



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA
MOLECULAR DE MORBILIVIRUS EN LOBOS MARINOS
(*Zalophus californianus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA“**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

I.B. NORA YUKIE DE JESÚS RIVERA GÁMEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ LEOPOLDO AGUILAR FAISAL

DR. HÉCTOR MANUEL ZEPEDA LÓPEZ

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Medicina de Conservación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Héctor Manuel Zepeda López y el Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal, en colaboración con el Dr. Joel Armando Vázquez Pérez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Así mismo con la colaboración del Instituto Nacional de Ecología con el convenio de colaboración INE/A1-033/2008 “Estudio de la condición de salud de aves marinas y pinnípedos en áreas protegidas del norte del Golfo de California: hacia una evaluación de la salud del ecosistema” y de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente con el convenio general PROFEPA-IPN numero PFPA-SJ-DGCPAC-298-2008. Y con el apoyo económico de la beca del Instituto Politécnico Nacional y de la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN registros 20082655 y 20091083.

Agradecimientos

Mamá te agradezco por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí, deseo que sepas que el logro mío, es el logro tuyo, que mi esfuerzo es inspirado en ti, y que mi único ideal eres tú. Te amo.

Papá como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el amor y el apoyo brindado. Te agradezco la orientación que siempre me has otorgado.

A mis hermanos Jahir, Edson, Eder, Ili porque gracias a su apoyo y sus consejos he llegado a realizar la más grande de mis metas (hasta ahora).

A mis sobrinas Ximena y Valeria, que son mi orgullo, espero ser un ejemplo a seguir.

A mi tía Rosita y primos Wendy, Vianey y Orlando por todos los momentos familiares vividos, los buenos y los excelentes.

Arturo porque eres una persona que todo lo comprende y da lo mejor de sí mismo sin esperar nada a cambio, porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario, porque te has ganado el cariño, admiración y respeto de todo el que te conoce.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Toño, Flor, Víctor, Maricela, Geovanna, Mariana Angélica, Jorge, Liz, Mario por el apoyo moral y estímulos brindados con confianza y por infundir en mi ese camino que inicio con toda la responsabilidad que representa el término de mi carrera profesional, por su calidez y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos.

A mis amigos Chela, Suri, Enrique, Joako, Jorge, Peter, Abraham, Daniel por su amistad incondicional, por compartir tantas nuevas aventuras, experiencias, desveladas y triunfos, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

A mis Amigos del norte! Daniela, Paul, Kalita, Mache, Ad, Julio, María Esther, Santa, Ricardo, Fernando, Damián, por que tome un poco de cada uno de ustedes y gracias a ello soy como soy, por los viejos tiempos y por los que vienen.

A mis directores de tesis: Dr. Leopoldo Aguilar y Dr. Héctor Zepeda, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Joel Vázquez por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi comité revisor: Dra. Gisela Gutiérrez, Dra. Norma Herrera, Dr. Ángel Miliar, por sus valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo.

A mis maestros: Dra. Evangelina Muñoz, Dr. Aarón Domínguez, Dr. Juan Asbun, Dr. Alfonso Méndez, por brindarme sus conocimientos y experiencias profesionales.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Índice

	Página
Índice de tablas.	iii
Índice de figuras.	iv
Resumen.	vi
Abstract.	vii
I. Introducción.	1
1.1 Generalidades del morbilivirus.	2
1.2 Mecanismo de replicación de los morbilivirus.	4
1.3 Patogénesis del morbilivirus.	6
1.4 Generalidades de los lobos marinos.	8
1.5 El lobo marino como especie centinela del Golfo de California.	11
1.6 El Golfo de California.	12
1.7 Impacto antropogénico, degradación del hábitat y contaminación.	16
1.8 Epizootias.	17
1.9 Técnicas de diagnóstico de morbilivirus.	18
II. Justificación.	20
III. Objetivo general.	21
IV. Objetivos particulares.	21
V. Materiales y métodos.	22
5.1 Obtención de muestras.	22
5.2 Extracción de ácidos nucleicos.	25
5.3 Detección de morbilivirus mediante la técnica de RT-PCR.	26
5.4 Determinación de la prevalencia de morbilivirus en lobos marinos del Golfo de California.	29
5.5 Identificación del morbilivirus mediante análisis filogenéticos.	30
VI. Resultados.	31
6.1 Límite de detección de la técnica de RT-PCR en punto final.	31
6.2 Detección de morbilivirus mediante la técnica de RT-PCR.	31

6.3 Determinación de la prevalencia de morbilivirus en lobos marinos del Golfo de California.	36
6.4 Análisis filogenéticos de las secuencias.	37
VII. Discusión.	43
VIII. Conclusiones	47
IX. BIBLIOGRAFIA.	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Clasificación taxonómica de los pinnípedos.	8
Tabla 2 Muestras recolectadas en las Islas del Golfo de California.	23
Tabla 3 Muestras recolectadas en la contingencia ocurrida en enero y febrero del 2009 en Mazatlán.	24
Tabla 4 Secuencia de nucleótidos de los iniciadores diseñados.	28
Tabla 5 Concentraciones de los reactivos de la mezcla de reacción de la RT-PCR.	28
Tabla 6 Condiciones de termociclación de la RT-PCR para la amplificación de un fragmento de 215pb del gen N.	28
Tabla 7 Prevalencia de morbilivirus en el Golfo de California en el 2008 y 2009.	37
Tabla 8 Prevalencia de morbilivirus obtenidas en las loberas monitoreadas en el 2008 y 2009	37
Tabla 9 Muestras positivas a morbilivirus.	39
Tabla 10 Epizootias registradas por morbilivirus.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura de un morbilivirus.	3
Figura 2 Ciclo de replicación de un morbilivirus.	5
Figura 3 Dimorfismo sexual de <i>Zalophus californianus</i>	10
Figura 4 Extensión del Golfo de California.	13
Figura 5 Ubicación de la loberas muestreadas en el Golfo de California.	23
Figura 6 Toma de muestras en crías de lobos marinos.	24
Figura 7 Necropsia del lobo marino varado el 29 de enero del 2009.	25
Figura 8 Purificación de los ácidos nucleicos.	26
Figura 9 Alineamiento de los iniciadores con las secuencias descargadas del banco de datos.	27
Figura 10 Vacuna comercial de Canine Distemper Virus utilizada como control positivo.	27
Figura 11 Equipos utilizados en la detección de morbilivirus.	29
Figura 12 Productos de la RT-PCR con un gradiente de concentración de RNA molde para obtener el límite de detección.	32
Figura 13 Productos de la RT-PCR de las muestras de hisopados oro-faríngeos de los lobos marinos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto de 2008.	33
Figura 14 Productos de la RT-PCR de las muestras 1 a la 30 de hisopados oro-faríngeos de los lobos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto del 2009.	34
Figura 15 Productos de la RT-PCR de las muestras 31 a la 60 de hisopados oro-faríngeos de los lobos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto del 2009.	35
Figura 16 Productos de la RT- PCR de las muestras de tejidos de lobos marinos varados en la costa de Mazatlán.	36

Figura 17	Alineamiento de los fragmentos de 151 nucleotidos del gen N.	40
Figura 18	Alineamiento de secuencias de aminoácidos.	41
Figura 19	Árbol filogenético de un fragmento de 151 nt altamente conservados del gen N.	42

RESUMEN

Los morbilivirus son patógenos altamente contagiosos que causan algunas de las enfermedades virales más devastadoras en humanos y en otros animales alrededor del mundo. A lo largo de la década de los años 90 y hasta la actualidad, el morbilivirus de los cetáceos y pinnípedos ha emergido como el patógeno de mayor importancia en mamíferos marinos salvajes, causando grandes epizootias en los océanos Atlántico, Pacífico y Mar Mediterráneo. Los lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) se han identificado como especie modelo para investigación de los efectos contaminantes ambientales en mamíferos marinos y en ecosistemas, por lo cual mediante técnicas de biología molecular se puede identificar y caracterizar el morbilivirus presente en estos mamíferos marinos para implementar una vigilancia epidemiológica en este ecosistema y poder proteger a otras especies susceptibles, algunas endémicas de la región y/o en peligro de extinción.

Se tomaron hisopados oro-faríngeos en cinco loberas en el 2008 y en seis en el 2009 en las Islas del Golfo de California de diez cachorros aparentemente sanos en cada lobera. También se tomaron muestras de tejidos de tres lobos marinos y dos delfines de Risso (*Grampus griseus*) varados en las costas de Mazatlán Sinaloa en enero y febrero de 2009. Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar por RT-PCR un fragmento de 217 pb del gen N de los morbilivirus que afectan mamíferos marinos, se determinó el límite de detección para evaluar la sensibilidad, la cual fue de 0.01 fg de RNA viral/ μ l, que equivale a 1.19 copias de genoma. 13 muestras del 2008 resultaron positivas (prevalencia = 26%) y 8 del 2009 (prevalencia = 13.3%). De las muestras de la contingencia, un lobo marino y los dos delfines de Risso resultaron positivos, observando una prevalencia de 60%. Se seleccionaron productos de PCR positivos de muestras representativas y se enviaron a secuenciar. En el análisis filogenético se observó que todas las secuencias obtenidas tienen alta similitud entre ellas y se relacionan a CDV que afecta a mamíferos marinos. Por la alta prevalencia observada y la ausencia de aparente enfermedad en los animales se sospecha que el morbilivirus puede ser endémico en los lobos marinos del Golfo de California.

ABSTRACT

Morbilliviruses are highly contagious pathogens that cause some of the most devastating viral diseases in humans and other animals around the world. Since the decade of the 90s, the morbillivirus of cetaceans and pinnipeds has emerged as the most important pathogen in wild marine mammals, causing major epidemics in the Atlantic and Pacific Oceans and the Mediterranean Sea. California sea lions (*Zalophus californianus*) have been identified as a model species for research on environmental pollution effects on marine mammals and ecosystems; molecular biology techniques can be used to identify and characterize the morbillivirus present in these marine mammals to implement an epidemiological surveillance on the ecosystem to protect susceptible wildlife species, some of them endemic and/or endangered on the region.

Oro-pharyngeal swabs were taken in five sea lion colonies in 2008 and in six colonies in 2009 in the Gulf of California Islands, ten apparently healthy pups were sampled in each rookery. Tissue samples were also taken from three sea lions and two Risso's dolphins (*Grampus griseus*) stranded on the coasts of Mazatlan Sinaloa in January and February 2009. Specific primers were designed to amplify by RT-PCR a 217 bp fragment of the N gene of the morbilliviruses that affect marine mammals; the detection limit was determined to estimate the sensitivity of the technique, which resulted on 0.01 fg or viral RNA/ μ l, equivalent to 1.19 genome copies. 13 samples of 2008 were positive (prevalence = 26%) and 8 of 2009 (prevalence = 13.3%). Of the samples of the contingency, one sea lion and two Risso's dolphins were positive, having a prevalence of 60%. Representative positive samples were selected to purify each RT-PCR product and were sequenced and analyzed. The phylogenetic analysis showed that all obtained sequences have high similarity between them and that are closely related to canine distemper viruses that affects marine mammals. Because of the high prevalence observed and no apparent sick animals, morbillivirus is suspected to be an endemic disease of sea lions in the Gulf of California.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades emergentes se definen como infecciones de nueva aparición o nueva existencia, con una rápida expansión de rango geográfico y un correspondiente incremento en la detección, prevalencia, mortalidad o morbilidad. Constituyen uno de los problemas más importantes que enfrenta la salud de humanos y animales, así como la conservación de la biodiversidad, ya que tienen complicaciones directas en el bienestar humano, causando impactos económicos enormes, y en el contexto de conservación pueden llevar al rápido decline de las poblaciones e incluso extinciones (Daszak *et al.*, 2000; Aguirre *et al.*, 2002).

Se han documentado muchas enfermedades infecciosas como emergentes o re-emergentes en el ambiente marino. Una enfermedad infecciosa puede emerger en poblaciones debido a cambios en las propiedades del agente infeccioso (mutaciones), cambios en la resistencia del hospedero, cambios ambientales causantes de nuevas interacciones entre el hospedero y el agente, o simplemente cuando el hospedero se ha observado con más detalle (Aguirre *et al.*, 2002).

Los morbilivirus son patógenos altamente contagiosos que causan algunas de las enfermedades virales más devastadoras en humanos y en otros animales alrededor del mundo (Tatsuo, *et al.*, 2001). A lo largo de la década de los años 90 y hasta la actualidad, el morbilivirus de los cetáceos y pinnípedos ha emergido como el patógeno de mayor importancia en los mamíferos marinos salvajes, causando grandes epizootias en los océanos Atlántico, Pacífico y Mar Mediterráneo (Rojas, 2004).

Los miembros del género morbilivirus comprenden a los patógenos como el virus de sarampión o “measles virus” (MV), virus de la peste bovina o “bovine rinderpest virus” (RPV), virus de la peste de pequeños rumiantes o “peste des petits ruminants virus” (PPRV), virus de moquillo canino o “canine distemper virus” (CDV), virus de moquillo de fócidos o “phocine distemper virus” (PDV), morbilivirus de delfín o “dolphin morbillivirus” (DMV), morbilivirus de marsopas o “porpoise morbillivirus” (PMV) y morbilivirus de ballenas piloto o “pilot whale morbillivirus” (PWMV) (Banyard *et al.*, 2008).

Los primeros estudios sobre la patología del virus en focas comunes en el norte de Europa sugieren que es la causa de las epizootias ocurridas a finales de la década de los

80, donde la principal patología encontrada era neumonía intersticial aguda, este virus fue rápidamente aislado y caracterizado, se encontró que estaba estrechamente relacionado a CDV, por lo que fue clasificado como un nuevo miembro del género morbilivirus y nombrado virus de moquillo de fócidos (PDV) (Banyard *et al.*, 2008).

A principios de 1990 se habían identificado dos tipos de morbilivirus en cetáceos: el morbilivirus de marsopa (PMV) aislado de marsopas (*Phocoena phocoena*) localizadas muertas a lo largo de la costa de Irlanda, y el morbilivirus de delfines (DMV) identificado de delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) encontrados varados en la costa del mar mediterráneo (McCullough *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 1993).

En el año 2000 por primera vez se aisló y se analizó un morbilivirus de una ballena piloto de aleta larga (*Globicephalus melas*). Los estudios de biología molecular sugirieron que esta especie marina es hospedera de un nuevo tipo de morbilivirus de cetáceos diferente a PMV y DMV, el cual fue nombrado “pilot whale morbillivirus” (PWMV) (Taubemberger *et al.*, 2000).

1.1. Generalidades del morbilivirus

El género *Morbilivirus* pertenece al orden de los *Mononegavirales*, a la familia *Paramixoviridae* y a la subfamilia de los *Paramixovirinae*. Los paramixovirus son virus esféricos, presentan un pleomorfismo por poseer una envoltura laxa. Su tamaño varía entre 150 y 250 nm. Es muy lábil al calor, a la congelación y a la desecación y por ello el transporte de las muestras para su procesamiento debe realizarse con extremo cuidado a una temperatura de 4°C para evitar la inactivación viral (Mateos, 2006; ICTVdB, 2010).

El genoma del morbilivirus es una cadena sencilla de RNA de sentido negativo, de una longitud aproximada de 16 kilobases (Kb) y es no segmentado, lo que lo hace más estable genéticamente. El genoma contiene seis unidades de transcripción que codifican para seis proteínas estructurales: la proteína de nucleocapside (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina (H) y la RNA polimerasa dependiente de RNA (L) (Banyard *et al.*, 2007) (Figura 1). El gen que codifica para la fosfoproteína P contiene marcos de lectura sobrelapados los cuales codifican para las proteínas no estructurales cuya función es el reconocimiento alternativo del codón de iniciación (C) y la transcripción de RNA (V) (Barret *et al.*, 1992; Banyard *et al.*, 2008).

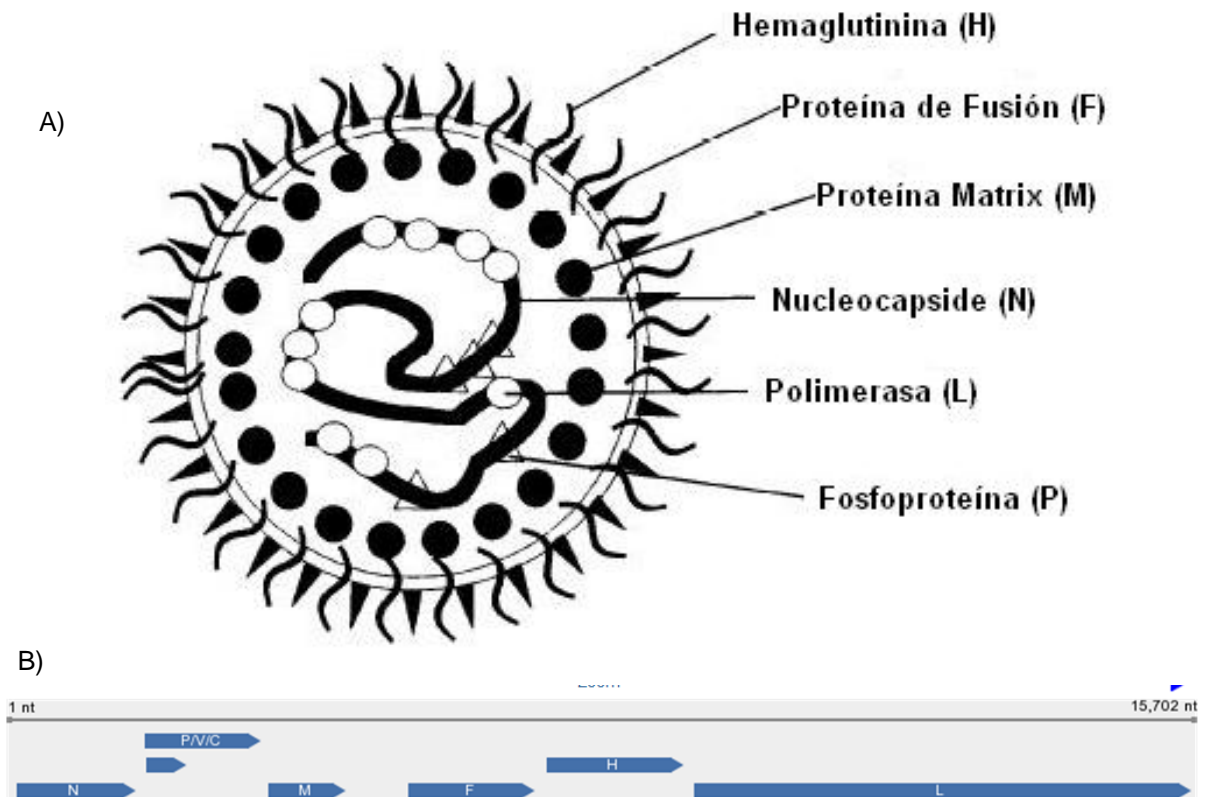


Figura 1. Estructura de un morbilivirus. A) Estructura del virus, donde se pueden observar las proteínas que lo conforman (Hall, 1995). B) Mapa del genoma del morbilivirus, el gen que codifica para la proteína de nucleocapside se ubica del nucleótido 108 al 1679; el gen que codifica para la fosfoproteína del 1801 al 3321; el gen que codifica para la proteína de matriz del 3432 al 4439; el que codifica para la proteína de fusión del 5277 al 6935; el gen que codifica para la hemaglutinina del 7091 al 8905 y el gen que codifica para la polimerasa del 9042 al 15593 (Genome, NCBI)

La proteína N desempeña una función importante en el ciclo de vida del virus, es el principal componente de la capsida helicoidal que envuelve al RNA viral (Blixenkrone-Møller, *et al*, 1994) y lo protege contra las RNasas celulares. La proteína P y L interactúan con la proteína N para formar unidades funcionales de transcripción y replicación del virión (Banyard *et al.*, 2008); la porción carboxilo terminal de la proteína N también interactúa con algunas proteínas reguladoras celulares como el factor de regulación de interferón IRF-3, esta interacción es vital para la eficiente replicación del virus (tenOever *et al*, 2002). La proteína M se ensambla entre la envoltura y la nucleocapside, organiza y mantiene la estructura del virión. Las dos glicoproteínas claves en el proceso de infección por morbilivirus son la proteína F, que es responsable de la fusión del virus y la membrana plasmática, y la proteína H que es la responsable de la adherencia al receptor, esta última es la menos conservada. Esto puede explicar el uso de diferentes receptores celulares

conforme la evolución del virus en diferentes especies de animales (Wild *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2006).

Basados en datos inmunológicos comparativos, se ha propuesto que el virus de la peste bovina representa al virus origen de la familia de los morbilivirus (Norrby *et al.*, 1985), el cual es un virus limitado al orden de los mamíferos herbívoros, artiodáctilos (bovinos, antílopes, jirafas, cerdos y venados), y en un momento debió haber cruzado la barrera de las especies infectando mamíferos carnívoros, dando lugar a CDV y posteriormente, cuando el hombre empezó a vivir en comunidades y a convivir con animales domesticados, el virus de la peste bovina posiblemente dio lugar al virus del sarampión (Wild *et al.*, 1995).

1.2. Mecanismo de replicación de los morbilivirus.

Las partículas virales reconocen a las células hospederas mediante la interacción de la hemaglutinina viral con dos receptores presentes en dos linajes celulares: la CD46, una proteína cofactor de unión de complemento que inhibe la activación de complemento y la CD150 o SLAM (signal lymphocyte-activating molecule) un receptor de los linfocitos y células dendríticas, la cual participa en la activación de estas células (Wild *et al.*, 1995; Tatsuo *et al.*, 2001; Iorio y Mahon, 2008). Después del reconocimiento, la proteína H modifica la conformación de la proteína F, la cual induce la fusión de membranas y el ingreso del virus a la célula. La polimerasa se asocia a la nucleocapside para la replicación y transcripción, por lo que no es necesario el ingreso del virus al núcleo celular. A partir del genoma de RNA negativo se lleva a cabo la transcripción de los diversos genes virales. Una vez que existen componentes proteicos suficientes para formar los viriones inicia la replicación, la cual consiste en la generación de copias positivas completas a partir del RNA genómico, las cuales son denominadas antígenomas y sirven como molde para la síntesis del RNA genómico (Santos *et al.*, 2004).

Las proteínas F y H se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y son glicosiladas en el aparato de Golgi; de ahí son exportadas a la membrana celular mediante vesículas. La proteína M, que se ubica en la parte interna de la membrana celular, tiene un papel muy importante en el ensamble de la partícula viral, ya que

interactúa con las proteínas transmembranales F y H y con la nucleocapside (Santos *et al.*, 2004).

La partícula viral no necesita ensamblarse para que se infecten otras células, ya que con la expresión de las glicoproteínas transmembranales se induce la fusión de la membrana de la célula hospedera con células vecinas, y de esta manera pasan las nucleocapsides de una célula a otra sin exponerse a eventos adversos en el exterior de la célula (Figura 2). Esta fusión de membranas ocasiona el efecto citopático de los paramixovirus, que es la formación de células gigantes multinucleadas llamados sincicios (Santos *et al.*, 2004).

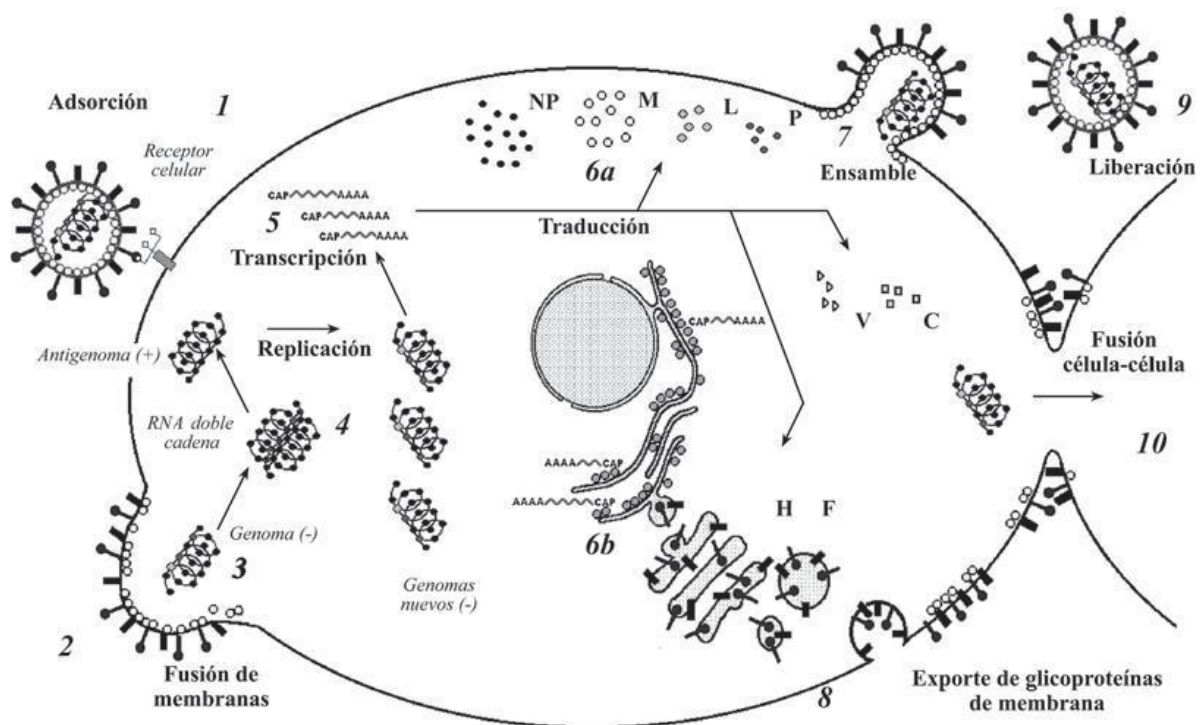


Figura 2. Ciclo de Replicación de un Morbilivirus: 1) Adsorción de la partícula viral a la membrana de la célula hospedera; 2) Fusión de las membranas celular y viral; 3) Liberación de la nucleocapside al citoplasma; 4) Síntesis de RNA de cadena positiva (antigenoma) y replicación de genoma; 5) Producción de RNA mensajero; 6a) Síntesis de proteínas virales; 6b) Las proteínas F y H son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y glicosiladas en el aparato de Golgi; 7) Las proteínas N, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular; 8) Las proteínas F y H son exportadas a la membrana citoplásmica en contacto íntimo con la proteína M; 9) La afinidad de las proteínas N, P y L con la M y ésta con la F y H es determinante para el ensamblaje del virión, el cual es liberado por exocitosis; 10) Los viriones pueden infectar las células vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, produciendo la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera (Modificado de Santos *et al.*, 2004).

1.3. Patogénesis de morbilivirus en mamíferos marinos.

La adaptación a un nuevo hospedero probablemente requiere la habilidad de reconocer y usar diferentes tipos de receptores celulares para la adhesión del virus y la entrada a la célula hospedera (Wild *et al.*, 1995). Sabiendo la distribución de las moléculas SLAM, se puede explicar la patología de los morbilivirus. Se ha propuesto que la infección y destrucción selectiva de los linfocitos que expresan la SLAM puede ser el mecanismo principal de la inmunosupresión causada por los morbilivirus en general (Tatsuo *et al.*, 2001).

Las manifestaciones de la infección viral pueden variar considerablemente entre especies. Estas diferencias de susceptibilidad pueden ser consecuencia de la exposición prolongada de la población, así como por las diferencias en la composición genética de las especies. La susceptibilidad a la infección del morbilivirus está relacionada a la virulencia del virus y la competencia inmunológica (Hall, 1995).

Los receptores celulares en los hospederos son unos de los principales determinantes de la especificidad y tropismo tisular de los virus. La molécula SLAM que se expresa en células T y B activadas, en timocitos inmaduros, en células T de memoria, en monocitos activados y células dendríticas maduras, tiene una función como regulador del sistema inmune (Ohishi, *et al.*, 2010).

La transmisión de miembros del género morbilivirus de un animal a otro se lleva a cabo mediante el contacto con secreciones de las mucosas de algún individuo infectado. Se ha demostrado que el virus no se trasmite de madre a hijo por medio de lactancia ni dentro del útero (Hammond *et al.*, 2005). Una vez que el virus ingresa al organismo, la replicación viral comienza en el bazo, nódulos linfáticos y tonsilas, causando la primer viremia, pirexia y leucopenia. Posteriormente el virus continúa replicándose en los tejidos linfoides y comienza su diseminación hasta llegar a los leucocitos de la piel, membranas mucosas del sistema respiratorio, gastrointestinal, urogenital y sistema nervioso, causando un segundo periodo febril. Los sistemas más afectados son el sistema respiratorio y el sistema nervioso (Rojas, 2004)

En el sistema respiratorio, las observaciones histopatológicas demuestran una neumonía bronquial y alveolitis con congestión, edema y exudación serofibrinosa, proliferación de neumocitos tipo II y formación de sincicios (Lipscomb *et al.*, 1994).

En el cerebro se produce necrosis neuronal, gliosis, infiltración perivascular de células inflamatorias, desmielinización con astrocitosis y sincicios, disminución del tejido linfoide en los nódulos linfáticos y lesiones características de encefalitis, la cual generalmente es no purulenta (Rojas, 2004).

En los exámenes post-mortem de los cetáceos y pinnípedos analizados, las principales observaciones macroscópicas son: caquexia de moderada a severa, representado por una marcada pérdida de volumen de la musculatura, estómagos vacíos, tejido subcutáneo amarillento y edematoso, nódulos linfáticos agrandados y edematosos, necrosis multifocal parenquimal especialmente en los nódulos linfáticos del tracto digestivo, estomatitis erosiva y mucosa densa amarillenta en el lumen. Microscópicamente, las principales lesiones son encontradas en los nódulos linfáticos, los cuales presentan linfoaneditis multifocal necrótica y células sinciciales multinucleadas; encefalitis no purulenta con células sinciciales y corpúsculos de inclusión intranuclear e intracitoplásmica; neumonía intersticial no severa y lesiones inflamatorias en el pulmón (Fernández *et al.*, 2008).

En los pinnípedos, la infección por morbilivirus tiene una signología muy similar a la que se observa en caninos infectados por CDV, presentándose principalmente hipertermia, disnea, síntomas entéricos y nerviosos, edema subcutáneo moderado o severo en la que se observan los clásicos cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplásmicos y los sincicios en lesiones de la piel, acompañado por la signología pulmonar mencionada anteriormente. Esto compromete la capacidad pulmonar para la apnea durante el buceo del animal para conseguir alimento, lo cual impide una alimentación adecuada y contribuye a la inmunosupresión severa inducida por la replicación viral sobre los linfocitos T y B en las placas de Peyer y ganglios linfáticos en el intestino delgado durante las etapas tempranas de la infección. La resultante inmunosupresión incrementa la susceptibilidad a infecciones secundarias como infecciones por bacterias, parásitos y virus los cuales contribuyen a los diversos signos clínicos que se observan (Lipscomb *et al.*, 2001; Di Guardo *et al.*, 2005; Philippa *et al.*, 2009)

1.4. Generalidades de los lobos marinos

El término “pinnipedia” se utiliza para designar al grupo de mamíferos marinos del orden *Carnívora* que se distinguen por presentar miembros anteriores y posteriores en forma de aleta y un cuerpo fusiforme que facilita su desplazamiento en agua. La palabra deriva del latín *pinna* (aleta, pala o ala) y *pedis* (pie) (INE, 2000).

Las tres familias de pinnípedos, *Otariidae*, *Odobenidae* y *Phocidae* (Tabla 1) están distribuidas mundialmente en aguas polares, subpolares y templadas. Hay 14 especies de otáridos (lobos marinos y lobos finos), 19 especies de fócidos (focas verdaderas) y una sola especie de odobénido (la morsa), el último de distribución estrictamente ártica (INE, 2000).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los pinnípedos

<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Subfamilia</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Género</i>	
<i>Carnívora</i>	<i>Otariidae</i>	<i>Otarinae</i>	Lobos marinos	<i>Eumetopias</i>	
				<i>Zalophus</i>	
				<i>Otaria</i>	
				<i>Noephocia</i>	
				<i>Phocartos</i>	
				<i>Arctocephalus</i>	
		<i>Arctocephalinae</i>	Lobos finos	<i>Callorhinus</i>	
				<i>Odobenus</i>	
		<i>Odobenidae</i>	<i>Odobenidae</i>	Morsa	<i>Odobenus</i>
		<i>Phocidae</i>	<i>Phocinae</i>	Focas del norte	<i>Halichoerus</i>
					<i>Cystophora</i>
					<i>Erignatus</i>
					<i>Phoca</i>
					<i>Monachus</i>
<i>Leptonychotes</i>					
<i>Monachinae</i>	Focas del sur	<i>Ommatophoca</i>			
		<i>Lobodon</i>			
		<i>HydrurgaMirounga</i>			

(Modificado de INE, 2000)

De las 34 especies de pinnípedos que se encuentran en el mundo, cuatro (11.52%) residen en México, la *Phoca vitulina richardsii*, el lobo marino común (*Zalophus californianus californianus*), una especie de foca elefante del norte (*Mirounga angustirostris*) y de lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*) (INE, 2000).

Actualmente los pinnípedos mexicanos están considerados dentro de los grupos animales más importantes para la conservación en territorio insular y costero de México: Las cuatro especies vivas se encuentran clasificadas en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza como vulnerable (lobo fino de Guadalupe), casi amenazada (elefante marino) y en menor riesgo (lobo marino de California y foca de puerto) (IUCN, 2010). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana-059-ECO-1994, el lobo marino de California y la foca de puerto son especies sujetas a protección especial; la foca elefante del Norte es especie amenazada y el lobo fino de Guadalupe está clasificado en peligro de extinción (SEMARNAT, 2002).

El lobo marino de California (*Z. californianus californianus*) es el pinnípedo de distribución más amplia y abundante en México. Se distribuye en el Pacífico nororiental, a lo largo de toda la costa occidental de la Península de Baja California y en todo el Golfo de California y se han observado individuos en Punta Mita, Nayarit y en Acapulco, Guerrero. Sus principales áreas de concentración en la costa del Pacífico son las islas Cedros, Natividad, Asunción y Santa Margarita; en el Golfo de California abunda en la Región de las Grandes Islas. En México se ha estimado su población en alrededor de 93,000 individuos: 63,000 en la costa del Pacífico y 30,000 en el Golfo de California (Zavala-González, 1993).

Los otáridos están cubiertos por pelaje de mayor o menor espesor según la especie; tienen una capa de tejido adiposo subcutáneo y presentan pabellón auditivo externo; su estructura pélvica es móvil, lo que les permite apoyar las extremidades posteriores para desplazarse en tierra. Aunque algunas actividades y fases de su biología, como el apareamiento, parto, descanso y muda, las realizan en tierra, los pinnípedos pasan la mayor parte de su vida en el mar, de donde obtienen su alimento. Se alimentan de una gran diversidad de recursos marinos, desde el krill de los mares antárticos hasta crustáceos, moluscos y peces (Odell, 1981).

Los individuos exhiben un marcado dimorfismo sexual; los machos llegan a medir hasta 2.4 m de nariz a cola y pesan aproximadamente 300 kg; las hembras alcanzan un peso de 150 kg con una longitud aproximada de 1.8 m. Al nacer, las crías pesan entre 5.5 y 6.5 kg y miden alrededor de 70 cm. Su pelaje es de color café oscuro, ligeramente más claro en las hembras y juveniles (Figura 3). A diferencia de otras especies de otáridos, la cresta sagital externa de los machos adultos es prominente y muy desarrollada, al igual que los músculos del cuello (Odell, 1981).



Figura 3. Dimorfismo sexual de *Zalophus californianus*. Macho a la izquierda y hembra a la derecha con su lobezno.

Después de la temporada reproductiva, los machos de las colonias del Pacífico migran hacia el norte, a lo largo de la costa de California y, probablemente, hasta Óregon, Washington y la Columbia Británica. Los patrones migratorios de las hembras y los animales jóvenes así como el patrón de migración en el Golfo de California aún no han sido descritos (Odell, 1981).

Los lobos marinos son altamente gregarios, se reúnen en sitios protegidos de depredadores terrestres formando loberas densas, especialmente durante la reproducción que se caracteriza por un sistema sexual poligínico y en donde un macho se aparea con más de una hembra. Ambos sexos alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 5 años de edad, mientras que la madurez física se presenta entre los 8 y 9 años. Se reproducen en junio, julio y parte de agosto. El periodo reproductivo inicia con el establecimiento de los machos en el territorio, posteriormente llegan las hembras a dar luz y tres semanas

después copulan, el periodo de gestación es de 11 meses y paren una sola cría por año. La longevidad es de 20-22 años en las hembras y de 17 años en los machos. La tasa de natalidad durante el período 1979-1985, se estimó en 22.75% (23,256 individuos). La tasa de mortalidad es diferente entre las categorías de edad y sexo: para las crías machos se estima en 38.44%, para las hembras en 20.59%; en la etapa juvenil, para los machos es del 13.32% y para las hembras del 11.42%; para los machos subadultos es del 8.6%; los machos adultos del 14.9% y las hembras adultas del 2.65%. Se ha estimado la estructura poblacional del lobo marino en el Golfo de California compuesta por un 6.9% de machos adultos, 5% de machos subadultos, 40.7% de hembras adultas, 23.9% de animales jóvenes, 22.7% de crías y 0.8% de animales no clasificados (Aurioles y García, 2005).

La alimentación del lobo marino de California varía estacionalmente. Los cambios que se presentan son principalmente atribuidos a las fluctuaciones temporales de la abundancia de los recursos. Esta especie es un especialista plástico ya que aunque explota pocos recursos en un momento dado, la composición del alimento varía a través del tiempo (García-Rodríguez, 1995).

1.5. El lobo marino como especie centinela del Golfo de California.

La palabra centinela es originaria del latín “sentiré” que significa sentir o percibir. Hoy en día se usa para referirse a una persona o animal que alerta a un grupo de una sorpresa. Un sistema centinela es en el cual los datos de los animales expuestos a los contaminantes del ambiente son colectados y analizados regular y sistemáticamente para identificar riesgos potenciales de salud en otros animales, en humanos y/o en ellos mismos. Idealmente, los centinelas deben detectar cambios antes que los efectos sean irreversibles. Los animales centinelas pueden ser silvestres o domésticos, de laboratorio o de zoológico, terrestres o marinos, deben tener una población estable y una adecuada distribución en el área de estudio (Reddy *et al.* 2001).

Los efectos contaminantes en los centinelas puede ocurrir a nivel sub-organismo, organismo y poblacional. El nivel sub-organismo incluye efectos xeno-tóxicos, alteraciones en funciones enzimáticas, cambios en función de tiroides, homeostasis y hematológicas. El nivel de organismo incluye lesiones patológicas, alteraciones en

desarrollo, crecimiento, reproducción y sobrevivencia. El nivel poblacional incluye alteraciones en abundancia y distribución de especies (Leblanc y Bain, 1997).

Los lobos marinos de California se han identificado como especie modelo para investigación de los efectos contaminantes ambientales en mamíferos marinos debido a que la ecología e historia de estos animales está muy estudiada, es fácil de muestrear y están dentro de un exitoso programa de reproducción y conservación (Reddy *et al.* 2001; INE, 2000). También debido a que los lobos marinos del Golfo de California tienen un largo periodo de vida, son predadores de un alto nivel trófico, recorren grandes extensiones en busca de alimento, contienen gran reserva lipídica la cual es un depósito ideal para algunos contaminantes y están presentes en todo el año en el Golfo, son especies útiles para conocer el grado de conservación de esas zonas y para monitorear enfermedades infecciosas como el morbilivirus, leptospirosis, calicivirus, Toxoplasmosis y concentraciones de compuestos organoclorados en el ambiente como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorociclohexanos (HCHs), hexaclorobenceno (HCB), clordanos (CHLORs) y bifenil policlorinado (PCB) (Godinez *et al.*, 2006; Niño-Torres *et al.*, 2009).

1.6. El Golfo de California.

El Golfo de California, también conocido como Mar Bermejo o Mar de Cortés, se ubica en el noroeste de México. Es una cuenca marina de forma alargada con una orientación de noroeste a sureste; está limitada al oeste por la Península de Baja California, al este por el macizo continental, al norte la desembocadura del Río Colorado y su límite sur se define como una línea imaginaria que se extiende desde Cabo San Lucas Baja California hasta Jalisco (Figura 4) (CONAMP, 2000).

En el Pacífico Norte de México se llevan a cabo mezclas de diferentes masas de agua; las frías provenientes del Pacífico norte a través de la Corriente de California y las cálidas provenientes del Pacífico central a través de la Corriente Costera de Costa Rica. Esto propicia la formación de zonas altamente productivas y de gran diversidad de ambientes en los cuales se han distribuido los mamíferos marinos que existen en México (INE, 2000).

Se calcula que en México existen entre 25 000 y 30 000 especies de plantas terrestres, habitando en la Península de Baja California alrededor de 3 000, y en el Desierto Sonorense alrededor de 2 700. En las islas se han identificado aproximadamente 655 especies de plantas, de las cuales 28 especies y subespecies son endémicas, asimismo, están presentes 13 especies amenazadas, raras o sujetas a protección especial (CONAMP, 2000).



Figura 4. Extensión del Golfo de California (www.wwf.org.mx)

La composición de la fauna terrestre de las islas se determina por diversos factores: la distancia que existe entre las islas y el continente, su origen, tamaño, altitud, la presencia o ausencia de agua dulce, la disponibilidad del alimento, la diversidad de hábitats y la diversidad de plantas que existen en cada isla (CONAMP, 2000).

Los insectos son el grupo más diverso de invertebrados en las islas; los reptiles sobresalen del resto de vertebrados terrestres por su alto nivel de endemismos. Existen 115 especies de reptiles en estas islas, 48 son endémicas (41.7%), que representan cerca

del 10% de la diversidad herpetológica de México. Asimismo, 25 de las especies de reptiles están incluidas en la NOM-059-ECOL-1994, bajo las categorías de peligro de extinción, raras, amenazadas y sujetas a protección especial. Los mamíferos son el grupo menos diverso en las islas. Entre ellos, el grupo mejor representado es el de los roedores, el cual incluye especies exóticas (CONAMP, 2000).

En las islas se encuentran aproximadamente 154 especies de aves terrestres representando a 30 familias, las cuales dependen principalmente de recursos terrestres para su alimentación y elaboración de sus nidos (CONAMP, 2000).

La fauna marina se clasifica dependiendo al tipo de hábitat donde se encuentra: zona costera y zona pelágica. En la zona costera sobresalen dos tipos de hábitat: la playa arenosa y la playa rocosa (Tait, 1987).

En las playas arenosas se encuentran invertebrados marinos como el cangrejo topo y el cangrejo fantasma, peces como los gruñones (*Leuresthes sardina*), los charales (*Atherinops regisvarias*) especies de curvinas, mojarra, el botete Diana (*Sphoeroides annulatus*). Se encuentran aves que dependen de este hábitat para su descanso, alimentación y en algunos casos para su anidación, la mayoría de estas especies son garzas y garzones, así como especies pequeñas de playeritos, avocetas, ibis, la gran garza morena (*Ardea herodias*), la picopando canela (*Limosa fedoa*) y el zarapito piquilargo (*Numenius americanus*) (CONAMP, 2000).

En las playas rocosas, se encuentran balanos (cirripedios), gusanos tubícolas y caracoles. En la zona de rompiente, se encuentran anémonas, estrellas de mar, quitones y en ocasiones coral verde (*Porites*), entre las cavidades de las rocas se refugian algunos cangrejos como el *Grapsus grapsus* y erizos (*Echinometra* spp. y *Eucidaris* spp). En las aguas cercanas a las playas rocosas se alimentan gran cantidad de especies de aves marinas, como el zambullidor orejudo (*Podiceps nigricollis*) y otros zambullidores. En los acantilados de algunas islas anidan cormoranes, gavilanes pescadores (*Pandion haliaetus*) y martín pescador norteño (*Ceryle alcyon*). En las costas rocosas libres de vegetación, anida el ostrero americano (*Haematopus palliatus*) (CONAMP, 2000).

En la zona pelágica se encuentran varias especies de calamares, medusas y eufáusidos; habitan cinco de los siete géneros de tortugas marinas del mundo: la tortuga prieta (*Chelonia mydas*), la javalina (*Caretta caretta*), la carey (*Eretmochelys imbricata*), la

golfinas (*Lepidochelys olivacea*) y la siete filos (*Dermochelys coriacea*); también, se puede observar a la serpiente marina de vientre amarillo (*Pelamis platurus*). Más de 875 especies de peses, representando a 145 familias y 446 géneros, habitan las aguas del Golfo de California, de las cuales 77 son consideradas endémicas. Por sus hábitos alimentarios, algunas aves marinas se encuentran relacionadas con la zona pelágica. Los paños, falaropos (*Phalaropus* spp.), gaviotas, charranes, pelícanos pardos, los pájaros bobos cafés (*Sula leucogaster*), los bobos de patas azules, el rabijunco pico rojo (*Phaeton aethereus*) y la fragata (*Fregata magnificens*) se alimentan del plancton y peces como sardinas (CONAMP, 2000).

El golfo de California presenta gran diversidad de mamíferos marinos, en sus aguas habitan la mayoría de las especies del Pacífico tropical además de presentar la vaquita (*Phocoena sinus*) que es endémica de la zona (Delgado-Estrella *et al.*, 1994). En las islas del golfo existen importantes colonias de lobos marinos de California. En la segunda mitad de los ochenta, en todo el golfo se conocían alrededor de 40 loberas: 13 de reproducción, con el 93% de la población del golfo; el resto se repartía en 14 áreas no reproductivas, cuatro de apareamiento y nueve paradores. El tamaño de la población fue estimado en unos 30 000 individuos, que representa el 24% de la población de esta especie en México. Las loberas más importantes se encuentran en las islas San Esteban, San Jorge, Ángel de la Guarda y San Pedro Mártir. En las loberas de reproducción de las provincias norteñas del golfo (parte media-alta: Provincias Canal de Ballenas y Provincia Norte, el máximo poblacional se presenta en el verano, mientras que en las loberas de la provincia central o parte sur del golfo, se presentan dos: uno en verano y otro en invierno, esto se debe principalmente a que las hembras de lobo marino aumentan significativamente en número en la provincia central de otoño a invierno a causa de las condiciones oceanográficas que favorecen la productividad primaria de la región en dicha estación. Hay evidencias de que algunos machos adultos también migran hacia el sur del Golfo de California y al Pacífico Nororiental durante el invierno. Sin embargo, en la región de las grandes islas y parte norte del golfo, un mayor número de los lobos marinos de edad adulta, de ambos sexos, permanece en las aguas de la región durante las cuatro estaciones del año, lo que hace suponer que dicha población es residente. En esta región es muy marcada la coincidencia de los lobos marinos y sus loberas en las áreas más productivas del golfo, motivo por el cual las interacciones de los lobos marinos con las actividades pesqueras son mayores (CONAMP, 2000).

1.7. Impacto antropogénico: degradación del hábitat y contaminación.

El efecto de los humanos se encuentra en cada ecosistema; el océano, que ocupa el 79% del planeta, se ve directamente afectado por desperdicios de la pesca comercial, o indirectamente por los efectos de calentamiento global. La marea, las corrientes marinas y el transporte atmosférico pueden desplazar los contaminantes tóxicos como metales pesados y organoclorados a grandes distancias y a través de diferentes niveles tróficos e incrementar su concentración en el paso por la cadena alimentaria, por lo que entre más alto sea el nivel trófico del organismo mayor será la concentración de contaminantes en sus tejidos, además los organismos de nivel trófico superior tienen una habilidad limitada para metabolizar estos compuestos por lo que tienden a bioacumularse (INE, 2000; Reddy *et al.* 2001).

Los avances en la tecnología e industrias mundiales han incrementado los contaminantes en ecosistemas marinos, particularmente en las aguas continentales. Muchos agentes químicos, físicos y biológicos representan un riesgo para la salud de las poblaciones silvestres de pinnípedos y demás mamíferos marinos. Existen pocos reportes sobre los efectos de contaminantes sobre la salud de los pinnípedos, se cree que juegan un papel significativo en los procesos patológicos de estos animales y se han observado relaciones causales entre los niveles de contaminantes, la alteración de procesos fisiológicos y el desarrollo de neoplasias en mamíferos marinos (House *et al.*, 2002).

Se han observado mortalidades a gran escala a causa de agentes infecciosos en muchas poblaciones de mamíferos marinos que habitan aéreas que contienen contaminantes industriales. Estas observaciones dejan la especulación de que la contaminación induce inmunosupresión y contribuye a las incidencias de epizootias en mamíferos marinos (Leblanc y Bain, 1997).

Durante una epizootia de focas comunes (*Phoca vitulina*) en el Mar Báltico e Irlandés debida a morbilivirus, se reporto mayor mortalidad en áreas con altos niveles de contaminantes y los análisis de los cadáveres de focas revelaron la presencia de altos niveles de PCB y otros contaminantes. Se ha demostrado que residuos químicos industriales como PCB, HCB y DDT causan inmunosupresión en animales de laboratorio (Leblanc y Bain, 1997).

Aunque las funciones inmunológicas juegan un papel importante en la defensa contra la infección por morbilivirus, sigue siendo difícil determinar si la contaminación contribuye significativamente a la severidad y la prolongación de las epizootias recientes en mamíferos marinos. Se especula que la observada inmunosupresión en combinación con factores antropogénicos, han creado las condiciones que facilitan las epizootias emergentes de morbilivirus en mamíferos acuáticos (Osterhaus *et al.*, 1995).

En las Islas del Golfo de California uno de los impactos más severos causado por los humanos ha sido la introducción de especies exóticas (gatos, ratas, ratones, cabras, entre otros). Las especies introducidas compiten o depredan sobre algunas especies nativas, e incluso actúan como transmisores de enfermedades que favorecen el debilitamiento, y eventualmente la extinción de las especies insulares, muchas de ellas endémicas (Zavala *et al.*, 2004). El crecimiento de la población humana en el noroeste de México conlleva al incremento en la demanda de recursos económicos y estéticos de la región, un aumento en la contaminación marina derivada de las actividades agropecuarias, pesqueras y turísticas, y por lo tanto la destrucción del hábitat y la perturbación en sitios de reproducción de estas especies nativas (Godínez *et al.*, 2006).

1.8. Epizootias

La primera epizootia reconocida en mamíferos marinos causada por morbilivirus ocurrió en 1987-1988 a lo largo de la costa del atlántico en Estados Unidos, más de la mitad de la población de delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) cercana a la costa murió y se identificó a DMV como la principal causa (Lipscomb *et al.*, 1994). En 1987 en el lago Baikal, Rusia, el virus de distemper canino causó la muerte de miles de focas siberianas (*Phoca sibirica*) (Hall, 1995). En 1988 ocurrió la más devastadora epizootia en el noroeste de Europa donde se reconoció por primer vez el virus de distemper de focidos, y aproximadamente 17 000 focas (*Phoca vitulina*) y un número pequeño de marsopas (*Phocoena phocoena*) murieron (Blixenkrone-Møller *et al.*, 1994).

Durante 1990-1992 en una epizootia de morbilivirus de delfín murieron miles de delfines rayados (*Stenella coeruleoalba*) en el occidente del mediterráneo. En 1993-94 otra epizootia por DMV de delfines nariz de botella ocurrió en el golfo de México (Lipscomb *et al.*, 1996; Taubenberger *et al.*, 2000). Delfines comunes (*Delphinus delphis*)

en 1995-1997 se encontraron varados en la costa de California y se demostró que estaban infectados con DMV (Reidarson *et al.* 1998). En el 2000 más de 10 000 focas del Mar Caspio murieron por PDV (Kuiken *et al.*, 2006); en el 2002 en otro brote similar murieron más de 22 000 focas en aguas del norte de Europa (Banyard *et al.*, 2008). En enero del 2007 se encontró por primera vez en Alemania un delfín (*Lagenorhynchus albirostris*) varado infectado con un DMV muy similar al encontrado en la epizootia del Mediterráneo (Wohlsein *et al.*, 2007), entre julio y agosto del 2007 más de 100 delfines rayados se encontraron en las costas del Mediterráneo, los estudios inmunohistoquímicos y moleculares indicaron que el virus estaba muy relacionado al de la epizootia de 1990 (Raga *et al.*, 2008). En el 2007 una epizootia de ballenas piloto (*Globicephala melas*) ocurrió en el mar mediterráneo identificando un nuevo morbilivirus llamado morbilivirus de ballenas piloto (Fernández *et al.*, 2008). Y en el 2006 por primera vez se detecto el PDV en el océano pacifico en el sur de Alaska en nutrias (*Enhydra lutris*) que se encontraron muertas en la costa (Goldstein *et al.*, 2009).

1.9. Técnicas para Diagnostico de Morbilivirus

El diagnostico de infección por morbilivirus en especies de pinnípedos y cetáceos se ha realizado por métodos histopatológicos, inmunocitoquímicos, por ensayo de inmunoabsorbencia ligado a enzimas (ELISA) y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Krafft *et al.*, 1995).

Para observar lesiones histológicas de la infección por morbilivirus se fijan los tejidos en formalina y luego se embeben en parafina, y mediante la tinción de hematoxilina y eosina se examinan en microscopio buscando las lesiones altamente características (Lipscomb *et al.*, 1996).

Las técnicas inmunológicas son las herramientas más utilizadas para detectar el contacto que tuvieron los mamíferos marinos con el morbilivirus en donde los signos clínicos no han sido observados. La prueba de neutralización viral (VNT) ha sido usada ampliamente para este propósito, es altamente sensible y especifica, sin embargo, su uso está limitado a laboratorios que tienen la facilidad de cultivar las células necesarias y el abasto de virus vivos. Entre otras desventajas la VNT es costosa y requiere de un periodo de incubación de por lo menos 4 días. Otras pruebas serológicas comúnmente usadas

como ELISA e inmunohistoquímica, requieren anticuerpos conjugados específicos anti-especie que no están comúnmente disponibles. Se ha utilizado una técnica de ELISA competitiva (cELISA) basada en anticuerpos monoclonales como prueba serológica en sueros de varias especies de mamíferos marinos. Las principales ventajas de ésta sobre las pruebas serológicas convencionales es que se puede utilizar un conjugado anti-ratón inmunoglobulina, es menos costosa y más rápida (Saliki *et al.*, 2001).

Se ha detectado el material genético del virus mediante la amplificación de porciones altamente conservadas de los genes N, H, P, L, M y F con la técnica de PCR acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR) (Bolt *et al.*, 1994; Wolhsein *et al.*, 2007; Banyard *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2008). Las proteínas P y N han sido las más utilizadas para la detección del morbilivirus debido a su alta conservación. Se han diseñado iniciadores específicos para amplificar regiones cortas del gen P para analizar muestras con el RNA degradado, como las muestras de tejidos fijados en formalina o embebidos en parafina, donde el producto de PCR no deben ser mayor a 150 nucleótidos (Krafft *et al.*, 1995; Taubenberger *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2007; Wohlsein *et al.*, 2007).

La RT-PCR en tiempo real se ha utilizado actualmente para la detección de los morbilivirus, esta técnica ofrece las ventajas de ser más sensible y específica debido al uso de una sonda interna y el diagnóstico se realiza en la mitad del tiempo que la RT-PCR convencional, además de permitir la cuantificación de partículas virales (Hammond *et al.*, 2005; Elia *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2009).

II. JUSTIFICACIÓN

Los morbilivirus son patógenos causantes de enfermedades infecciosas emergentes en mamíferos marinos. En el golfo de California existe una gran biodiversidad de especies susceptibles a este virus, algunas especies endémicas y/o en peligro de extinción, por lo que es necesaria una vigilancia epidemiológica.

A través de animales centinela como los lobos marinos del Golfo de California, se puede determinar la prevalencia de morbilivirus y caracterizarlo como agente etiológico con carácter epidemiológico mediante el uso de herramientas como las técnicas de biología molecular ya que tienen una gran sensibilidad y especificidad.

La información obtenida de este estudio asentara las bases para diseñar estrategias que ayuden a preservar las especies en peligro de extinción y la biodiversidad en el Golfo de California.

III. OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante técnicas de biología molecular el morbilivirus en lobos marinos (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar mediante técnicas de biología molecular el morbilivirus en muestras de hisopados oro-faríngeos de crías de lobos marinos aparentemente sanos de las islas del Golfo de California.
- Identificar mediante técnicas de biología molecular el morbilivirus en muestras de tejidos de lobos marinos varados en las costas del Golfo de California.
- Determinar la prevalencia del Morbilivirus en lobos marinos en el Golfo de California en los años 2008 y 2009.
- Determinar la prevalencia del Morbilivirus en lobos marinos en cada lobera muestreada en el Golfo de California

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de muestras

Las muestras fueron recolectadas por personal capacitado del Laboratorio de Medicina de Conservación (LMC) en colaboración con personal de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) y Africam Safari en dos monitoreos en las Islas del Golfo de California, el primero en agosto de 2008 de las loberas Partida, Rasito, Cantiles, Granito y Machos y el segundo en agosto de 2009 de las loberas Partida, Rasito, Cantiles, Granito, Machos y El coloradito (Figura 5). Se capturaron 10 crías de lobo marino en cada lobera (Tabla 2), se tomó un hisopado oro-faríngeo de cada cría aparentemente sana, los hisopos se depositaron en un tubo con 3 ml de medio de transporte viral (solución salina amortiguadora con fosfato (PBS) 1x, suero fetal bovino (SFB) al 20%, estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 ul/ml, anfotericina B 0.25 µg/ml, gentamicina 32 µg/ml, rojo de fenol 15 mg/ml), y se transportaron al laboratorio de medicina de conservación de la Escuela Superior de Medicina del IPN a una temperatura de 4°C en hieleras con refrigerantes (Figura 6).

En enero y febrero del 2009 la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente solicitó al LMC el análisis de lobos marinos y otros mamíferos marinos como delfines de Risso (*Grampus griseus*) encontrados varados a lo largo de la costa de Mazatlán Sinaloa. Personal capacitado recolectó muestras de los órganos en menor estado de descomposición, se tomó tejido de dos secciones de los órganos, se depositaron en bolsas Wirlpack estériles y transportaron en hieleras con refrigerantes (Figura 7). En la tabla 3 se especifica el tipo de muestra y ejemplar de procedencia.

Tabla 2. Muestras recolectadas de las Islas del Golfo de California.

<i>Lobera</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Lobos marinos muestreados en 2008</i>	<i>Lobos marinos muestreados en 2009</i>	<i>Total de muestras</i>
Partida	N 28° 50.208´ W 112° 59.925´	10	10	20
Rasito	N 28° 54.719´ W 113° 2.612´	10	10	20
Cantiles	N 29° 30.143´ W 113° 26.576´	10	10	20
Granito	N 29° 33.254´ W 113° 33.826´	10	10	20
Machos	N 29° 17.139´ W 113° 29.861´	10	10	20
El coloradito	N 30° 2.925´ W 114° 29.424´	0	10	10
Total		50	60	110



Figura 5. Ubicación de las loberas muestreadas en el Golfo de California.

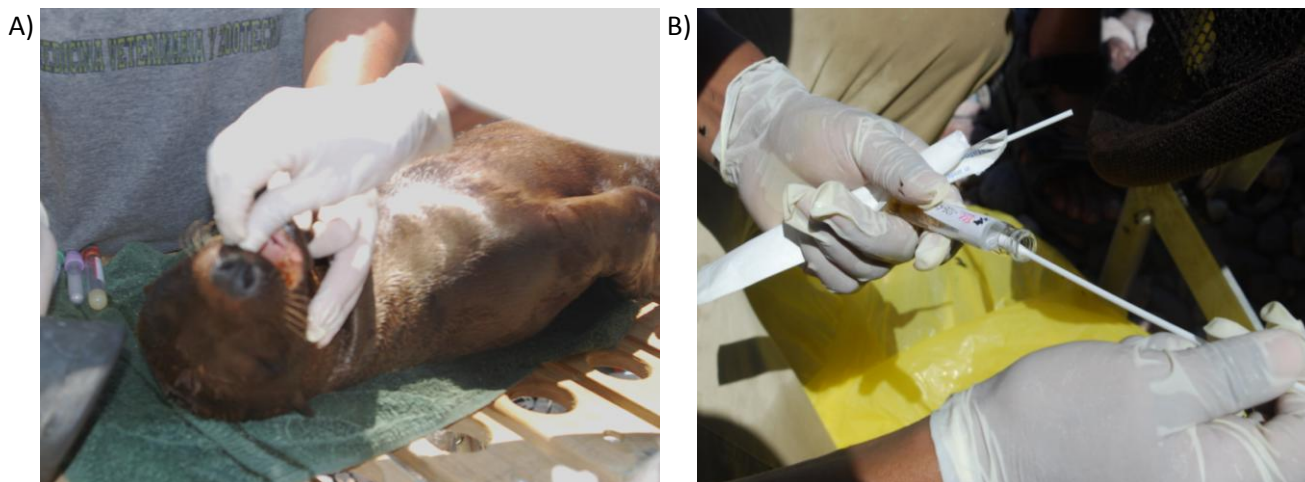


Figura 6. Toma de muestra en crías de lobos marinos A) hisopado orofaríngeo B) Inoculación del hisopo en medio de transporte viral.

Tabla 3. Muestras recolectadas en la contingencia ocurrida en enero y febrero del 2009 en Mazatlán.

<i>Número de muestra</i>	<i>Muestra</i>	<i>Ejemplar de procedencia</i>	<i>Fecha de varamiento</i>
1	Hígado	Lobo marino 1	28 de enero de 2009
2	Bazo		
3	Pulmón derecho		
4	Pulmón izquierdo	Lobo marino 2	29 de enero de 2009
5	Corazón		
6	Hígado		
7	Piel		
8	Encéfalo	Lobo marino 3 cría	26 enero de 2009
9	Pulmón		
10	Encéfalo	Delfín de Risso 1	28 de enero de 2009
11	Piel		
12	Pulmón		
13	Testículo	Delfín de Risso 2	22 de febrero de 2009
14	Encéfalo		
15	Hígado		



Figura 7. Necropsia del lobo marino varado el 29 de enero del 2009. A) Lobo varado en la playa. B) Corte longitudinal para descubrir los órganos. C) Selección de órganos para toma de muestra. D) La muestra se transporta en bolsas Wirtpack estériles.

5.2. Extracción de ácidos nucleicos

Se cortó una porción de 3 mm de largo y 3 mm de ancho aproximadamente de los tejidos de cada órgano, se maceraron y resuspendieron en 300 μ l de medio de transporte viral (solución salina amortiguadora con fosfato (PBS) 1x, suero fetal bovino (SFB) al 20%, estreptomycin 100 μ g/ml, penicilina 100 ul/ml, anfotericina B 0.25 μ g/ml, gentamicina 32 μ g/ml, rojo de fenol 15 mg/ml), se homogenizaron con vortex durante 20 segundos y centrifugaron a 5000 xg durante 2 minutos. Los tubos con hisopados en medio de transporte viral se homogenizaron con vortex durante 20 segundos previo a la extracción del RNA.

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó con el equipo MagNA Pure LC 2.0 (Roche, Alemania) y el Kit MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation usado el protocolo Total NA External-lysis, en el cual 200 μ l de los sobrenadantes de las muestras se mezclaron con 200 μ l de buffer de lisis dentro de una campana de bioseguridad; posteriormente dentro del equipo se realizó la purificación de los ácidos nucleicos automáticamente: se agrega la proteinasa K para la digestión de las proteínas, después el ácido nucleico se adhiere a la superficie de sílica de las partículas magnéticas debido a la diferencia de cargas, magnéticamente se separa el ácido nucleico de los residuos lisados, posteriormente el ácido nucleico es lavado y finalmente el ácido nucleico purificado se eluye en un volumen de 50 μ l (Figura 8). Este procedimiento de aislamiento es totalmente automatizado, altamente eficiente, y el RNA obtenido es de una alta calidad para su posterior utilización en reacciones de biología molecular.

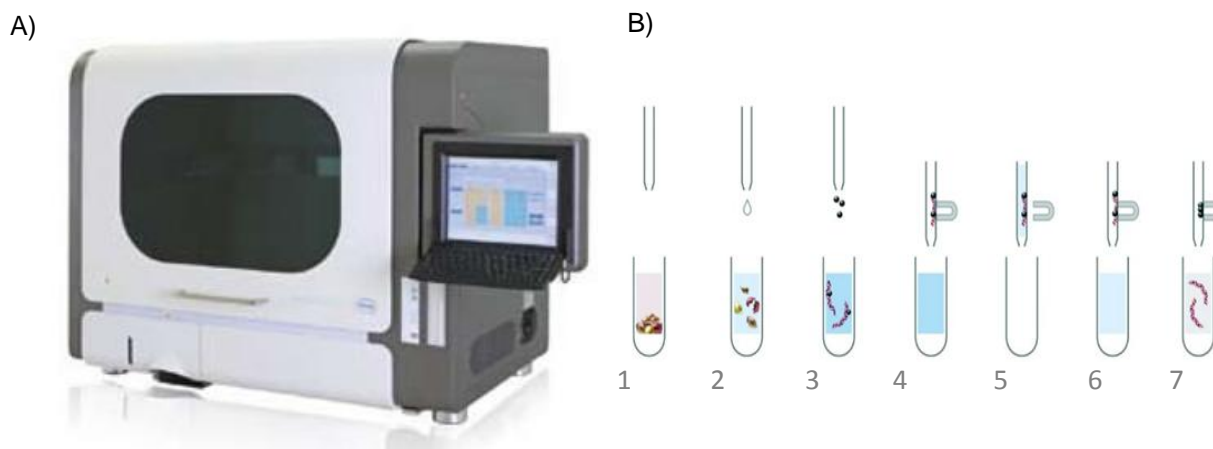


Figura 8. Purificación de los ácidos nucleicos. A) Equipo MagNA Pure LC 2.0. B) Procedimiento de Purificación de RNA: 1. Lisis; 2. Digestión; 3. Unión a las partículas magnéticas; 4. Separación de los residuos lisados; 5. Lavado; 6. Separación de buffer; 7. Elución (Roche, 2008).

5.3. Detección de morbilivirus mediante la técnica de RT- PCR

Se usó la técnica de RT-PCR en punto final en un solo paso (tablas 4 y 5), empleando el kit comercial One-step RT-PCR de Qiagen y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Se diseñó un par de iniciadores universales para morbilivirus de mamíferos marinos que amplifican una región de 217 pb del gen N: Morb_N_LMC_F y Morb_N_LMC_R e hibridan en los nucleótido 651 al 670 y 846 al 868 respectivamente de la cepa Onderstepoort (AF378705) de CDV (figura 9) (Tabla 4). Se

utilizó una temperatura de alineamiento de 57°C la cual se determino por el cálculo de las Tm de cada iniciador. Como control positivo se empleó RNA del virus de distemper canino vacunal (Intervet) que contiene la cepa Onderstepoort (figura 10). La RT-PCR se realizó en un termociclador T Gradient (Biometra, Alemania) (figura 11).

Para evaluar la sensibilidad de la técnica se determinó el límite de detección de RNA, se cuantifico el RNA de CDV vacunal y se hizo un gradiente de 9 diluciones, con concentraciones finales en la reacción desde 100 pg/μl hasta 0.001fg/μl.

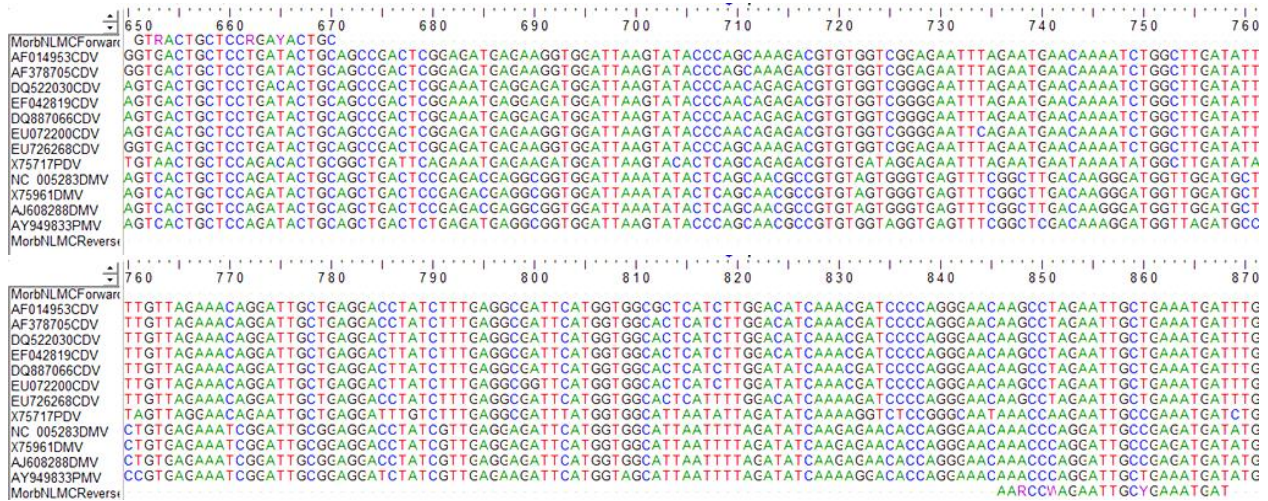


Figura 9 . Alineamiento de los iniciadores a las secuencias descargadas del banco de datos.

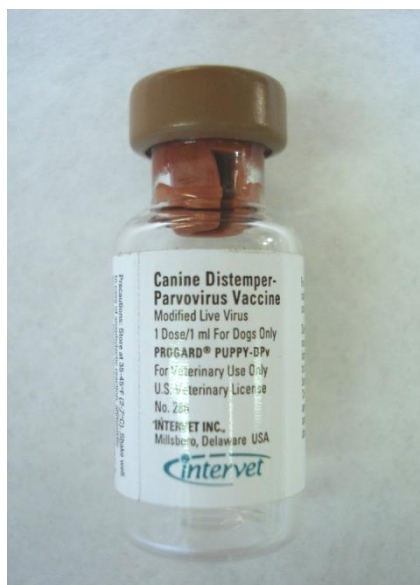


Figura 10. Vacuna comercial de canine distemper virus utilizada como control positivo

Tabla 4. **Secuencia de nucleótidos de los iniciadores diseñados**

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia 5' - 3'</i>
Morb_N_LMC_F	GTR ACT GCT CCR GAY ACT GC
Morb_N_LMC_R	ATC ATT TCR GCA ATT CTW GGY TT
R = A ó G; Y = C ó T; W = A ó T	

Tabla 5. **Concentraciones de los reactivos de la mezcla de la reacción de la RT-PCR**

<i>Componente</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen por reacción (µl)</i>
Regulador de reacción	1X	5
dNTPs	0.4 mM c/u	1
Iniciador MorbN_LMC F	0.6 µM	1
Iniciador MorbN_LMC R	0.6 µM	1
Inhibidor RNAsa	1 U/ µl	0.8
Agua	Cbp	5.7
Mezcla de enzimas	0.5 X	0.5
RNA molde	-	10
	Volumen final	25 µl

Tabla 6. **Condiciones de termociclación para la amplificación de un fragmento de 217 pb del gen N.**

<i>Proceso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
Retrotranscripción	30 min	50 °C
	15 min	95°C
Amplificación (40 ciclos)	30 seg	94°C
	30 seg	57°C
	30 seg	72°C
Extensión final	10 min	72°C

Se preparó el gel de agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen, EUA) al 2% en regulador TBE 1X (tris-borato-EDTA), se colocó dentro de la cámara de electroforesis, se agregó TBE 1X hasta cubrir completamente el gel; se tomaron 8 µl de cada tubo de reacción de RT-PCR y se mezclaron con 2 µl de regulador de carga (Qiagen, EUA), luego se colocaron individualmente en cada pozo del gel, se sometió el gel a 110 volts durante 60 min, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/ml, y posteriormente se observó en un fotodocumentador Gel Doc XR System (Bio-Rad, EUA) (figura 11).

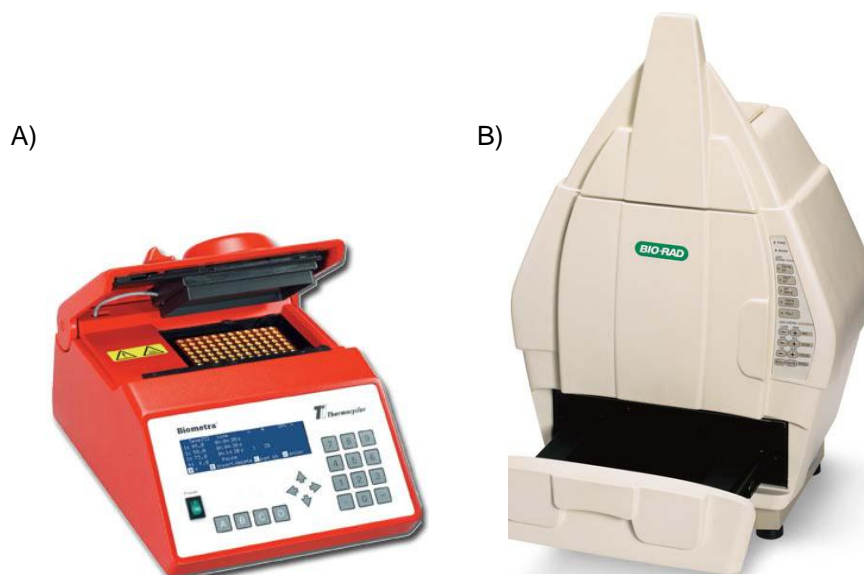


Figura 11. Equipos utilizados en la detección de morbilivirus. A) Termociclador Tgradient (Biometra, Alemania). B) Fotodocumentador Gel Doc XR System (Biorad, EUA).

5.4 Determinación de la prevalencia de morbilivirus en lobos marinos del Golfo de California

Se determinó la prevalencia de morbilivirus en lobos marinos del Golfo de California por año y por lobera y de los lobos marinos y delfines varados en Mazatlán Sinaloa siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{numero de infectados}}{\text{numero total de muestreados}} \times 100$$

5.5 Identificación del morbilivirus mediante análisis filogenéticos

Se purificó cada fragmento de DNA de longitud de 217 pb a partir del gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, EUA) siguiendo el protocolo del proveedor. Se cortó el fragmento del gel de agarosa donde se localiza el DNA con una hoja de bisturí limpia y se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml limpio y libre de pirógenos, se agregaron 300 µl de buffer QG, se incubó a 50°C durante 10 min (mezclando con vortex cada 3 min), después que se fundió la agarosa se agregaron 100 µl de isopropanol, se transfirió la mezcla a la columna y se centrifugó durante un minuto, se desechó el filtrado, se agregaron 500 µl de buffer QG a la columna y se centrifugó durante un minuto; para lavar se agregaron 750 µl de buffer PE a la columna, se incubó 5 minutos, se centrifugó un minuto, se desechó el filtrado, se centrifugó a 17 900 x g durante un min, se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio y se eluyó el DNA adicionando 50 µl de agua en el centro de la membrana, se incubó durante un minuto y se centrifugó por un minuto y luego se almacenó a una temperatura de -30°C hasta su uso.

El DNA purificado a partir del gel se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para la secuenciación del fragmento utilizando el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems (EUA) modelo 3730 que utiliza el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing.

Usando el Software MEGA versión 4 las secuencias de DNA obtenidas fueron traducidas a las secuencias de proteínas correspondientes, se alinearon y posteriormente se empleó este alineamiento de para guiar el alineamiento de las secuencias de DNA basado en la estructura de codones. Para el análisis se utilizaron las siguientes secuencias de morbilivirus descargadas del banco de datos: AF305419, EU726268, HM046486, EU072200, DQ005134, DQ887066, EF042819, DQ522030, X71757, AY949833, AJ608288. Se eliminó el fragmento de las secuencias donde hibridaron los iniciadores para evitar que el programa identifique diferencias en esas regiones que pudieran deberse a las degeneraciones que contienen los iniciadores.

Los arboles filogenéticos fueron construidos con el programa MEGA 4, usando el algoritmo Neighbor Joining, con el modelo evolutivo de Kimura 2 parámetros. Se realizó una prueba de confiabilidad bootstrap con 10 000 repeticiones para observar la consistencia del árbol obtenido (Tamura *et al*, 2007).

VI. RESULTADOS

6.1 Límite de detección de los iniciadores en RT-PCR en punto final

Se obtuvo un límite de detección de 0.01 fg/μl de reacción, en el gel de electroforesis se observó cómo decremента la intensidad de la banda al disminuir la concentración de RNA molde utilizando diluciones de 1:10, todos los fragmentos fueron de una longitud de 217 pb (Figura 12). Conociendo el peso molecular de un genoma del virus CDV cepa Ondertepoort (AF378705) se puede decir que el límite de detección de esta técnica es equivalente a 1.19 copias del genoma completo.

6.2 Detección de morbilivirus mediante la técnica de RT- PCR

Se detectó el RNA de morbilivirus en 13 de las 50 muestras de crías de lobos marinos de las islas del Golfo de California muestreadas en agosto de 2008, en la figura 13 se observa un amplificado de 217 pb correspondiente al esperado, la muestra 42 amplificó un producto inespecífico de aproximadamente 400 pb.

De las 60 muestras de crías de lobos marinos obtenidas en las Islas del Golfo de California en el 2009, se obtuvieron 8 muestras con bandas de longitud de 217 pb (Figura 14 y 15).

De las muestras de tejidos obtenidos de los lobos varados en Mazatlán en enero y febrero de 2009, se detectó RNA viral en el pulmón derecho, el pulmón izquierdo, el

hígado y la piel del lobo marino varado el 29 de enero; en el encéfalo y la piel del delfín de Risso varado el 28 de enero de 2009 y en el pulmón y el encéfalo del delfín de Risso varado el 22 de febrero de 2009. También se observó una banda inespecífica de aproximadamente 300 pb en la muestra 9 que corresponde al pulmón de una cría de lobo marino que nació en el acuario y falleció el 26 de enero de 2009 (Figura 16).

En total se obtuvieron 29 muestras positivas a morbilivirus y 2 muestras con amplificación de un producto con longitud diferente.

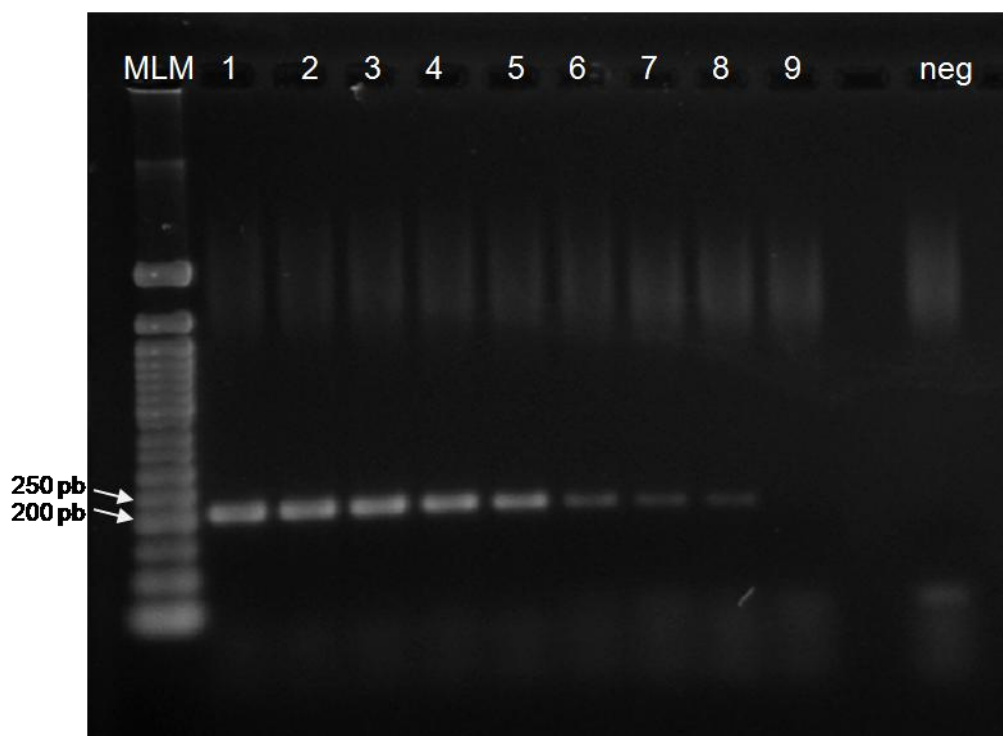


Figura 12. Productos de la RT-PCR con un gradiente de concentración de RNA molde para obtener el límite de detección. La concentración de RNA molde fue la siguiente: pozo 1 - 100 pg/ μ l; pozo 2 - 10 pg/ μ l; pozo 3 - 1 pg/ μ l; pozo 4 - 100 fg/ μ l; pozo 5 - 10 fg/ μ l; pozo 6 - 1 fg/ μ l; pozo 7 - 0.1fg/ μ l; pozo 8 - 0.01 fg/ μ l; pozo 9 - 0.001 fg/ μ l. Se observa un fragmento de longitud esperada 217pb en los pozos 1 al 8.

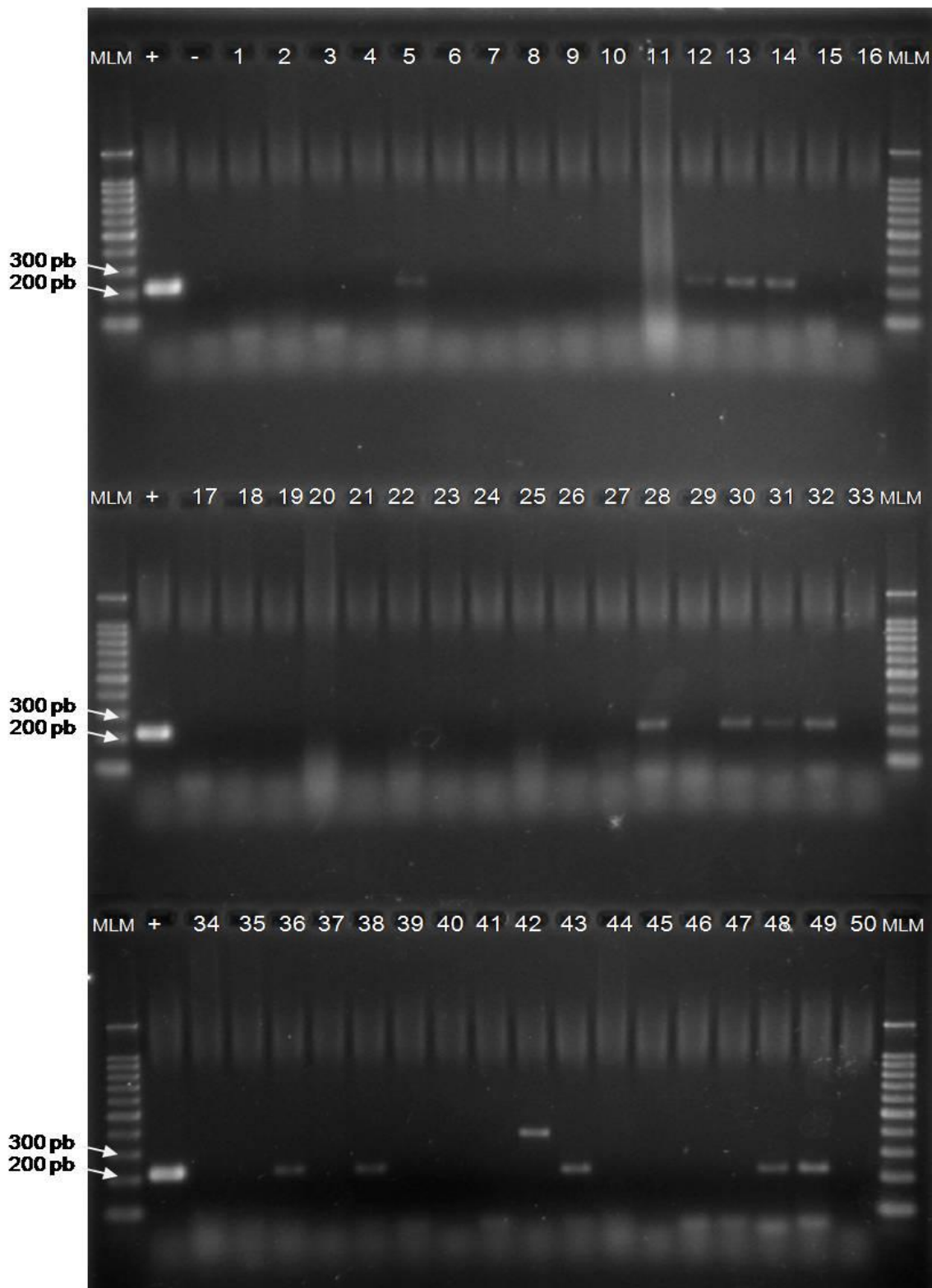


Figura 13. Productos de la RT-PCR de las muestras de hisopados oro-faríngeos de los lobos marinos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto del 2008. Se observan 13 bandas positivas de 217 pb, en el pozo 42 se observa una banda de aproximadamente 400 pb.

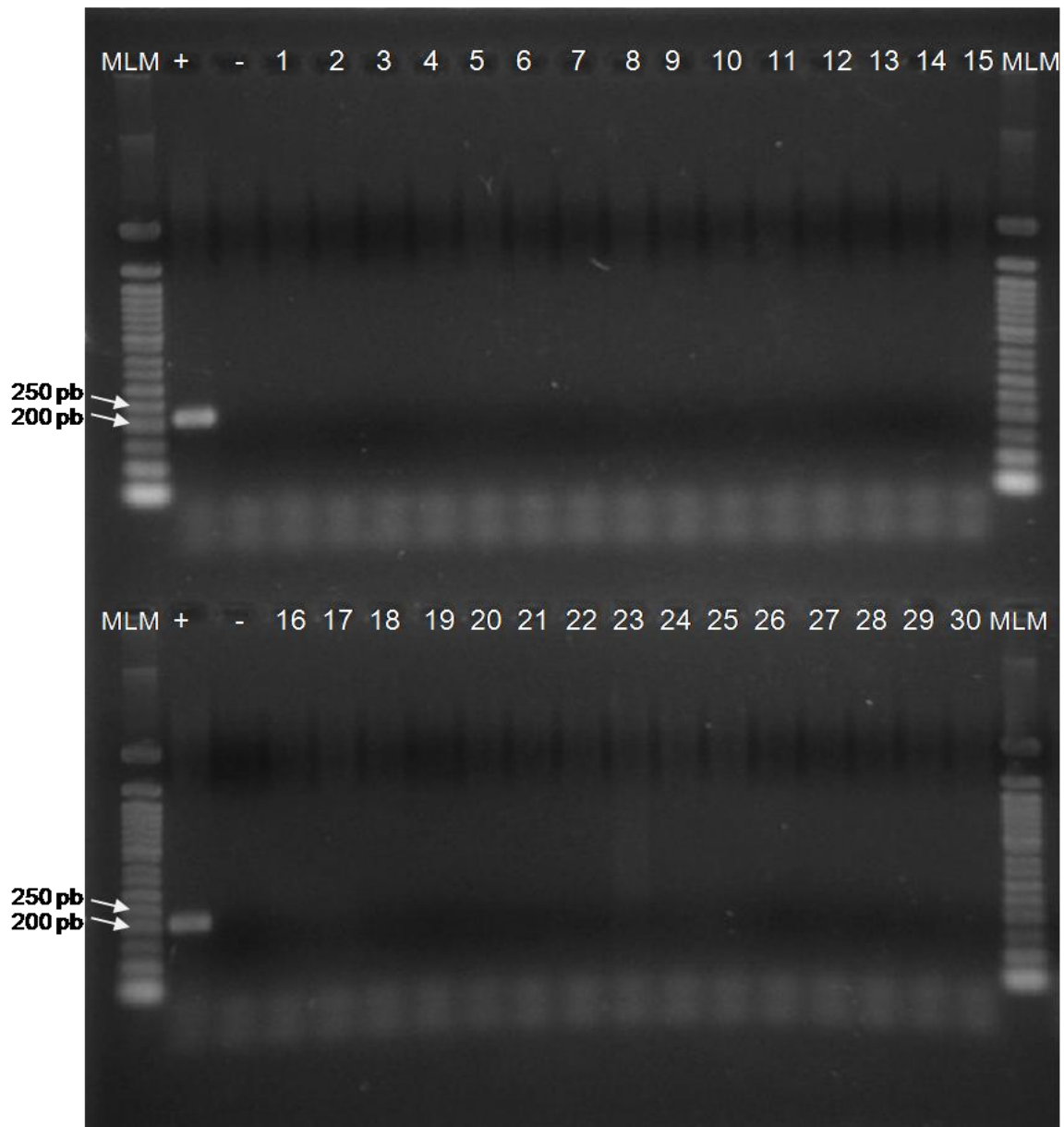


Figura 14. Productos de la RT-PCR de las muestras 1 a la 30 de hisopados oro-faríngeos de los lobos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto del 2009.

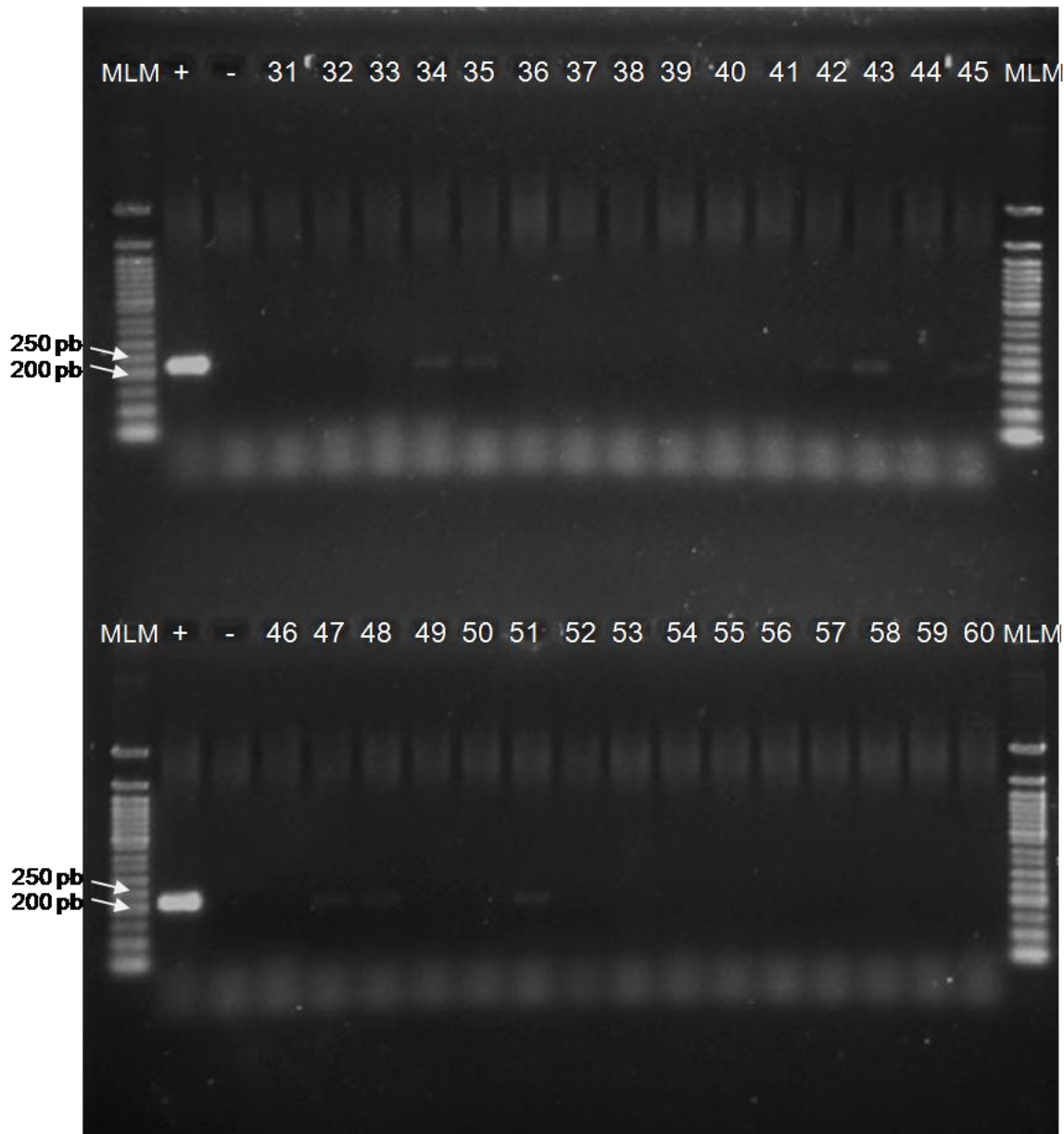


Figura 15. Productos de la RT-PCR de las muestras 31 a la 60 de hisopados oro-faríngeos de los lobos de las Islas del Golfo de California tomadas en agosto del 2009. Se observan 8 bandas de una longitud de 217pb.

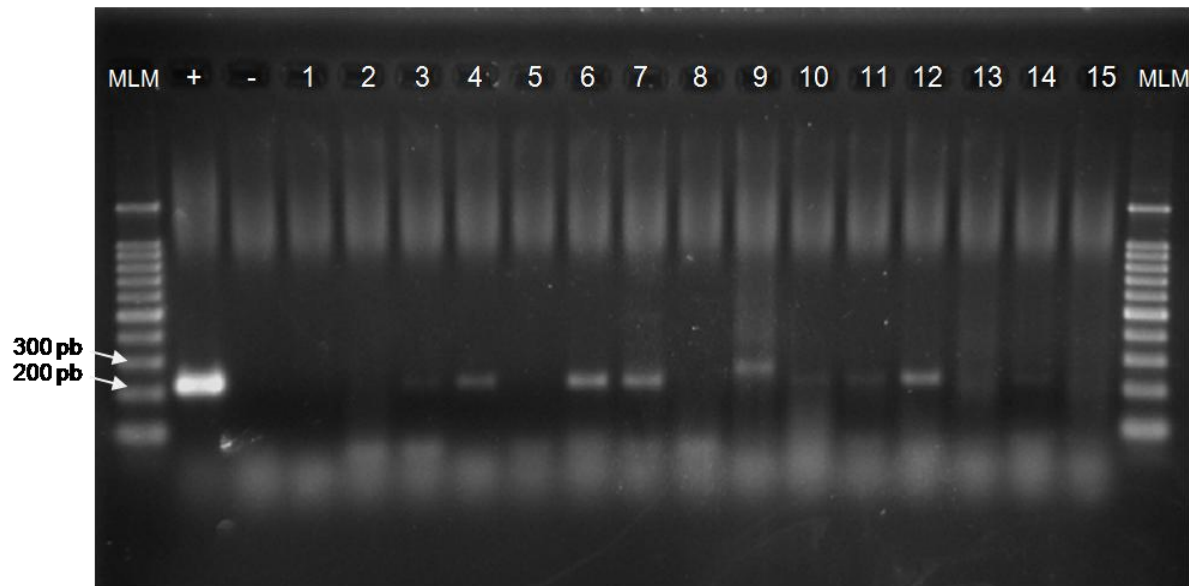


Figura 16. Productos de la RT-PCR de las muestras de tejidos de lobos marinos varados en la costa de Mazatlán. El contenido de los pozos es el siguiente: pozo MLM ->marcador de longitud molecular de 100 pb; pozo + -> CDV vacunal; pozo - ->control negativo; los pozos 1 a 15 corresponden al número de muestra que señala la tabla 3. En 8 muestras se observa una banda de fragmento de 217 pb, en la muestra 9 se observa una banda de 300 pb aproximadamente.

6.3 Determinación de la prevalencia de morbilivirus en lobos marinos del golfo de california

La prevalencia de morbilivirus en las crías de lobos marinos por año en las Islas del Golfo de California se determinó dividiendo el número de crías de lobos marinos infectadas de morbilivirus entre el número total de crías de lobos marinos monitoreadas en las islas del golfo de california en agosto de 2008 y se multiplicó por cien, y lo mismo para el monitoreo de agosto de 2009, obteniendo un valor de prevalencia de 26% para el 2008 y para el 2009 una prevalencia de 13.3% (Tabla 7).

Para determinar la prevalencia por cada lobera se dividió el número de crías infectadas de una lobera entre el número total muestreados en dicha lobera en ese año y se multiplicó por cien, por lo tanto la prevalencia en la lobera Partida fue de 10% en el 2008 y de 0% en el 2009; en el Rasito fue 30 % en el 2008 y de 0% en el 2009; en Cantiles fue de 40% en el 2008 y de 0% en el 2009; en la lobera el Granito la prevalencia fue de 30% en el 2008 y de 20% en el 2009; en Machos se obtuvo una prevalencia de

20% en el 2008 y de 50% en el 2009, y en el Coloradito se observó una prevalencia de 10% en el 2009 (Tabla 8).

Tabla 7. Prevalencia de morbilivirus en el Golfo de California en el 2008 y 2009

<i>Año</i>	<i>Prevalencia</i>
2008	26%
2009	13.30%

Tabla 8. Prevalencia de morbilivirus obtenida en las loberas monitoreadas en el 2008 y 2009

<i>Lobera</i>	<i>Prevalencia</i>	
	<i>2008</i>	<i>2009</i>
Partida	10%	0
Razito	30%	0
Cantiles	40%	0
Granito	30%	20%
Machos	20%	50%
El coloradito	NR	10%

NR : Monitoreo no realizado

La prevalencia de morbilivirus en los lobos marinos y delfines de Risso que vararon en enero y febrero de 2009 en las costas de Mazatlán fue de 60%.

6.4 Análisis filogenéticos de las secuencias

Para la secuenciación se seleccionó una muestra positiva de cada una de las loberas en las que se encontró al virus en cada año, además de una muestra de cada animal positivo analizado en la contingencia, estas se muestran en color rojo en la tabla 9.

Se obtuvieron 10 secuencias en total, además de la secuencia del control positivo. La muestra 35 de las Islas del Golfo de California no se secuenció satisfactoriamente.

También se secuenciaron los fragmentos con longitud distinta a la esperada que corresponden a la muestra 42 de la lobera Razito en el 2008 y la muestra 9 que corresponde al tejido del pulmón de una cría de lobo marino en Mazatlán, dichas secuencias se analizaron en la herramienta BLAST y se mostró que son homólogas a *Escherichia coli* y un fragmento del cromosoma 5 de *Homo sapiens* respectivamente.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos mostró un alto grado de conservación en el fragmento estudiado (Figura 17). Por otra parte, la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia de nucleótidos del fragmento codificante secuenciado corresponde a la posición 188-238 de la proteína N, y se encuentra dentro de la región más conservada de la proteína (Figura 18).

En el análisis filogenético se observó que todas las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon en un subgrupo estrechamente relacionado a la cepa Onderstepoort de CDV y separado de otras cepas incluidas en el análisis. (Figura 19).

Tabla 9. Muestras positivas a morbilivirus

<i>Monitoreo</i>	<i>Muestras positivas</i>	<i>Lobera</i>	<i>Tipo de muestra</i>
Islas del Golfo 2008	5	Partida	Hisopado oro faríngeo
	12	Granito	Hisopado oro faríngeo
	13	Granito	Hisopado oro faríngeo
	14	Granito	Hisopado oro faríngeo
	28	Machos	Hisopado oro faríngeo
	30	Machos	Hisopado oro faríngeo
	31	Cantiles	Hisopado oro faríngeo
	32	Cantiles	Hisopado oro faríngeo
	36	Cantiles	Hisopado oro faríngeo
	38	Cantiles	Hisopado oro faríngeo
	43	Rasito	Hisopado oro faríngeo
	48	Rasito	Hisopado oro faríngeo
49	Rasito	Hisopado oro faríngeo	
Islas del Golfo 2009	34	Granito	Hisopado oro faríngeo
	35	Granito	Hisopado oro faríngeo
	42	Machos	Hisopado oro faríngeo
	43	Machos	Hisopado oro faríngeo
	45	Machos	Hisopado oro faríngeo
	47	Machos	Hisopado oro faríngeo
	48	Machos	Hisopado oro faríngeo
	51	El coloradito	Hisopado oro faríngeo
Contingencia Mazatlán	3	NA	Pulmón derecho lobo 2
	4	NA	Pulmón izquierdo lobo 2
	6	NA	Hígado lobo 2
	7	NA	Piel lobo 2
	10	NA	Encéfalo delfín 1
	11	NA	Piel delfín 1
	12	NA	Pulmón delfín 2
	14	NA	Encéfalo delfín 2
Total	29	NA	

En color rojo se muestran las secuencias analizadas para la filogenia

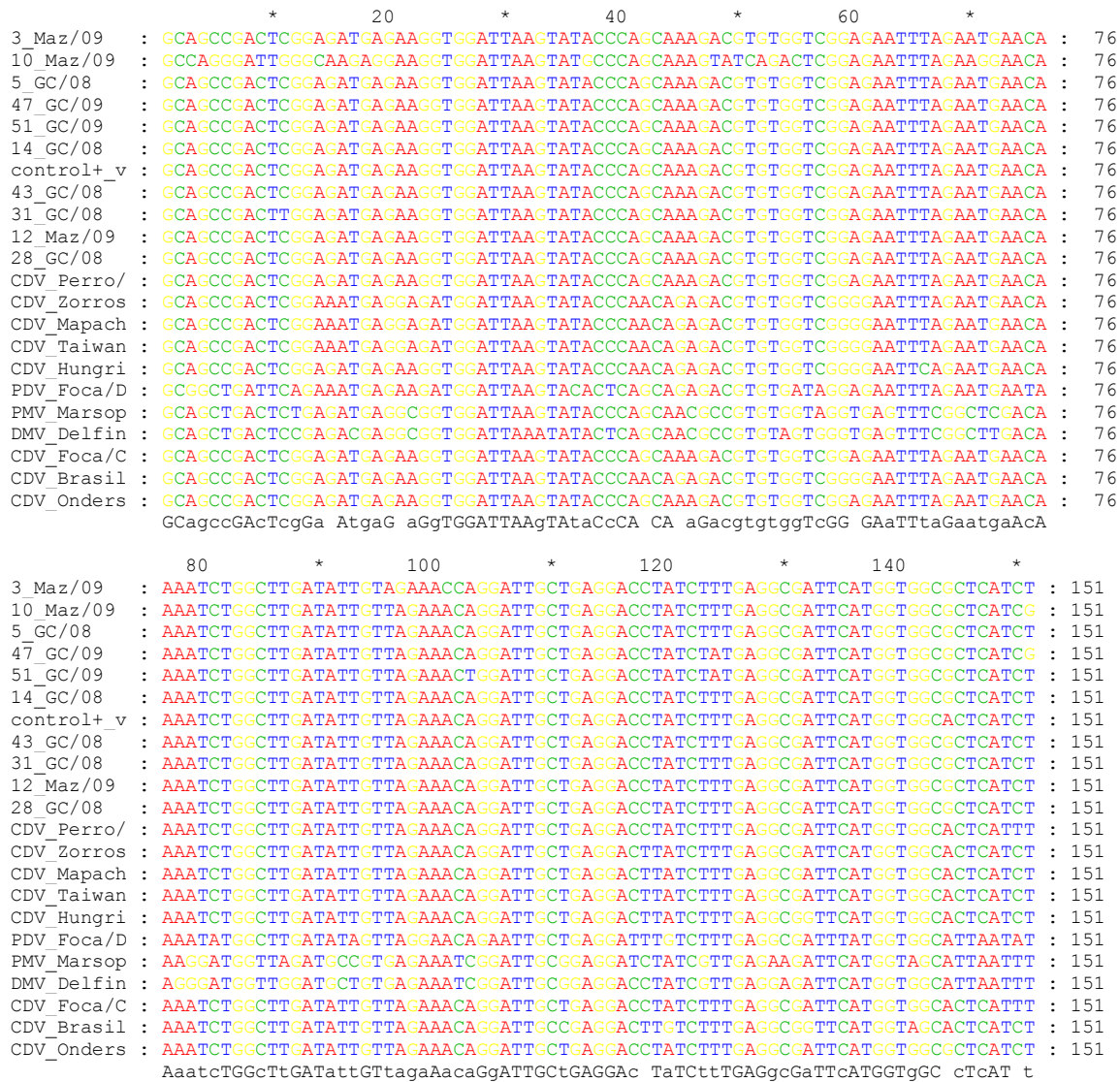


Figura 17. Alineamiento de los fragmentos de 151 nucleótidos del gen N. Se alinearon las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias descargadas del GenBank con números de acceso: CDV (EU726268, DQ887066, EF042819, DQ522030, HM046486, DQ005134, AF305419), DMV (AJ608288), PMV (AY949833) y PDV (X75717).

```

                *           20           *           40           *
3_Maz/09      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVETRIAEDLSLRRFMVALI : 50
10_Maz/09     : ARDWARGRWIKYAQQSIRLGEFRRNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
5_GC/08       : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
47_GC/09      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSMRRFMVALI : 50
51_GC/09      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNWIAEDLSMRRFMVALI : 50
14_GC/08      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
control+_v    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
43_GC/08      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
31_GC/08      : AADLEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
12_Maz/09     : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
28_GC/08      : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Perro/    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Zorros    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Mapach    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Taiwan    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Hungri    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
PDV_Foca/D    : AADSEMRRWIKYTQQRRVIGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
PMV_Marsop    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRLDKGWLDAVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
DMV_Delfin    : AADSETRRWIKYTQQRRVVGEFRLDKGWLDAVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Foca/C    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Brasil    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
CDV_Onders    : AADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALI : 50
                AaDsemrRWIKYtQQrrv6GEFR 1KiWLDiVrnrIAEDLS6RRFMVALI

```

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos. Estas secuencias fueron obtenidas a partir de las secuencias de nucleótidos. La composición de la secuencia se muestra en colores donde esta presenta 100% de conservación, y en negro las que presentaron alguna modificación.

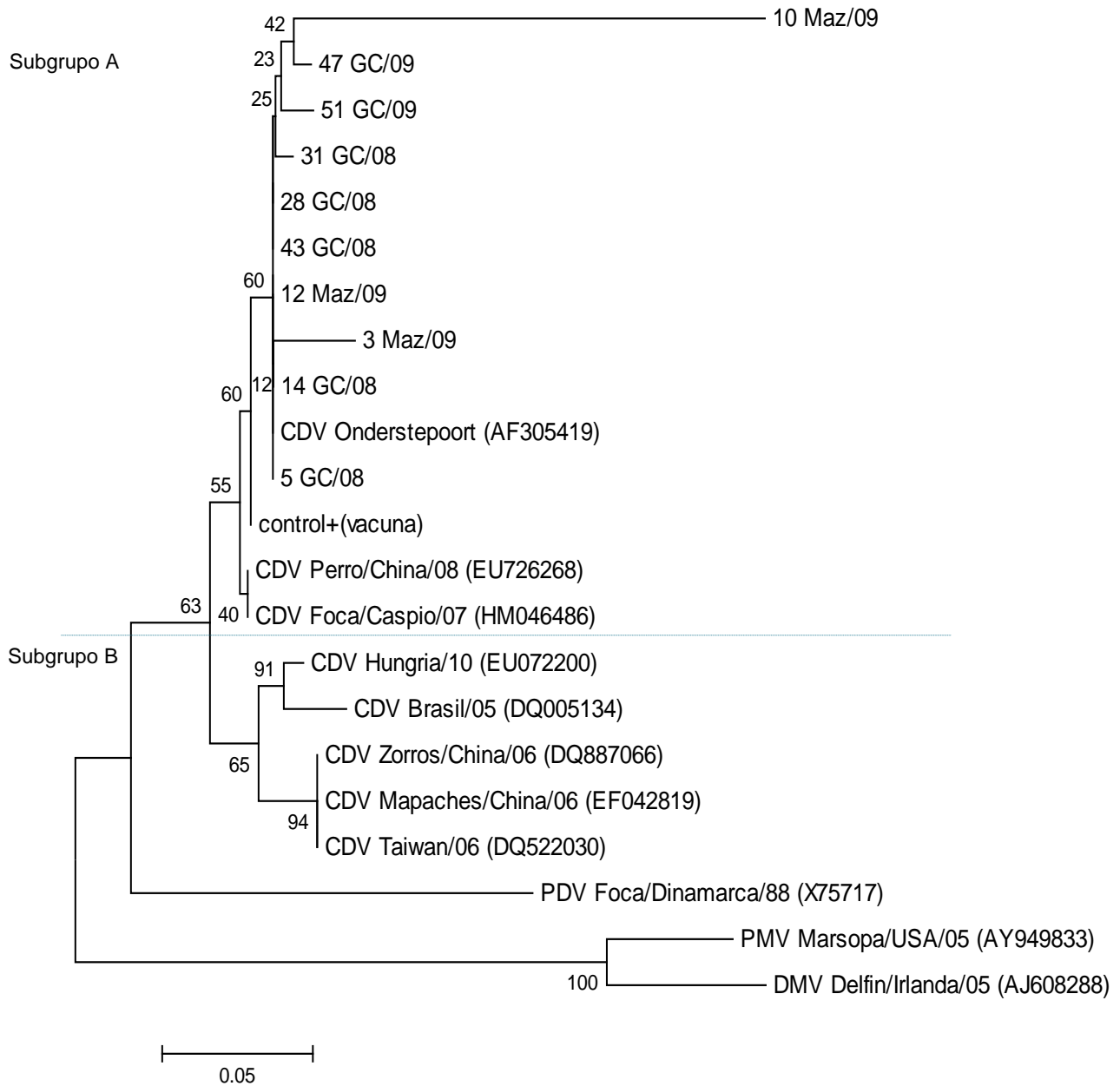


Figura 19. Árbol filogenético de un fragmento de 150 pb altamente conservado del gen N. El número en cada nodo indica el valor de bootstrap después de 10 000 replicaciones, los números en paréntesis indican el número de acceso de las secuencias en GenBank. Se observa el agrupamiento en dos subgrupos: subgrupo A y subgrupo B, en el subgrupo A se encuentran todas las secuencias obtenidas en este estudio. La línea azul indica la división de los subgrupos.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio se estandarizó un método de RT-PCR para la detección de morbilivirus de mamíferos marinos, los cuales son los patógenos de mayor importancia de cetáceos y pinnípedos (Rojas, 2004). Este ensayo está dirigido a una porción altamente conservada del gen N (Banyard *et al*, 2008). Se determinó el límite de detección de la técnica para evaluar su sensibilidad, obteniendo 0.01 fg/ μ l de reacción; se puede observar que es muy similar al obtenido en un ensayo realizado por Grant *et al* en el 2008 en donde detectaron mediante una técnica de RT-PCR convencional a DMV con una sensibilidad de 0.02 fg/ μ l de reacción. Cabe mencionar que la metodología recomendada por los fabricantes del kit de RT-PCR sugiere que el mínimo de RNA por reacción es de 20 fg/ μ l. Debido a estas características, ensayo desarrollado puede ser utilizado para la detección de morbilivirus en los mamíferos marinos en México ya que los iniciadores diseñados son útiles para hacer un estudio epidemiológico en muestras de mamíferos marinos con poca carga viral.

Por el método estandarizado se encontró morbilivirus en crías de lobos marinos en ambos años muestreados y en todas las loberas en por lo menos uno de los muestreos. La prevalencia en el 2008 (26%) fue significativamente más alta que en 2009 (13.3%) y más baja que las observadas en dos especies de focas aparentemente sanas: focas grises (*Halichoerus grypus*) y focas comunes (*Phoca vitulina*) de una misma región, con una prevalencia de anticuerpos de 73% y 37% respectivamente (Duignan *et al*, 1995). La

razón de que las prevalencias observadas por Duignan *et al* sean más altas puede ser por dos razones: el método que nosotros usamos detecta el antígeno el cual debe estar presente en el individuo al momento de tomar la muestra a diferencia del que ellos usaron en el que buscan anticuerpos los cuales permanecen en un individuo en un largo periodo de tiempo después de la infección y debido a que el transporte y conservación de un virus es más complejo y menos exitoso que el de un suero. En el estudio de Duignan *et al* (1995) se encontró una prevalencia de anticuerpos más alta en focas adultas que en juveniles, y proponen que el morbilivirus es enzootico en ambas especies. En nuestro estudio solo se tomaron muestras de las crías por el fácil manejo (los lobos marinos adultos llegan a pesar 300 kg y es difícil tomar muestras de adultos), pero es muy posible que se encontraría una mayor prevalencia si se tomaran muestra de los adultos. Se sugiere que para demostrar un endemismo del virus en los lobos marinos del golfo de California es necesario tomar muestras con regularidad de lobos marinos adultos, subadultos, juveniles, crías y de ambos sexos para hacer ensayos serológicos además del uso de las herramientas de biología molecular para la detección del virus, como se ha hecho en estudios donde se determinó que el virus del oeste del Nilo es endémico en las poblaciones humanas de los Estado Unidos de América (Lindsey *et al*, 2010).

En el 2008 se detecto el virus en las 5 loberas muestreadas a diferencia del 2009 donde en solo 3 de 6 loberas se demostró la presencia del virus. En todas las loberas se observó una disminución de prevalencia a excepción de la lobera machos que aumentó en un 30% la prevalencia. La disminución de la prevalencia de morbilivirus del 2008 al 2009 se puede deber a que las muestras del 2009 permanecieron más tiempo almacenadas desde la llegada al laboratorio hasta su procesamiento, lo que puede promover la degradación del RNA viral y la obtención de falsos negativos. Desafortunadamente los datos obtenidos sobre las loberas no nos dan información suficiente para hacer un estudio epidemiológico en cada lobera, se necesitan más años de monitoreos.

En la contingencia ocurrida en la costa de Mazatlán Sinaloa, la prevalencia observada (60%) fue similar a las observadas durante las epizootias registradas de morbilivirus en otros mamíferos marinos como se observa en la tabla 10 y más alta que la prevalencia obtenida en este trabajo en las crías aparentemente sanas. Esto se puede deber a que los animales encontrados en la costa son adultos, los cuales viajan largas distancias en busca de alimento y tienen más contacto con animales de otras especies,

por lo tanto están más expuestos a infecciones por los morbilivirus que las crías que tienen 2 meses de nacidas y aun no se alejan de la lobera (Aurioles y Sinsel, 1988). Sin embargo aunque presentan una alta prevalencia al virus no se puede asegurar que fue la causa de su muerte ya que en la misma área se encuentran animales vivos a los que se les detectó el virus, sin embargo no han presentado enfermedad, además de que los animales varados no presentaron los signos clínicos característicos de infección del morbilivirus en los mamíferos marinos.

La prevalencia de morbilivirus observada en este estudio sugiere que el CDV en lobos marinos en esta zona geográfica es endémico y no causa aparentemente mortandad de lobos marinos como se ha observado en otras especies de mamíferos marinos en los océanos Atlántico, Pacífico y Mar Mediterráneo (Blixenkrone-Møller *et al*, 1994; Lipscomb *et al*, 1994; Reidarson *et al*, 1998; Kuiken *et al*, 2006; Raga *et al*, 2008). Aunque no hay datos experimentales, se podría especular que el virus tuvo una adaptación al ecosistema o que el virus presenta una virulencia disminuida debido a diversas presiones evolutivas y por eso no causa la muerte de los animales. La muerte de mamíferos marinos en una infección por morbilivirus es multifactorial y la respuesta inmunológica juega un papel muy importante tanto en la prevención de la infección como en la recuperación de la misma. Se ha documentado que las infecciones secundarias y oportunistas son efectos indirectos del morbilivirus y son difíciles de evaluar (Duignan *et al*, 1995). En un estudio realizado se evaluó la diversidad genética del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de los lobos marinos en el Golfo de California, obteniendo una baja diversidad genética en el MHC, se ha observado una relación directa entre la diversidad genética y la eficiencia de la respuesta inmune, por lo que podemos decir que existe un peligro latente para esta población si un virus similar pero de mayor virulencia aparece en la zona (Bowen *et al*, 2006).

Tabla 10. Epizootias registradas por morbilivirus.

Año	Lugar	Especie	Prevalencia	Técnica de diagnóstico
1988	EUA, costa del Atlantico	<i>Tursiops truncatus</i>	56.16%	Inmunohistoquímica
1993	Golfo de Mexico	<i>Tursiops truncatus</i>	61.4%	RT-PCR
1993	EUA, costa del Atlantico	<i>Tursiops truncatus</i>	100%	RT-PCR
1994	Golfo de Mexico	<i>Tursiops truncatus</i>	54.54%	RT-PCR
2000	Mar Caspio	<i>Phoca caspica</i>	64.28%	RT-PCR
2002	Norte de Europa	<i>Halichoerus grypus</i>	9.84%	RT-PCR
2005	Suroeste de Alaska	<i>Enhydra lutris kenyoni</i>	38.93%	Seroneutralización
2005	Suroeste de Alaska	<i>Enhydra lutris kenyoni</i>	10.38%	RT-PCR
2007	Mar Mediterraneo	<i>Globicephalas melas</i>	100%	RT-PCR
2007	Mar Mediterraneo	<i>Stenella coeruleoalba</i>	70%	Inmunohistoquímica

En el árbol filogenético (figura 18) se observa que todas las secuencias obtenidas se agrupan a la especie de canine distemper virus, también se observó que tienen una alta similitud entre ellas, principalmente las secuencias analizadas de las muestras del 2008. Se forman dos subgrupos de CDV, uno contiene todas las secuencias obtenidas en este estudio asociándose a la cepa Onderstepoort y la cepa DK/88 obtenida de una foca en el Mar Caspio y en otro subgrupo las que corresponden a carnívoros terrestres. Se incluyeron las secuencias de PDV, PMV y DMV para determinar la especie de morbilivirus a la que pertenece las secuencias encontradas. Las secuencias obtenidas de 2 muestras en la contingencia que corresponden a la 10 Maz/09 y la 3 Maz/09 presentaron más diferencias entre las secuencias obtenidas, lo que podría significar que estos virus son una cepa diferente de CDV. No se observa una diferenciación de grupos filogenéticos en cuanto a las zonas geográficas, se requieren estudios más amplios, como una secuenciación de fragmentos de mayor longitud y más analizados para hacer comparaciones con otras secuencias del banco de datos y obtener valores de bootstrap más altos. También se sugiere continuar con muestreos periódicos y obtener más muestras representativas de lobos marinos de diferentes edades y ambos sexos, para poder comprobar el endemismo del virus en el Golfo de California e identificar nuevas variantes del canine distemper virus que afecta a los mamíferos marinos de dicha región.

VIII. CONCLUSIONES

La técnica desarrollada en este trabajo para la detección de los morbilivirus en mamíferos marinos es altamente sensible (0.01 fg/μl de reacción) y se puede aplicar para realizar estudios en muestras con poca carga viral.

La prevalencia de morbilivirus en las crías de lobos marinos de las Islas del Golfo de California en el 2008 fue de 26% y en el 2009 fue de 13.3%. Y la observada en la contingencia en la costa de Mazatlán Sinaloa fue de 60%, sin embargo, no se puede asegurar que el morbilivirus fue la causa de muerte ya que no presentaban los signos clínicos característicos y los animales aparentemente sanos que se estudiaron también tenían al virus.

Los virus detectados en este estudio tienen alta similitud con CDV que afecta a mamíferos marinos

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que CDV es endémico en los lobos marinos del Golfo de California, es necesario hacer estudios durante más años y monitorear lobos marinos de diferentes edades así como animales de otras especies en la región.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre A.A., House C., House J. A. (2002). "Emergence of Infectious Diseases in Marine Mammals". En: Conservation Medicine Ecological Health in practice. Aguirre A.A., Ostfeld R.S., Tabor G.M., House C. y Pearl M.C. (Eds).Oxford University press. Pag 104.

Aurioles D. y García M.C. Zalophus californianus En: Los mamíferos silvestres de México. Editores: Ceballos González G. y Oliva G. Fondo de cultura Economica – CONABIO. Primera edición. Mexico 2005. P 398-399.

Aurioles D. y Sinsel F. (1988). Mortality of California sea lion pups al los islotes, Baja California Sur, México. Journal of Mammalogy. 69(1): 180-183.

Banyard A.C., Grant R.J., Romero C.H., Barret T. (2008) Sequence of the nucleocapsid gene and genome and antogenome promoters for an isolate of porpoise morbillivirus. Virus Research. 132: 213-219.

Barret T., Blixenkrone-Møller M., Di Guardo G., Domingo M., Duignan P., Hall A., Mamaev L. Osterhaus A.D.M.E. (1995) Morbilliviruses in aquatic mammals: report on rond table discussion. Veterinary Microbiology. 44: 261-265.

Barret T., Visser I. K. G., Mamaev L., Goatley L., Van Bresse M. F., Osterhaus A. D. M. E. (1993). Dolphin and porpoise morbiliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. Virology. 193: 1010-1012.

Blixenkrone-Møller M., Bolt G., Gottschalck E., Kenter M. (1994). Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirua reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and rumiand morbilliviruses. Journal of General Virology. 75: 2829-2834.

Bolt G., Blixenkrone-Møller M., Gottschalck E., Wishaupt R.G.A., Welsh M.J., Philip Earle J.A., Rima B.K. (1994). Nuleotide and educed amino acid sequences of the matrix (M) and fusion (F) protein genes of cetacean morbilliviruses isolated from a porpoise and a dolphin. Virus Research. 34: 291-304.

Bowen L., Aldridge B.M., DeLong R., Melin S., Godinez C., Zavala A., Gulland F., Lowenstine L., Stott J.L., Johnson M.L. (2006). MHC gene configuration variation in geographically disparate populations of California sea lions (Zalophus californianus). Molecular Ecology. 15: 529-533.

CONAMP. 2000. Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California. SEMARNAP. México.

Daszak P., Cunningham A. A., Hyatt A. D. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. Science. 287: 443–449.

Delgado-Estrella A., Ortega-Ortiz J.G., Sánchez Ríos A. (1994). Varamientos de mamíferos marinos durante primavera y otoño y su relación con la actividad humana en el norte del golfo de california. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología. 65(2): 287-295.

Di Guardo G., Marruchella G., Agrimi U., Kennedy S. (2005). Morbillivirus infections in Aquatic mammals: A brief overview. Journal of Veterinary Medicine A physiology, pathology, clinical medicine. 52: 88-93.

Elia G., Decaro N., Martella V., Cirone F., Lucente M.S., Lorusso E., Di Trani L., Buonavoglia C. (2006). Detection of Canine Distemper Virus in dogs by Real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods. 136: 171-176.

Fernandez A., Esperon F., Herraes P., Espinosa A., Calvel C., Bernabe A., Sanchez-Viscaino J. M., Verborgh P., DeStephanis R., Toledano F., Bayon A., (2008). Morbillivirus and Pilot Whale deaths, Mediterranean Sea. Emerging Infectious Diseases. 14(5): 792-794.

García-Rodríguez F.J. (1995). Ecología alimentaria del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* en Los Islotes, B.C.S., México. Tesis de Licenciatura. Biología. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. 106 p.

Godínez-Reyes C., Santos del Prado K., Zepeda-López H., Aguirre A., Anderson D.W., Parás-González A., Velarde E., Zavala-González A. (2006). Monitoreo de poblaciones y condiciones de salud de aves marinas y lobos marinos en las Islas del norte del Golfo de California, Mexico. Gaceta Ecológica. 81: 31-45.

Goldstein T., Mazet J., Gill V. A., Doroff A. M., Burek K. A., Hammond J. A. (2009) Phocine distemper Virus in Northern Sea Otters in the Pacific Ocean, Alaska, USA. Emerging Infectious Diseases. 15(6): 925-927.

Grant R.J., Banyard A.C., Barret T., Saliki J.T., Romero C.H. (2009) Real-time RT-PCR assays for the rapid and differential detection of dolphin and porpoise morbilliviruses. Journal of Virological Methods. 156: 117-123.

- Hall A. J. (1995).** Morbilliviruses in marine mammals. Trends in Microbiology. 3: 4-9.
- Hammond J.A., Pomeroy P.P., Hall A.J., y Smith V.J. (2005).** Identification and real-time PCR quantification of Phocine distemper virus from two colonies of Scottish grey seals in 2002. Journal of General Virology. 86: 2563-2567.
- House C., Aguirre A.A., House J.A.** Emergence of infectious diseases in marine mammals. En: Conservation Medicine. Ecological Health in practice. Editores: Aguirre A.A., Otsfeld R.S., Tabor G.M., House C., Pearl M.C. Oxford University press. Estados Unidos de Norteamérica. **2002.** P 104-117.
- INE. 2000.** Proyecto para la conservación, recuperación, manejo y aprovechamiento sustentable de Pinnípedos. SEMARNAP. México.
- Iorio R.M. y Mahon P.J. (2008).** Paramyxoviruses: different receptors – different mechanisms of fusion. Trends in Microbiology. 16(4): 135-137.
- Krafft A., Lichy J.H., Lipscomb T.P., Klaunberg B.A., Kennedy S., Taubenberger J.K. (1995).** Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) in the Atlantic al Gulf of Mexico epizootics by a polymerase chain reaction-based assay. Journal of Wildlife Diseases 31(3): 410-415.
- Lamb R.A., Kolakofsky D.** “Paramyxoviridae: The viruses and their replication”. En: Fields Virology. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (ed.) (1996). Tercera edición. Lippincott-Raven Publishers, E.U.A.
- Lamb R.A., Paterson R.G., Jardetzky T.S.(2006)** Paramyxovirus membrane fusion: Lesson from the F and HN atomic structures. Virology. 344: 30-37.
- Leblanc G.A. y Bain L.J. (1997).** Chronic Toxicity of Environmental Contaminants: Sentinels and Biomarkers. Environmental Health Perspectives. 105(1): 65-80.
- Lindsey N.P., Staples J.E., Lehman J.A., Fischer M. (2010).** Surveillance for human West Nile virus disease – United States, 1999-2008. Morbidity and mortality weekly report. 59: 1-17.
- Lipscomb T.P., Schulman F.Y., Moffett D., Kennedy S.(1994)** Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from the 1987-1988 epizootic. Journal of Wildlife Diseases 30:567-71.

- Lipscomb** T.P., Kennedy S., Moffett D., Krafft A.E., Klaunberg B.A., Lichy J.H. (1996). Morbilliviral epizootic in Atlantic bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 8: 283-290.
- Lipscomb** T.P., Mense M.G., Habecker P.L., Taubenberger J.K., Schoelkopf R. (2001) Morbilliviral dermatitis in seals. Veterinary Pathology. 38: 724-726.
- McCullough** S.J., McNeilly F., Alan G.M., Kennedy S., Smith J.A., Cosby S.L., McQuaid S., Rima B.K. (1991). Isolation and characterisation of a porpoise morbillivirus. Archives of Virology. 118 (3-4): 247-252.
- Mateos** S. Virus Respiratorios. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica. Instituto de Higiene. Segunda edición. Uruguay. 2006. P 437.
- Morita** Y., Suzuki T., Shiono M., Shiobara M., Saitoh M., Tsukagoshi H., Yoshizumi M., Ishioka T., Kato M., Kozawa K., Tanaka-Taya K., Yasui Y., Noda M., Okabe N. y Kimura H. (2007) Sequence and Phylogenetic Analysis of the Nucleoprotein (N) Gene in Measles Viruses Present in Gunma, Japan, in 2007. Japan Journal of Infectious Diseases. 60: 402-404.
- Müller** G., Kaim U., Haas L., Greiser-Wilke I., Wohlsein P., Slebert U. y Baumgärtner. (2008) Phocine Distemper Virus: characterization of the morbillivirus causing the seal epizootic in northwestern Europe in 2002. Archives of Virology. 153: 951-956.
- Niño-Torres** C.A., Gardner S.C., Zenteno-Savín T., Ylitalo G.M. (2009). Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in California Sea Lions (*Zalophus californianus californianus*) from the Gulf of California, México. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 56: 350-359.
- Norrby** E., Sheshberadan H., McCullough K.C., Carpenter W.C., Orvell C. (1985). Is Rinderpest virus the Archevirus of the morbillivirus genus? Intervirology. 23: 228-232.
- Odell** D.K. California Sea Lion *Zalophus californianus*. En: Handbook of marine mammals. Volumen 1. Editores: Rigway S.H. y Harrison R.J. Academic press. 1981. P 69-71.
- Ohishi** K., Ando A., Suzuki R., Takishita K., Kawato M., Katsumata E., Ohtsu D., Okutso K., Tokutake K., Miyahara H., Nakamura H., Murayama T., Maruyama T. (2010). Host-virus specificity of morbilliviruses predicted by structural modeling of the marine mammal SLAM, a receptor. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 33: 227-241.

Osterhaus A.D.M.E., de Swart L. R., Vos W. H., Ross S.P., Kenter J. H., Barret T. (1995). Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. Veterinary microbiology. 44: 219-227.

Philippa J.D.W., van de Bildt M.W.G., Kuiken T., 't Hart P., Osterhaus A.D.M.E. (2009). Neurological signs in juvenile harbor seals (*Phoca vitulina*) with fatal phocine distemper. Veterinary record. 164: 327-331.

Raga J.A. Banyard A., Domingo M., Corteyn M., Van Bresseem M.F., Fernández M., Aznar F.J., Barret T. (2008) Dolphin Morbillivirus Epizootic Resurgence, Mediterranean Sea. Emerging Infectious Diseases. 14(3): 471-473.

Reddy M.L., Dierauf L.A. y Gulland F.M.D. Marine Mammals as sentinels of Ocean Health. En: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Editores: Dierauf L.A. y Gulland F.M.D. CRC press LLC. 2da edición. 2001. P 3-8.

Reidarson T.H., McBain J., House C., King D.P., Stott J.L., Krafft A., (1998) Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. Journal of Wildlife Diseases. 34:771-776.

Roche. 2008. Manual de Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation

Rojas A. (2004) Morbilivirus en Cetáceos. Boletín GEAS. 6(3): 18-21.

Saliki J. T., Lehenbauer T. W. (2001) Monoclonal antibody-based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Morbillivirus Antibody in Marine mammal sera. Journal of Clinical Microbiology. 39(5): 1877-1881.

Saliki J.T., Cooper E.J., Gustavson J.P. (2002) Emerging Morbillivirus Infections of Marine Mammals. Development of Two Diagnostic Approaches. Annals New York Academic Sciences. 969: 51-59.

Santos-López G., Hernandez J., Borraz-Arguello M.T., Ramirez-Mendoza H., Vallejo V., Reyey-Leyva J. (2004) Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubolavirus porcino*. Archivos de Medicina Veterinaria. 2:119-136.

Santos-López G., Rosas-Murrieta N.H., Borraz-Arguello M.T., Alvarado-Castillo M.G., Bermúdez-Aguirre A., Vallejo-Ruiz V., Reyes-Leyva J.R. “La Hemaglutinina neuraminidasa, determinante de tropismo y virulencia en los Paramixovirus”. En: Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parasito-Hospedero. Rocha-Gracia Rosa del

Carmen, Lozano-Zarain Patricia, Martínez-Laguna Ygnacio (Eds): **(2004)** Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. Pp. 246-263.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana-059-ECO-2001 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. México.

Tait R.V. La costa. En: Elementos de ecología marina. Segunda edición, Editorial Butterworks and Co. Londres. **1987.** P 300.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software versión 4.0. Molecular biology and evolution. 24(8):1596-1599.

Tatsuo H., Ono N. y Yanagi Y. (2001) Morbilliviruses Use Signaling Lymphocyte Activation Molecules (CD150) as Cellular Receptors. Journal of Virology. 75(13): 5842-5850.

Taubenberger J.K., Tsai M.M., Atkin T. J., Fanning T.G., Krafft A. E., Moeller R. B., Kods S.E., Mense M.G., Lipscomb T.P. (2000) Molecular Genetic Evidence of a novel morbillivirus in a Long-finned Pilot Whale (Globicephalus melas). Emerging Infectious Diseases. 6: 42-45.

Tenoever B.R., Servant M.J., Grandvaux N., Lin R., Hiscott J. (2002) Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. Journal of Virology. 76(8): 3659-3669.

Wild T.F., Nanche D., Rabourdin-Combe C., Gerlier D., Malvoisin E., Lecouturier V., Buckland R. (1995). Mode of entry of morbilliviruses. Veterinary microbiology. 44: 267-270.

Wohlsein P., Müller G., Haas L., Siebert U., Harder T.C. y Baumgärtner W. (2007) Antigenic characterization of phocine distemper virus causing mass mortality in 2002 and its relationship to other morbilliviruses. Archives of Virology. 152: 1559-1564.

Wohlsein P., Puff C., Kreutzer M., Siebert U., Baumgärtner W. (2007) Distemper in a Dolphin. Emerging Infectious Diseases. 13(12): 1959-1961.

Zavala-González A., Godines-Reyes C., Enríquez-Andrade R. “La conservación de la Islas del Mar de Cortés: Experiencias en Baja California”, en El manejo costero en México. Rivera-Arriaga E., Villalobos G.J., Azuz-Adeth I. y Rosado-May F. (eds.): Universidad

Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS- Universidad, Universidad de Quintana Roo. **2004**, Pp. 354-355.

Zavala-González, A. (1993). Biología poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus, californianus*, en la Región de las Grandes Islas del Golfo de California, México. Tesis de Maestría. UNAM. 79 pp.

Genoma del NCBI (Publicación en línea) Número de acceso NC_005283 Encontrado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17490&window=80000&begin=-34999#protmap>

ICTVdB, 2010 Encontrado en: <http://www.ictvdb.org/lctv/index.htm>

IUCN, 2010. Encontrado en: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41666/0>