófilos así como la cápsula de un nódulo rodeada de tejido fibroso y abundantes cocobacilos Gram positivos rodeándola la capsula y en el intersticio pulmonar (Fig. 27A). Algunos alvéolos estaban llenos de un material eosinofílico característico del edema pulmonar. También se encontraron algunos nematodos en los espacios alveolares; estos parásitos están en proceso de identificación (Fig. 27B).

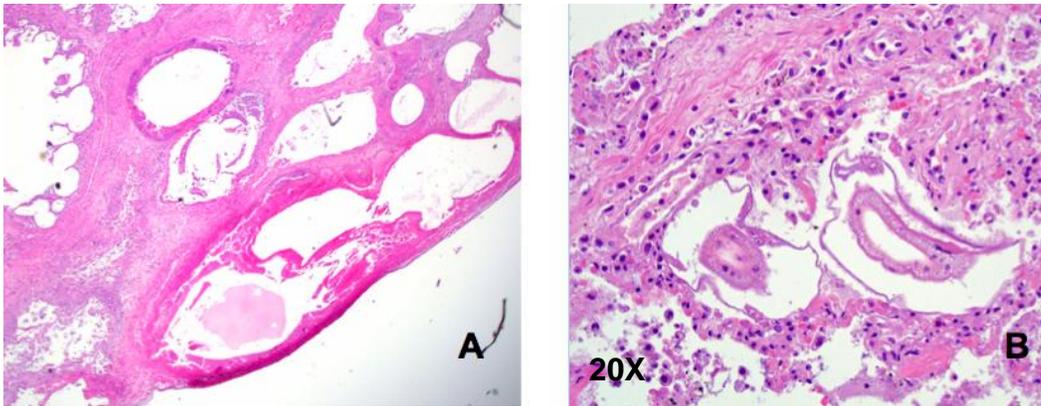


Figura 27.-A) Pulmón, se muestra presencia de células inflamatorias y bacterias rodeándola capsula del nódulo, así como edema. B) Nematodos pulmonares y células inflamatorias.

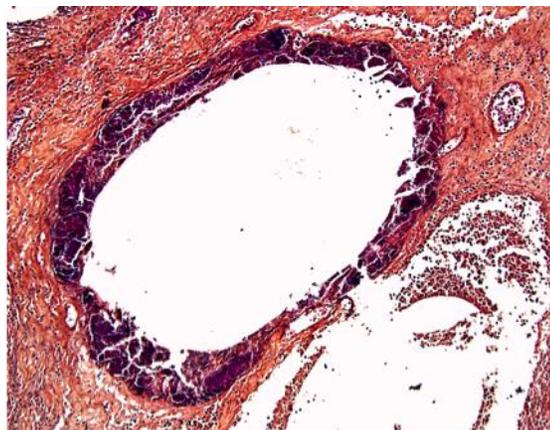


Figura 28 - Tinción de Gram en pulmón, tiñendo a las bacterias como cocobacilos Gram positivos.

### c) Traumatismo craneal

Se encontraron dos casos de animales frescos con evidencia de traumatismo craneoencefálico.

Uno de ellos fue un macho juvenil, el cual fue encontrado en la lobera. El individuo presentaba inflamación de la piel y el tejido subcutáneo del rostro y otras zonas de la cabeza; y hemorragia en nariz y boca (Fig. 29).



Figura 29.-*Zalophus californianus*, ejemplar juvenil con severa inflamación del rostro.

#### **Hallazgos macroscópicos**

La piel y músculo de la parte superior de la cabeza sobre el hueso parietal estaba desprendidas del cráneo y presentaba inflamación y edema (Fig.30A). No se encontraron anomalías importantes en los órganos internos, salvo algunos nematodos gástricos compatibles con anisákidos y algunos nematodos pulmonares compatibles con *Parafilaroides spp.*(Fig. 30B).

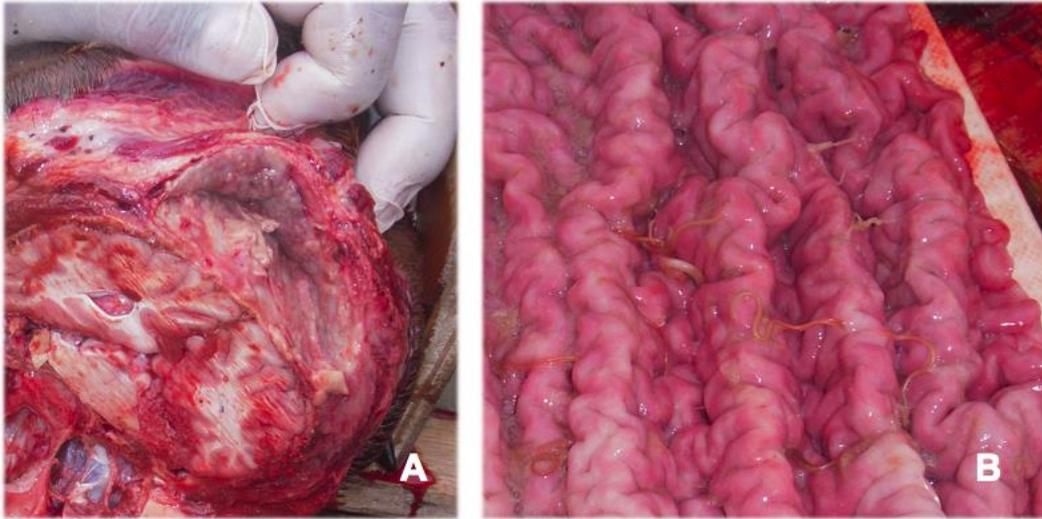


Figura 30.-A) Área desprendida de tejido sobre el hueso parietal. B) Nemátodos sobre la mucosa gástrica.

### Hallazgos microscópicos

Cerebro: se encontraron neuronas eosinofílicas, angulares y con núcleos picnóticos (Fig. 31).

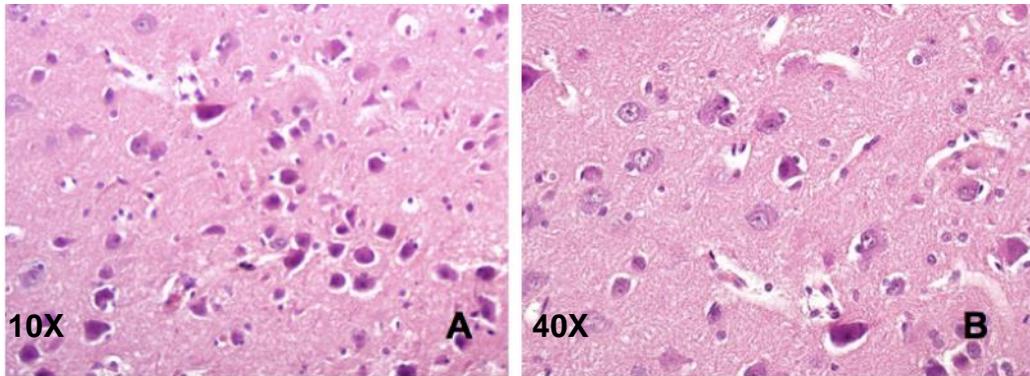


Figura 31.-Se muestra la coloración eosinofílica de algunas neuronas afectadas por isquemia. Tinción H/E.

El otro caso fue una hembra adulta, la cual presentaba fractura aguda, no desplazada, no articular de mandíbula; y exoftalmia (Fig. 32A). Este animal presentaba también hemorragias en nariz, boca y ojo izquierdo, su condición corporal era pobre ya que presentaba poca grasa de depósito.(Fig. 32 B).



Figura 32.-A) Fractura de mandíbula y exoftalmía. B) Pobre condición corporal del animal.

### **Hallazgos macroscópicos**

Los pulmones presentaron múltiples nódulos blancos a lo largo de gran parte del parénquima pulmonar los cuales eran esféricos, de superficie irregular, y consistencia ligeramente más firme que el resto del parénquima (Fig. 33).



Figura 33. Pulmón con presencia de múltiples nódulos.

El estómago no contenía alimento solo un poco de contenido hemorrágico, y parásitos. El bazo presentaba un par de lesiones amarillas ligeramente elevadas alargadas de superficies irregulares, de 2.5 a 3.0cm de largo con una distancia de 4.0 cm entre ellas en la porción terminal del órgano (Fig. 34). No se encontraron cambios significativos en el resto de los órganos.



Figura 34-. Masas alargadas de color amarillo en la porción caudal del bazo.

## 9. DISCUSIÓN

### 1) Aspectos generales de los varamientos de mamíferos marinos

La costa occidental de Isla Magdalena representa uno de los puntos más importantes de varamientos de mamíferos marinos en México (Mercuri, 2007). La zona de Bahía Magdalena es reconocida como un centro de actividad biológica (BAC), lo que la hace también una zona de importancia pesquera (Arreguín-Sánchez, 2000).

El lobo marino de California, *Z. californuanus*, es la especie que se vara con mayor frecuencia en Isla Magdalena, esto se ha reportado también en otros estudios de varamientos en la península de Baja California, y se cree que es un reflejo de la abundancia de esta especie en la región (Antonelis *et al.*, 1980; Bravo *et al.*, 2005). En esta zona en particular, se encuentra Isla Santa Margarita, una de las colonias reproductoras de mayor importancia para esta especie, donde para junio de 2011 se estimó una población de 3,000 animales (Auriolles, datos no publicados<sup>1</sup>). Además, en Cabo San Lázaro se encuentra una pequeña colonia de descanso, con una población de alrededor de 500 animales en su mayoría machos subadultos y adultos.

La composición de los varamientos registrados por categorías de edad y sexo siguió las tendencias observadas desde 2003 en la zona (Mercuri, 2007; Ascencio, 2010), siendo los machos adultos y los juveniles las categorías que se vararon con mayor frecuencia. Lo mismo se ha reportado para otras zonas donde se han monitoreado los varamientos de esta especie (Bravo *et al.*, 2005). Se sabe que los individuos jóvenes y viejos así como los machos presentan bajas tasas de supervivencia (Hernández-Camacho *et al.*, 2008), por lo que no es raro que se encuentren con mayor frecuencia en los varamientos. Los juveniles son curiosos e inexpertos para conseguir alimento, lo que los hace más susceptibles a debilitamiento, enfermedades y depredación, así como para evitar redes de pesca o embarcaciones, por lo que también son más susceptibles al enmalle (Zavala & Mellink, 1997). Las hembras adultas presentan la tasa de

(1) Auriolles-Gamboa, D. 2011. Datos no publicados. Laboratorio de Ecología de Pinnípedos. CICIMAR-IPN. La Paz. México.

supervivencia más alta, probablemente porque son mucho más fieles a su sitio de nacimiento, ya que la tener una cría, sus viajes de alimentación son mucho más cortos tanto en distancia como en tiempo, por lo que no están tan expuestas a la depredación, enmalle, etc., a diferencia de los machos al realizar migraciones pasan mucho más tiempo en el mar y recorren distancias mayores (Hernández-Camacho, 2001).

Los varamientos durante todos los años de muestreo parecen estar distribuidos a lo largo de toda la isla, pero concentrándose más hacia el extremo sur. Durante el muestreo de mayo a junio de 2012 también se concentraron en ambos extremos, pero aún más al extremo sur. La mayor abundancia de varamientos hacia esta zona se debe probablemente a la cercanía con la colonia de descanso de lobos marinos que está ubicada al sur de la isla, en la zona D, el resto de los varamientos a lo largo de la isla puede deberse a que la configuración de la costa podría generar corrientes costeras locales que facilitan el depósito de los cuerpos a lo largo de la playa (Mercuri, 2007).

Se ha observado año con año una marcada estacionalidad, siendo las temporadas de primavera y verano las que registran mayor incidencia de varamientos. Esto coincide con dos fenómenos: la productividad del ecosistema y el ciclo de vida de la especie. El ecosistema marino costero frente a Isla Magdalena presenta un claro patrón de productividad estacional. Mercuri (2007) explica cronológicamente el suceso de las variables en la zona, donde primero se registran temperaturas bajas en el mes de abril, seis días después, el máximo de surgencias, seguido del máximo de concentración de clorofila en 26 días, posteriormente el máximo de capturas de sardina después de 29 días, seguido del máximo de varamientos 11 días después, durante mayo y junio de cada año.

En mayo también se inicia la temporada reproductiva, lo que trae consigo un aumento en la población de las colonias en Isla Santa Margarita y Cabo San Lázaro, ya que los animales comienzan a agregarse con este motivo. Los machos, que realizan migraciones en busca de mayores presas, regresan en

esta época a las colonias reproductivas a tratar de establecer territorios, por lo que aumenta su proporción en las colonias con respecto a otras épocas del año. Esta inmigración de machos que provienen de áreas lejanas puede determinar una mayor presencia de machos en los varamientos durante estos meses.

Por otra parte, los partos se presentan durante los meses de mayo y junio, y las cópulas poco menos de un mes después, es decir durante junio y julio. Por tanto la inmigración de animales para la reproducción como el nacimiento de la nueva generación de lobos marinos, genera un incremento notable de la población en el área. Finalmente, en agosto termina la temporada reproductiva y se reduce la abundancia de animales en las áreas reproductivas debido a la emigración de machos adultos y subadultos (Aurioles et al., 1983; Aurioles y Zavala, 1994; Heath & Perrin, 2009).

## **2) Análisis de las causas de muerte de lobos marinos**

En años anteriores, solo se registraban las causas de muerte que eran evidentes a través del examen externo de los cadáveres, como algunas heridas de bala o enmalles en redes de pesca, etc., sin embargo, no todas las causas de muerte pueden ser determinadas mediante la sola inspección externa. En la base de datos de varamientos que se originó en 2003, se cuenta solo con algunas notas sobre hallazgos incidentales, de casos en los que se examinaron los cuerpos internamente. En esos individuos se encontraron lesiones, sin embargo no se realizó el mismo esfuerzo en todos los casos, por lo que no se cuenta con esta información para todos los registros. Además no se realizaron necropsias completas, ni el examen interno fue realizado por un veterinario. Con esto se destaca la importancia de realizar necropsias en los animales varados para tener información más completa y así tratar de determinar la causa de muerte con mayor grado de certidumbre.

A pesar de realizar necropsias durante el muestreo intensivo en 2012, los resultados de este estudio mostraron un elevado número de causas de muerte

indeterminadas, debido al avanzado grado de autólisis de los cadáveres. No obstante, no es siempre posible llegar al diagnóstico a pesar de haber realizado una necropsia completa en un animal fresco (Read & Murray, 2000; Department of Health and Human Services, 2003). Un alto porcentaje de los animales varados llegan a la playa en un estado avanzado de descomposición, por lo que es difícil encontrar muestras frescas aun cuando se recorrió la playa diariamente, lo que afectó los resultados. Esto más que a altas temperaturas en la playa, se debe a que al morir los animales en el mar, se hunden, y es hasta que se inicia el proceso de descomposición y la producción de gas por bacterias, que flotan nuevamente y son arrastrados por las corrientes hasta las playas (Geraci & Lounsbury, 1993). Los ejemplares llegan a tierra con un grado de descomposición que dificulta en gran medida el diagnóstico, ya que los cambios macroscópicos a evaluar como color, consistencia, tamaño, etc., son enmascarados por la descomposición. Microscópicamente la autólisis de los tejidos provoca la pérdida del detalle celular y de la estructura (Read & Murray, 2000).

Afortunadamente hay algunas causas de muerte que pueden ser determinadas aun con un grado de descomposición importante (Grado 4), por ejemplo la ingesta de objetos extraños, heridas de bala, enmalles, masas tumorales grandes, etc.

Los pocos animales encontrados frescos (Grado 2), fueron animales que murieron en tierra (04, 16, 17, 21 y 23), el hacer recorridos diarios por la playa minimiza el efecto de la temperatura ambiental y facilita la obtención de estos en buen estado para poder obtener el máximo provecho de las muestras.

Además de la descomposición hay algunas causas de muerte que son de difícil diagnóstico mediante los cambios anatomo-patológicos. Tal es el caso de algunas intoxicaciones u otras enfermedades muy agudas, que producen la muerte súbita del animal, sin dar tiempo a que se generen lesiones en los tejidos, lo que impide llegar a la causa de muerte si no se cuenta con pruebas complementarias (Munson, 2006). Además de esto, cuando se realizan

necropsias de animales en vida libre, no se cuenta con información previa, no hay historia clínica, no se sabe si se presentaron signos de enfermedad, si hubo exposición a patógenos, tóxicos o estresores, ni sobre su comportamiento previo a la muerte. Tampoco se tiene control sobre el estado de descomposición de las muestras, ya que estas se obtienen de muestreos oportunistas. Toda esta información es valiosa y orienta el diagnóstico.

Otro factor importante a considerar es la presencia de un gran número de coyotes, estimándose la población en la isla en aproximadamente 230 ejemplares (Lorenzo *et al.*, 2012), además de otros animales carroñeros, que pueden alterar los cuerpos varados (Delgado-Estrella, 1994; Mercuri, 2007). Durante este muestreo fue muy común encontrar coyotes comiendo los cuerpos varados (Datos no presentados).

Hubo una gran incidencia de traumatismo craneal, del cual si bien es difícil conocer el origen, se cuenta con información anecdótica de los pescadores locales, quienes dicen que los lobos marinos frecuentemente quedan atrapados en las redes de pesca, y al ser animales agresivos, no es posible liberarlos fácilmente, por lo que son golpeados en la cabeza con algún objeto pesado, como un garrote para liberar al animal, ya sea muerto o herido, y recuperar las redes. Esto también ha sido documentado en otras áreas donde los animales interceptan las capturas de pesca y pueden quedar enmallados (Zavala & Mellink, 1997). La relación entre pescador y lobo marino no es armoniosa, ya que los pescadores le atribuyen a esta especie pérdidas económicas importantes, como daños a las redes o pérdidas en las capturas, por lo que suelen tomar acciones en perjuicio de los animales como disparos con arma de fuego, golpes, etc. (Gallo, 1986).

No se puede ignorar que existe una alta incidencia de esta lesión en particular, más que cualquier otra, en los animales varados, sobre todo en animales juveniles de ambos sexos y debe considerarse que al coincidir con una época de alta actividad pesquera, estas lesiones puedan atribuirse presuntivamente a interacciones con pesquerías. En otros estudios se ha visto

un incremento en la incidencia de varamientos asociado al incremento en la actividad pesquera, principalmente de tiburón y escama (Delgado-Estrella, 1994). En uno de los casos en los que pudo analizarse el cadáver fresco de un animal con traumatismo craneal, se pudo observar histológicamente la presencia de una lesión neuronal originada por la isquemia la cual puede asociarse a traumatismo (Fuller, 2007) .

Para Bahía Magdalena, la temporada de pesca de escama se realiza durante los meses de mayo a agosto e incluye especies como lenguado (*Paralichthys californicus*), verdillo (*Paralabrax* sp.), pierna (*Caulolatilus princeps* y *C. affinis*), jurel (*Seriola* spp., *Caranx* spp.) y roncacho (*Cheilotrema* spp.) que se pescan con chinchorros, así como sierra (*Scomberomorus sierra*) y corvina (*Cynoscion parvipinnis* y otros scianidos) que se pescan con redes de superficie, (Ramírez-Rodríguez, 1996). La pesquería de tiburón (especies de los géneros *Mustelus*, *Carcharhinus*, *Alopias*, *Sphyrna* y *Squatina*), se lleva a cabo con cimbra y palangre (Villavicencio-Garayzar, 1996). Esta pesquería se realizaba durante todo el año, sin embargo, a partir del 2012 se estableció un periodo de veda que va de mayo a julio, aunque para este año, dicha veda no se hizo efectiva hasta el mes de junio (DOF, 2012). Además, existe la pesquería de pelágicos menores que se realiza de manera comercial durante los meses de abril a septiembre, con redes de cerco (Rodríguez-Sánchez, 1996)

Durante los años anteriores, el porcentaje de interacciones antropogénicas fue relativamente bajo (4%), sin embargo este puede estar subestimado, principalmente por el avanzado grado de descomposición de los animales varados, que dificulta la identificación de marcas producidas por redes y otros instrumentos de pesca (Mercuri, 2007).

En años anteriores fueron especies de delfines las que más frecuentemente presentaron evidencia de interacción antropogénica. Esto puede deberse a que la evidencia es más clara en este tipo de animales, al ser la mayoría de las veces la falta de aleta caudal y las marcas de cuchillo o restos de redes los indicadores de la interacción, ya que los animales son comúnmente

mutilados para poder retirarlos de las redes de pesca (Read & Murray, 2000), lesión que es visible a pesar de la descomposición.

Para el lobo marino de California, el porcentaje de causas de muerte de origen antropogénico presentado en años anteriores, al igual que el actual, puede estar subestimado, debido a que muchas veces los animales mueren ahogados en la red, lo cual no necesariamente produce marcas, y al llegar a tierra en un estado de descomposición avanzado, es imposible determinar el ahogamiento. Otras veces son golpeados y de la misma manera es difícil distinguir las lesiones por lo que no son registradas, y si se hace, es difícil asociarlas a una interacción antropogénica (Bravo *et al.*, 2005). Además, los organismos que mueren a más de 15 millas de la costa muy difícilmente serán registrados (Ascencio, 2010).

El edema pulmonar fue uno de los hallazgos histológicos más frecuentes, incluso en animales con grado de descomposición avanzado, este indica la presencia de líquido y solutos en el intersticio y/o espacios aéreos del pulmón (Trigo, 2007), lo que provoca insuficiencia respiratoria si se origina *ante mortem* y puede ser causa de muerte. Sin embargo, muchas veces es solo un cambio *post mortem* dado por un gradiente de presión entre la vascularización pulmonar y los espacios alveolares, así como una alteración en la permeabilidad de los capilares, lamentablemente es imposible distinguir uno de otro (Durlacher *et al.*, 1950).

Se encontró un caso de neoplasia, diagnosticado como carcinoma colangio-celular, considerado de tipo maligno y que afecta los conductos biliares presentes en el hígado. Su etiología es desconocida pero puede estar asociada a diferentes factores, como predisposición genética, exposición a contaminantes, consanguinidad, presencia de trematodos biliares, etc. (Acevedo *et al.*, 2003; McAlouse & Newton, 2009; Vikram & Alastair, 2007). Se encontró la presencia de algunos huevos de trematodos en los ductos biliares de este ejemplar, lo que pudo haber tenido influencia en el desarrollo de la lesión, como sucede en otros mamíferos (Vikram & Alastair, 2007) sin embargo este parásito es comúnmente

encontrado en el lobo marino de California (Dailey, 2001 ), mientras que esta neoplasia parece ser rara. Hasta ahora no hay evidencia de altos niveles de contaminación en la zona donde el animal fue encontrado, se sabe que los ejemplares de Baja California, están menos contaminados que los ejemplares en California, ( Del Toro *et al.*, 2006 ) pero al ser este un macho adulto pudo estar expuesto en otra áreas, ya que estos suelen realizar migraciones, sin embargo sin el análisis toxicológico no podemos saber exactamente qué papel jugó esto en el desarrollo de la neoplasia. Se sabe también que altos niveles de consanguinidad están asociados al desarrollo de enfermedades neoplásicas (Acevedo-Whitehouse, 2003), pero de la misma manera no contamos con información genética del animal.

También se encontró un caso de neumonía, con la presencia de cocobacilos Gram positivos. y nematodos pulmonares, donde ambos agentes se encontraban provocando una reacción inflamatoria. La neumonía es una de las causas de muerte más frecuentes en animales varados a lo largo de las costas de California (Haulena *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2010), pero se desconocía su prevalencia en las poblaciones mexicanas. De acuerdo a lo encontrado en este estudio la prevalencia fue de 5.2%, la cual es baja en comparación con las poblaciones de California (Gerber *et al.*, 1993) aunque esto puede estar influenciado por el bajo número de muestra.

Se detectó la presencia de algunos parásitos tanto gastrointestinales como pulmonares, los cuales son comúnmente encontrados en estos animales, pero bajo ciertas condiciones pueden ser de mayor gravedad, especialmente en crías y juveniles o geriatras, debilitados por condición nutricional pobre, heridas u otras enfermedades (Measures, 2001).

Las pruebas de PCR realizadas para el diagnóstico de tres agentes infecciosos (*Leptospira spp.* *Brucella spp.* y *Morbillivirus*) se pudieron realizar solamente a los tejidos colectados frescos y en los que había sido posible

mantener la cadena fría desde la colecta hasta el momento de realizar las pruebas. El mantenimiento de la cadena fría es de gran importancia ya que el material genético de las bacterias o virus que se desea diagnosticar, es fácilmente degradado por endo y exonucleasas que están contenidas en los propios tejidos del animal, las bajas temperaturas detienen este proceso enzimático permitiendo la preservación del material genético por más tiempo (Linn, 1981; Seutin *et al.*, 1991).

Para el diagnóstico de *Leptospira* spp. la prueba más utilizada es la microaglutinación (MAT) (Colagross-Schouten *et al.*, 2002). Sin embargo para este estudio no fue posible utilizar esta técnica, ya que requiere el uso de suero, que no siempre se puede obtener de animales muertos. El cultivo bacteriológico sería ideal, pero es poco utilizado ya que el proceso es lento y poco sensible, (Wuthiekanun *et al.*, 2007). También se utiliza la tinción de plata para el diagnóstico de *Leptospira* spp. (Mikaelian *et al.*, 1997). El diagnóstico mediante PCR, es una herramienta sensible y específica que permite el diagnóstico exitoso de la presencia de la bacteria en diferentes tipos de muestras (Cameron *et al.*, 2008).

Para este estudio aun cuando el número de muestra fue limitado (escasez de animales frescos), y además de que todos los animales analizados presentaron causas de muerte diferentes a la leptospirosis, se obtuvo una proporción alta de animales positivos a *Leptospira interrogans* (3 de 4), mediante la técnica de PCR. Esto sugiere que un número importante de la población puede ser portadora asintomática, lo que tendría un papel muy importante en la epidemiología de la enfermedad (Zuerner & Alt, 2009). En dos organismos a los que se les realizó tinción de plata en cortes de riñón, los resultados fueron congruentes con los obtenidos mediante la técnica de PCR.

En otros sitios de distribución de la especie como son las costas de California y Oregon, se han presentado eventos de mortalidad masiva causados por esta bacteria desde la década de 1970 a la fecha, y estos se dan de manera

periódica cada 3 a 4 años (Colagross-Schouten *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 2008).

En México se ha evaluado la presencia de anticuerpos contra *Leptospira*, principalmente en crías en diversas colonias del Golfo de California mediante MAT, o de la presencia de la bacteria en sangre y orina mediante PCR. Dos estudios muestran una seroprevalencia de 32% y 54% respectivamente, siendo las serovariedades más frecuentemente encontradas las *hardjo* y *cynopteri* (Godinez *et al.*, 1998; Acevedo-Whitehouse, 2003), a diferencia de las poblaciones de la costa oeste de EUA, donde la variedad *pomona* es la más frecuentemente asociada con la enfermedad (Zuerner & Alt, 2009). Se carece de información acerca de las serovariedades presentes en las colonias del Pacífico mexicano.

El mecanismo de transmisión aún se desconoce, aunque se sugiere que podría ser a través de la contaminación de las costas marinas con las excreciones de lobos marinos infectados (Cameron *et al.*, 2008). Se sabe que la bacteria es capaz de sobrevivir en cuerpos de agua salada marina por periodos cortos y que tiene una distribución cosmopolita (Cameron *et al.*, 2008). Se han tomado muestras de pozas de agua en las colonias del golfo, considerando que en estas se pudiera acumular orina de los animales y al estar el agua estancada, favorecería a la supervivencia de la bacteria, sin embargo los resultados han sido negativos (Acevedo- Whitehouse *et al.*, 2003).

Se desconoce cuál ha sido la fuente de contaminación o infección de estos animales, en este estudio no se llegó a identificar la genomo-especie o serovariedad a la que pertenecen las bacterias detectadas, sin embargo podría lograrse en el futuro. El tener esta información podría orientarnos hacia la fuente de contaminación, ya que ciertas variedades están íntimamente asociadas a una especie en particular, así como los mecanismos de infección y reinfección de las poblaciones de lobo marino (Romero y Yasuda, 2006).

Ya que el número de muestras de tejidos obtenidas de animales muertos frescos suele ser muy limitado, es de gran importancia para futuras investigaciones ampliar el muestreo a animales vivos; las muestras que podrían ser colectadas son: orina, suero y sangre e incluso arena contaminada con orina y heces (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2008). Con este tipo de muestras, se podrían realizar estudios diagnósticos mediante técnicas como PCR, MAT, e incluso intentar el aislamiento de la bacteria, sobre todo considerando, que los animales que fueron positivos, no murieron a causa de la presencia de esta bacteria en sus tejidos.

Esta puede no ser aun, una causa importante de mortalidad, pero es una enfermedad latente que podría emerger en cualquier momento como ha sucedido en las poblaciones de E.U.A., e incluso podría afectar a las poblaciones humanas (Zuerner & Alt, 2009).

Las pruebas para el diagnóstico de *Brucella* spp., se realizaron también mediante PCR. Todos los animales analizados fueron negativos. La brucelosis es considerada una importante zoonosis, la bacteria se encuentra en numerosas especies terrestres y a partir de la década de 1990 se ha aislado también de animales marinos las subespecies *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti* (Nielsen *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2007).

En el caso de los pinnípedos se aisló por primera vez de la foca común *Phoca vitulina* en Escocia en 1994 (Ross *et al.*, 1994) y ha sido posteriormente aislada de diversas especies de fócidos y de algunos odobénidos (Forbes *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001). En otáridos, su presencia ha sido casi insignificante, se han encontrado algunos animales seropositivos, pero en proporciones muy bajas (Burek *et al.*, 2005; Roe *et al.*, 2010). En México se realizó un estudio en el cual 22.5% de los animales fueron positivos a *Brucella* terrestre y 14% a la cepa marina (Avalos-Tellez *et al.*, en prensa). No hay reportes de animales que

presenten los signos clínicos de la enfermedad como en el caso de fócidos y cetáceos.

Los estudios realizados alrededor del mundo sugieren que la brucelosis es una enfermedad enzoótica en muchos de los océanos del mundo. Pocas patologías han sido asociadas a la infección con la bacteria, por lo que parece ser un patógeno secundario u oportunista, sin embargo podría llegar a tener un fuerte impacto en las poblaciones al afectar sus tasas de natalidad ya que provoca abortos e infertilidad (Foster *et al.*, 2002).

Durante las necropsias realizadas en este estudio no se encontraron lesiones que sugirieran a presencia de la enfermedad, por lo que los resultados son congruentes. Sin embargo, la brucelosis es considerada una zoonosis reemergente por lo que su monitoreo constante es de gran importancia (Godfroid *et al.*, 2004).

Infecciones por Morbillivirus han sido causantes de al menos 8 eventos de mortalidades masivas de mamíferos marinos alrededor del mundo en los últimos años (Stone *et al.*, 2012). La enfermedad afecta principalmente las vías respiratorias, así como al sistema nervioso central, principalmente al cerebro, también presenta una forma dérmica (Kennedy-Stoskopf, 2001). Para nuestro estudio, solo uno de los casos examinados presentaba signos respiratorios (ejemplar 17), y ninguno presentó signos nerviosos. Se realizó la prueba por RT-PCR a 3 animales (incluido el que presentó signos respiratorios), todos fueron negativos.

Hasta 1988 se conocían solo 4 miembros de este género viral, Measles Virus (MV) causante del sarampión, Canine Distemper Virus (CDV) causante del moquillo canino, Rinder Pest Virus (RPV) de la peste bovina y Peste-des-Pettite Ruminants Virus (PPRV) de la peste de pequeños rumiantes (Kennedy-Stoskopf, 2001). Actualmente se conocen además 4 miembros que afectan a mamíferos marinos, el Phocine Distemper Virus, aislado de focas, el cual es muy cercano al CDV, el Porpoise morbillivirus, de marsopas, el Dolphin morbillivirus (DMV) en delfines y el Pilot whale morbillivirus (PWMB) en ballenas piloto, los 3

últimos muy cercanos entre si y se les considera en general como Cetacean morbillivirus (CMV), y que a su vez son más cercanos a los RPV y PPRV. Se han obtenido resultados positivos de animales muestreados en colonias de México (Golfo de California), y al realizar la secuenciación, se encontró que el virus encontrado es muy cercano al que produce el moquillo canino (CDV) (Suárez-Ramírez, datos no publicados<sup>2</sup>).

La prevalencia de las causas de muerte identificadas en este estudio, en cuanto a categoría de edad y sexo para el traumatismo craneal fue igual para hembras y machos y la única categoría que se vio afectada por esta, fueron los juveniles. En las causas relacionadas con la salud de los animales, como el carcinoma y la neumonía, fueron más altas en los machos e iguales para adultos y subadultos. Para la presencia de *Leptospira*, de la misma manera fue mayor en machos que en hembras, y se encontró de igual manera en juveniles, subadultos y adultos.

En otras regiones como California y Oregon (Stroud *et al.*, 1979; Greig *et al.*, 2005) se han realizado múltiples estudios de la mortalidad y patologías más comunes en esta especie, sin embargo esta es la primera vez que se conduce un estudio dirigido a conocer las causas de mortalidad en alguna población mexicana de *Zalophus californianus*.

Aunque nuestro número de muestra es limitado y fue colectado en un periodo muy corto, no se encontró evidencia que sugiera la presencia de las enfermedades más prevalentes en otras áreas como el carcinoma urogenital, intoxicación por ácido domoico, e incluso la leptospirosis (Colagross-Schouten *et al.*, 2002; Gulland *et al.*, 2002; Colegrove *et al.*, 2009). A pesar de que ésta última se encontró en una alta proporción de los animales muestreados, en ninguno de estos casos se encontraron las lesiones patológicas, por lo que no se puede decir que presentaban la enfermedad, y fueron considerados como casos subclínicos. Sin embargo, la presencia de la bacteria representa una alerta ante

(2) Suárez-Ramírez, L.. 2013 Datos no publicados. Laboratorio de Virología veterinaria. UNAM. México D.F.

futuros brotes de la enfermedad. El resto de las enfermedades no pueden descartarse sin realizar las pruebas diagnósticas específicas.

Cabe destacar que este muestreo fue conducido en un periodo muy corto y con un número limitado de muestras, por lo que más estudios son necesarios, ya que se tienen muestras de un periodo durante el cual se incrementa también la actividad pesquera, lo que podría repercutir directamente en el incremento de mortalidad por traumatismo craneal observado, pero no necesariamente esta tendencia se mantenga durante todo el año. Quizá en periodos de baja productividad, y por lo tanto menor abundancia de alimento, un mayor número de animales presenten mortalidad a causa del síndrome de malnutrición, lo cual favorecería también la presencia de enfermedades.

Es de gran importancia que se continúe con más estudios epidemiológicos y de ecología de enfermedades, que permitan ampliar la colección de muestras durante diferentes épocas del año, y que proporcionen información más completa sobre las causas de muerte en la zona, ya que el estado de salud de los animales es un reflejo de la salud del ecosistema (Schwacke *et al.*, 2013).

## 10. CONCLUSIONES

Después de realizar este estudio, podemos concluir que debido a la temporalidad del muestreo (mayo-junio), la hipótesis originalmente propuesta de que la mayoría de las causas de muerte estarían dentro del síndrome de malnutrición, no fue soportada. Esto probablemente debido a que las necropsias se realizaron solo durante una época del año en la cual la región es altamente productiva y por lo tanto hay más abundancia de alimento. También durante esta época aumenta la actividad pesquera, lo que explica que exista una alta incidencia de animales con lesiones craneales (42%), las cuales parecen estar más relacionadas con la pesca, que con el síndrome de malnutrición.

La mayoría de los animales que se varan, presentan un alto grado de descomposición (categoría 4), lo que indica que la mayoría de estos mueren en el mar. Los animales que se encontraron frescos, murieron en tierra y la mayoría presentaron lesiones patológicas de importancia.

No se encontró evidencia clara de enfermedades epizoóticas que estén relacionadas a los varamientos, sin embargo existe la presencia de enfermedades de importancia que requieren ser monitoreadas, tales como el cáncer y la latente leptospirosis, que pueden tener importantes implicaciones ecológicas y epidemiológicas.

Es importante continuar este tipo de estudios con el fin de determinar el estado de salud de las poblaciones mexicanas de esta especie, ya que con ello se mide indirectamente el estado de salud de los ecosistemas y pudiera asociarse con cambios ambientales y climáticos.

## 11. LITERATURA CITADA

Acevedo-Whitehouse, K., W.K. Acevedo, C.F. Constantino, G.D. Aurióles, M.H. Rodríguez & R.C.R. Godínez. 1999. Hepatic carcinoma with spleen metastasis in a California sea lion from the Gulf of California. *J Wildlife Dis.* 35: 565-68.

Acevedo-Whitehouse, K., F. Gulland, D. Greig & W. Amos. 2003. Inbreeding: Disease susceptibility in California Sea Lions. *Nature.* 422:35.

Acevedo-Whitehouse, K., H. de la Cuevas, F.M.D. Gulland, D. Aurióles-Gamboa, F. Arellano-Carbajal & F. Suarez-Güemes. 2003. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J. Wildlife Dis.* 39(1): 145–151.

Antonelis, G.A. Jr. & C.H. Fiscus. 1980. The pinnipeds of the California current. *Cal. Coop. Ocean Fish.* 21:68-78.

Arreguín-Sánchez, F. 2000. Modelación de flujos de biomasa de centros de actividad biológica. *En: Lluch-Belda D., J. Elourduy-Garay, S. E. Lluch-Cota & G. Ponce-Díaz (Eds). BAC, Centros de Actividad Biológica del Pacífico mexicano.* 367 p.

Ascencio-Estrada, H. 2010. Evaluación de la Mortalidad del Lobo Marino de California *Zalophus Californianus* en Isla Magdalena B.C.S. México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. 98 p.

Aurióles, G.D., F. Sinsel, C. Fox, E. Alvarado & O. Maravilla. 1983. Winter migration of subadult male California sea lions (*Zalophus californianus*) in the southern part of Baja California. *J. Mammal.* 64: 513-518.

Aurioles, G. D. & F. Sinsel. 1988. Mortality of California sea lion pups at Los Islotes Baja California Sur, México. *J. Mammal.* 69: 180-183.

Aurioles, G.D. & B.J. Le Boeuf. 1991. Effects of the El Niño 1983 on the California sea lion population in México, p. 112-118. *En: Trillmich F. y K. Ono (Eds), Pinnipeds and El Niño. Responses to environmental stress.* Springer-Verlag, 293 p.

Aurioles, G. D. & A. Zavala-Gonzalez. 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Cienc. Mar.* 20: 535-553.

Ávalos-Téllez, R., C. Ramirez-Pfeiffer, R. Hernández-Castro, E. Díaz-Aparicio, C. Sánchez-Domínguez, A. Zavala-Norzagaray, B. Arellano-Reynoso, F. Suárez-Güemes, A. A. Aguirre, D. Aurioles-Gamboa. 2013. Brucella infection in Sea Lions (*Zalophus californianus*) from the Gulf of California. *Vet. J.* en prensa.

Baker, J.R. 1887. Causes of mortality and morbidity in wild juvenile and adult grey seals (*Halichoerus grypus*). *Brit. Vet. J.* 143:203-220.

Baker, J.R & T.S McCann. 1989. Pathology and bacteriology of adult male Antarctic fur seals, *Arctocephalus gazella*, dying at Bird Island, South Georgia. *Brit Vet. J.* 145:263-275.

Bravo, E., G. Heckel, Y. Schramm & R. Escobar-Fernández. 2005. Occurrence and distribution of marine mammal strandings in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico, 1998-2001. *LAJAM.* 4(1): 15-25.

Burek, K.A., F.M.Gulland, G. Scheffield, K.B. Beckmen, E. Keyes, T.R. Spraker, A.W. Smith, D.E. Skilling, J.F. Evermann, J.L Stott, J.T.Saliki & A.W. Trites. 2005. Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias*

*jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data. *J. Wildlife Dis.* 41:512-24.

Cameron, C. E, R.L. Zuerner, S. Raverty, K.M. Colegrove, S. A. Norman, D. M. Lambourn, S. J. Jeffries, F. M. Gulland. 2008. Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and Identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment. *J. of Clin. Microbiol.* 46, 1728-1733.

Caughley, G. 1966. Mortality patterns in mammals: *Ecology.* 47: 906-918.

Colagross-Schouten, A. M., J. A. Mazet, F. M. Gulland, M. A. Miller, & S. Hietala. 2002. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *J. Wildlife Dis.* 38:7–17

Colegrove, K.M., F.M.D. Gulland, D.K. Naydan & L.J. Lowenstine. 2009. Tumor morphology and immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptor, p53, and Ki67 in urogenital carcinomas of California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Pathol.* 46:642–655.

Dailey, M.D. 2001. Parasitic diseases. In: *CRC Handbook of marine mammal medicine*, L. A. Dierauf LA and F. M. D. Gulland FMD editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, 357-379 p.

Delgado-Estrella, A., J.G. Ortega-Ortiz & A. Sánchez-Ríos. 1994. Varamientos de mamíferos marinos durante primavera y otoño y su relación con la actividad humana en el norte del Golfo de California. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México Ser. Zool.* 65(2):287-295.

Del Toro, L., G. Heckel , V.F. Camacho-Ibar, Y. Schramm. 2006. California sea lions (*Zalophus californianus californianus*) have lower chlorinated hydrocarbon

contents in northern Baja California, México, than in California, USA. *Environ Pollut* 142:83-92.

Department of Health and Human Services. 2003. *Medical examiners' and coroners' Handbook of death registration and fetal death reporting*. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. National Center of Health Statistics. E.U.A. 130 p.

Dierauf, A.L. 1990. Marine Mammal Necropsy Specimen Collection, p. 291-294. *En*: Dierauf, A.L. (Ed). *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease and Rehabilitation*. Dierauf, A.L. CRS Press. Boca Ratón, Florida. 1065 p.

Dierauf, A.L. & L.J. Gage. 1990. Gross Necropsy of Cetaceans and Pinnipeds, p. 285-286. *En*: Dierauf, A.L. (Ed). *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease and Rehabilitation*. Dierauf, A.L. CRS Press. Boca Ratón, Florida. 1065 p.

Diario Oficial de la Federación. 2012. ACUERDO por el que se modifica el Aviso por el que se da a conocer el establecimiento de épocas y zonas de veda para la pesca de diferentes especies de la fauna acuática en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos, publicado el 16 de marzo de 1994 para establecer los periodos de veda de pulpo en el Sistema Arrecifal Veracruzano, jaiba en Sonora y Sinaloa, tiburones y rayas en el Océano Pacífico y tiburones en el Golfo de México. SAGARPA. México.

Durlacher, S.H., W.G. Bunfield, A.D. Bergner. 1950. Post-mortem pulmonary edema. *Yale J. Biol. Med.* 22(6): 565–572.

Farooq, U., Q. Mahmood-Khan & T. Barrett. 2008. Molecular diagnosis of

rinderpest and peste des petits ruminants virus using trizol reagent. *Pak. Vet. J.* 28, 63-67.

Fauquier, D., F. Gulland, M. Haulena, M. Dailey, R.L. Rietcheck, T.P. Lipscomb. 2004. Meningoencephalitis in Two Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) Caused by Aberrant Trematode Migration. *J. Wildlife Dis.* 40(4): 816–819.

Forbes, L. B., O. Nielsen, L. Measures & D.R. Ewalt. 2000. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *J. Wildlife Dis.* 36:595–598.

Foster, G., A.P. MacMillan, J. Godfroid, F. Howie, H.M. Ross, A. Cloeckaert, R.J. Reid, S. Brew & I.A.P. Patterson. 2002. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90:563–580.

Foster, G., B.S. Osterman, J. Godfroid, I. Jaques & A. Cloeckaert. 2007. *Brucella ceti* sp.nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetacean and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 57: 2688–2693.

Fuller, G. N. & P. C. Burger. 2007. Central nervous system, p. 273-319. *En: Mills, E. (Ed) Histology for pathologists, Third Edition.* Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. U.S.A. 1272 p.

Gallo-Reynoso, J.P. 1986. Sobre los mamíferos marinos mexicanos. *Técnica Pesquera.* 1986: 10-16.

Geraci, J.R. & D.J. St. Aubin. 1987. Effects of Parasites on Marine Mammals. *Int J. Parasitol.* 17(2).

Geraci, J.R., J. Harwood y V. J. Lounsbury, 1999. Marine Mammals Die-Offs, p. 363-395. *En: Conservation and management of marine mammals*, Twiss, J.R y Reeves, R. R. Smithsonian Institution Press. U.S.A. 576 p.

Geraci, J.R. & V.J. Lounsbury. 1993. *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*. Texas A&M University Se Grant College Program. U.S.A. 271 p.

Gerber, J.A., J. Roletto, L.E. Morgan, D.M. Smith, L.J. Gage. 1993. Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *J. Wildlife Dis.* 29:423-33.

Godfroid, J., A. Cloeckaert, J.P. Liutard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B.Garin-Bastuji & J.J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36: 313-326

Godínez, C.R., B. Zelaya de Romillo, D. Aurióles-Gamboa, A. Verdugo-Rodríguez, E.A. Rodríguez-Reyes & A. De la Pena-Moctezuma. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. *J. Wildlife Dis.* 35:108-111.

Goldstein, T., T.S. Zabka, R.L. De Long, E.A. Wheeler, G. Ylitalo, S Bargu, M. Silver, T. Leighfield, F. Van Dolah, G. Langlois, I. Sidor, J. Lawrance-Dunn & F.M.D. Gulland. 2009. The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California. *J. Wildlife Dis.* 45(1): 91–108

Goldstein, T., K.M. Colegrove, M. Hanson & F.M.D. Gulland. 2011. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis. Aquat. Org.* 94: 243–248.

Greig, D.J., F.M.D. Gulland & C. Kreuder. 2005. A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) stranding along the central California coast: Causes and trends, 1991-2000. *Aquatic Mammals*. 31(1):11-22.

Gulland, F.M., M. Haulena, D. Fauquier, G. Langlois, M. E. Lander, T. Zabka & R. Duerr. 2002. Domoic acid toxicity in Californian sea lions (*Zalophus californianus*): clinical signs, treatment and survival. *Vet. Rec.* 150(15):475-80.

Haulena, M., F.M.D. Gulland, J.A. Lawrence, D.A. Fauquier, S. Jang, B. Aldridge, T. Spraker, L.C. Thomas, D.R. Brown, L. Wendland & M.K. Davidson. 2006. Lesions associated with a novel *Mycoplasma* sp. in California sea lions (*Zalophus californianus*) undergoing rehabilitation. *J. Wildlife Dis.* 42(1): 40–45

Heath, C.B. & W.F. Prim. 2009. California, Galapagos and Japanese sea lions, *Zalophus californianus*, *Z. wollebeaki* and *Z. Japonicus*, p. 170-175. *En: Perrin W. F., B. Würsig, J. G. M. Thewissen (Eds). Encyclopedia of Marine Mammals.* Elsevier. E.U.A. 1320 p.

Hernández-Camacho, C., D. Aurióles-Gamboa, J. Laake, & L. Gerber. 2008. Survival rates of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico. *J Mammal.* 89(4):1059-1066.

Hernández-Camacho, C. 2001. Tabla de vida del lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* en la lobera Los Islotes, B.C.S., México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. 66 p.

Hernández-Castro, R., L. Martínez-Chavarría, A. Díaz-Avelar, A. Romero-Osorio, C. Godínez-Reyes, A. Zavala-González, A. Verdugo-Rodríguez. 2005. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. *The Veterinary Journal.* 170(3): 359-363.

Johnson, S.P., S. Jang, F.M. Gulland, M.A. Miller, D.R. Casper, J. Lawrence & J. Herrera. 2003. Characterization and clinical manifestations of *Arcanobacterium phocae* infections in marine mammals stranded along the central California coast. *J. Wildlife Dis.* 39: 136-44.

Kajiwara, N., K. Kannan, M. Muraoka, M. Watanabe, S. Takahashi, F. Gulland, H. Olsen, A.L. Blankenship, P.D. Jones, S. Tanabe, J.P. Giesy. 2001. Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls, and Butyltin Compounds in Blubber and Livers of Stranded California Sea Lions, Elephant Seals, and Harbor Seals from Coastal California, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 90–99.

Kennedy-Stoskopf, S., 2001. Viral Diseases, p. 285-307. *En: Dierauf, A.L. & F.M. Gulland (Ed). Handbook of Marine Mammal Medicine, 2<sup>nd</sup> edition. CRS Press. Boca Raton, Florida. 1063 p.*

Keyes, R.S. 1965. Pathology of the northern fur seal. *Amer. Vet. Med. Assoc. J.* 147:1090-1095.

King, D.P., M.C. Hure, T. Goldstein, B.M. Aldridge, F.M. Gulland, J.T. Saliki, E.L. Buckles, L.J. Lowenstine & J.L. Stott. 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel gamma herpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 86(1-2):131-137.

Kovacs, K.M., A. Aguilar, D. Aurióles, V. Burkanov, C. Campagna, N. Gales, T. Gelatt, S. D. Goldsworthy, S. J. Goodman, G. J. G. Hofmeyr, T. Härkönen, L. Lowry, C. Lydersen, J. Schipper, T. Sipilä, C. Southwell, S. Stuart, D. Thompson, F. Trillmich. 2012. Global threats to pinnipeds. *Mar. Mammal Sc.* 28(2): 414–436.

Le Boeuf, B.J., R.J. Whiting & R.F. Gantt. 1972. Perinatal behavior of northern elephant seal females and their young. *Behavior*. 43:121-156.

Linn, S. 1981. Deoxyribonucleases: survey and perspectives. *En: The enzymes*. Vol. 14. Edited by P. D. Boyer. Academic Press, New York. 121-135 p.

Lipscomb, T.P., D.P. Scott, R.L. Garber, A.E. Krafft, M.M. Tsai, J.H. Lichy, J.K. Taubenberger, F.Y. Schulman & F.M.D. Gulland. 2000. Common Metastatic Carcinoma of California Sea Lions (*Zalophus californianus*): Evidence of Genital Origin and Association with Novel Gamma herpes virus. *Vet. Pathol.* 37:609-617.

Léon, A, S. Pronost, J. Tapprest, N. Foucher, B. Blanchard, G. André-Fontaine, C. Laugier, G. Fortier & R. Leclerc. 2006. Identification of Pathogenic *Leptospira* strains in Tissues of a premature foal by use of Polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:218-221.

Lorenzo, C., A. Carrilo-Reyes, T. Rioja-Paradela & M. La Paz-Cuevas. 2012. Estado actual de conservación de liebres insulares en Baja California Sur. *Therya*. 3:185-206.

Matsuda, M., S. Hashiura, Y. Une, H. Sirouzu & Y. Nomura. 2003. Two distinct carcinomas of mammary gland origin in a California sea lion. *J. Wildlife Dis.* 39:241-243.

McAloose, D. & A. Newton. 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Rev.* 9(7):517-526.

Mercuri, M. 2007. Varamiento de Mamíferos Marinos en Isla Magdalena, B.C.S., México y su Relación con Factores Físicos y Biológicos. Tesis de Maestría en

Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. 122 p.

Measures, L.N. 2001. Lungworms of marine mammals, p. 279-290. *En: W.M. Samuel, M.J. Pybus, A. Kocan (Eds). Parasitic Diseases of Wild Mammals'. 2nd edition. 559 p.*

Mikaelian, I., R. Higgins, M. Lequent, M. Major, F. Lefebvre, D. Martineau.1997. Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area. *Can Vet J* 1997; 38:440-442

Munson, L. 2006. *Necropsy of wild animals*. Wildlife Health Center, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis. U.S.A. 28 p.

Nielsen, O., R.E.A. Stewart, K. Nielsen, L. Measures, & P. Duignan. 2001. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. *J. Wildlife Dis.* 37:89–100.

Nielsen, O., K. Nielsen & R. E. A. Stewart. 1996. Serologic evidence of *Brucella* spp. exposure in Atlantic walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) and ringed seals (*Phoca hispida*) of Arctic Canada. *Artic* 49: 383–386.

Nollens, H.H., E.R. Jacobson, F.M.D. Gulland, D.O. Beusse, G.D. Bossart, J.A. Hernandez, P.A. Klein & R.C. Condit. 2006. Pathology and preliminary characterization of a parapoxvirus isolated from a California sea lion (*Zalophus californianus*). *J. Wildlife Dis.* 42(1): 23–32

Ralls, K., R.L. Brownell & F. Ballou. 1980. Differential mortality by sex and age in mammals, with special reference to the sperm whale. *Rep. Int. Whaling Comm.* 2:233–243.

Ramírez-Rodríguez, M. 1996. Pesquería de escama, p. 287-304. *En: Casas-Valdez, M. & G. Ponce-Diaz (Eds). Estudio del potencia pesquero y acuicola de Baja California Sur. Vol.1.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 350 p

Read, A.J. & K.T. Murray. 2000. Gross Evidence of Human-Induced Mortality in Small Cetaceans. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-15. 21 p.

Riedman, M. 1990. *The pinnipeds: Seals, sea lions and walruses.* University of California Press. Berkeley, CA. U.S.A. 439 p.

Rodríguez-Sánchez, R., S. Hernández-Vázquez, D. Lluch-Belda, R. Felix-Uraga, S. Ortega-García, A. Villa-Arce, G. Ponce-Diaz & D. Lluch-Cota. 1996. Pesquerías de pelágicos menores (Sardinias y anchovetas), p. 317-350. *En: Casas-Valdez, M. & G. Ponce-Diaz (Eds). Estudio del potencia pesquero y acuicola de Baja California Sur. Vol.1.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 350 p.

Roe, W.D., L.E. Rogers, B.D. Gartrell, B.L.Chilvers & P.J. Duignan. 2010. Serologic evaluation of New Zealand sea lions for exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp. *J. Wildlife Dis.* 46:1295-9.

Romero, E.C. & H.P. Yasuda. 2006. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health too. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 373-378.

Ross, H. M., G. Foster, R. J. Reid, K. L. Jahans & A. P. Macmillan. 1994. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet. Rec.* 134: 359.

Sato, T., T. Higuchi, H. Shibuya, S. Ohba, S. Nogami, W. Shirai, H. Watanabe, & S. Honda. 2002. Lingual Squamous Cell Carcinoma In A California Sea Lion (*Zalophus Californianus*). *J. Zoo Wildlife Med.* 33(4):367-370.

Schwacke, L., F.M. Gulland & S. White. 2013. Sentinel Species in Oceans and Human Health, p. 503-528. *En: E.A. Laws (Ed). Environmental Toxicology. Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology.* Springer. E.U.A. 737 p.

SEMARNAT, 2013. Protocolo varamientos MM. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (SEMARNAT). Subsecretaría de Fomento y Normatividad Ambiental. México. 45 p.

Seutin, G., B.N. White, & P.T. Boag. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69:82-90.

Smith, A.W. & D.E. Skilling. 1979. Viruses and virus diseases of marine mammals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175: 918-920.

Spraker, T.R., R.L. DeLong, E.T. Lyons & S.R. Melin. 2007. Hookworm enteritis with bacteremia in California sea lion pups on San Miguel Islando. *J. Wildlife Dis.* 43(2): 179–188

Stapleton, H.M., N.G. Dodder, J.R. Kucklick, C.M. Reddy, M.M. Schantz, P.R. Becker, F. Gulland, B.J. Porter & S.A. Wise. 2006. Determination of HBCD, PBDEs and MeO-BDEsin California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded between 1993 and 2003. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 522–531

Stone, B. M., D. J. Blyde, J. T. Saliki, J. M. Morton. Morbillivirus Infection In Live Stranded, Injured, Trapped, And Captive Cetaceans In Southeastern Queensland And Northern New South Wales, Australia. *J. Wildl. Dis.* 48:47-55.

Stroud, R.K. & T.J. Roffe. 1979. Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon Coast. *J. Wildlife Dis.* 15:91-97.

Stunkard, H.W. & C.H. Alvey. 1930. *The morphology of Zalophotrema hepaticum, with a review of the trematode family fasciolidae.* Department of Biology, New York University. U.S.A. 326-332 p.

Terra, R., K.D. Greig, K.M. Colgrove, L. Lowenstine, M. Dailey, F.M. Gullando & M. Haulena. 2005. Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California Sea Lion (*Zalophus californianus*) a new Host-parasite association. *J. Wildlife Dis.* 41(3): 593–598.

Trigo-Tavera, F.J. 2007. *Patología Sistémica Veterinaria, Tercera edición.* McGraw-Hill Interamericana. México. 421 p.

Trillmich, F. & D. Limberger. 1985. Drastic effects of El Niño on Galapagos pinnipeds. *Oecologia.* 67:19–22.

Valero, E.G. 1997. *Diagnóstico veterinario. Requisitos, procesos, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas.* Segunda Edición. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. 51 -57 p.

Van Bonn, W., E.D. Jensen, C. House, J.A. House, T. Burrage, A. Gregg. 2000. Epizootic vesicular disease in captive California sea lions. *J. Wildlife Dis.* 36:500-507.

Vikram, R.P. & D.B. Alastair. 2007. Pathology of liver tumors. *Surgery.* 25(1):10-15.

Villavicencio-Garayzar, C. J. 1996. Pesquería de tiburón y cazón, p. 305-316. *En: Casas-Valdez, M. & G. Ponce-Díaz (Eds). Estudio del potencia pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol.1.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 350 p.

Wheeler, J.S., R.B. Carey, B. Jensen, C.M. Crandall, K.N. Scharader, D. Jessup, K. Colegrove & F.M. Gulland. 2010. Pleuritis and suppurative pneumonia associated with a hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 141(1-2):174-177.

Woo, T.H.S., B.K.C. Patel, L.D. Smythe, M.A. Noris, M.L. Symonds & M.F. Dohnt. 1998. Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a light cycler. *Analytical Biochem.* 256: 132-134.

Wuthiekanun, V., W. Chierakul, D. Limmathurotsakul, L.D. Smythe, M.L. Symonds, M.F. Dohnt, A.T. Slack, R. Limpai boon, Y. Suputtamongkol, N.J. White, N.P.J. Day, S.J. Peacock. 2007. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1363-1365.

Zavala-González, A. y E. Mellink. 1997. Entanglement of California sea lions, *Zalophus californianus californianus*, in fishing gear in the central-northern part of the Gulf of California, Mexico. *Fish Bull.* 95:180-184.

Zuerner, R.L. & C.A. Bolin. 1997. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 35:2612-2617.

Zuerner, R.L. & D.P. Alt. 2009. Variable nucleotide tandem-repeat analysis revealing a unique group of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* isolates associated with California sea lions. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1202–1205

## **ANEXO 1. Método histológico**

### **a. Fijación**

1. Las muestras fueron fijadas en formaldehído neutralizado con fosfatos al 10%.
2. Posteriormente estas fueron divididas en submuestras de las secciones de interés, fueron colocadas en bolsas de tul individualmente y etiquetadas.

### **b. Lavados**

3. Después se sometieron varios lavados con agua corriente para retirar el exceso de formaldehido y se colocaron en alcohol al 70% por 24 hrs.

### **c. Deshidratación, transparentación e impregnación**

4. Las muestras se catalogaron de acuerdo al tamaño y consistencia de los tejidos y se dividieron en 3 lotes: piezas grandes, medianas y pequeñas.
5. A cada uno de estos lotes se le asignaron diferentes tiempos en las diferentes sustancias en el procesador de tejidos, los cuales se muestran en la Tabla I.

Tabla I.- Tiempos dados en el procesador de tejidos para cada lote.

<b>Reactivo</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>
<b>Alcohol etílico 70°</b>	-	-	-
<b>Alcohol etílico 80°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol etílico 96°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol etílico 96°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol etílico 100°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol etílico 100°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol etílico 100°</b>	1 hora	1 hora 30 min	2 horas 30 min
<b>Alcohol-cloroformo</b>	15 min	30 min	30 min
<b>Cloroformo</b>	10 min	15 min	15 min
<b>Cloroformo- parafina</b>	30 min	30 min	30 min
<b>Parafina I</b>	1 hora 30 min	2 horas	2 horas 30 min
<b>Parafina II</b>	1 hora 30 min	2 horas	2 horas 30 min
<b>Parafina III</b>	30 min	1 hora	1 horas

#### **d. Inclusión**

6. Al salir del procesador los tejidos fueron colocados en moldes de cartón hechos a la medida de cada tejido e incluidos en Paraplast de manera individual y se dejaron secar.

#### **e. Microtomía**

7. De los bloques obtenidos se realizaron cortes de 5µm, con un micrótopo rotatorio, se realizaron de 3 a 5 cortes de cada uno de los tejidos las cuales

8. Fueron colocados en portaobjetos de vidrio y se colocaron en la estufa por 24 horas para eliminar el exceso de parafina.

#### **f. Tinción**

9. Posteriormente se realizó la técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina. Los tiempos dados en el proceso de tinción en cada reactivo se muestran en la Tabla II.

10. una vez teñidos fueron montados con cytoseal.

Tabla II.- Tiempos dado en cada paso para la técnica H/E.

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
Hematoxilina de Harris	1 min
Agua corriente	lavar
Alcohol ácido	30 seg
Agua corriente	Lavar 2
Agua amoniacal	Lavar
Agua corriente	2 min
Agua destilada	1 min
Eosina al 1%	30 seg
Alcohol al 96%	Lavar 2

#### **g. Observación**

11.- Las laminillas obtenidas fueron observadas a microscopio de luz, con los objetivos 2x, 4x, 10x, 20x, 40x y 60x en busca de lesiones patológicas.

## **ANEXO 2. Extracción de ADN y ARN**

### **1. Extracción de ADN método clásico (fenol-cloroformo)**

1. Preparación de solución de lisis

#### **Solución de Lisis**

1% SDS

50mM Tris-Cl pH 8

50 mM EDTA pH 8

50mM NaCl

20 µl /ml RNAsa

2. Se incubaron a 56°C durante 1 hr.

#### **Tratamiento con Proteinasa K**

3. Se agregaron 20 µl de Proteinasa K a cada muestra y se incubo a 37°C durante 16 h.

#### **Extracción con Fenol/ Cloroformo**

4. Se agregó Fenol Equilibrado
5. Se homogenizó por vortex
6. Se centrifugó 12,000 xg, 3 min, 4 °C
7. Se recuperó la fase acuosa
8. Se agregó Fenol /Cloroformo (1:1)
9. Se homogenizó por vortex
10. Se centrifugó 12,000 rpm, 3 min, 4 °C
11. Se recuperó la fase acuosa
12. Se agregó Cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1)
13. Se centrifugó 12,000 xg, 3 min, 4 °C
14. Se recuperó la fase acuosa

### **Precipitación con Etanol**

15. Se agregó etanol al 100% (frío) y 10% de Acetato de sodio 5M
16. Se permitió la precipitación del DNA a -70°C 16 h
17. Se centrifugó 12,000 xg, 10 min, 4°C
18. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de DNA se lavó con etanol al 75%
19. Se permitió el secado de la pastilla y se resuspendió en 100 µl de agua grado molecular.

### **Cuantificación de ADN**

Se realizó la cuantificación de ADN en Espectrofotómetro Biotech en 2µl de la muestra (Tabla III)

Una vez obtenidas las concentraciones de ADN en cada muestra se realizaron dos alícuotas de 50 µl, una de estas se designó para el diagnóstico de *Leptospira* y otra para el diagnóstico de *Brucella* mediante PCR, a una concentración de 500 ng/ µl de material genético.

### **Verificación de la viabilidad del ADN**

Se realizó electroforesis de 1µg de ADN de cada muestra en agarosa al 1.6%, con el objetivo de verificar la integridad del DNA.

## **2. Extracción de ADN mediante kit comercial (QUIAGEN)**

Se realizó la extracción a tres tejidos adicionales (testículo, linfonódulo y cerebro). Se realizaron los siguientes pasos:

1. Se colocaron de 10 a 25 mg de cada tejido en tubos previamente etiquetados para microcentrífuga de manera individual
2. Se agregaron 180 µl del Buffer ATL
3. Se agregaron 20 µl de Proteinasa K
4. Se homogenizó por vortex

5. Se incubó a 56°C hasta que el tejido estuvo totalmente lisado (aprox. 1hr)
6. Se homogenizó por vortex durante 15 segundos
- 7.- Se agregaron 200µl del Buffer AL
8. Se homogenizó por vortex
9. Se agregó etanol al 100%
10. Se homogenizo por vortex

### **Verificación de la viabilidad del ADN**

Se realizó electroforesis de 1µg de ADN de cada muestra en agarosa al 1%, con el objetivo de verificar la integridad del DNA.

### **3. Extracción de ARN**

1. Se macero el tejido en un mortero de Ágata con PBS
2. Se colocó el sobrenadante en tubos Ependorf
3. Se agregaron de 500-700 µl de trizol
4. Se agregaron 200 µl de cloroformo
5. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.
6. Se recuperó el sobrenadante en viales de 5ml
7. Se agregaron 500 µl de isopropanol a 4°C
8. Se centrifugo a 12,000 rpm durante 15 min.
9. Se dejó precipitar por 30 min a -20°C
10. Se decantó el sobrenadante
11. Se agregaron 2 ml de etanol al 75%
12. Se centrifugo 12,000 rpm durante 10 min.
13. Decantar el sobrenadante y dejar secar.

### **Verificación de la viabilidad del ARN**

Se realizó electroforesis de 1µg de ARN de cada muestra en agarosa al 1.6%, con el objetivo de verificar la integridad del ARN.

### **ANEXO 3. Protocolos de PCR para diagnóstico de *Leptospira* spp. *Brucella* spp. y Morbillivirus**

#### **1. Diagnóstico de *Leptospira* sp. mediante PCR**

##### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira* spp.**

Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µl totales, conteniendo 300ng de ADN, 0.5 µM iniciador L737 (5'-GACCCGAAGCCTGTGCGAG-3) y del iniciador L1218 (5'-GCCATGCTTAGTCCCGATTAC-3), 0.2 mM dNTP's, 3mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer de reacción 50mM Tris -HCl (pH 8.3), 0.25 mg/ml BSA y 0.4 Unidades de Taq DNA polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 50 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 40 s y 74°C por 1min con 20 s y un ciclo de extensión final a 74°C por 10 min. Posteriormente se realizó la electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

##### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira biflexa sensu lato* (saprófitas)**

Las reacciones se hicieron en un volumen de 15 µl totales, con 300ng de ADN, 0.5 µM iniciador 16S FWD (AGAAATTTGTGCTAATACCGAATGT) y del 16S RVS (GGCGTCGCTGCTTCAGGCTTTTCG), 0.2 mM de cada NTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer de reacción 50mM Tris -HCl (pH 8.3), y 0.4 Unidades de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 50 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 45 s y 74°C por 1min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Se realizó la electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de *Leptospira interrogans sensu lato* (patógenas)**

Las reacciones se hicieron en un volumen de 15 µl con 500ng de ADN, 0.5 µM iniciador P1 (TTC-GAT-TCA-AAG-CAT-GGC-TAA-CG) y del M16 (AAA-GAA-GGA-CTC-AGC-GAC-TGC-G), 0.2 mM de cada NTP, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer de reacción 50mM Tris-HCl (pH 8.3), y 0.5 Unidades de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 50 ciclos a 94°C por 30 s, se aplicó gradiente de 60°C 40 s y 74°C por 2min, seguido de un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Se realizó la electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

## **2. Diagnóstico de *Brucella* sp. mediante PCR**

### **Reacción en cadena de la polimerasa PCR para diagnóstico de *Brucella* sp.**

Las reacciones se hicieron en un volumen de 25µl con 500ng de ADN, 0.4 µM iniciador P26A (5' GCCCCTGACATAACCCGCTT 3'), 0.4 µM del iniciador P26B (5' GAGCGTGACATTTGCCGATA 3'), 0.4 mM de dNTP, 1 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5 µM de Buffer de reacción y 0.15 µM de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 58°C por 1 min, 70°C por 1 min 30 seg, 94°C por 1min, 58°C por un min, seguido de un ciclo de extensión final a 70°C por 10 min. Se realizó la electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio

### **3. Diagnóstico de Morbillivirus mediante R-PCR**

#### **Reacción reversa de la cadena de la polimerasa R-PCR para el diagnóstico de Morbillivirus**

Las reacciones se hicieron con el kit de Qiagen One Step, en un volumen de 25µl, con 5µl de ARN, 5 µl de 5x buffer, 1 µl de dNTP, 0.6 µl del iniciador Forward (5'- ATG TTT ATG ATC ACA GCG GT -3', 0.6 µl del Reverse (5'-ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC-3'), 1 µl de enzima Quiagen. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de transcripción reversa a 50°C por 30 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 min, 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, seguido de un ciclo de extensión final a 72°C por 1 min y en stand by a 4°C. Se realizó la electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.