

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

REGIONALIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CONTRA *Leptospira spp*, NIVELES DE CORTISOL Y
VALORES HEMÁTICOS EN ONCE COLONIAS DE
LOBOS MARINOS *Zalophus californianus californianus*
EN EL GOLFO DE CALIFORNIA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

CECILIA PEDERNERA ROMANO

TUTOR

FRANCISCO A. GALINDO MALDONADO

COMITÉ TUTORAL

DAVID AURIOLES GAMBOA

JORGE I. TORRES BARRANCA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIAS

A toda mi familia la que está cerca y la que está lejos por estar siempre y apoyarme en todas mis aventuras y proyectos.

A José por acompañarme siempre aunque eso signifique irse de su tierra.

A toda mi gente de Argentina, familia, familia política y amigos que me hicieron crecer y que son parte de mi vida todos los días.

A mis amigos: Lau Brier siempre cerquita, Lau Duhau toda una vida en común, Lu por los sueños compartidos, Tania mi amiga verde y valiente, Marina y Tomás consejeros, amigos, apoyo académico y vecinos, Primari tan cerquita de acá. Todos no caben en esta lista pero tienen un lugar en mi corazón y en mi memoria y eso es lo que importa.

A las crías de lobo marino de California todo mi respeto y admiración.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cecilia Pedernera Romano

FECHA: 01/09/04

FIRMA: CP-Rom.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a todos los que hicieron posible este proyecto y digo todos así no me olvido de nadie.

-Agradecimientos a la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMERNAT por el permiso de investigación Oficio No. SGPA/DGVS. – 0575 Para el proyecto Evaluación de la interacción de las pesquerías y el lobo marino *Zalophus californianus* y la estructura del complejo *Leptospira interrogans* en las Colonias reproductoras del Golfo de California. CONACYT-SEMARNAT (1230).

-Al CONACYT por la beca para mis estudios de maestría.

-Al Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza por su apoyo financiero al proyecto, en especial a nuestro fotógrafo y mil usos Manfred Mainers.

-Agradecimientos a la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMERNAT por el permiso de investigación Oficio No. SGPA/DGVS. – 0575 Para el proyecto Evaluación de la interacción de las pesquerías y el lobo marino *Zalophus californianus* y la estructura del complejo *Leptospira interrogans* en las Colonias reproductoras del Golfo de California. CONACYT-SEMARNAT (1230).

-Al equipo de trabajo de la embarcación “El Amigo” a su tripulación y a todos los que compartimos el crucero: David, Osvaldo, Ciro, Manfred, Claudia, Heidi y Cimarrón.

-A mis tres tutores Francisco A. Galindo Maldonado, David Auriol Gamboa y Jorge I. Torres Barranca por sus comentarios y cuestionamientos que hicieron crecer esta tesis.

-A David Auriol por tener la paciencia de ser mi tutor a distancia. Gracias por invitarme a ser parte de este proyecto.

-Al Zoológico Africam Safari por facilitarnos el equipo de anestesia además de la experiencia de la gente que en él trabaja: gracias Alberto, Osvaldo y Karina.

- A toda la gente del laboratorio dirigido por la Dra. Marta Romano, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. En especial a Ricardo Valdez por enseñarme la técnica de radioinmunoanálisis, por su paciencia y por compartir todo lo que sabe conmigo.

-A la Dra. Marta Romano por el asesoramiento en las determinaciones de cortisol y por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

- Al International Fund for Animal Welfare (IFAW), por financiar la compra de los kits de cortisol.

- A toda la gente del Laboratorio de *Leptospira* de la UAM-Xochimilco, dirigido por el Dr. Jorge I. Torres Barranca, en especial a Patricia Meléndez por todo lo que me enseñó y por todo el tiempo que compartimos juntas.

- Al Dr. Enrique Pedernera por ceder espacio en su laboratorio para complementar el trabajo de hematología.

- A toda la gente del Departamento de Etología y Fauna Silvestre, mi segundo hogar. En especial a Dulce por ser parte del proyecto y por su amistad y apoyo en todo momento.

- A mi jurado: Dulce M. Brousset y Alejandro de la Peña-Moctezuma por sus valiosos comentarios.

- A Adriana Ducoing por el apoyo en el análisis estadístico y por trabajar horas extras y compartir sus conocimientos y pasiones conmigo

RESUMEN

Estudios anteriores han demostrado la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp en lobos marinos de California, *Zalophus californianus californianus*, en el Golfo de California, México. Este es el primer estudio que cubre 11 colonias reproductivas. Además, es la primera vez que se mide la respuesta de la glándula adrenal en esta especie al estrés por captura y se miden algunos valores hemáticos en animales de esa edad y en tantas colonias. Se colectaron 106 muestras de sangre de crías de 1 a 8 semanas de vida, bajo anestesia. Los anticuerpos contra *Leptospira* fueron determinados por medio de la prueba de aglutinación microscópica las serovariedades más frecuentes fueron Patoc 53.8%, Pyrogenes 39.6 %, Ballum 35.8 %. Las colonias que presentaron mayor porcentaje de individuos positivos fueron Rasito 41.9%, Lobos 26.3%, Farallón de San Ignacio 25.9% y Partido 21.5%. A través de un análisis de componentes principales se obtuvieron las serovariedades que tenían más relevancia para cada región. A través de la presencia de serovariedades en los cachorros de lobo marino de cada colonia se obtuvieron 3 grupos utilizando análisis de racimos asociados a regiones geográficas: al Sur Grupo 1 Islotes y Farallón de San Ignacio; Grupo 2 la región de islas del Centro y Norte: San Pedro Nolasco, San Pedro Mártir, San Esteban, Granito, Cantiles, Lobos y Consag y Grupo 3 formado por Rasito y Partido. Además se obtuvo una correlación positiva entre la distancia Euclidiana y la distancia geográfica lo que sugiere que la distancia entre colonias puede ser un factor importante para la transmisión de leptospiras. Se sugiere que existe un patrón de regionalización de las serovariedades de leptospira en el Golfo de California. A cinco de los diez animales capturados por colonia se les tomaron dos muestras de sangre, la segunda cinco minutos después que la primera, para evaluar la respuesta al estrés por captura. Las mediciones de cortisol sérico se hicieron a través de radioinmunoanálisis y demostraron que las crías de lobo marino son capaces de responder al estrés por captura y manejo, ya que los valores obtenidos para la segunda muestra fueron más altos que los obtenidos para la primera muestra. Se encontró también que los niveles de cortisol promedio fueron más altos en las hembras que en los machos y una correlación positiva con la temperatura corporal, pero no se encontraron correlaciones con las demás variables individuales como peso, condición corporal, estado de salud, estado de ánimo y valores hematológicos. En el análisis geográfico el cortisol se encontraron diferencias entre loberas y se formaron dos grupos: Norte que incluye a las colonias del centro y norte y sur compuesto por Islotes y Farallón de San Ignacio. Se obtuvieron valores hematológicos como el hematocrito y la hemoglobina que mostraron una correlación negativa con la condición corporal y el peso, como sucede en otros pinnípedos. El porcentaje de eosinófilos fue en las colonias y éste podría utilizarse como un indicador indirecto de la carga parasitaria. Se evaluó a las loberas seleccionando algunos criterios como condición corporal, niveles de cortisol, porcentaje de eosinófilos entre otros y Rasito fue la colonia con menor puntaje y la de mayor fue Islotes. Presencia de enfermedades, la respuesta de la glándula adrenal, valores hemáticos, entre otras pueden ser algunas de las variables a medir para describir diferencias entre las poblaciones y regiones en el Golfo de California.

Geographic distribution of *Leptospira* spp, cortisol levels, and hematological values in eleven rookeries of California sea lions *Zalophus californianus californianus* in the Gulf of California

ABSTRACT

Previous studies showed evidence concerning the presence of diverse serovars of *Leptospira* in California sea lion pups *Zalophus californianus californianus*, in several rookeries in the Gulf of California. This is the first time that *Leptospira* antibodies, cortisol levels and hematologic values were assessed in eleven reproductive rookeries. 106 blood samples were collected from pups aged 1 to 8 weeks old under anesthesia. Antibodies against 27 serovars were evaluated by microscopic agglutination test (MAT). The most frequent serovars were Patoc 53.8 %, Pyrogenes 39.6% and Ballum 35.8 %. The rookeries that showed a higher percentage of positive reactions were Rasito 41.9%, Lobos 26.3%, Farallón de San Ignacio 25.9% and Partido 21.5%. Principal components analysis help us to reduce the number of serovars that could define a geographic region. Then a cluster analysis yielded a pattern of association, forming three groups, Group 1, Islotes y Farallón de San Ignacio; Group 2, central and northern rookeries: San Pedro Nolasco, San Pedro Mártir, San Esteban, Granito, Cantiles, Lobos and Consag and Group 3, Rasito y Partido. A positive correlation was obtained from the relationship between Euclidian distance and geographic distances showing that the distance between rookeries seems to be a factor related with leptospira transmission. To assess the adrenal response to capture stress five pups from each rookery were sampled twice within 5 minutes between each sample. Cortisol was assayed by radioimmunoanalysis and the results showed that the sea lions pups are able to respond to capture stress, the second sample showed higher values than the first one. Females showed higher levels of cortisol than males and cortisol values showed a positive correlation with body temperature. However, no correlation was found with other individual variables such as weight and body condition. Mean cortisol levels were different between rookeries; based on those levels only two groups were defined: Group 1 including central and northern rookeries and Group 2 formed by Los Islotes and Farallón de San Ignacio. Hematological values as hematocrit and hemoglobin showed a negative correlation with weight and body condition as shown in other pinnipeds. Eosinophils percentage was different between rookeries and this might be used as an indirect indicator of the presence of parasites infection. Rookeries were evaluated using criteria such as body condition, eosinophils percentage, cortisol levels, etc; Rasito was the rookery with the lowest mark and Islotes got the highest one. The presence of diseases, adrenal gland response, hematological values and other factors could be the variables to measure in order to describe regions and define populations in the Gulf of California.

Keywords: California sea lions, *Leptospira*, cortisol, hematology

CONTENIDO

I Introducción	1
II Justificación	2
III Objetivo	3
IV Antecedentes	4
1. Generalidades del lobo marino de California	4
1.1 Taxonomía y distribución geográfica	4
1.1 Descripción de la especie	4
1.2 Biología reproductiva	5
1.4 Población de <i>Zalophus c. californianus</i> en el Golfo de California	6
1.4.1 Distribución y abundancia	6
1.4.2 Parámetros poblacionales	6
1.4.3 Enfermedades infecciosas	7
2 Leptospirosis	8
2.1 Epidemiología y signos clínicos	8
2.2 Transmisión	9
2.3 Patogenia	10
2.4 Respuesta inmune del hospedero.....	10
2.5 Diagnóstico	11
2.6 Leptospirosis en <i>Zalophus californianus californianus</i>	12
2.7 <i>Leptospira</i> spp en el Golfo de California	13
3. Respuesta al estrés	15
3.1 Diferencias individuales en la respuesta a estrés	17
3.3 Cortisol y sistema inmune	17
3.4 Cortisol y anestesia	18
4. Hematología	18
4.1 Leucograma por estrés	19
5. Regiones del Golfo de California	20
V Material y métodos	21
1. Área de estudio	21

1.1 Colonias visitadas	21
2. Toma de muestras	24
2.1 Método de captura y manejo.....	24
3. Protocolo de estrés por captura	25
4 Pruebas de laboratorio	26
4.1 Detección de anticuerpos contra <i>Leptospira</i>	26
4.1.1 Interpretación diagnóstica de la prueba	29
4.2 Determinación de cortisol sérico.....	29
4.3 Hemograma.....	30
5. Análisis estadístico	30
5.1 Patrón de regionalización	30
5.2 Análisis univariado	30
5.3 Análisis de racimos	31
5.4 Análisis de componentes principales.....	31
6. Evaluación de las colonias.....	32
VI Resultados.....	33
1. Anticuerpos contra <i>Leptospira</i> spp.....	33
1.1 Patrón de regionalización.....	38
2. Cortisol.....	43
3. Hematología	46
4. Evaluación de las colonias	47
VII Discusión	49
1. Anticuerpos contra <i>Leptospira</i> spp.....	49
2. Hematología	52
3. Cortisol	53
4. Evaluación de las colonias.....	56
VII Conclusiones	57
Literatura citada	59
Apéndice I	67
Apéndice II	72

Lista de Figuras

Figura 1. Ubicación geográfica de las colonias reproductoras muestreadas de lobo marino en el Golfo de California y división geográfica en Alto Golfo, Región de las Grandes Islas, Central y Boca del Golfo.....	23
Figura 2 Presencia de anticuerpos contra leptospira sólo animales positivos según la OIE.....	34
Figura 3. Dendrograma de la agrupación de serovariedades por colonia.....	38
Figura 4. Correlación entre distancia geográfica y distancia Euclidiana.....	39
Figura 5. Dendrograma utilizando las serovariedades Hebdomadis, Grippotyphosa, Canicola, Australis, Lai, Pyrogenes, Tarassovi, Panama, Ballum, Dajsiman e Icterohaemorrhagiae Palo Alto	40
Figura 6. Mapa con las tres regiones diferenciadas a partir de su asociación con determinadas serovariedades.....	41
Figura 7. Proporción de individuos con anticuerpos contra las 11 serovariedades que definen regiones en A por región geográfica y B por análisis de grupos.....	42

Lista de cuadros

Cuadro 1 Porcentaje de aumento o disminución para cada colonia reproductiva de lobos marinos en el Golfo de California de California desde el reporte de Auriolles-Gamboa y Zavala-González (1994). Periodos comparados	7
Cuadro 2. Serovariedades de <i>Leptospira</i> empleadas en la prueba de aglutinación microscópica (AM) para determinación de anticuerpos en las crías de <i>Z Californianus</i> . en el año 2000.....	14
Cuadro 3. Serovariedades de <i>Leptospira</i> en las que se encontraron reacciones positivas a partir de títulos 1:25 en el estudio realizado en el año 2000 a la prueba de AM por colonia reproductiva de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California.....	15
Cuadro 4. Nombre, ubicación y población de las colonias de lobo marino visitadas.....	22
Cuadro 5. Número de muestras obtenidas en la salida de campo.....	25
Cuadro 6. Lista serovariedades de <i>Leptospira</i> spp utilizadas en la prueba de aglutinación microscópica.....	28
Cuadro 7 Total de individuos positivos y sospechosos en al prueba de AM por colonia para cada serovariedad.....	35
Cuadro 8. Porcentaje de lobos marinos del total (106) que reaccionaron contra una o más serovariedades de <i>Leptospira</i> spp en la prueba de AM. Tomando en cuenta positivos y sospechosos.....	36
Cuadro 9. Total de reacciones positivas a las 27 serovariedades para cada colonia tomando en cuenta positivos y sospechosos.....	37
Cuadro 10 Valores promedio de cortisol sérico en lobos marinos de acuerdo con el sexo para la muestra uno y la dos.....	44
Cuadro 11 Valores promedio de cortisol sérico de muestras tomadas por la mañana (AM) y por la tarde (PM) en la muestra uno y la dos.....	44
Cuadro 12. Valores promedio de cortisol sérico ng/ml en las 11 colonias estudiadas.....	45
Cuadro 13. Valores hematológicos promedio de los 106 individuos.....	46
Cuadro 14 Evaluación de las once colonias utilizando características individuales de las crías y valores de la población.....	48

Introducción

A pesar de décadas de intensos estudios sobre los agentes biológicos que componen las comunidades marinas, la dinámica de las enfermedades infecciosas, su impacto ecológico y evolutivo no han sido comprendidos totalmente (Harvell *et al.*, 1999).

La leptospirosis es una de las zoonosis de amplia distribución a nivel mundial que afecta animales domésticos, silvestres y al humano (Faine *et al.*, 1999; Heath y Johnson, 1994). La enfermedad es causada por espiroquetas patógenas del género, *Leptospira* spp que penetra al hospedero susceptible a través de abrasiones cutáneas y de las mucosas por contacto con fluidos corporales de animales infectados tales como sangre, orina o secreciones genitales (Heath y Johnson, 1994; Levett, 2001). A pesar de la frecuencia de estos eventos, la fuente de infección y el medio de transmisión de la leptospirosis en lobos marinos de vida libre es aun desconocida (Gulland *et al.*, 1996; Gulland, 1999).

Desde el reporte de un evento de mortalidad causada por leptospirosis ocurrido en el año 1970 que afectó a lobos marinos de vida libre *Zalophus californianus californianus* en las costas de California y Oregon, EEUUA la especie ha sido afectada en varias ocasiones (Vedros *et al.*, 1971; Dierauf *et al.*, 1985; Gulland *et al.*, 1996).

Actualmente no hay ningún reporte de mortalidad por leptospirosis en los lobos marinos del Golfo de California en México, aunque existen estudios serológicos, histopatológicos y hallazgos clínicos que sugieren la presentación de leptospirosis en las colonias reproductivas del Golfo (Acevedo-Whitehouse, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Godínez *et al.*, 1999). Sin embargo, no se han observado casos de mortalidades significativas o de abortos que sugieran la presencia de la enfermedad como los reportados en California y Oregon, EEUUA.

El lobo marino de California, *Zalophus c. Californianus*, es el más abundante de las especies de pinnípedos en México y es el único que habita permanentemente el Golfo de California (Aurioles, 1993). Esto lo convierte en una especie de importancia ecológica que puede ser utilizada como un bio-indicador de condiciones ambientales específicas, de presencia y abundancia de ciertos recursos marinos, de niveles de contaminación y de fenómenos ambientales irregulares, entre otros (Aurioles *et al.*, 2000).

El ambiente, las actividades del hombre y las enfermedades tienen un efecto constante en la vida de los animales. A través de la medición de los niveles circulantes de glucocorticoides en los animales de vida libre, se puede hacer un seguimiento de las poblaciones con relación a estos eventos. Estos representan situaciones de estrés a las cuales los animales pueden o no estar adaptados y por lo tanto esto se reflejará en la actividad de la glándula adrenal (Wingfield y Ramenofsky, 1999)

La utilización de las mediciones endocrinas en el trabajo de campo puede ser utilizada para identificar poblaciones vulnerables a las perturbaciones humanas y hasta estresores naturales como temporadas largas de clima extremo como El Niño. A mayor perturbación se espera una mayor producción de cortisol por lo tanto mayor susceptibilidad a enfermedades. La captura y la contención de los individuos normalmente da como resultado un aumento en los glucocorticoides normalmente entre los 5 y 10 minutos y alcanza sus niveles máximos a los 30 a 60 minutos, lo que permite establecer un protocolo para la medición de la respuesta de la glándula adrenal al estrés por captura (Wingfield, 1997).

Otros indicadores que se deben analizar en relación con esta respuesta son la masa corporal, condición, niveles de grasa, enfermedades, variables hematológicas entre otras que pueden darnos información adicional sobre la condición del individuo.

II Justificación

Es importante determinar el impacto de la leptospirosis en las colonias reproductoras de lobos marinos del Golfo de California y determinar si existe una regionalización de las diferentes serovariedades, medida en respuesta de anticuerpos contra las mismas, que pudiera estar relacionado con el comportamiento y la distribución de *Z. c. californianus*. Otros factores a evaluar son la respuesta de la glándula adrenal al estrés por captura y variaciones en los valores hemáticos asociados a la misma o a un estado de salud.

HIPÓTESIS

1. Existe un patrón de distribución regionalizado de los anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira* en las colonias reproductivas de lobos marinos del Golfo de California.
2. Los niveles promedio de cortisol de los lobos marinos varían en las diferentes regiones del Golfo de California.
3. Los valores hemáticos individuales se verán afectados por el manejo y pueden reflejar alteraciones asociadas a un estado de salud no evidente como la presencia de parásitos.

III Objetivo general

Determinar la presencia y patrón de regionalización de anticuerpos antileptospira, los niveles de cortisol sérico y los valores hemáticos en crías de lobo marino, *Zalophus c. Californianus*, presentes en once colonias del Golfo de Baja California.

Objetivos específicos:

1. Determinar por colonia, cuales son las serovariedades más frecuentes de leptospira para inferir aquellas a las que han sido más expuestas.
2. Determinar que colonias se parecen más entre sí con base en las serovariedades contra las que presentan anticuerpos.
3. Determinar si existe una relación entre la presencia de anticuerpos contra las diferentes serovariedades de *Leptospira* y la ubicación geográfica de las once colonias Golfo de California y asociarlo con otras variables como distancia entre colonias.
4. Comparar los valores hemáticos de las crías de lobo marino de las diferentes colonias.
5. Determinar los niveles de cortisol como respuesta al manejo y la captura y relacionarlos con características individuales.

IV Antecedentes

1. Generalidades del lobo marino de California

1.1 Taxonomía y distribución geográfica

El nombre de pinnípedo deriva de dos palabras latina *pinna* y *pedis* que juntas se traducen como pie fino. Los pinnípedos están divididos en tres familias: Phocidae, las focas; Otariidae, las focas con orejas (lobos marinos) y Odobenidae, las morsas. *Z. californianus*: pertenece al orden Carnivora, Suborden Pinnipedia, Familia Otariidae (Gage, 2003). Se reconocen tres subespecies de lobo marino de California en el mundo: la del archipiélago japonés, *Zalophus californianus japonicus*, la cual se considera en riesgo de extinción; la Norteamericana *Zalophus californianus californianus* y la de las Islas Galápagos, *Zalophus californianus wallebaeki* (Aurioles y Zavala, 1994; Odell, 1981).

La distribución de *Z. c. californianus* se extiende desde Columbia Británica, Canadá (51° N) hasta las Islas Marías, México (19° N) incluyendo algunas islas y la costa del Golfo de California (King, 1983; Zavala, 1990).

1.2 Descripción de la especie

El cuerpo del lobo marino de California es alargado, cubierto por una capa de pelaje denso. Presenta un cuello grueso y miembros anteriores y posteriores largos, en forma de aleta, que le permiten desplazamientos terrestres y acuáticos (King, 1983). Los animales adultos exhiben marcado dimorfismo sexual en tamaño, peso y características sexuales secundarias. Los machos pesan aproximadamente 300 Kg y llegan a medir hasta 240 cm. Las hembras alcanzan un peso de 150 Kg con una longitud de hasta 180 cm. 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. Los machos adultos presentan una cresta sagital prominente que se manifiesta como un crecimiento redondeado del cráneo y alcanza su tamaño definitivo de 4 cm a los 10 años de edad, los músculos del cuello presentan también un mayor desarrollo. (King, 1983; Odell, 1981).

1.3 Biología reproductiva

La estrategia de reproducción del lobo marino es la poliginia territorial. En el Golfo de California las hembras llegan a las zonas de reproducción días antes del parto, que ocurre desde mediados del mes de mayo e inicios de junio. Durante todo el mes de julio y parte de agosto las hembras se dedican exclusivamente a la crianza, hacia mediados de agosto se presentan las cópulas (Reindjers *et al.*, 1993; Zavala, 1990)

Los machos adultos establecen territorios en las zonas de reproducción y los defienden de otros machos hasta el término de la temporada reproductiva, cuando copulan con el mayor número de hembras posible. Las características del territorio que un macho ocupa son las que determinan en gran medida su éxito reproductivo. Los machos que controlen los mejores territorios tendrán mayor acceso a las hembras reproductivas. Por este motivo la competencia es intensa, especialmente hacia finales de la temporada cuando las hembras entran en celo (Odell, 1981).

La gestación dura de 11 a 11.5 meses. Esta especie presenta implantación retardada del blastocisto. La blástula permanece en el útero de 3 a 5 meses antes de implantarse; esto asegura que la cría nazca en la mejor época del año, lo que incrementa la probabilidad de supervivencia. El periodo de gestación activa es de 7.5 a 8.5 meses, la placentación es endoteliochorial (Schroeder, 1990).

Los machos no cuidan a las crías, por lo que la alimentación y la supervivencia de los cachorros depende completamente de la madre durante el año que dura la lactancia (King, 1983). Durante ese tiempo las hembras hacen viajes de alimentación al mar, con una duración promedio de dos días y regresan a tierra para amamantar a sus crías. Después del destete, las crías se convierten en animales juveniles que se alimentan de manera independiente (Gisiner y Schusterman, 1991). En esta etapa permanecen hasta la madurez sexual, las hembras la alcanzan a los cuatro años de vida y los machos a los cinco (Caldwell y Caldwell, 1972). Sin embargo, a pesar de ser sexualmente maduros, los machos de esta edad no pueden reproducirse por ser animales socialmente inmaduros, condición en la que permanecen hasta aproximadamente los nueve años, cuando son capaces de defender un territorio. La longevidad reportada en vida libre es de 22 años para las hembras y de 18 años para los machos (Odell, 1981).

1.4 Población de *Zalophus californianus californianus* en el Golfo de California

1.4.1 Distribución y abundancia

El lobo marino de California, *Zalophus c. Californianus*, es el más abundante de las especies de pinnípedos en México y es el único que habita permanentemente el Golfo de California (Aurioles, 1993). Se distribuye en el Pacífico nororiental, a lo largo de toda la costa occidental de la península de Baja California (Zavala, 1993).

Se conocen 40 colonias de lobos marinos en el Golfo de California, principalmente en la región de las Grandes Islas (Aurioles y Zavala, 1994; Le Boeuf *et al.*, 1983). Trece colonias son reproductivas y albergan al 93% de la población de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California durante los meses de mayo a julio, la época reproductiva; 18 colonias no son reproductivas y se han reportado nueve sitios utilizados como paraderos temporales (Zavala, 1990). Ver mapa en la figura 1

En base al último conteo, la población en el Golfo de California se estima en 30 mil individuos, lo que equivale al 14% de la población mundial (Le Boeuf *et al.*, 1983). Según Zavala 1990 las estimaciones van de 28,000 a 30,000 individuos.

1.4.2 Parámetros poblacionales

La tasa de mortalidad es diferencial entre las categorías de edad y sexo: para las crías macho se estima en $38.44\% \pm 14.5$, para las hembras de $11.42\% \pm 4.04$; los machos subadultos tienen una tasa de $8.6\% \pm 2.38$; los machos adultos tienen una tasa de $14.9\% \pm 8.3$ y las hembras adultas de $2.65\% \pm 2.45$ (Hernández, 1996).

Se ha reportado que la estructura de la población de las colonias del Golfo de California se compone por un 6.9 % de machos adultos, 5% de machos subadultos, 40.7% de hembras adultas, 23.9% de animales juveniles, 22.7% de crías y 0.8% de animales que no pudieron ser clasificados. La proporción sexual al nacimiento es de 1:1 (Aurioles y Zavala, 1994; Hernández, 1996).

Cuadro 1 Porcentaje de aumento o disminución para cada colonia reproductiva de lobos marinos en el Golfo de California de California desde el reporte de Auriolles-Gamboa y Zavala-González (1994). Periodos de tiempo comparados.

Colonia	Periodo	% de cambio
Consag	1981-2002	42.5
San Jorge	1985-1999	29.4
Isla Lobos	1984-2002	-56.7
Los Cantiles	1991-2002	-66.7
Isla Granito	1991-2002	-40.1
Los Machos	1990-2000	-41.0
El Partido	1991-2002	-46.6
Rasito	1991-2002	-45.3
San Esteban	1990-1997	-4.9
S.P. Mártir	1991-2000	-39.4
S.P. Nolasco	1991-1997	-44.8
F. San Ignacio	1985-2002	-21.7
Los Islotes	1993-2002	19.6
Total		- 28.1

(Szteren *et al.*, 2004)

1.4.3 Enfermedades infecciosas

Se sabe poco sobre las enfermedades y causas de mortalidad de *Zalophus c. californianus* en el Golfo de California, aunque se cree que las parasitosis influyen en la mortalidad de las crías durante su primer año de vida (Auriolles y Sinsel, 1983). Otras posibles causas de muerte en crías de lobo marino son inmunodepresión crónica por desnutrición y neumonía bacteriana (Acevedo-Whitehouse, 1999; Auriolles y Sinsel, 1983). Se ha reportado la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *L. interrogans* en crías de lobo marino de California (Godínez *et al.*, 1999) y se han observado lesiones que sugieren leptospirosis en crías encontradas muertas en las colonias reproductivas de esta región (Acevedo-Whitehouse, 1999).

2 Leptospirosis

2.1 Epidemiología y signos clínicos

La leptospirosis es el resultado de la infección con diferentes especies patógenas de la espiroqueta del género *Leptospira*. Es una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo que afecta animales domésticos, silvestres y al humano (Faine *et al.*, 1999; Heath y Johnson, 1994). En el cuadro 1 se pueden observar la importancia geográfica de algunas serovariedades y cuales son sus hospederos principales.

Las leptospiras son espiroquetas que normalmente miden 0.1 μm de diámetro por 6 a 20 μm . de longitud (Faine *et al.*, 1999). Son bacterias aerobias obligadas con una temperatura óptima de crecimiento in vitro de 28 a 30° C (Levett, 2001).

La fuente de organismos infecciosos de leptospira son, además de los animales enfermos, los reservorios, y portadores asintomáticos en los cuales la infección persiste sin causar signos severos de enfermedad. Estos reservorios y portadores dispersan las leptospiras en el ambiente, que infecta a otros individuos de la misma especie promoviendo así la dispersión. A su vez pueden infectar a otras especies y causar eventualmente la enfermedad. La infección con leptospira aumenta comúnmente durante los períodos de lluvia, en ambientes con pobre drenaje o inundaciones y donde hay una gran cantidad de animales portadores y animales susceptibles. Prevalencias altas de animales seropositivos han sido relacionadas con temperaturas ambientales promedio altas (Faine *et al.*, 1999).

Hay dos formas de presentación de la enfermedad; la que se da en un hospedero adaptado y la que se da en uno no adaptado a la leptospirosis. Cuando un animal se infecta con una serovariedad hospedero adaptado, este se convierte en un hospedero reservorio o de mantenimiento. La exposición de animales susceptibles a serovariedades hospedero no adaptado causa una enfermedad accidental o incidental. Porque la misma serovariedad puede ser mantenida en un hospedero y eliminada por otro, los factores del hospedero y no necesariamente los de la serovariedad, determinan si la infección se mantiene. El diagnóstico serológico de leptospirosis hospedero adaptado en un animal o en una proporción pequeña de individuos prácticamente refleja la infección endémica de toda la población (Heath y Johnson, 1994).

Prácticamente todos los mamíferos pueden ser infectados por cualquier *Leptospira* patógena. Diferentes serovariedades de leptospira, están asociadas a regiones en particular y a uno o más huéspedes de mantenimiento, que sirven de reservorio de la enfermedad. Estos huéspedes de mantenimiento son frecuentemente animales silvestres algunas veces animales domésticos como el ganado. Para algunas serovariedades, la relación con el hospedero de mantenimiento es constante en amplias regiones geográficas, otras pueden variar dentro y entre ecosistemas (Bolin, 2003).

Una relación hospedero de mantenimiento-serovariedad está caracterizada por una transmisión eficiente entre animales, una prevalencia relativamente alta (30% a 50%) en la población, la enfermedad en forma crónica, más que aguda y la infección persistente en los riñones. El diagnóstico de la infección en los huéspedes de mantenimiento es a veces difícil por la baja respuesta de anticuerpos a la serovariedad infectante. En contraste, un hospedero incidental se caracteriza por una prevalencia baja de la infección, pero una patogenicidad alta o muy alta, enfermedad aguda y un periodo corto de infección renal. El diagnóstico en estos casos es menos complicado porque la respuesta antigénica es muy marcada (Bolin, 2003).

2.2 Transmisión

La transmisión de la leptospirosis puede ser por contacto directo o indirecto con orina infectada, fluidos placentarios o leche. En bovinos incluso se ha sugerido la transmisión a través del semen (Ellis, 1986). La infección puede ser transmitida de forma transplacentaria. Bajo condiciones favorables, las leptospiras pueden sobrevivir fuera del hospedero por varios meses en condiciones de humedad, protegidas de la luz del sol y a temperaturas templadas. La leptospirosis se presenta más comúnmente en primavera, otoño e inicios del invierno en climas templados y en la estación de lluvia en los trópicos. Las epidemias de leptospirosis están asociadas con un aumento inusual de las lluvias e inundaciones, probablemente porque se aumenta la probabilidad de exposición con aguas contaminadas (Trevejo *et al.*, 1998)

2.3 Patogenia

En prácticamente todos los mamíferos incluyendo al hombre, las leptospiras invaden el cuerpo después de haber penetrado membranas mucosas o piel lesionada. Entran dentro del torrente sanguíneo y circulan en sangre durante 7 días, durante este periodo, las leptospiras pueden replicarse en tejidos como: el hígado, los riñones, los pulmones, el tracto genital y el sistema nervioso central. Los signos clínicos se observan durante el periodo de bacteremia e invasión de tejidos. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser detectados tan pronto como la leptospiremia sucede y la presencia de estos anticuerpos coincide con la eliminación de las leptospiras de la sangre y la mayoría de los órganos. Aunque las leptospiras son eliminadas, de diversos tejidos, permanecen en los túbulos renales. A pesar de que los signos clínicos empiecen a desaparecer, los animales pueden morir por el daño producido a un determinado órgano u órganos (Faine *et al.*, 1999). Las leptospiras permanecen en los túbulos renales de huéspedes incidentales y son eliminadas de varios días a varias semanas. En contraste, en el hospedero de mantenimiento, la infección renal persiste, y la eliminación en orina es a largo plazo. Si los animales están gestantes en el momento de la infección, puede darse la infección fetal y como consecuencia un aborto o fetos momificados o neonatos débiles, pero también el nacimiento de crías sanas pero infectadas (Bolin, 2003).

2.4 Respuesta inmune del hospedero

La inmunidad contra leptospira se da inicialmente con anticuerpos IgM que son dirigidos de forma específica la serovariedad contra el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la espiroqueta. Esto retrasa el crecimiento de leptospiras pero no las elimina. Después de unos días, los anticuerpos IgG inactivan las leptospiras circulantes. Los mamíferos normalmente nacen con una pobre respuesta específica a patógenos y dependen de una combinación de defensas no específicas y protección temporal adquirida de forma pasiva de los anticuerpos maternos, contra infecciones tempranas (Banks, 1982).

No existe información acerca de la habilidad de los pinnípedos jóvenes para montar una respuesta inmunológica a antígenos en vivo, o de la relativa importancia de los niveles de anticuerpos derivados de las inmunoglobulinas maternas en el suero de los cachorros. El

cachorro debe lidiar de forma independiente con el ambiente en un período muy corto después del nacimiento. Un sistema inmune activo unido a la protección materna temporal derivada de anticuerpos tiene que ser un componente vital dentro de su naturaleza precocial. Se sugiere que esto refleja una adaptación evolutiva al corto período de lactancia y al corto tiempo de cuidado maternal (Ross *et al.*, 1994). Aunque en el caso de los lobos marinos de California se han reportado periodos de lactancia de 15 a 18 meses (Geraci, 1986).

A pesar de que es imposible distinguir entre las IgG producidas de forma endógena por el cachorro y las transmitidas por la madre, se cree que los niveles altos durante los 14 días postparto reflejan un bajo nivel de transmisión transplacentaria y un alto nivel de transmisión a través del calostro y la leche.(Carter *et al.*, 1990; King *et al.*, 1998). Si las inmunoglobulinas pasan de forma placentaria y/o calostrada para conferir una inmunidad pasiva en los neonatos es algo que no está definido aún en pinnípedos (King *et al.*, 1998). Los niveles de IgM altos en el recién nacido pueden estar relacionados con una infección intra-uterina. Se sugiere que las IgM encontradas en el suero de los cachorros son producidas por una síntesis activa y no por una transmisión pasiva (Marquez *et al.*, 2004).

La inmadurez inmunológica de los cachorros recién nacidos de foca común (*Phoca vitulina*) y la posible supresión de la función inmune de las madres durante la lactancia puede aumentar la susceptibilidad a enfermedades. De tal manera, hay que considerar la época de cría como un estado sensible en la vida del individuo, lo cual puede ser aplicado a otros pinnípedos (Ross *et al.*, 1993).

2.5 Diagnóstico

La identificación de la bacteria y el diagnóstico de la enfermedad se establece con base en características morfológicas, propiedades antigénicas y análisis moleculares (Levett, 2001).

Los procedimientos de diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis caen en dos grupos: el primero consiste en pruebas para demostrar la presencia de leptospiras en material proveniente de un animal. El segundo contiene pruebas que detectan la presencia

de anticuerpos. La selección de las pruebas a realizar depende del propósito del diagnóstico y de los recursos disponibles (Office International des Epizooties, 1992).

El diagnóstico serológico de leptospirosis es la aglutinación microscópica (AM), prueba que detecta anticuerpos, principalmente del tipo IgM, contra la serovariedad infectante. Los títulos de anticuerpos $\geq 1:10$ indican una exposición previa a *Leptospira* spp. Sin embargo, en la mayoría de las especies animales el diagnóstico serológico de leptospirosis se establece con títulos de anticuerpos $\geq 1:100$ para evitar confundir las reacciones de aglutinación con respuestas vacunales (Heath y Johnson, 1994).

Las co-aglutininas se presentan frecuentemente en individuos con leptospirosis. Los anticuerpos que causan reacciones cruzadas son los primeros en aparecer pero desaparecen rápidamente. Los anticuerpos homólogos, aunque aparecen un poco después, duran más tiempo, y esto permite la identificación presuntiva del serogrupo responsable de la infección y también rastros de infecciones previas (Postic *et al.*, 2000).

Los estudios serológicos han sido utilizados ampliamente para determinar la prevalencia de enfermedades en animales silvestres (Bender y Hall, 1996).

2.6 Leptospirosis en *Zalophus c. californianus*

La leptospirosis se observó por primera vez en *Zalophus c. californianus* en otoño de 1970, en las costas de California y Oregon EEUU, durante un evento de mortalidad elevada. En este evento se aisló *L. interrogans* serovariedad Pomona de la orina y tejido renal de los lobos marinos varados (McIlhattan *et al.*, 1971; Vedros *et al.*, 1971). Desde 1984 se han observado brotes epizooticos regulares de leptospirosis en esa región cada 3 a 4 años durante los meses de otoño, con una tasa alta de mortalidad donde los animales más afectados son los machos juveniles (Dierauf *et al.*, 1985; Gulland *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1974). En las colonias de lobos marinos de las Chanel Islands, cerca de las costas de California, se aisló *L. interrogans* Pomona en fetos abortados, placentas y crías prematuras (Gilmartin *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1974).

En *Z. c. californianus* la enfermedad se manifiesta como un cuadro renal (Dierauf *et al.*, 1985). Los signos clínicos más frecuentes incluyen depresión, anorexia, polidipsia, deshidratación, renuencia a utilizar los miembros pélvicos, vómito, dolor abdominal y

tremores musculares (Gulland *et al.*, 1996). Los cambios hematológicos reportados son aumento del nitrógeno uréico, fósforo, globulina, sodio, creatinina, leucocitosis y, en ocasiones, neutrofilia (Dierauf *et al.*, 1985; Bossart y Dierauf 1990).

Aunque no existen lesiones propias de leptospirosis, frecuentemente se observan cambios macroscópicos como nefromegalia, palidez de la corteza renal, pérdida de diferenciación entre la corteza y la médula renal, hemorragias subcapsulares y de la unión córticomedular. Se ha reportado también hepatomegalia con parénquima friable, bilis negra y espesa en la vesícula biliar y ulceraciones gástricas y orales (Gulland, 1999; Smith *et al.*, 1974).

Existen otros reportes de leptospirosis en pinnípedos. En la península de Alaska se documentó una alta mortalidad en crías de lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus*, asociada al complejo neonatal hemorrágico múltiple, provocada por *L. interrogans* Pomona (Smith *et al.*, 1977). En 1996 se observaron signos clínicos y hematológicos de insuficiencia renal en tres individuos de foca común, *Phoca vitulina richardsii*, que se encontraban en rehabilitación en Sausalito, California que presentaban anticuerpos contra *L. interrogans* serovariedad Grippothyphosa (Stamper *et al.*, 1998).

2.7 *Leptospira* spp en el Golfo de California

Actualmente no hay ningún reporte de mortalidad por leptospirosis en los lobos marinos del Golfo de California en México, aunque existen estudios serológicos e histopatológicos y hallazgos clínicos que sugieren la presentación de leptospirosis en las colonias reproductivas del Golfo (Acevedo-Whitehouse, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Godínez *et al.*, 1999). El estudio realizado en el año 2000 (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003) en el Golfo de California sirve como antecedente de la presencia de algunas serovariedades y de un posible patrón de distribución de las mismas, en las colonias reproductoras ver cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Serovariedades de *Leptospira* empleadas en la prueba de aglutinación microscópica (AM) para determinación de anticuerpos en las crías de *Z. c. Californiamus*.
En el año 2000

Serogrupo	Serovariedad
Autumnalis	Autumnalis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Castellonis	Castellonis
Cynopteri	Cynopteri
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
	Sejroe
	Wolffi
Tarassovi	Tarassovi

(Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003)

Cuadro 3. Serovariedades de *Leptospira* en las que se encontraron reacciones positivas a partir de títulos 1:25 en el estudio realizado en el año 2000 a la prueba de AM por colonia reproductiva de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California.

Serovariedad	Los Islotes	San Pedro Mártir	San Esteban	Roca Blanca	Los Machos	Granito	Los cantiles
Autumnalis	+	-	-	-	-	+	+
Bataviae	+	-	-	-	+	+	+
Canicola	+	-	-	-	-	-	+
Castellonis	-	-	-	+	-	+	+
Cynopteri	-	+	+	+	+	+	+
Grippotyphosa	-	-	-	+	+	+	+
Hardjo	+	-	+	-	+	+	+
Icterohaemorrhagiae	-	-	-	-	-	+	+
Pomona	+	-	-	-	+	+	+
Pyrogenes	-	-	-	-	-	+	+
Sejroe	-	-	-	-	-	+	-
Tarassovi	-	-	-	-	-	+	+
Wolffi	-	-	-	-	-	+	+

(Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003)

3. RESPUESTA AL ESTRÉS

El término de estrés fue introducido en 1949 por Hans Seyle para referirse a una carga o presión psico-somática con repercusiones patológicas. Dicho de otro modo, el estrés es una respuesta inespecífica a todos los estímulos que trastornan la homeostasis. Esta respuesta tiene tres fases diferenciadas: alarma, resistencia y extenuación o agotamiento (Seyle, 1973).

Un determinado estímulo ambiental es estresante en la medida que es percibido como una amenaza para la homeostasis del individuo, por lo que la respuesta al estrés depende tanto de las características del estímulo como de las características del individuo en cuestión. Los estímulos pueden clasificarse según sus características cualitativas:

térmico, químico, visual, etc; o por su intensidad y temporalidad: frecuencia, duración y regularidad o secuencia (Broom, 1993).

La respuesta hormonal al estrés agudo incluye en los primeros segundos: 1) aumento en la secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) por parte del sistema nervioso simpático; 2) liberación de la hormona liberadora de corticosteroides (CRH) por parte del hipotálamo y aproximadamente 10 segundos después, aumento de la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a nivel de la hipófisis; 3) disminución de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo y enseguida disminución de la secreción de gonadotropinas y 4) secreción de prolactina (PRL) por la hipófisis y secreción de glucagon por el páncreas. Una segunda respuesta más lenta involucra principalmente la liberación de hormonas esteroides. Después de unos minutos, la secreción de glucocorticoides (GC) es estimulada y la secreción de esteroides gonadales disminuye. Finalmente el resultado de esta respuesta incluye: 1) utilización de energía para el músculo en ejercicio (se utiliza la energía de reserva, se inhibe el proceso siguiente de reserva de energía y la gluconeogénesis); 2) a través del aumento del tono cardiovascular se aumentan los nutrientes en músculo; 3) se estimula la función inmune inicialmente; 4) se inhibe la fisiología y el comportamiento reproductivos; 5) disminuye el apetito; 6) se afinan los procesos cognitivos y la perfusión cerebral y se aumenta el uso de glucosa a este nivel (Sapolsky *et al.*, 2000).

La utilización de las mediciones endocrinas en el trabajo de campo puede ser utilizada para identificar poblaciones vulnerables a las perturbaciones humanas y hasta estresores naturales como temporadas largas de clima extremo como El Niño. A mayor perturbación se espera una mayor producción de cortisol por lo tanto mayor susceptibilidad a enfermedades. La captura y la contención de los individuos normalmente da como resultado un aumento en los glucocorticoides normalmente entre los 5 y 10 minutos y alcanza sus niveles máximos a los 30 a 60 minutos, lo que permite establecer un protocolo para la medición de la respuesta de la glándula adrenal al estrés por captura (Wingfield, 1997).

La función adrenal en mamíferos marinos puede ser evaluada a través de medir los niveles circulantes de cortisol (Thomson y Geraci, 1986).

3.1 Diferencias individuales en la respuesta a estrés

La forma de responder a un estímulo estresante depende de factores extrínsecos e intrínsecos o genéticos, que determinan la respuesta individual y la elección de estrategias para enfrentar este estímulo (Wendelaar Bonga y Balm, 1999).

Otros factores que contribuyen a las variaciones entre individuos son las experiencias individuales, el sexo o la forma de vida. Los efectos morfogenéticos de experiencias de estrés perinatal son de gran importancia en el desarrollo de la respuesta al estrés. Se ha establecido que la intensidad de la respuesta puede ser modificada de manera importante a través de la experiencia temprana a estresores físicos y emocionales. Las consecuencias de estímulos estresantes fuertes durante el periodo neonatal pueden persistir a lo largo de la vida y alterar la respuesta al estrés, a través de modificaciones de los patrones de secreción neuroendócrino y cambios en la actividad celular, reflejados como cambios en el RNAm y cambios en la densidad de receptores para glucocorticoides en el cerebro (Meaney *et al.*, 1996).

3.2 Cortisol y sistema inmune

Los animales responden a las condiciones adversas a través de cambios conductuales y fisiológicos que pueden producir, a su vez, cambios en el sistema inmune. Los corticosteroides, las catecolaminas y varias hormonas hipofisarias pueden afectar la inmunocompetencia. Se ha demostrado la existencia de receptores para estas hormonas en la superficie de algunos leucocitos (Griffin, 1989).

Los resultados obtenidos por Cockram, *et al.*, (1994) en ovejas, sugieren que algunos manejos que producen estrés pueden causar cambios en las poblaciones de leucocitos. Estos cambios pueden provocar que los individuos sean más susceptibles a algunas infecciones por un periodo limitado. En la misma especie, Minton y Blecha (1990) sugieren que los efectos transitorios provocados por el estrés agudo, no necesariamente afectan las funciones inmunológicas, aunque tengan un efecto sobre las secreciones adrenales, no afectan de manera significativa el conteo total y diferencial de leucocitos.

De alguna manera, los animales pueden enfrentarse a factores estresantes y hasta adaptarse a ellos en horas o días, pero una adaptación insuficiente puede llevar a un estado

prepatológico, caracterizado por una reducción de la inmunocompetencia. (Degabriele y Fell, 2001).

3.3 Cortisol y anestesia

Existen reportes de que el cortisol plasmático no aumenta durante la anestesia, por ejemplo con enflorano, pero sí aumenta al momento de iniciar el manejo quirúrgico. En un estudio realizado en humanos el aumento del cortisol se empiezan a notar a partir de los 30 minutos de anestesia (Oyama *et al.*, 1979). En el estudio de Lacoumenta *et al* (1986) las concentraciones de cortisol aumentaron de manera significativa después de los 30 minutos de cirugía utilizando halotano. Otros estudios realizados en caballos reportan un aumento del cortisol después de 20 minutos con el uso de halotano (Taylor, 1989).

La contribución del aumento de la concentración de cortisol es difícil de evaluar. Esta hormona está considerada como una “hormona permisiva” que permite que otras como las catabólicas hagan efecto. Esto dependerá de las condiciones del individuo al momento de la anestesia (Traynor y May, 1981).

4. HEMATOLOGIA

La hematología es el estudio de la sangre y se ocupa de la interacción de los sistemas vascular y hematopoyético (Schalm *et al.*, 1981). La patología clínica en mamíferos marinos está todavía en una fase inicial, muy pocas especies han sido estudiadas a fondo (Bossart y Dierauf, 1990) .

Los glóbulos rojos (GR) en los mamíferos que bucean son más grandes. El conteo total de GR en mamíferos marinos es menor que en cualquier otra especie de mamífero. Comparando los neonatos con los adultos, al nacer el conteo de GR y hemoglobina (Hb) son más altos y disminuyen sus valores conforme el animal gana peso y aprende a bucear. Un volumen corpuscular medio (MCV) y hemoglobina corpuscular media (MCH) más altos, son adaptaciones para una necesidad mayor de oxígeno (Bossart y Dierauf, 1990).

El hematocrito corresponde a la relación entre el volumen ocupado por los eritrocitos y el de la sangre total y depende principalmente de la concentración de células rojas. Se determina mediante la centrifugación de la sangre total y se expresa en porcentaje.

El volumen del paquete celular eritroide también se identifica como PCV (Schalm *et al.*, 1981).

Los leucocitos, también llamados glóbulos blancos constituyen un conjunto de células con funciones diversas relacionadas con la defensa del organismo, su estudio ayuda establecer un diagnóstico y seguir el curso de la enfermedad. Se clasifican en dos grupos: polimorfonucleares o granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos y mononucleares que incluyen: linfocitos y monocitos (Medway y Geraci, 1986).

El conteo diferencial de glóbulos blancos es informativo, sirve para distinguir cada uno de los leucocitos. El conteo celular está influenciado por la especie, edad y sexo. Los neutrófilos aumentan (neutrofilia) con la inflamación, el estrés y alteraciones fisiológicas de excitación o ejercicio. La presencia de bandas en una neutrofilia (desviación a la izquierda) absoluta es un signo de regeneración y tiene un buen pronóstico. Si hay una infección bacteriana muy fuerte podemos encontrar neutropenia (baja en neutrófilos) y si está acompañada de una desviación a la izquierda es signo de una respuesta degenerativa, entonces el pronóstico es malo. La neutropenia sin desviación a la izquierda sugiere una infección viral, una bacteriana controlada o una toxemia (Bossart y Dierauf, 1990).

Si el conteo de leucocitos es normal o un poco elevado pero con un aumento en los monocitos (monocitosis) se debe pensar en una inflamación crónica con daños tisulares. Los monocitos son excelentes para monitorear el progreso de una enfermedad crónica. Los mamíferos marinos presentan frecuentemente parasitismos así que es importante buscar parásitos en casos de eosinofilia (aumento de eosinófilos) (Bossart y Dierauf, 1990).

4.1 Leucograma por estrés

Los valores hematológicos son indicadores útiles para algunas enfermedades en varias especies. Se sabe que el ejercicio, el esfuerzo y el estrés tienen efecto sobre los valores hematológicos entonces el efecto del manejo de un animal antes de la toma de muestra debe ser considerado (Ettinger, 1983).

Los corticosteroides adrenales son conocidos por tener un efecto inmudepresivo (Munck *et al.*, 1984). En ovinos por ejemplo la inyección de cortisol produce cambios característicos en las poblaciones de leucocitos y afecta las funciones linfocitarias (Collins

y Suárez- Güemes, 1985). Los cambios típicos que definen el leucograma por estrés incluyen 1) leucocitosis con neutrofilia y eosinopenia y en algunos casos linfopenia y monocitosis y 2) proliferación reducida de linfocitos (Munck *et al.*, 1984).

5. Regiones del Golfo de California

Existen grandes diferencias oceanográficas entre las regiones del Golfo de California que pueden influir sobre variables ecológicas y biológicas, por ejemplo hábitos alimenticios y presencia de metales pesados entre otros (Aurioles *et al.*, 2004). La regionalización o subdivisión de las colonias de lobos marinos del Golfo de California coincide más con los gradientes de productividad a lo largo del Golfo. El Norte del Golfo ha sido reconocido como una región de alta productividad y zona de crianza de varias especies de peces. La región que rodea las grandes islas en el centro del Golfo, ha sido dividida en zona biogeográficas basadas en la distribución estacional de nutrientes en la superficie y concentración de pigmentos de clorofila. Las aguas que rodean las islas de San Esteban y San Pedro Mártir, justo al Sur de las grandes islas es la zona de desove de sardina. Los pigmentos de superficie y las concentraciones de nutrientes van disminuyendo conforme se avanza hacia el Sur, siendo la boca del Golfo el área más oligotrófica y la más oceánica (Santamaría-del Angel *et al.*, 1994).

Estas zonas biogeográficas tienen influencia en las estructuras de los diferentes ecosistemas. Su influencia puede ser vista en predadores de niveles altos como el lobo marino de California por ejemplo a nivel de diferencias en hábitos alimenticios (García y Aurioles, 2004).

Las diferencias genéticas de las colonias de lobo marino en México pueden ser estructuradas en cuatro grupos bien definidos: 1) Grupo del Pacífico, que incluye las colonias de la Isla Coronados, las Islas Benitos, Isla Cedros, Isla Asunción e Isla Santa Margarita; 2. Sur del Golfo, Los Islotes; 3) Zona Central, que incluye: colonias en San Esteban, Cantiles, Granito e Isla Lobos y 4. El norte del Golfo que incluye a San Jorge (Schramm *et al.*, 2001).

V Material y métodos

1. Área de estudio

El Golfo de California se encuentra al noroeste de la República Mexicana, entre los 20 y 30° N y los 112 y 118 ° W (Figura 1) Está delimitado por los estados de Baja California y Baja California Sur hacia el Oeste; Sonora, Sinaloa, Nayarit y parte de Jalisco hacia el Este (Bourillón *et al.*, , 1998). Su longitud aproximada es de 1,500 Km y en su parte más ancha es de 150 Km. Se divide en cuatro áreas oceanográficas; Alto Golfo, Región Región de las Grandes Islas, Central y Boca del Golfo (Maluf, 1983).(Figura 1)

El clima de la región del Golfo de California es predominantemente árido, con baja humedad e intensa radiación solar, alcanzando en ocasiones una temperatura ambiental superior a los 50° C en verano y menor a los 15° C en invierno. La temperatura promedio del agua se mantiene entre los 10-16° C en invierno y de 27 a 38° C en verano (Zavala, 1990). Representa un área subtropical con altas tasa de productividad primaria debida a surgencias y mezcla de mareas (Alvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991) y en él se encuentran muchas especies endémicas de flora y fauna marina y terrestre (Bourillón *et al.*, 1988).

Existen 900 islas en el Golfo de California, distribuidas de manera irregular (Bourillón *et al.*, 1988), con formas irregulares y de diferentes dimensiones. Sus playas son rocosas y áridas con algunas zonas de canto rodado y grava (Zavala, 1990).

1.1 Colonias visitadas

Se define colonia o lobera, como el grupo de lobos que habitan en una isla, una isla puede tener más de una colonia, como el caso de Ángel de la Guarda en donde se encuentran Granito y Cantiles. Durante la temporada reproductiva del año 2002 se visitaron once colonias reproductivas de *Z. c. californianus* en el Golfo de California. (Cuadro 4 y Figura 1)

Cuadro 4. Nombre, ubicación y población de las colonias de lobo marino visitadas

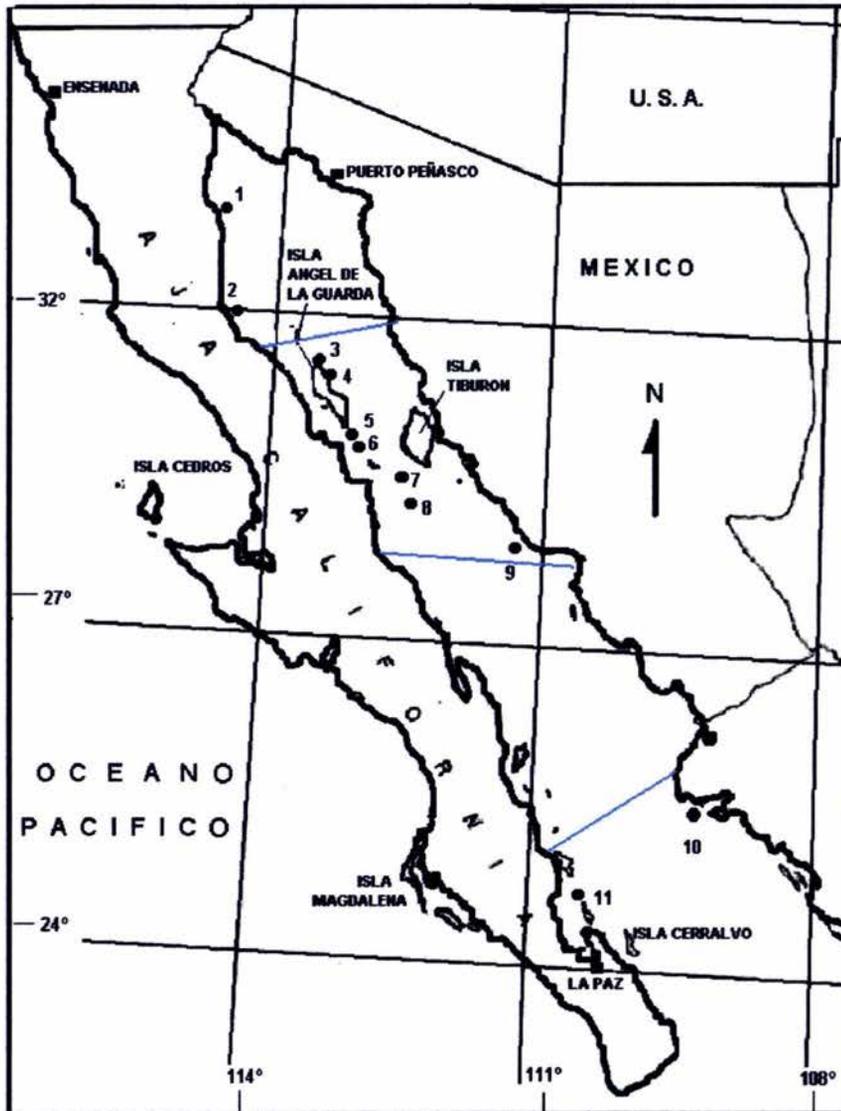
COLONIA	COORDENADAS	POBLACIÓN (número de lobos)
Rocas Consag (Consag)	31° 07' lat. N. 114° 27' long. W.	555 (2002)
Lobos	30° 03' lat. N. 114° 30' long. W.	1350 (2002)
Granito	29° 33' lat. N. 113° 32' long. W.	553 (2002)
Los Cantiles (Cantiles)	29° 32' lat. N. 113° 29' long. W.	773 (2002)
El Partido (Partido)	28° 54' lat. N. 113° 02' long. W.	487 (2002)
El Rasito (Rasito)	28° 49' lat. N. 113° 01' long. W.	235 (2002)
San Esteban (SE)	28° 43' lat. N. 112° 35' long. W.	4982 (1997)
San Pedro Mártir (SPM)	28° 23' lat. N. 112° 20' long. W.	1116 (2000)
San Pedro Nolasco (SPN)	27° 58' lat. N. 111° 22' long. W.	659 (1997)
Farallón de San Ignacio (FSI)	25° 26' lat N 109° 24' long W.	418 (2002)
Los Islotes (Islotes)	23°35' lat. N. 110°24' long.W.	600 (2002)

(Auriolos-Gamboa no publicado)

El crucero se realizó a bordo de la embarcación “AMIGO” de la Cd. de la Paz, Baja California Sur del 15 al 27 de julio del 2002, como parte del proyecto del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional: Evaluación de la interacción de las pesquerías y el lobo marino *Zalophus c. californianus* y la estructura del complejo *Leptospira interrogans* en las Colonias reproductoras del Golfo de California. CONACYT-SEMERNAT (1230). Todos los muestreos se realizaron bajo el permiso de investigación Oficio No. SGPA/DGVS. – 0575

Figura 1.

Ubicación geográfica de las colonias reproductoras muestreadas de lobo marino en el Golfo de California y división geográfica en Alto Golfo, Región de las Grandes Islas, Central y Boca del Golfo



1. Rocas Consag; 2. Isla Lobos; 3. Isla Granito; 4. Los Cantiles; 5. El Partido; 6. El Rasito; 7. San Esteban; 8. San Pedro Mártir; 9. San Pedro Nolasco; 10. Farallón de San Ignacio; 11. Los Islotes.

2. Toma de muestras

2.1 Método de captura y manejo

La captura se realizó de acuerdo con lo descrito por Lazo de la Vega (1998) en donde una persona localiza el lugar con mayor concentración de crías y es la que generalmente dirige toda la captura. Es necesario aislar al o los animales de otros individuos y alejarlos del agua para asegurar un mejor manejo. La forma de capturar una cría es tomarla de las aletas caudales y levantarla del suelo procurando mantenerla lo más alejado del cuerpo del manejador para evitar ser mordido.

En cada colonia se capturaron de 8 a 10 crías de *Z. c. californianus* de 1 a 8 semanas de edad. Los animales se pesaron en una bolsa de peso conocido que colgaba de una báscula (más menos 0.5kg), se anestesiaron con Isoflurano (Laboratorios Abbott, EEUA), se sexaron, y se midieron para determinar longitud total y perímetro axilar en cm y se contaron las lesiones en la piel. Los tiempos de anestesia fueron entre 15 y 30 minutos como máximo.

Debido a que es complicado calcular la edad exacta se registró el tipo de cicatriz umbilical, para después usarla para la clasificación por edad del más joven al más grande: cicatriz fresca (CF), cicatriz semiseca (CSS) y cicatriz seca (CS).

La condición corporal de las crías se midió usando dos criterios: el peso relativo y el contenido relativo de grasa subcutánea. Se utilizó el factor de condición de Fulton (peso / largo estándar³) como el primer criterio y los residuos de la regresión lineal del grosor de la grasa sobre el largo estándar (Luque y Auriolles, 2001)

Se registró también el tipo de suelo de cada colonia para tener una descripción del ambiente de cada una y los tipos observados fueron: plataforma rocosa, pozas de marea, rocas en derrumbe, canto rodado, suelo arenoso, suelo de grava y combinaciones de las anteriores.

De cada cría se obtuvieron aproximadamente 10 ml de sangre por venopunción en la región yugular utilizando una aguja calibre 21 (S-Monovette® Sarstedt). Se colectaron de 2 a 2.5 ml en tubos con EDTA como anticoagulante (Hematología EDTA-K S-Monovette® Sarstedt) para hemograma y de 7 a 7.5 ml de sangre sin anticoagulante (Suero-Gel S-Monovette® Sarstedt) para serología. El suero se obtuvo de estos tubos por centrifugación

a 3,500 rpm por 5 min. Todas las muestras de suero se congelaron a bordo de la embarcación y se almacenaron a -20°C

En el cuadro 5 se muestra el total de hembras y machos utilizados para el estudio, así como el número de muestras que se utilizaron para cada determinación.

Cuadro 5. Número de muestras obtenidas en la salida de campo

Lobera	Machos	Hembras	AM	RIA	Hematología
Islotes	8	2	10	5	10
FSI	9	2	10	6	10
SPN	2	8	10	5	10
SPM	4	4	8	5	8
SE	6	4	10	5	10
Rasito	3	7	10	5	10
Partido	8	2	10	5	10
Granito	5	5	10	5	10
Cantiles	8	1	9	5	9
Lobos	7	3	10	5	10
Consag	5	4	9	5	9
Total	64	42	106	56	106

3. Protocolo de estrés por captura

El protocolo para evaluar la respuesta a la captura y el manejo consistió en tomar una segunda muestra 5 minutos después de la primera, que se había tomado para el estudio de leptospira.

El protocolo utilizado está definido por el efecto que produce en cada individuo la anticipación, la captura y el manejo en respuesta de la glándula adrenal (Wingfield y Ramenofsky, 1999).

La llegada a cada colonia representaba ya una reacción en los individuos, algunos vocalizaban, otros se tiraban al agua, por lo tanto esto ya representa un estímulo nuevo-extraño. Los tiempos de la primera muestra varían ya que en algunas ocasiones y dependiendo de las características de cada colonia, se capturaban varias crías al mismo

tiempo y se mantuvieron en redes a la espera de ser muestreadas y en otras ocasiones eran capturadas una por una y sometidas al muestreo.

Los animales utilizados para esta parte del estudio fueron crías de 1 a 8 semanas de edad y pesaban entre 4 y 15.5 kilos, 34 fueron machos y 22 hembras. La segunda muestra fue de 2 a 2.5 ml de sangre, cinco minutos después de la primera, que se colocó en tubos sin anticoagulante (Suero-Gel S-Monovette® Sarstedt) y se separó de la misma forma que las anteriores. Se registró además la hora del día en que se tomó la muestra así como la hora de captura y de inicio de la anestesia.

Se registró también el estado de reactividad de los individuos al ser capturados que se clasificó de la siguiente manera 1) Calmado (animal que no opone resistencia a ser capturado y no vocaliza o intenta morder a quien lo captura); 2) Activo (vocaliza y trata de escaparse) y 3) Excitado (vocaliza e intenta morder a quien lo captura). Así como el estado general de salud a simple vista en 1) aparentemente sano; 2) lesiones en piel, parásitos en piel, pérdida de peso leve y 3) lesiones abundantes, o muy grandes pérdida de peso muy aparente y mucosas pálidas.

4 Pruebas de laboratorio

4.1 Detección de anticuerpos contra *Leptospira*

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en crías de *Z. c. californianus* en el Golfo de California durante la temporada reproductiva del año 2002 se colectaron muestras de suero en once colonias reproductivas y se realizaron pruebas de AM para determinar la seroprevalencia de anticuerpos.

La prueba de AM (Office International des Epizooties, 1992) fue realizada en el Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Se utilizaron 27 cepas vivas en medio de cox. Se realizaron diluciones dobles de suero con PBS iniciando con una dilución 1:10. A cada dilución del suero se agregaron 0.05 ml de antígeno, obteniendo una dilución final de 1:20, en micro placas e incubándolos a temperatura ambiente por una hora en condiciones húmedas. La lectura se realizó con microscopio de campo oscuro (120X) (Meléndez, 1997).

El cepario fue obtenido de la WHO/FAO/OIE - Collaborating Centre for Reference y Research on Leptospirosis, Australia y Western Pacific Region, Queensland, Australia. Para mantener y preparar los antígenos, las serovariedades fueron cultivadas en un medio de Cox modificado (Yanagawa y Adachi, 1977). Al medio se le agregó el 10% de suero de conejo estéril y descomplementado mediante calor. Los cultivos fueron incubados a 28 ° C durante 7 días. El crecimiento fue determinado por observación en un microscopio de campo oscuro (120x). El cepario utilizado con los datos completos de especie, serogrupo, serovariedad y cepa se encuentra en el cuadro 6

Cuadro 6. Lista serovariedades de *Leptospira* spp utilizadas en la prueba de AM

ESPECIE*	SEROGRUPO	SEROVARIEDAD	CEPA
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jes-Bratislava
<i>L. noguchii</i>	Australis	München	München C90
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Portland-vere	Sinaloa **
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskova V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagie	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagie	Lai	Lai
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagie	Icterohaemorrhagiae	Palo Alto **
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Mini	Sari
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ214
<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Mozdok	5621
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	LT1085
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	H-89 **
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3707
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc1 ***
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342k
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

*Faine, S 1999 ** Aislamientos nacionales ***No patógena

4.2 Interpretación diagnóstica de la AM

Al observar la aglutinación en el microscopio esta recibía un puntaje según el grado de aglutinación y el porcentaje de leptospiras libres:

0	Negativo sin aglutinación 100% de leptospiras libres
1+	25% de aglutinación 75% de leptospiras libres
2+	50% de aglutinación 50% de leptospiras libres
3+	75% de aglutinación 25% de leptospiras libres
4+	100% de aglutinación 0% de leptospiras libres

El título se determinó en la dilución más alta de suero en donde se presentó el 50% de aglutinación. Se tomaron como positivas las reacciones que presentaron 50% o más de aglutinación (2+) pero también se registraron los animales que presentaban aglutinación entre 25% y 50% y se los consideró como sospechosos.

4.3 Determinación de cortisol sérico

Se tomó una segunda muestra de sangre en 5 de los 10 individuos muestreados por colonia con el fin de evaluar la respuesta de la glándula adrenal a la captura y el manejo, esta muestra se tomó 5 minutos después que la primera.

Las concentraciones de cortisol fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA) y se realizaron en el laboratorio dirigido por la Dra. Marta Romano, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. Todas las muestras de suero fueron evaluadas directamente utilizando kits de radioinmunoanálisis de ¹²⁵I (Cort.CT2, CIS Bio International, France). Todas las muestras se midieron por duplicado. La especificidad del sistema para detectar cortisol según el proveedor es de 100%, 84.5% para 5 α - Dihidrocortisol y 45.3% para Prednisolona. La sensibilidad del método, definida como la concentración mínima detectable dos veces la desviación estándar del valor de cero, es aproximadamente 4.6nmol/l con dos horas de incubación según el proveedor.

4.4 Hemograma

Se colectaron muestras de sangre y se realizaron evaluaciones hematológicas con el fin de tener indicadores de salud y poder relacionarlos con la seroprevalencia de anticuerpos.

El hemograma se divide en serie roja: (glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito) y serie blanca (glóbulos blancos y cuenta diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo). Las técnicas utilizadas fueron las descritas por Benjamin (1987). Los glóbulos rojos y blancos, el hematocrito se realizaron en la embarcación por métodos manuales utilizando pipetas Thoma y cámara de Neubauer. y la hemoglobina se midió con un hemoglobinómetro de Spencer. Se realizaron también en el momento de la toma de muestra los frotis sanguíneos los cuales se fijaron con etanol se para su posterior tinción y lectura.

5. Análisis estadístico

5.1 Patrón de regionalización

Cada animal muestreado puede ofrecer información sobre la presencia de una o más serovariedades. El número total de animales muestreados por colonia debe mostrar un grado de asociación debido a que están expuestos a las mismas condiciones ambientales y al contacto corporal cercano. Se asume entonces que deben existir semejanzas entre colonias de acuerdo al grado de similitud ambiental y el potencial de contacto entre animales de distintas colonias que migren o viajen entre localidades. Bajo este esquema es posible utilizar la información disponible para generar un análisis de racimos para las diferentes respuestas de anticuerpos contra leptospira, que permita determinar el grado de “parentesco” entre colonias (Aurioles *et al.*, 2002).

5.2 Análisis univariado

Se hizo un análisis descriptivo para las variables y posteriormente se utilizaron pruebas de t para variables dependientes para comparar las medias de la muestra uno, de la muestra dos y de la diferencia entre ambas en cortisol. Pruebas de t para variables independientes en el caso de comparar las medias de cortisol, el total de respuestas positivas a la prueba de AM y los valores hemáticos entre sexos. Se realizó análisis de

varianza para los grupos de edad, colonias y ubicación. Se obtuvieron correlaciones entre variables continuas como temperatura corporal, peso, condición corporal y los valores de hematología.

5.3 Análisis de racimos

El término análisis cluster o de racimos, se utiliza para definir una serie de técnicas, fundamentalmente algoritmos, que tienen por objeto la búsqueda de grupos similares de individuos o variables que se van agrupando en conglomerados o racimos. Dadas las muestras de individuos, de cada uno de los cuales se dispone de una serie de observaciones, este análisis sirve para clasificarlos en grupos lo más homogéneos posible con base en las variables observadas. Los individuos que queden clasificado en el mismo grupo serán tan similares como sea posible (Pérez, 2001).

Este análisis se utilizó inicialmente con las serovariedades como variables y los grupos se formaron con base en las colonias. Es decir las colonias se agruparon con base en las serovariedades que compartían o en la que eran similares. A partir de este análisis se definieron los grupos por ubicación Sur, Centro y Norte.

Se hizo una correlación entre la distancia Euclidiana obtenida del análisis de racimos y la distancia geográfica entre colonias.

5.4 Análisis de componentes principales

Es un método estadístico multivariado de simplificación o reducción de la dimensión de una tabla de casos-variables con datos cuantitativos, para obtener un menor número de variables, combinación lineal de las primitivas, que se denominan componentes principales o factores, cuya posterior interpretación permitirá un análisis más simple del problema estudiado. Su aplicación es directa sobre cualquier conjunto de variables, a las que se considera en bloque, sin que el investigador haya establecido previamente jerarquías entre ellas, ni necesite comprobar la normalidad de su distribución (Pérez, 2001).

A través de componentes principales reducimos la cantidad de serovariedades necesarias para definir los grupos. Definimos cuantos factores eran necesarios para explicar el 70% de la varianza entre los individuos. En esta etapa del análisis no trabajamos por

colonia sino por individuo. Esto nos llevó nuevamente al análisis de grupos con el fin de encontrar nuevamente similitudes.

6. Evaluación de las colonias

Con el fin de evaluar a cada una de las colonias se eligieron algunos criterios que reflejaban características tanto ambientales como individuales. Se establecieron niveles de confianza para estos valores y se obtuvo una calificación para cada colonia. Los criterios utilizados fueron: estado de salud, que mostró una correlación con algunos valores hemáticos, condición corporal, respuesta a estrés por captura: muestra dos menos muestra uno, porcentaje de eosinófilos como una asociación a la carga parasitaria y estado de las poblaciones a lo largo del tiempo (cuadro 1), en número de individuos si decrecen, se mantiene o crecen desde el reporte de Auriolles-Gamboa y Zavala-González (1994).

VI RESULTADOS

De las 106 crías a las que se les tomaron muestras para serología y biometría hemática 64 fueron machos y 42 fueron hembras. El peso promedio de las crías fue de 10.9 Kg \pm 2.41 con un valor mínimo de 4 Kg y un máximo de 15.5 Kg. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el peso entre machos y hembras. Los machos en promedio pesaron 11.88 Kg \pm 2.2 y las hembras 9.4 Kg \pm 1.9 ($t=9.38$, df 104 $p<0.05$).

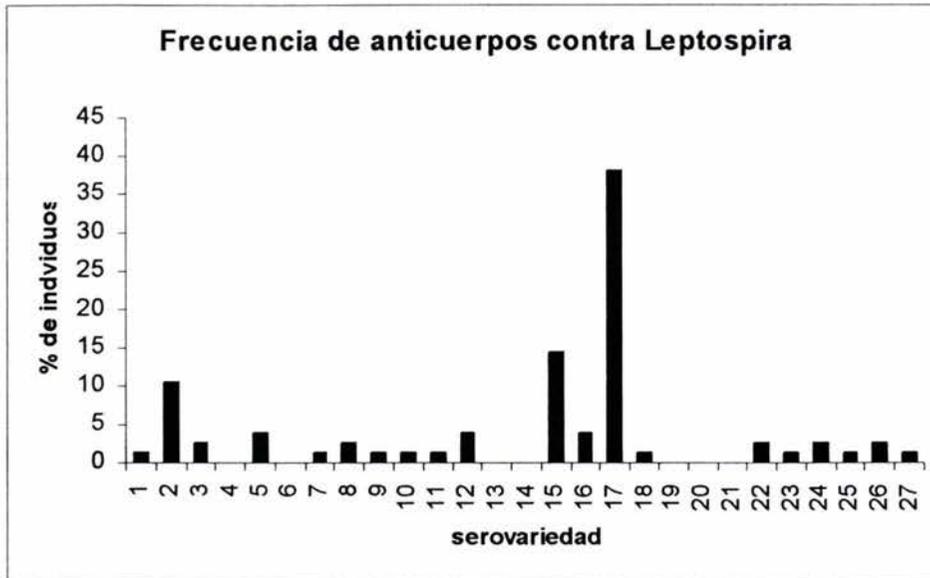
La condición corporal (factor de condición de Fulton) promedio fue de 1.97 ± 0.29 con un mínimo de 1.17 y un máximo de 2.84. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre sexos.

1. Anticuerpos contra *Leptospira* spp

Los títulos encontrados para los individuos positivos fueron de 1:20. En el caso de los animales que se consideraron sospechosos, según la metodología, los títulos variaron de 1:20 a 1:80, pero por considerarse sospechosos el título que se reporta es el menor. De los 106 animales que se sometieron a la prueba de AM 105 fueron positivos contra una o más serovariedades. Sólo una cría en Cantiles resultó ser negativa a las 27 serovariedades.

Las serovariedades que se presentaron con mayor frecuencia fueron Patoc con un 33.3 %, Ballum con 14.4%, Hebdomadis con 8.9%, Pyrogenes 5.6% y Grippytyphosa 4.4 %; las demás serovariedades se presentaron en menor frecuencia. Las serovariedades Pomona, Shermani, Panama y Djasiman, tuvieron una frecuencia de 0% ya que no se observó cuando menos el 50% de aglutinación en la dilución 1:20 del suero (Figura 2).

Figura 2 Presencia de anticuerpos contra leptospira sólo animales positivos según la OIE



1 Icterohaemorrhagiae, 2 Hebdomadis, 3 Pyrogenes, 4 Grippotyphosa, 5 Canicola, 6 Pomona, 7 Hardjobovis, 9 Wolffii, 10 Tarassovi, 11 Bratislava, 12 Autumnalis, 13 Shermani, 14 Panama, 15 Ballum, 16 Bataviae, 17 Patoc, 18 Australis, 19 Cynopteri, 20 Celledoni, 21 Djasiman, 22 Lai, 23 Mozdok, 25 Portland-vere Sinaloa, 26 Hardjobovis, H-89, 27 Icterohaemorrhagiae, Palo Alto.

Cuando se consideraron las reacciones sospechosas, el suero reaccionaron a diferentes porcentajes contra 26 de las 27 serovariedades de *Leptospira* utilizadas en la prueba de AM. La única serovariedad para la cual no se encontró ningún tipo de reacción fue Shermani.

En el cuadro 7 se observa el total de individuos positivos y sospechosos que reaccionaron a la prueba de AM por cada colonia y para cada serovariedad, es importante recordar que un individuo puede presentar anticuerpos contra más de una serovariedad. .

Cuadro 7 Total de individuos positivos y sospechosos en al prueba de AM por colonia para cada serovariedad

	Islotes	FSI	SPN	SPM	SE	Rasito	Partido	Granit	Cantil	Lobos	Consag
1 Icterohaemorrhagiae	1	1	0	0	0	0	0	1	2	0	4
2 Hebdomadis	4	9	3	1	1	6	3	2	1	0	2
3 Pyrogenes	3	6	1	1	2	7	7	2	4	4	5
4 Grippytyphosa	4	5	2	2	1	2	2	0	0	2	2
5 Canicola	7	4	1	0	1	6	4	0	3	3	1
6 Pomona	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	2
7 Hardjobovis	0	2	4	0	0	4	0	0	0	0	1
8 Hardjo	1	1	3	1	1	0	3	0	4	2	4
9 Wolffii	1	0	0	0	0	4	0	1	1	3	0
10 Tarassovi	4	0	0	0	1	5	4	1	1	2	2
11 Bratislava	1	1	3	4	2	4	3	0	0	7	5
12 Autumnalis	1	4	3	0	0	1	1	0	1	2	1
13 Shermani	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14 Panama	0	1	3	5	3	9	9	1	3	3	0
15 Ballum	2	2	3	3	4	8	6	1	2	6	1
16 Bataviae	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	1
17 Patoc	4	4	10	3	7	6	6	4	4	7	2
18 Australis	3	5	3	0	0	5	0	0	1	3	1
19 Cynopteri	2	1	0	0	0	3	0	1	0	1	0
20 Celledoni	1	1	1	0	0	0	1	0	2	0	3
21 Djasiman	2	2	0	0	1	7	1	0	2	2	1
22 Lai	6	6	1	1	2	5	5	1	0	0	2
23 Mozdok	1	1	2	1	4	6	0	1	2	7	4
24 Muenchen	0	4	3	1	0	3	1	1	0	1	3
25 Portland-vere	0	2	1	2	2	6	0	0	0	3	0
26 Hardjobovis	1	5	0	0	2	5	0	2	1	3	3
27 Icterohaemorrhagiae	0	1	0	0	0	8	0	0	0	0	2

En el cuadro 8 se muestran las frecuencias totales para cada serovariedad, en las que nuevamente las más frecuentes fueron Patoc con un 53.8 %, Pyrogenes 39.6 %, Ballum con 35.8 %, Hebdomadis con 30.2% Grippytyphosa 20.8 %. Aparecen frecuencias altas de otras serovariedades como Bratislava (28.3%), Canicola (28.3%), Panamá sólo aparece como sospechosa y presenta una frecuencia de 34.9%.

Cuadro 8. Porcentaje de lobos marinos del total (106) que reaccionaron contra una o más serovariedades de *Leptospira* spp en la prueba de AM. Tomando en cuenta positivos y sospechosos.

Serovariedad	%	# de positivos
1 Icterohaemorrhagiae	8.5	9
2 Hebdomadis	30.2	32
3 Pyrogenes	39.6	42
4 Grippotyphosa	20.8	22
5 Canicola	28.3	30
6 Pomona	6.6	7
7 Hardjobovis	10.4	11
8 Hardjo	18.9	20
9 Wolffi	9.4	10
10 Tarassovi	18.9	20
11 Bratislava	28.3	30
12 Autumnalis	13.2	14
13 Shermani	0	0
14 Panama	34.9	37
15 Ballum	35.8	38
16 Bataviae	21.7	23
17 Patoc	53.8	57
18 Australis	19.8	21
19 Cynopteri	7.5	8
20 Celledoni	8.5	9
21 Djasiman	17.0	18
22 Lai	27.4	29
23 Mozdok	27.4	29
24 Muenchen	16.0	17
25 Portland-vere, Sinaloa*	15.1	16
26 Harjobovis, H-89 *	20.8	22
27 Icterohaemorrhagiae, Palo Alto*	10.4	11
Total		582

*Aislamientos nacionales.

En cuadro 9 se muestra el porcentaje de sueros que reaccionaron contra una o más serovariedades. Se observó que las colonias que presentaron mayor número de individuos positivos fueron Rasito (41.9), Lobos (23.6) y Farallón de San Ignacio (25.9). La colonia que mostró menor número de individuos positivos fue Granito (7.8).

Para el cálculo del porcentaje total de reacciones positivas (%TRP) se utilizó el número de individuos por las 27 serovariedades como el 100% y se sacó el porcentaje a partir del total de reacciones positivas por colonia (TRP).

Cuadro 9. Total de reacciones positivas a las 27 serovariedades para cada colonia tomando en cuenta positivos y sospechosos

Colonia	% de TRP	TRP por colonia	n
Los Islotes	19.3	52	270
Farallón de San Ignacio	25.9	70	270
San Pedro Nolasco	18.9	51	270
San Pedro Mártir	13.0	28	216
San Esteban	13.3	36	270
Rasito	41.9	113	270
Partido	21.9	59	270
Granito	7.8	21	270
Cantiles	13.3	36	270
Lobos	26.3	64	243
Consag	19.3	52	270

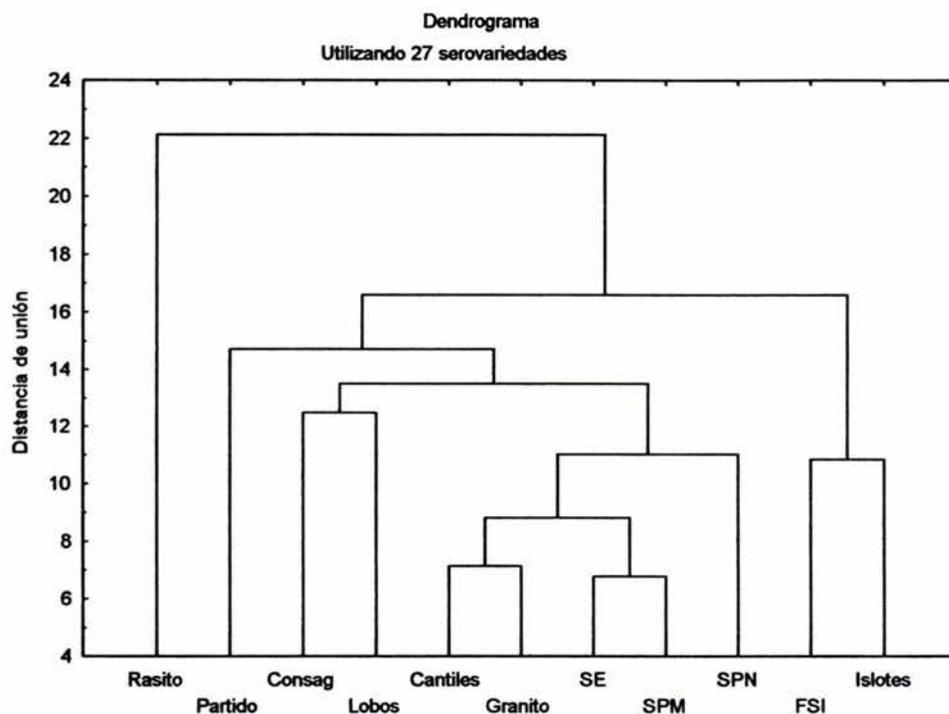
No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre sexos para el total de reacciones positivas contra leptospira por individuo.

Las serovariedades más frecuentes por isla (ver apéndice I) fueron para los Islotes 70% Canicola, Lai 60% y 40% para Hebdomadis, Grippotyphosa, Tarassovi y Patoc. Para FSI 90% Hebdomadis, 60% Pyrogenes y Lai y 50% Australis. Para SPN 100% Patoc, 40% Hardjobovis y 30% Hebdomadis, Hardjoprajitno, Bratislava, Autumnalis entre otras. Para SPM 62.5% Panama, 50% Bratislava y 37.5% Ballum y Patoc. Para San Esteban 70% Patoc, 40 % Ballum y Mozdok y 30% Panama. Para Rasito que fue la colonia que presentó mayor frecuencia en más serovariedades: 90% Panama, 80% Ballum e Icterohaemorrhagiae Palo Alto, 70% Pyrogenes y Djasiman. Partido presentó frecuencias de 90% para Panama, 70 % Hebdomadis, 60% Ballum y Patoc. Granito y cantiles dos colonias que se encuentran en la misma isla Angel de la Guarda presentaron la primera 40% Patoc y 20% para Ballum, Harjobovis H-89, Hebdomadis y Pyrogenes y la segunda 44% a Patoc, Pyrogenes y Hradjoprajitno, 33% a Canicola y Panama. Isla Lobos 70% a Patoc Bratislava y Mozdok, 60% a Ballum y 40% Pyrogenes. Rocas Consag 56% a Bratislava y Pyrogenes, 44% Icterohaemorrhagiae, Hardjoprajitno y Mozdok, 33% Muechen y Celledoni.

1.1 Patrón de regionalización

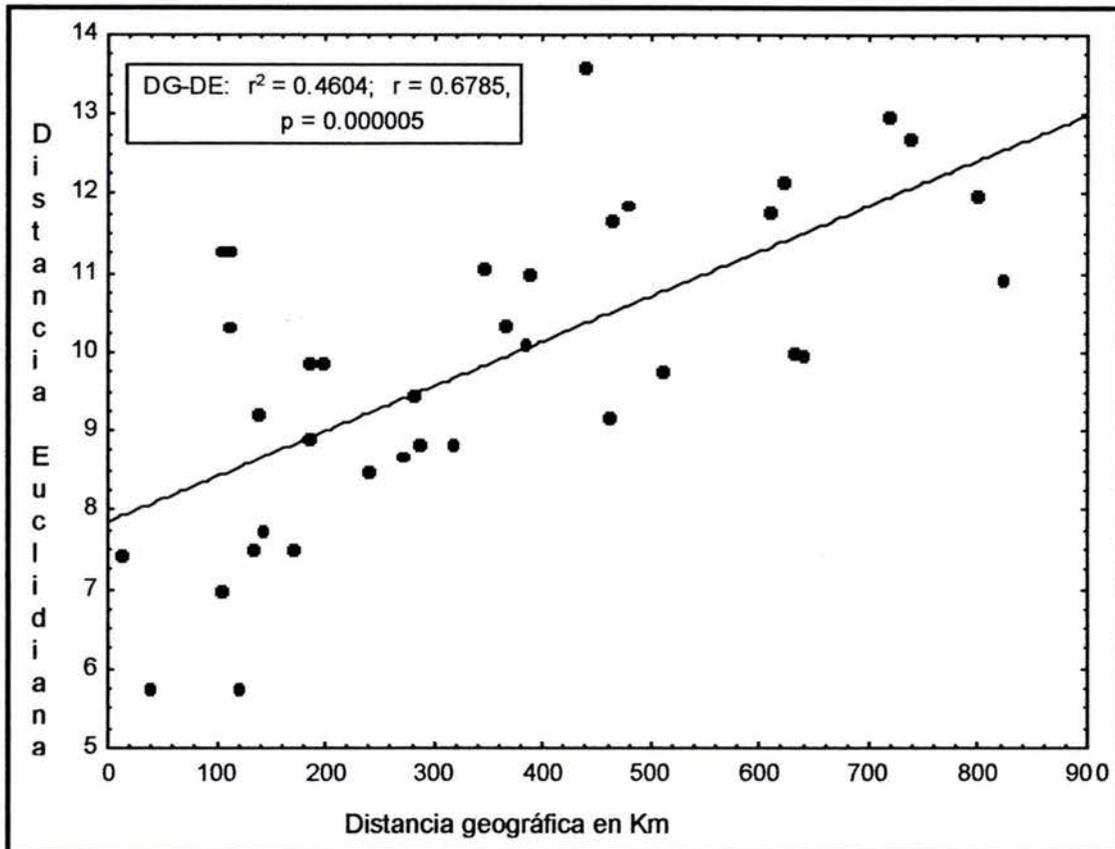
Se realizó un análisis de racimos inicial (figura 3) con el que se obtuvieron tres grupos formados tomando en cuenta las serovariedades presentes en cada isla: GI Los Islotes y San Ignacio al sur, GII. San Esteban, San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco, Cantiles y Granito al noroeste y GIII Consag y Lobos las dos colonias más al norte. El Partido y El Rasito (a ~8 millas entre sí) se separaron de las demás.

Figura 3 Dendrograma de la agrupación de serovariedades por colonia



Se propone que la distancia geográfica entre colonias puede ser un factor importante en definir la similitud de anticuerpos entre islas, para probar esto se obtuvieron dos matrices una de la distancia geográfica entre colonias y otra de las distancias Euclidianas obtenidas del primer análisis de grupos (Figura 3). Estas matrices se correlacionaron y la correlación fue positiva y significativa (Figura 4)

Figura 4 Correlación entre distancia geográfica y distancia Euclidiana



Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales que arrojó algunas serovariedades que podrían tener más importancia para definir las regiones geográficas. Al utilizar la proporción de individuos positivos a cada serovariedad, análisis de racimos (k-medias) y tablas cruzadas, se pudieron definir las serovariedades que se asociaban de una manera clara a alguna región (figura 7). Las serovariedades Hebdomadis, Grippytyphosa, Canicola, Australis y Lai están fuertemente asociadas a la región Sur (Islotes y Farallón de San Ignacio) del Golfo de California. Pyrogenes, Tarassovi, Panama,

Ballum, Djasiman e Icterohaemorrhagiae Palo Alto a las islas Rasito y Partido. Las demás islas que se encuentran en el centro y el norte parecen no tener una asociación específica con algunas serovariedades. A partir de esta serovariedades se obtuvo un nuevo dendrograma que se observa en la figura 5 que refleja los grupos cuya ubicación geográfica puede ser observados en la figura 6.

Figura 5 Dendrograma utilizando las serovariedades Hebdomadis, Grippotyphosa, Canicola, Australis, Lai, Pyrogenes, Tarassovi, Panama, Ballum, Djasiman e Icterohaemorrhagiae Palo Alto

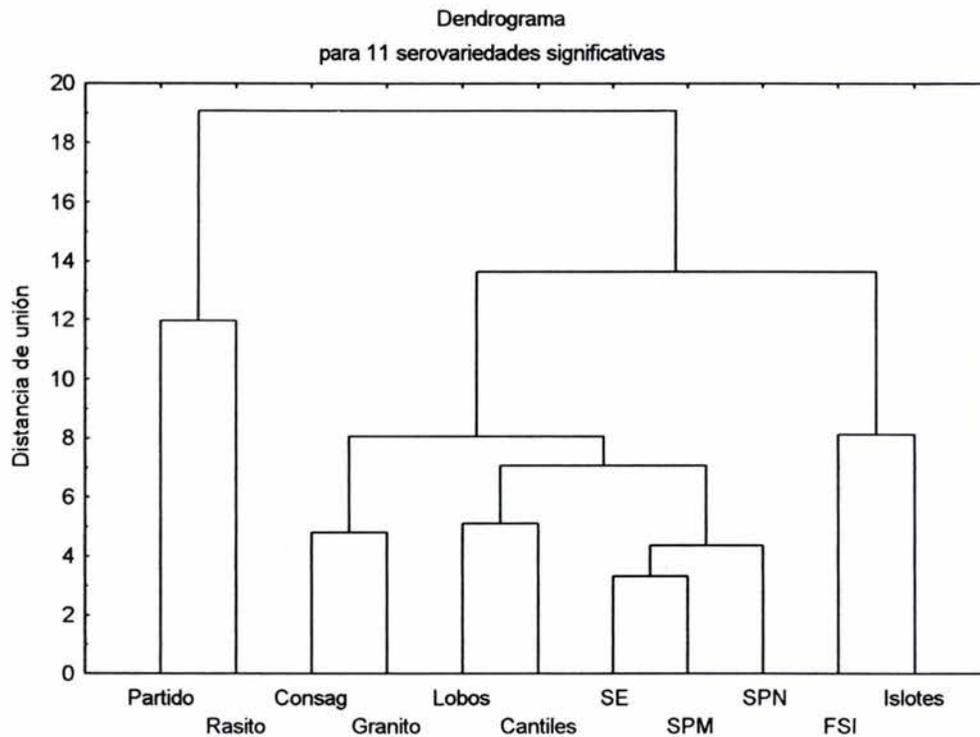
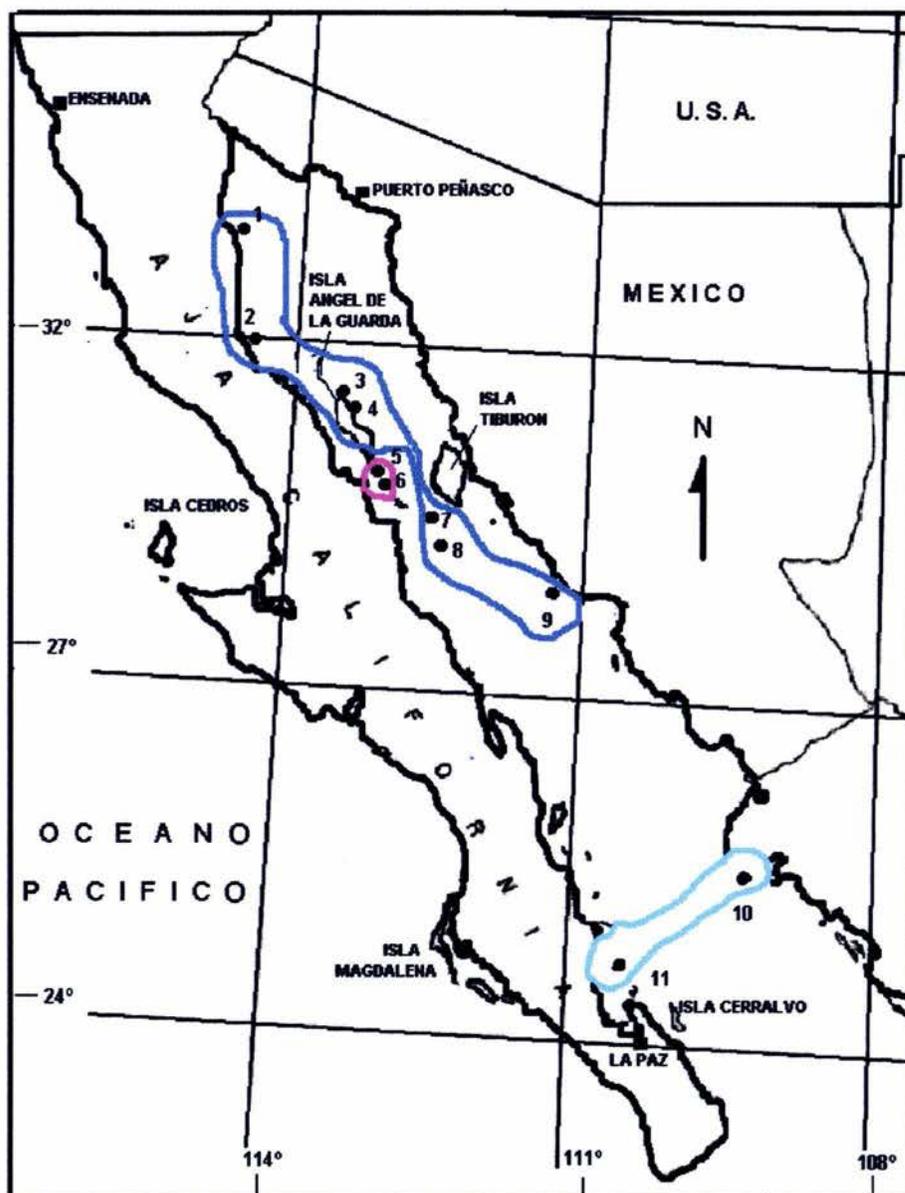


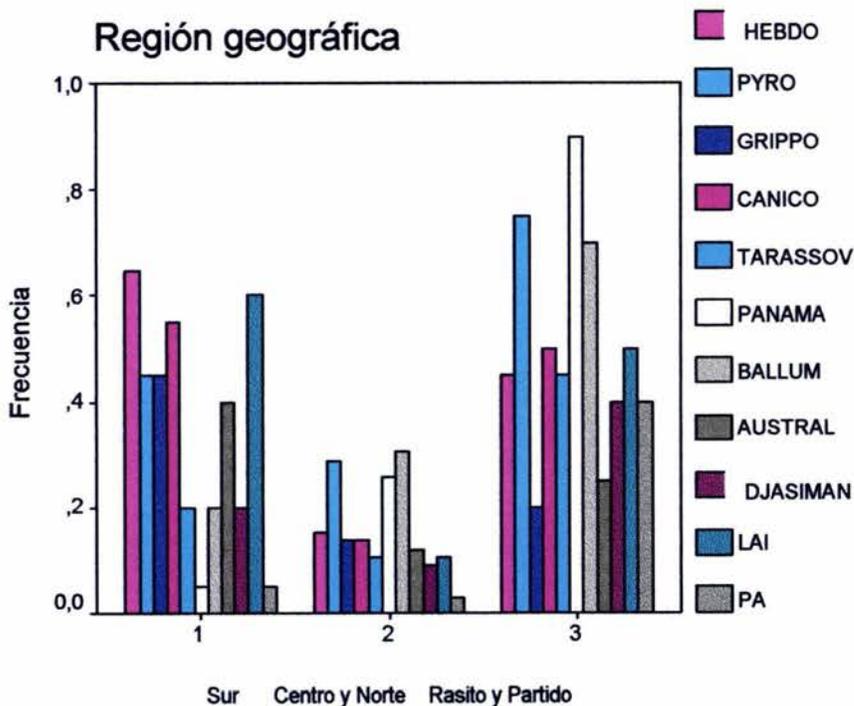
Figura 6. Mapa con las tres regiones diferenciadas a partir de su asociación con determinadas serovariedades



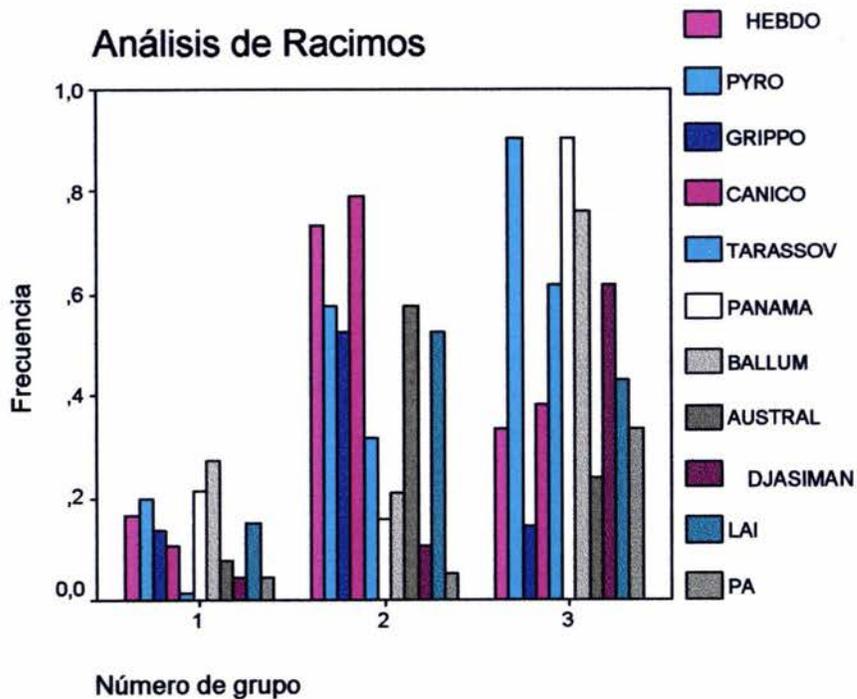
1. Rocas Consag; 2. Isla Lobos; 3. Isla Granito; 4. Los Cantiles; 5. El Partido; 6. El Rasito;
7. San Esteban; 8. San Pedro Mártir; 9. San Pedro Nolasco; 10. Farallón de San Ignacio; 11. Los Islotes.

Figura 7. Proporción de individuos con anticuerpos contra las 11 serovariedades que definen regiones en A por región geográfica y B por análisis de grupos

A



B



2. Cortisol

De las 56 crías capturadas 34 fueron machos y 22 fueron hembras. El peso promedio fue de 10.42 ± 2.58 Kg con un mínimo de 4 Kg y un máximo de 15.5 Kg, la condición corporal (Factor de Fulton) en promedio de 1.99 ± 0.29 . La temperatura corporal promedio fue 37.8 ± 1.18 °C.

Los niveles de cortisol para hembras y machos en la primera muestra estuvieron en un rango de 6.64 a 219.40 ng/ml (media 59.95 ± 49.90 ng/ml) y en la segunda muestra de 7.94 a 330.95 ng/ml (media 70.74 ± 60.77 ng/ml).

La diferencia promedio de la muestra dos menos la uno fue 10.78 ± 34.64 ng/ml. Y el rango fue de -59.56 a $+130.01$ ng/ml.

La diferencia entre la muestra uno y la dos, 5 minutos después, fue estadísticamente significativa, ($t = -2.239$, $df=55$, $p=0.023$). Existe una correlación positiva entre la muestra uno y la muestra dos (0.831 , $p<0.05$). También se observó correlación positiva entre la muestra dos y la diferencia, es decir la muestra dos menos la muestra uno (0.725 , $p<0.05$). Existe una correlación positiva entre la temperatura corporal y la segunda muestra (0.28 , $p<0.05$).

Se encontraron diferencias significativas entre sexos en la primera muestra siendo mayor en las hembras que en los machos (Cuadro 9). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la segunda muestra aunque el valor de las hembras es mayor que el de los machos. Tampoco fue significativa la diferencia entre la muestra dos menos la muestra uno hembras y machos. Los valores en los machos fueron: media 12.55 ± 31.0 ng/ml y en las hembras media 8.04 ± 40.24 ng/ml.

La variación inter e intra ensayo respectivamente fue de 12.9% y 6.06 %. Se hicieron diluciones seriadas del suero de ambos sexos de las crías de lobo marino de California (hasta 1:16) dando como resultado una curva paralela a la curva estándar de cortisol.

Cuadro 10 Valores promedio de cortisol sérico en lobos marinos de acuerdo con el sexo para la muestra uno y la dos.

Muestra 1	Media ± DS	Muestra 2	Media ± DS
Machos	51.02 ± 44.32 ng/ml	Machos	63.57 ± 59.74 ng/ml
Hembras	73.75 ± 37.48ng/ml	Hembras	81.8 ± 62.06 ng/ml
p<0.05		p>0.05	

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tomadas por la mañana (antes de 12:00 PM) y aquellas tomadas por la tarde (después de 12:00 PM) (Cuadro10), 10 muestras fueron tomadas en la mañana y 46 por la tarde.

Cuadro 11 Valores promedio de cortisol sérico de muestras tomadas por la mañana (AM) y por la tarde (PM) en la muestra uno y la dos.

Muestar 1	Media ± DS	Muestar2	Media ± DS	
AM	50.82 ± 20.53 ng/ml	AM	63.12± 34.7 ng/ml	Se formaron tres grupos con base en
PM	61.93 ± 40.59 ng/ml	PM	72.39 ± 65.24 ng/ml	
p>0.05		p>0.05		

la ubicación geográfica: Grupo I al sur(n=11): Los Islotes y Farallón de San Ignacio, Grupo II al centro(n=35): San Pedro Mártir, San Pedro Nolasco, Rasito, Partido, Granito, Cantiles y Grupo III al norte (n=10): Lobos y Consag. Los niveles de cortisol en la segunda muestra tienden a ser diferentes entre los tres grupos (ANOVA p=0.08) GI media 107.09 ng/ml, GII 61.48 ng/ml y GIII 63.13 ng/ml. Existe diferencia significativa entre el grupo I y el II p<0.05 Es interesante notar que si se suman los grupos II y III, que no difieren entre si, contra el grupo I aparecen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la diferencia entre la muestra dos menos la muestra uno por ubicación. Los valores fueron GI 22.99 ± 37.95 ng/ml, GII 5.05 ± 34.52 ng/ml y GIII 17.4 ± 34.64 ng/ml. En el cuadro 11 se observan los valores promedio para cada colonia de la primera y segunda muestra, además de la diferencia entre la segunda menos la primera.

Cuadro 12. Valores promedio de cortisol sérico ng/ml en las 11 colonias estudiadas.

Lobera	Muestra ¹ ± DS	Muestra ² ± DS	M2-m1	± DS
Islotes	74.18 ± 57.54	80.10 ± 45.10	5.92 ±	13.83
Farallón de San Ignacio	92.37 ± 47.73	129.58 ± 92.77	37.21 ±	46.84
San Pedro Nolasco	92.35 ± 29.08	101.33 ± 32.32	8.98 ±	8.93
San Pedro Mártir	35.62 ± 18.32	28.40 ± 20.59	-7.22 ±	20.63
San Esteban	25.03 ± 29.14	36.36 ± 38.00	11.33 ±	53.55
Rasito	62.63 ± 17.44	54.59 ± 28.07	-8.03 ±	32.36
Partido	50.56 ± 29.41	58.81 ± 41.30	8.25 ±	28.79
Granito	57.87 ± 39.25	50.72 ± 29.44	-7.15 ±	36.54
Cantiles	70.94 ± 84.69	100.18 ± 130.22	29.24 ±	46.31
Lobos	29.97 ± 15.76	51.29 ± 43.07	21.32 ±	38.23
Consag	61.48 ± 13.46	74.96 ± 11.07	13.48 ±	21.53
Total	59.95 ± 42.90	70.74 ± 60.77	10.78 ±	34.64

Se correlacionaron los valores de la diferencia de la muestra dos menos la uno con los valores hematológicos. Se obtuvo una correlación positiva con el conteo total de glóbulos rojos (0.43, $p < 0.05$) y con el porcentaje de linfocitos (0.38, $p < 0.05$) y correlaciones negativas con MCV, MCH y el porcentaje de neutrófilos (-0.46, -0.35, -0.39, $p < 0.05$) respectivamente.

3.Hematología

Los valores promedio obtenidos para cada colonia se encuentran en el apéndice II en el cuadro 12 se presentan los valores promedio de los 106 individuos con los intervalos de confianza al 95%

Cuadro 13. Valores hematológicos promedio de los 106 individuos

	Media	Desv Estan	Intervalos de confianza 95%
GB x 10 ³	6.68	1.50	6.18 - 7.35
GR x 10 ⁶	1.96	0.24	1.83 - 2.05
HB g/dl	6.89	3.62	8.41 - 9.2
HTO %	42.16	4.06	41.02 - 44.54
VCM fl	204.58	112.73	227.08 - 265.02
HCM pg	38.56	22.00	46.46 - 53.94
CHCM %	46.86	27.59	48.93 - 56.02
PT mg/dl	3.97	2.56	5.29 - 5.58
Neutrófilos %	70.10	4.00	67.46 - 72.57
N. Bandas %	0.86	0.46	0.4 - 1.2
Linfocitos %	24.66	3.49	22.04 - 27.09
Monocitos %	2.33	1.09	1.87 - 2.97
Eosinófilos %	1.98	1.09	1.52 - 2.37
Basófilos %	0	0	0

Al comparar los datos hematológicos entre las diferentes colonias los únicos valores que fueron estadísticamente significativos fueron GB, Hb, Proteínas, VCM, HCM, CHCM totales y eosinófilos

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos en el conteo total de GB, que es mayor en machos que en hembras ($p < 0.05$). Lo mismo sucede en el caso de los neutrófilos en el conteo diferencial de blancos, pero en los linfocitos las hembras mostraron valores más elevados que los machos.

El hematocrito fue diferente entre los tres grupos de edad siendo mayor en los más jóvenes (valores promedio de 40.5% en los mayores a 46.9% en los más jóvenes $p < 0.05$).

Con respecto a las observaciones sobre el estado de salud que se basó únicamente en una observación general de cada individuo se encontraron diferencias significativas en el

porcentaje de del HTO, en el conteo de GB y de sus diferenciales, exceptuando el porcentaje de linfocitos.

Con respecto al hematocrito éste disminuye del grado 1 (mejor) al 3 (peor); el conteo total de GB fue más alto en los animales que se consideraron grado 2 y en el diferencial del GB para neutrófilos: va de mayor a menor con relación al grado de salud. Los bandas son mayores en el grado 3, los monocitos se comportan igual que los bandas y los eosinófilos fueron mayores en el grado 1.

Se encontró una correlación positiva entre los grados del estado de salud y MCV (0.26), el porcentaje de bandas (0.37) y el porcentaje de monocitos (0.26) y una correlación negativa con el porcentaje de neutrófilos (-0.29) y el Hto (-0.027)

Cuando se relacionaron los valores hematológicos con los grupos por ubicación, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de porcentaje de Hto, Hb y PT siendo mayores en la región centro y en el conteo diferencial de eosinófilos donde el porcentaje mayor correspondió a la región Norte.

Al relacionar los valores de hematología con los distintos tipos de suelo se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de eosinófilos ($p < 0.05$) para el tipo de suelo descrito como arenoso y con roca de derrumbe

Se observó una correlación positiva entre peso y condición corporal 0.61 ($p < 0.05$) a su vez se obtuvo una correlación negativa del peso con Hb y Hto de -0.27 ($p < 0.05$) y una correlación negativa de la condición corporal y la Hb de -0.29 ($p < 0.05$).

El porcentaje de eosinófilos mostró una correlación negativa con temperatura y Hto de -0.25 ($p < 0.05$)

4. Evaluación de las colonias

Utilizando los criterios de calificación establecidos en material y métodos encontramos que Rasito es la colonia con menor puntaje, seguida por Partido, nuevamente se separan del resto del grupo e Islotes es la que tiene mejor calificación como se puede ver en el cuadro 14. Consag tiene una buena calificación que presenta un buen crecimiento de la población.

Cuadro 14 Evaluación de las once colonias utilizando características individuales de las crías.

	Est							
	Salud	Cond Corp	% eosino (-)*	cortisol (-)*	lesiones (-)*	Población	Total	
Islotes	11	17	1	1	3	2	25	
FSI	11	13	2	4	3	-2	13	
SPN	11	10	6	0	0	-4	11	
SPM	9	12	6	0	0	-4	11	
SE	10	13	6	1	3	-1	12	
Rasito	10	12	3	1	13	-4	1	
Partido	9	15	3	1	10	-4	6	
Granito	11	13	11	1	1	-4	7	
Cantiles	10	14	4	1	2	-6	11	
Lobos	9	15	5	2	2	-6	9	
Consag	10	15	8	3	2	4	16	

* estos valores mientras más altos son, menor es su valor para evaluar a la colonia por lo tanto se restan en el total.

VII. Discusión

1. Leptospira

Se sabe que la leptospirosis es una enfermedad más frecuente de lo que se diagnostica o se reconoce (Faine *et al.*, 1999). Los rangos de infección basados en serología pueden subestimar la verdadera prevalencia porque algunos animales pueden estar infectados con múltiples serovariedades y algunos huéspedes pueden seguir excretando espiroquetas en orina, aún después de convertirse en seronegativos (Bunneli *et al.*, 2000). De ahí la importancia de tomar títulos bajos además de las respuestas menores al 50% de aglutinación como sospechosas ya que finalmente estamos haciendo un estudio exploratorio de la presencia de anticuerpos contra diferentes serovariedades en diferentes colonias.

La producción de anticuerpos es dependiente de la habilidad que tiene el hospedero para montar una respuesta inmune, y esta depende de varios factores como el sexo, factores genéticos y el estado nutricional de cada individuo (Gulland, 1997). Debido a que las crías de lobo marino provenían de vida libre, los títulos encontrados no representan una respuesta vacunal, más bien pueden ser el reflejo de la transmisión de anticuerpos maternos a la cría o una previa exposición de la cría a determinadas serovariedades (Gulland, 1997; Michna, 1970). Uno de los estudios a realizar en el futuro, sería evaluar la relación que tienen los anticuerpos maternos con los de la cría, para poder definir si lo que sucede en las crías es un reflejo de lo que sucede en los adultos.

El mantenimiento de leptospiras en la naturaleza requiere de contacto social entre animales silvestres, ya que el ambiente contaminado por sí solo parece no ser suficiente, al menos para algunos mamíferos arbóreos (Bunneli *et al.*, 2000). El mantenimiento de la leptospirosis en los lobos marinos puede estar potenciado por el comportamiento gregario de la especie. Un hospedero infectado puede eliminar hasta 105 leptospiras/ml de orina durante las primeras semanas de infección (Heath y Johnson, 1994), y en lobos marinos se ha reportado que los individuos pueden eliminar leptospiras hasta 154 días después de la infección (Dierauf *et al.*, 1985). La presencia de anticuerpos contra más serovariedades en Rasito y Partido, puede deberse a que son las colonias más pequeñas y esto hace que los animales necesariamente estén en contacto y la exposición a patógenos es mayor.

La presencia de mamíferos como reservorios potenciales en las islas puede explicar la presencia de *Leptospira* spp pero no explica totalmente las diferencias encontradas en serovariedades para cada colonia. Lobos marinos juveniles, que fueron marcados cuando eran cachorros en los Islotes han sido vistos en Granito, San Pedro Mártir y San Esteban (Auriolles-Gamboa, comunicación personal.).

Debido a la cercanía que existe entre las colonias del Norte, el intercambio de animales entre ellas puede ser común. Si los animales que suelen viajar entre estas colonias se infectan, son ellos los que pueden transmitir la infección (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Como observamos en los resultados, la distancia entre colonias puede ser un factor de transmisión entre éstas.

No se encontraron serovariedades que definieran la región Centro y Norte, es probable que compartan las mismas, en este estudio faltaron dos colonias San Jorge, la más norteña y Machos que se encuentra en la Isla Ángel de la Guarda y pertenecería al centro. Es probable que completando la información existan serovariedades que definan el centro y el norte como regiones diferentes.

La evidencia serológica en el caso de la foca peluda del norte, sugiere que la infección con la serovariedad Pomona sucede en el mar, sin embargo, el aislamiento de estas serovariedad de la placenta de lobos marinos de California, de las isla San Miguel, California, indica que la exposición dentro de la misma colonia es posible. Se ha sugerido que otro factor de infección sería la contaminación del agua con orina de algunos mamíferos domésticos y roedores salvajes (Dunn, 1990).

De los 106 animales a los que se les realizó la prueba de AM 105 mostraron anticuerpos contra al menos una serovariedad. La alta presencia de anticuerpos y los títulos bajos (1:20), más la ausencia de signos clínicos que sugieran leptospirosis y la ausencia de mortalidades altas en el Golfo de California, indican que la leptospirosis es enzoótica y que es probable que las serovariedades presentes sean hospedero adaptadas (Heath y Johnson, 1994).

El cepario utilizado en este estudio contiene en su mayoría cepas aisladas en humanos y en roedores, marsupiales y perros. Todos estos y otros mamíferos pueden ser la fuente de estas serovariedades en las islas e incluso también de que las serovariedades se

compartan entre islas. Finalmente, hay mucho que entender todavía sobre la transmisión de la leptospira en los lobos marinos.

En los dos estudios anteriores realizados en el Golfo de California Godínez (1999) y Acevedo-Whitehouse (2003), la serovariedades con mayor frecuencia fueron Hardjo y Cynopteri respectivamente y en este estudio la respuesta de anticuerpos más importante fue hacia Patoc seguida de Pyrogenes y Ballum. Es probable que la presencia o la importancia de la serovariedades cambie con los años y esté relacionada con la presencia o ausencia de ciertos vectores o es probable que las diferentes serovariedades sean transmitidas por reservorios diferentes, además de la posibilidad de reacciones cruzadas. Sin embargo en los resultados del estudio realizado por Acevedo-Whitehouse (2003), ya se empezaba a un observar un patrón de agrupación de las serovariedades por colonia (Aurioles comunicación personal).

En este estudio a diferencia de los anteriores realizados en el Golfo de California y en California, EEUUA encontramos anticuerpos contra la serovariedad Mozdok y en menor cantidad contra la serovariedad Pomona, es posible que exista antigenicidad cruzada ya que pertenecen al mismo serogrupo.

Es importante remarcar, como se menciona en los antecedentes, que no hay reportes de mortalidades por leptospira de forma epizoótica en los lobos marinos en el Golfo de California y la serovariedad que más se encontró es Patoc, una serovariedad de *L. biflexa* que es no patógena. Sin embargo se debe resaltar que una enfermedad infecciosa puede emerger en una población por cambios en las propiedades del agente, cambios en la resistencia del hospedero y cambios ambientales que modifiquen la interacción huésped-agente (House *et al.*, 2002).

Algunas enfermedades en mamíferos marinos deben ser endémicas y pueden reflejar el efecto de las condiciones ambientales a largo plazo o de los procesos evolutivos, debido a reducciones de la población o aislamiento geográfico. La incidencia de una enfermedad dentro de una población que tiene una distribución amplia, puede revelar patrones geográficos como resultado de diferentes efectos ambientales y diferencias en estructura genética (Aurioles *et al.*, 2004).

Existe alguna evidencia que indica que los lobos marinos de las colonias del Golfo de California están genéticamente aislados de aquellos de las colonias de la costa Oeste de Baja California y de las de California (Maldonado *et al.*, 1995). El lobo marino de California *Zalophus c. californianus* es el más abundante de las especies de pinnípedos en México y es el único que habita permanentemente el Golfo de California (Aurioles, 1993). Esto lo convierte en una especie de importancia ecológica y puede ser utilizada como un bio-indicador de condiciones ambientales específicas, de presencia y abundancia de ciertos recursos marinos, de niveles de contaminación y de fenómenos ambientales irregulares, entre otros (Aurioles *et al.*, 2000).

Es interesante ver cómo la presencia de anticuerpos contra las diferentes serovariedades nos lleva a la formación de grupos que coinciden con regiones geográficas. Por ejemplo, basados en la dieta del lobo marino, en un estudio realizado entre 1995 y 1996, García y colaboradores (2004) estudiaron 7 colonias del Golfo donde se encontraron 4 grupos, cada uno caracterizado por una dieta en especial. El caso de leptospira puede usarse de indicador de las relaciones entre colonias, debido al tipo de transmisión.

2. Hematología

Es la primera vez que se reportan los valores hematológicos para esta especie en once colonias del Golfo de California, el único trabajo previo es el de Lazo de la Vega (1998), que fue hecho en Cantiles, en crías que no fueron anestesiadas, pero que eran aproximadamente de la misma edad. Se encontraron algunas diferencias con el estudio anterior: el conteo total de glóbulos rojos fue más bajo pero esto puede deberse a que durante la anestesia puede haber captura de GR en el bazo y esto también afectó el valor de MCV. Lo interesante de este estudio es que nos permite comparar colonias, además de que el número de individuos evaluados es mayor. Este trabajo es útil como antecedente para estudios a futuro.

Debemos considerar que los animales fueron sometidos al protocolo de estrés por captura y estaban anestesiados al momento de tomar la muestra. Es probable que la elevación transitoria del cortisol producida por el estrés por captura, no sea lo suficientemente larga o intensa como para afectar las funciones inmunológicas y producir

un leucograma por estrés. Sin embargo, los mamíferos marinos en general se estresan con facilidad por lo que un hemograma que muestra leucocitosis con neutrofilia, linfopenia, eosinopenia y monocitosis, en ausencia de alguna enfermedad evidente, puede ser la respuesta a liberación endógena de corticosteroides y esto con fines prácticos puede considerarse como un hemograma basal “normal”(Bossart y Dierauf, 1990).

Es interesante resaltar que el porcentaje de eosinófilos era diferente en las colonias, lo que nos hace pensar que puede haber diferencias en las cargas parasitarias en las islas o por lo menos esto puede ser un indicador indirecto a utilizar en el futuro. Sin embargo Roletto (1999), encontró una disminución de eosinófilos en animales adultos parasitados, a diferencia de lo que sucede con otras especies en las que la eosinofilia está asociada a parasitosis y lo que sugiere que eosinofilia es el reflejo de una infección parasitaria reciente (Ettinger, 1983).

Es interesante remarcar que los resultados mostraron una relación del tipo de suelo con el porcentaje de eosinófilos, siendo más alta en colonias con suelos arenosos. Hay reportes de presencia de *Uncinaria*. spp en este tipo de suelos en la lobera en la Isla San Miguel en California (Lyons *et al.*, 2001).

Los valores publicados para la especie por autores como Bossart y Dieruaf (1990) y Roletto (1999) son de animales adultos por lo que no pueden ser comparados. Se sabe además que los valores hematológicos varían con la edad. Como es el caso del hematocrito y el valor de la hemoglobina, que disminuyen conforme la cría empieza a ganar peso y empieza a bucear (Bossart y Dierauf, 1990).

Debido a que los títulos de los anticuerpos contra leptospira fueron muy bajos y a que sólo obtuvimos una muestra, no podemos considerar que los animales estaban enfermos, además de que no se observaron los cambios hematológicos característicos de esta enfermedad.

3. Cortisol

No existen reportes anteriores a este acerca de los valores de cortisol sérico de crías de lobos marinos de California en el Golfo de California.

A través del protocolo de estrés por captura fue posible hacer una aproximación para evaluar la respuesta de la glándula adrenal de las crías, ya que la mayoría de los individuos mostró un nivel más alto de cortisol sérico en la segunda muestra, tomada 5 minutos después de la primera. Sin embargo, está es una primera aproximación y sería interesante probar con protocolos diferentes.

La variación de los niveles de cortisol a la captura no se asoció significativamente con factores individuales como peso, condición corporal, edad, entre otros. Estos resultados difieren con otros estudios por ejemplo en reptiles, en los cuales estos factores puede influenciar de forma significativa la respuesta de la glándula adrenal al estrés (Moore, *et al.*, 2000).

En otros animales de vida libre la variación a gran escala en la capacidad de respuesta adrenocortical puede ser explicada por factores ambientales externos. Estudios han demostrado recientemente que eventos climáticos como tormentas severas o eventos como “El Niño”, pueden explicar las variaciones en niveles de cortisol en estrés inducido en otros vertebrados (Romero, 2002). La interacción entre factores externos (eventos climáticos) y factores internos fisiológicos tiene una influencia importante en la capacidad de respuesta adrenocortical en poblaciones de vida libre (Jessop *et al.*, 2003).

Se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos en los niveles de cortisol sérico, esta diferencia ha sido observada en otros pinnípedos como los lobos marinos de Steller en los que las hembras presentan valores de cortisol fecal basales menores a 200 ng/g y picos que van desde 200 a 700 ng/g. Por otro lado, los machos tenían basales que frecuentemente estaban arriba de 200 ng/g con algunos pico arriba de 1,000 ng/g Hunt *et al.*(2004).

Un estudio realizado en elefantes marinos (*Mirounga angustirostris*) realizado por Ortiz *et al.*, (2003) describe los cambios hormonales en cachorros en periodos tempranos del parto, la crianza y hasta 8 semanas después del destete, en los cuales encontró un incremento gradual de cortisol plasmático. En este estudio no se encontraron diferencias en la edad pero es probable que las crías de lobo marino se comporten parecido a las del elefante marino, además de que la edad de destete es diferente.

La correlación positiva con temperatura y niveles de cortisol puede ser explicada por estrés calórico (Minton y Blecha, 1990), algunas de las crías mientras esperaban a ser manejadas, estaban expuestas a las condiciones ambientales, tales como temperatura alta.

Los muestreos en mamíferos marinos en vida libre generalmente están influenciados por la dificultad en las capturas, por lo que en general se capturan animales muy jóvenes, animales varados o enmallados, o animales en cautiverio (Kendall y Atkinson, 2004). Por lo tanto, los resultados están dedicados a describir a estos individuos que no siempre son totalmente representativos.

En este estudio se tomaron muestras de crías de lobos pero no podemos descartar que la respuesta de su glándula adrenal no sea un reflejo de la historia de vida de la madre o de eventos que sucedieron durante la gestación, e incluso en las primeras semanas de vida de la cría. Existe evidencia de una modificación e incluso una hiperactividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) en crías de animales estresados durante la gestación (Buitelaar *et al.*, 2003). Además, varios estudios han demostrado que el comportamiento y la actividad del eje HPA puede ser influenciado por factores postnatales tempranos, como la cantidad de cuidado materno, los niveles de cortisol en la leche de la madre y el manejo de las crías (Weinstock, 1997).

Consideramos que la anestesia pudo no tener un efecto significativo sobre la respuesta del cortisol. Otros estudios (Kendall y Atkinson, 2004) han demostrado que no se encuentran diferencias en los niveles séricos de cortisol entre animales anestesiados y animales manejados con restricción física. Suponemos que fueron, la captura, el manejo y el tiempo de restricción los que marcaron de forma significativa la respuesta adrenocortical.

Existe la necesidad de integrar estudios a largo plazo, particularmente aquellos enfocados en evaluar poblaciones, con estudios de estrés para evaluar como estas interacciones pueden influir variables de la historia de vida de los individuos (Jessop *et al.*, 2003).

Es interesante poder agrupar a las colonias con base en sus niveles de cortisol y que esto coincida nuevamente con la distribución geográfica. Puede ser que la formación de grupos esté determinada por condiciones ambientales y oceanográficas, entonces tanto el

caso de leptospira como el de los niveles de cortisol pueden utilizarse como indicadores de estos factores.

El seguimiento de cambios en la abundancia de animales, la presencia de patógenos y del bienestar en fauna silvestre es crítico para el manejo de enfermedades. Monitorear las poblaciones nos permite determinar su abundancia y posibles mortalidades, monitorear patógenos nos lleva a posibles causas de mortalidad y el seguimiento de eventos de estrés, alertan a los investigadores sobre la existencia de condiciones que pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades (Wasser *et al.*, 2002).

4. Evaluación de colonias

Los resultados de la evaluación son apenas una sugerencia de algunos de los criterios que se podrían utilizar para definir colonias y que a la larga sean una referencia para manejos o intervenciones que tengan que ver con conservar a la especie. Evidentemente Rasito es una colonia que presenta alguna diferencia con las demás pues su puntuación fue muy baja, probablemente al ser una población pequeña y en una superficie pequeña, los animales convivan más estrechamente y tanto la competencia por espacio y la transmisión de enfermedades sean más altas. Partido y Granito también obtuvieron puntuaciones bajas, Granito tiene el valor más alto para porcentaje de eosinófilos y Partido un valor alto el número de lesiones cutáneas (Cuadro14). Las colonias Islotes y Consag parecen ser las que en mejores condiciones se encuentran, con base en la evaluación que se propuso. Además coincide que a nivel de crecimiento poblacional (cuadro 1) son las dos que presentan un balance positivo, además Islotes tiene el mejor puntaje en la condición corporal (cuadro 14)

Sería importante ir definiendo poco a poco cuales son los valores a evaluar y que reflejan de forma más clara la condición de las colonias en el Golfo. Presencia de enfermedades, respuesta adrenal, valores hemáticos, entre otros, pueden ser algunas de las variables a medir para describir regiones del Golfo de California y que a la larga nos definan diferencias entre las poblaciones.

VIII Conclusiones

1. Existe un patrón de distribución geográfico de la respuesta de anticuerpos contra leptospira a lo largo del Golfo.
2. Se encontraron diferencias en la presencia de anticuerpos tanto en títulos como en serovariedades al compararlos con reportes previos.
3. Las serovariedades Hebdomadis, Grippytyphosa, Canicola, Australis y Lai están fuertemente asociadas a la región Sur (Islotes y Farallón de San Ignacio) del Golfo de California. Pyrogenes, Tarassovi, Panama, Ballum, Djasiman e Icterohaemorrhagiae Palo Alto a las islas Rasito y Partido. Las demás islas que se encuentran en el Centro y el Norte parecen no tener una asociación específica con algunas serovariedades.
4. Los niveles de cortisol son más altos en la región Sur que en la región Norte del golfo y esto puede estar asociado a diferencias oceanográficas entre ambas, que definen por ejemplo la disponibilidad de alimento y eventos climáticos entre otros.
5. La respuesta al estrés agudo de las crías de *Zalophus californianus* apoya la conclusión de que el eje HPA en lobos marinos es activado en respuesta a estrés por captura y manejo. Aunque son necesarios más estudios para definir con claridad la respuesta de la glándula adrenal en esta especie y en animales de esta edad.
6. Se necesita más investigación sobre otros factores que pueden afectar los niveles de cortisol sérico, como efecto de la dieta, ritmos estacionales y diurnos, edad y frecuencias de alimentación por ejemplo. Además de comparaciones entre especies de pinnípedos.

7. Los valores hemáticos obtenidos representan una base de referencia para estudios posteriores. Fueron un reflejo del estado de salud de los individuos en ese momento y también podrían reflejar diferencias regionales, como en el caso del porcentaje de eosinófilos.

8. Es posible definir variables que nos ayuden a calificar a las colonias y que a larga sean valores de referencia para definir manejos en la especie.

Literatura Citada

Acevedo-Whitehouse K. El lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) en el Golfo de California: Hallazgos Patológicos. Tesis Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1999.

Acevedo-Whitehouse K, Gulland FMD, de la Cueva H, Aurioles GD, Arellano-Carbajal F, Suarez Güemes F. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *Journal of Wildlife Diseases* 2003; 39:145-151.

Alvarez-Borrego, S. & Lara-Lara, R. The physical environment y primary production of the Gulf of California. Dauphin, J. P. y Simone, B.. *The Gulf y Peninsular Province of California: Amer. Assoc. of Petrol. Geol.* 47, 555-556. 1991.

Aurioles GD. Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos en México. *Rev Soc Mex Hist N* 1993; Vol Esp (XLIV):397-412.

Aurioles, G. D., Castro, G. I., García, R. F., Luque, F. L., Godínez, C. R., Brousset, D., Montaña, H. J. & Perez-Gil, R. F. Estado de salud de las poblaciones de lobo marino *Zalophus californianus* en el Golfo de California. *Memorias del Primer Congreso de Responsables de Proyecto de Investigación en Ciencias Naturales, CONACYT; Veracruz, México: 2000.*

Aurioles GD, Díaz-Guzman C, Le Boeuf BJ, Casper D. Incidence of temporomandibular arthritis in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Mammalogy*. In press.

Aurioles, G. D., Luque, S., García, R. F., Brousset, D., Parás, A., Montaña, J., Rosiles, R., Aguiñiga, A.S., Acevedo-Whitehouse, K. & Elorriaga, V.F . Exploración de variables biológicas y ecológicas de las poblaciones de lobo marino (*Zalophus californianus*) del Golfo de California: Regionalización para el manejo. Veracruz, México: 2002.

Aurioles GD, Sinsel F. Winter migration of subadult male California sea lions (*Zalophus californianus*) in the Southern part of Baja California. *J Mammal* 1983; 64:513-518.

Aurioles GD, Zavala GA. Algunos factores ecológicos que determinan las distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas* 1994; 20:535-553.

Aurioles, GD, Díaz-Guzman,C, Le Boeuf, BJ, Casper, D. Incidence of temporomandibular arthritis in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Mammalogy* (en prensa) 2004

Banks KL. Host defense in the newborn animal. *JAVMA* 1982; 181:1053-1056.

Bender LC, Hall PB. *Leptospira interrogans* exposure in free ranging elk in Washington. *Journal of Wildlife Diseases* 1996; 32:121-124.

Benjamin MM. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. Mexico: Limusa, 1987.

Bolin CA. Leptospirosis. In: Fowler ME, Miller R, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine*. Missouri: Saunders, 2003.

Bossart D, Dierauf LA. Marine Mammal Clinical Laboratory Medicine. In: Dierauf LA, editor. *Handbook of Marine Mammal Medicine: Disease and Rehabilitation*. Washington, D. C.: CRC Press, 1990: 1-52.

Bourillón ML, Cantú A, Eccardi AF, Lira FE, Ramírez R.J., Velarde E *et al.* *Islas de Golfo de California*. Mexico: 1988.

Broom DM. Welfare assesment and welfare problems araeas during handling and transport. In: Grandin T, editor. *Livestock Handling and Transport*. Wallingford: CAB International, 1993.

Buitelaar JK, Huizink AC, Mulder EJ, Robles de Medina PG, Visser GHA. Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiology of aging* 2003; 24:S53-S60.

Bunneli JE, Hice CL, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM. Detection of pathogenic *Leptospira* spp infections among mammals captured in the peruvian amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63:255-258.

Caldwell MC, Caldwell DK. Behavior of Marine mammals. In: Ridgway SH, editor. *Mammals of the sea, biology and medicine*. U.S.A: Charles C. thomas Publisher, 1972.

Carter SD, Hughes DE, Baker JR. Characterization and measurement of immunoglobilins in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Journal of Comparative Phathology* 1990; 102:13-23.

Cockram MS, Ranson M, Imlah P, Goddard PJ, Burrels C, Harkiss GD. The behavioural, endocrine and immune responses of sheep to isolation. *Animal Production* 1994; 58:389-399.

Collins MT, Suárez- Güemes F. Effects of hydrocortisone on circulating lymphocyte numbers and their mitogen-induced blastogenesis in lambs. *American Journal of Veterinary Research* 1985; 46:836.

Degabriele R, Fell LR. Changes in behavior, cortisol and lymphocyte types during isolation and group confinement of sheep. *Immunology and Cell Biology* 2001; 79:583-589.

Dierauf LA, Vanderbroek DJ, Roletto JBA, Koski M, Amaya L. An epizootic of leptospirosis in California sea lions. *JAVMA* 1985; 187:1145-1148.

- Dunn JL. Bacterial and mycotic diseases of cetaceans and pinnipeds. In: Dierauf LA, editor. Handbook of Marine Mammal Medicine: Disease and Rehabilitation. Washington, D. C.: CRC Press, 1990.
- Ellis WA. Leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice* 1986; 27:683-692.
- Ettinger SJ. Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat. New South Wales, Australia: W. B. Saunder Company, 1983.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Letospirosis. 2 ed. Melbourne Australia: MediSci, 1999.
- Gage LJ. Pinnipedia (Seals, Sea Lions, Warluses). In: Fowler ME, Miller R, editors. Zoo and Wildanimal Medicine. Missouri: Saunders, 2003.
- García RF, Aurióles GD. Spatial and temporal variation in the diet of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Fish Bulletin* 2004; 102:47-62.
- Geraci JR. Husbandry of Marine Mammal (Cetacea, Pinnipedia and Sirenia). In: Fowler ME, Miller R, editors. Zoo and Wild Animal Medicine. Missouri: Saunders, 1986.
- Gilmartin WG, DeLong R, Smith AW, Sweeney JC, DeLappe BW, Risebrough RW *et al.* Premature parturition in the California sea lion. *Journal of Wildlife Diseases* 1976; 12:104-115.
- Gisiner R, Schusterman RJ. California sea lion pups play an active role in reunion with their mothers. *Animal Behavior* 1991; 41:364-366.
- Godínez CR, Zelaya de Romillo B, Aurióles GD, Verdugo-Rodríguez A, Rodríguez-Reyes EA, de la Peña-Moctezuma A. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups of the Gulf of California. *Journal of Wildlife Diseases* 1999; 35:108-111.
- Griffin JFT. Stress and immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1989; 20:263-312.
- Gulland FMD. The impact of parasites on wild animal populations. *Parassitologia* 1997; 39:287-291.
- Gulland FMD. Leptospirosis in marine mammals. In: Fowler ME, Miller RE, editors. Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999: 469-471.
- Gulland FMD, Koski M, Lowenstine LJ, Colagross-Schouten AM, Morgan L, Spraker TR. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981-1994. *Journal of Wildlife Diseases* 1996; 32:572-580.

Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Crimes DJ *et al.* Emerging infectious diseases. Climate links and anthropogenic factors. *Science* 1999; 285:1505-1509.

Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. *JAVMA* 1994; 205:1518-1523.

Hernández CJC. Dinámica poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, la lobera de Los Islotes, Golfo de California, México. Tesis Licenciatura Facultad de Ciencias. UNAM, 1996.

House C, Alonso AA, House JA. Emerge of infectious diseases in marine mammals. In: Alonso AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearls MC, editors. *Conservation Medicine. Ecological health practice*. New York: Oxford University Press, 2002: 105-117.

Jessop TS, Tucker AD, Limpus JC, Whittier JM. Interactions between ecology, demography, capture stress, and profiles of corticosterone and glucose in a free-living population of Australian freshwater crocodiles. *General and Comparative Endocrinology* 2003; 132:161-170.

Kendall LM, Atkinson S. Evaluation of adrenal function in serum and feces of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, sample storage, and age on glucocorticoid metabolism. *General and Comparative Endocrinology* 2004; in press.

King DP, Sanders JL, Nomura CT, Stoddard RA, Ortiz CL, Evans SW. Ontogeny of humoral immunity in northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) neonates. *Comp Biochem Physiol* 1998;(121B):363-368.

King JE. *Seals of the world*. Cornell Univ. Press, 1983.

Lacoumenta S, Paterson JL, Burrin J, Causon RC, Brown MJ, Hall GM. Effects of two differing halothane concentrations on the metabolic and endocrine responses to surgery. *British Journal of Anaesthesiology* 1986; 58:844-850.

Lazo de la Vega AT. Obtención de los valores medios de biometría hemática en crías de lobo marino común *Zalophus californianus*, durante el verano de 1994 en los Cantiles, Isla Angel de la Guarda, Golfo de California, México Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.

Le Boeuf BJ, Auriolos GD, Condit R, Fox C, Gisiner R, Romero R *et al.* Size and distribution of the California sea lion population in Mexico. *Proceedings of the California Academy Science* 1983; 43:77-85.

Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14:296-326.

Luque FL, Auriolos GD. Sex differences in body size and body condition of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups in the Gulf of California. *Marine Mammal Science* 2001; 17:147-160.

- Lyons ET, Melin SR, DeLong R, Orr AJ, Gulland FMD, Tolliver SC. Current prevalence of adult *Uncinaria* spp. in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) pups on San Miguel Island, California, with notes on the biology of these hookworms. *Veterinary Parasitology* 2001; 97:309-318.
- Maldonado JE, Orta-Davila F, Stewart BS, Geffen E, Wayne RK. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science* 1995; 11:46-58.
- Maluf LY. The Physical Oceanography. In: Cassey TJ, Cody ML, editors. *Island Biography of the Sea of Cortez*. University of California Press, 1983: 26-48.
- Marquez MEI, Carlini AR, Slobodianik NH, Ronayne de Ferrer PA, Godoy MF. Immunoglobulin M serum levels in females and pups of southern elephant seal (*Mirounga leonina*). *Comp Biochem Physiol* 2004; 119A:795-799.
- McIlhattan TJ, Martin JW, Wagner RJ, Iversen JO. Isolation of *Leptospira pomona* from naturally infected California sea lion, Sonoma County, California. *Journal of Wildlife Diseases* 1971; 7:195-197.
- Meaney MJ, Dioro J, Francis D, Widdowson J, Johnson DW. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience* 1996; 18:49-72.
- Medway W, Geraci JR. Clinical Pathology of Marine Mammals (Cetacea, Pinnipedia and Sirenia). In: Fowler ME, editor. *Zoo and Wild Animal Medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1986: 791-797.
- Meléndez, V. P. Prueba de aglutinación microscópica, procedimiento y valor diagnóstico. *Memorias primer seminario. Taller Nacional sobre el diagnóstico y control*. 1997g
- Michna SW. Leptospirosis. *Veterinary Record* 1970; 86:484-496.
- Minton JE, Blecha F. Effect of acute stressors on endocrinological and immunological functions in lambs. *Journal of Animal Science* 1990; 68:3145-3151.
- Moore IT, Lemaster MP, Mason RT. Behavioural and hormonal responses to capture stress in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis paretalis*. *Animal Behaviour* 2000; 59:529-534.
- Munck A, Guyre P, Holbrook N. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their reaction to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 1984; 5:25-44.
- Odell DK. California sea lion, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828). In: Ridgway SH, Harrison RJ, editors. *Handbook of Marine Mammals: The walrus, sea lions, fur seals and sea otter*. London: Acad. Press. London, 1981: 67-97.

Office International des Epizooties. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 2nd ed. Paris: 1992.

Ortiz RM, Noren DP, Ortiz CL, Talamantes F. GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). J Endocrinol 2003; 178:533-539.

Oyama T, Taniguchi K, Ishihara H, Matsuki A, Maeda A, Murakawa T *et al.* Effects of enflurane anaesthesia and surgery on the endocrine function in man. British Journal of Anaesthesiology 1979; 51:141-147.

Pérez CL. Técnicas estadísticas con spss. Madrid: Prentice Hall, 2001.

Postic D, Merien F, Perolat P, Baranton G. Diagnostic Biologique Leptospirose - Borreliose de Lyme. 2nd ed. France: Institute Pateur, 2000.

Reindjers P, Brasseur S, Van der Toorn J, Van der Wolf P, Harwood J, Lavigne D *et al.* Seals, fur seal and walrus. Status survey and conservation action plan. 1993.

Roletto JBA. Hematology and serum chemistry values for clinically healthy and sick pinnipeds. Journal of Zoo and Wildlife Disease 1999; 24:145-147.

Romero LM. Seasonal changes in plasma glucocorticoids concentrations in free-living vertebrates. General and Comparative Endocrinology 2002; 128:1-24.

Ross PS, de Swart IKG, Visser LJ, Vedder W, Bowen WD, Osterhaus ADME. Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*. Veterinary Immunology and Immunopathology 1994; 42:331-348.

Ross PS, Pohajadak B, Bowen WD, Addison RF. Immune function in free-ranging harbour seal (*Phoca vitulina*) mothers and their pups during lactation. Journal of Wildlife Diseases 1993; 29:21-29.

Santamaría-del Angel E, Alvarez-Borrego S, Muller-Karger FE. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. Journal of Geophysical Research 1994; 99(C4):7411-7421.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine Reviews 2000; 21:55-89.

Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ. Hematología Vetrinaria. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1981.

- Schramm, Y., Mesnick, S., de la Rosa, J., Hyde, J., Palacio, D., Snell, H. & Dizon, A. Genetic structure of California y Galapagos sea lions. Vancouver, Canadá. Abstracts of the 14th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 2001
- Schroeder JP. Reproductive aspects of marine mammals. In: Dierauf LA, editor. Handbook of Marine Mammal Medicine: Disease and Rehabilitation. Washington, D. C.: CRC Press, 1990: 353-369.
- Seyle H. The evolution of the stress concept. American Science 1973; 61:692-699.
- Smith AW, Brown RJ, Skilling RL, Bray HL, Keyes MC. Naturally-occurring leptospirosis in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). Journal of Wildlife Diseases 1977; 13:144-148.
- Smith AW, Brown RJ, Skilling RL, DeLong R. *Leptospira pomona* and reproductive failure in California sea lions. JAVMA 1974; 165:996-998.
- Stamper MA, Gulland F.M.D., Spraker TR. Leptospirosis in rehabilitated pacific harbor seals from California. Journal of Geophysical Research 1998; 34:407-410.
- Szteren, D, Auriolos GD, Gerber, LR. Are California Sea Lions in the Gulf of California, Mexico, Increasing in Abundance? Sea Lions of the World: Conservation and Research in the 21st Century 22nd Lowell Wakefield Fisheries Symposium Anchorage, Alaska: 2004.
- Taylor PM. Equine stress responses to anaesthesia. British Journal of Anaesthesiology 1989; 69:702-709.
- Thomson CA, Geraci JR. Cortisol, aldosterone and leucocytes in the stress reponse on bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 1986; 43:1010-1016.
- Traynor C, May GM. Endocrine and metabolic changes during surgery: anaesthetic implications. British Journal of Anaesthesiology 1981; 53:153-160.
- Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary haemorrhage-Nicaragua, 1995. Journal of Infectious Diseases 1998; 178:1457-1463.
- Vedros NA, Smith AW, Schoneweld J, Migaki G, Hubbard R. Leptospirosis epizootic among California sea lions. Science 1971; 172:1250-1251.
- Wasser SK, Hunt KE, Clarke CM. Assesing stress and population genetics through noninvasive means. In: Alonso AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearls MC, editors. Conservation Medicine. Ecological health practice. New York: Oxford University Press, 2002: 130-141.

Weinstock M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neuroscience and Behavioral Reviews* 1997; 21:1-10.

Wendelaar Bonga SE, Balm PHM. Histological and histopathological effects of stress. In: Balm PHM, editor. *Stress physiology in animals*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999: 178-204.

Wingfield JC. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: Clemons J., Bucholz R., editors. *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild*. Cambridge: Cambridge University Press., 1997.

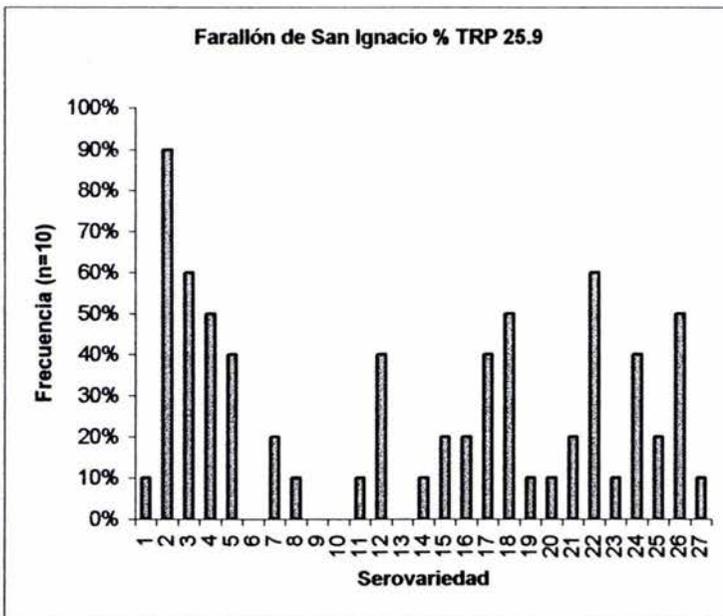
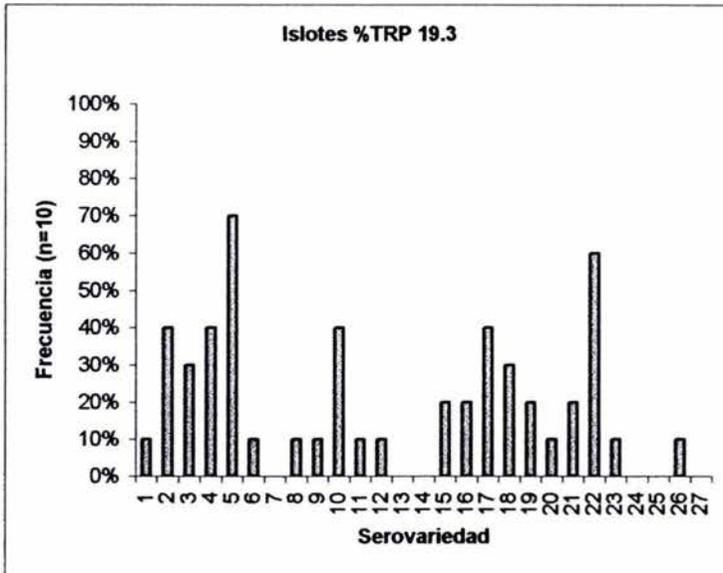
Wingfield JC, Ramenofsky M. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: Balm PHM, editor. *Stress physiology in animals*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999: 1-51.

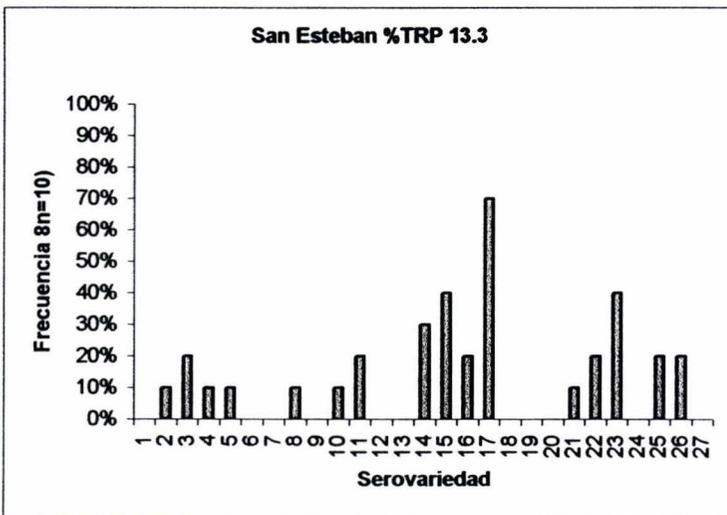
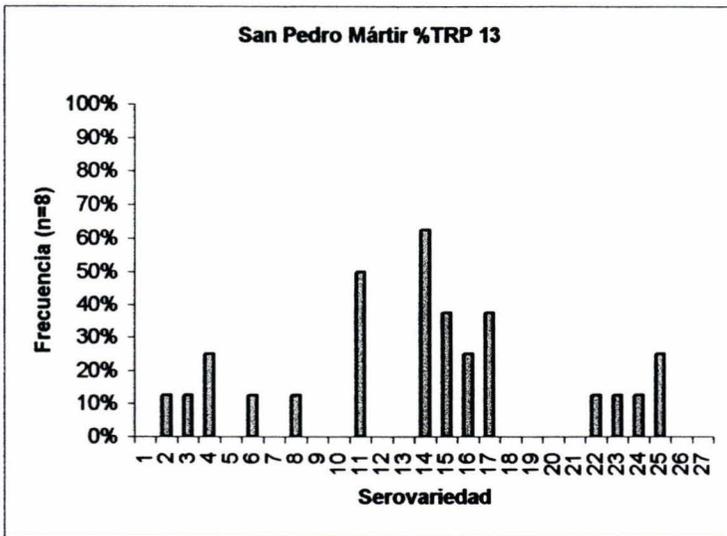
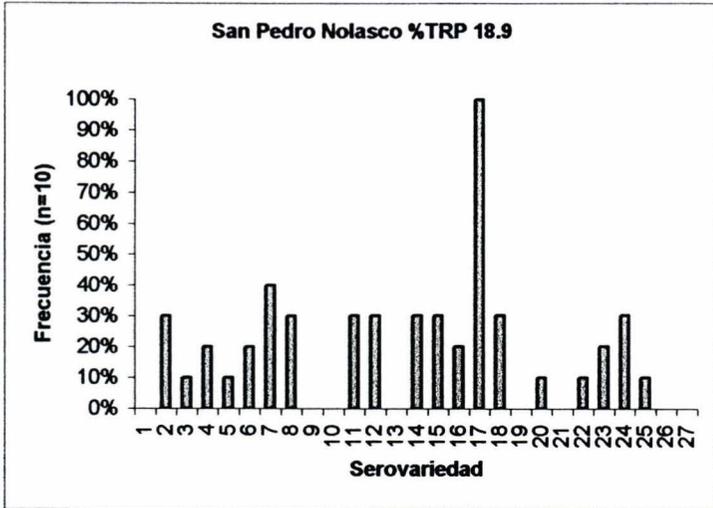
Yanagawa R, Adachi Y. Identification of some Japanese leptospiral strains as serotypes Copenhageni and icterohaemorrhagiae by precipitin-absorption test in gel ZBL. *Bakt. Hyg. J Abt Orig A* 1977; 237:96-103.

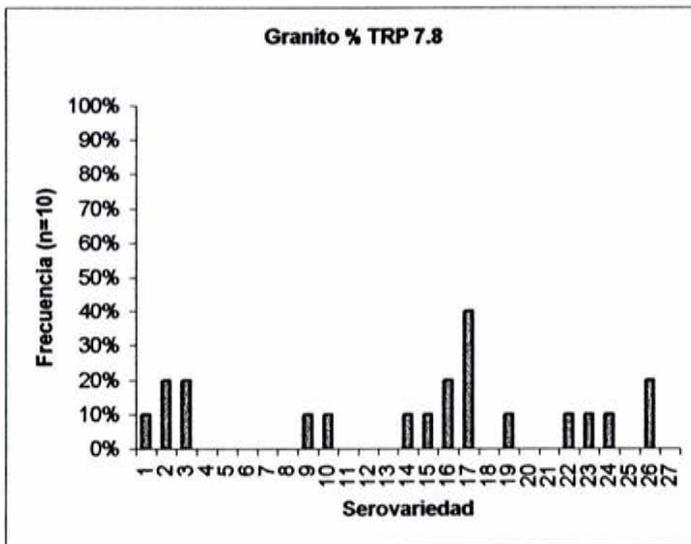
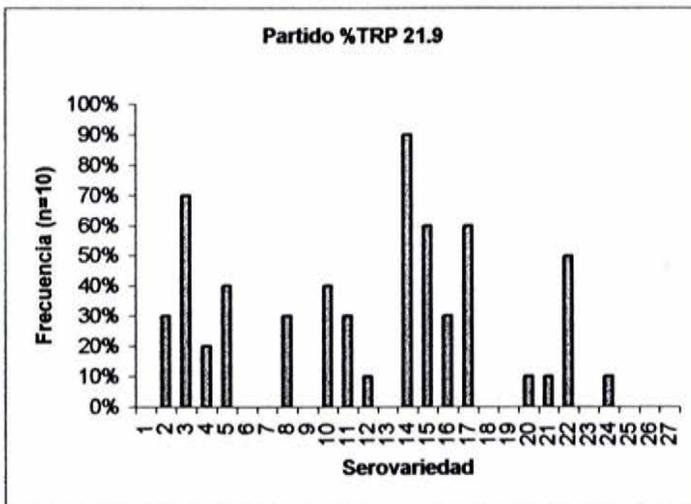
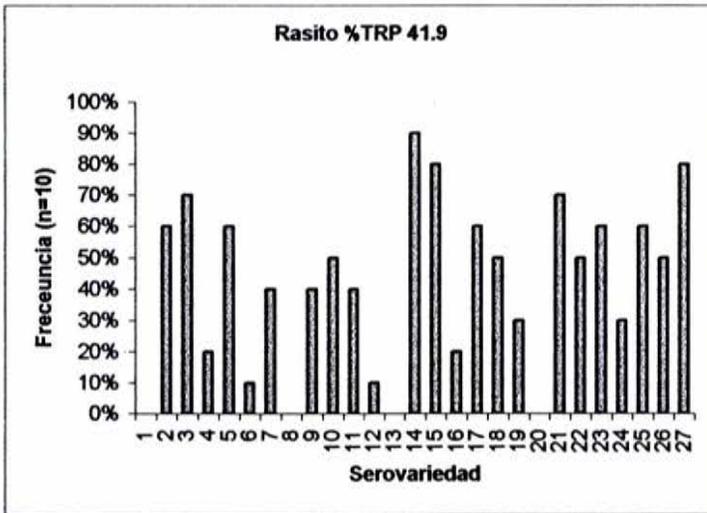
Zavala GA. La población de l lobo marino común (*Zalophus californianus californianus*) en las Islas del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1990.

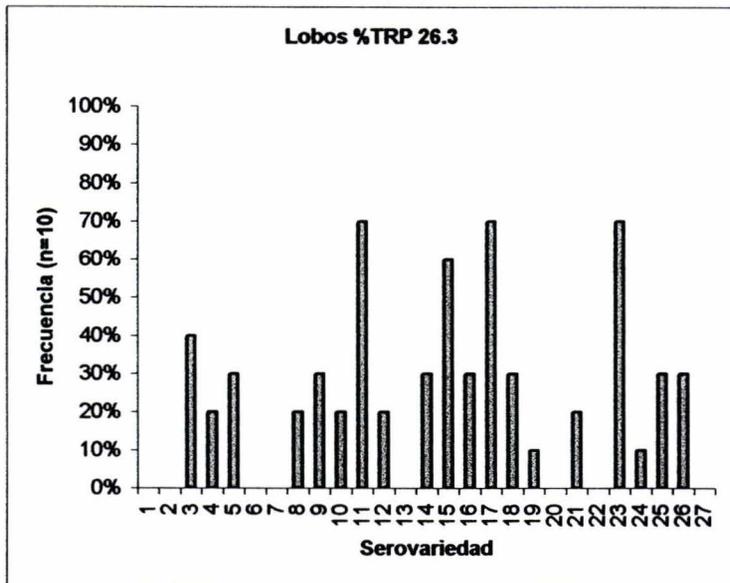
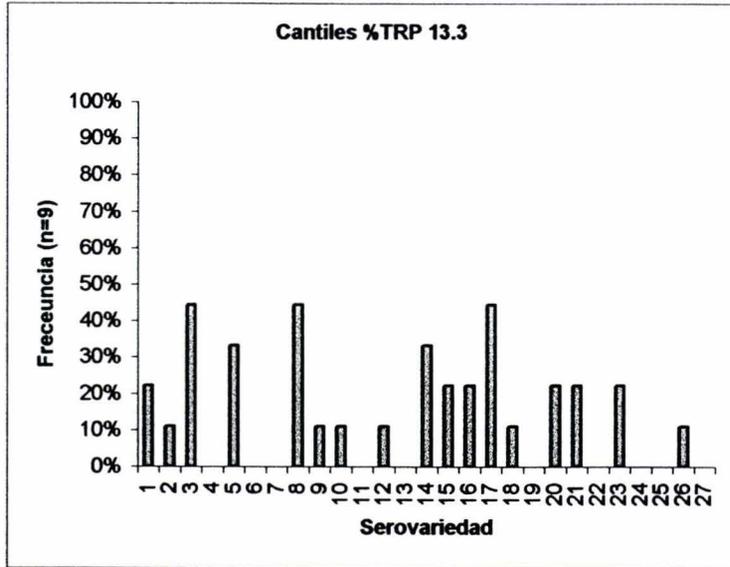
Zavala GA. Biología poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) en la región de las Grandes Islas del Golfo de California. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, 1993.

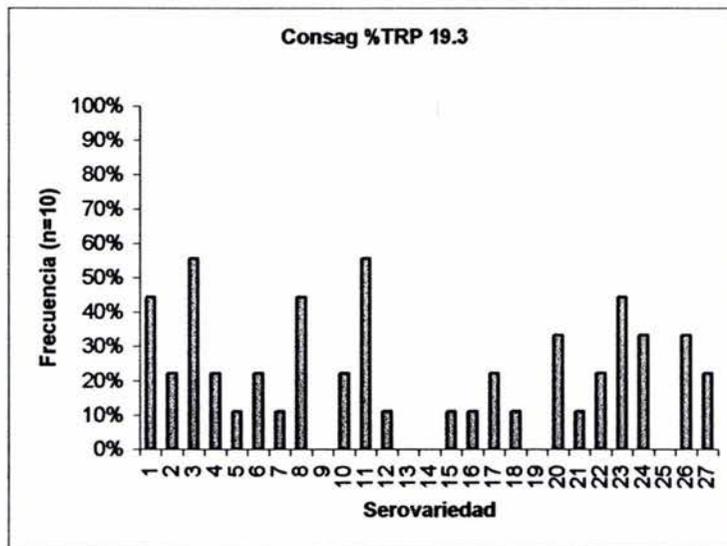
APENDICE I Frecuencia de presencia de anticuerpos contra leptospira en las 11 colonias. Para cada colonia se indica el porcentaje de individuos positivos (TRP).











1 Icterohaemorrhagiae, 2 Hebdomadis, 3 Pyrogenes, 4 Grippytyphosa, 5 Canicola, 6 Pomona, 7 Hardjobovis, 9 Wolffi, 10 Tarassovi, 11 Bratislava, 12 Autumnalis, 13 Shermani, 14 Panama, 15 Ballum, 16 Bataviae, 17 Patoc, 18 Australis, 19 Cynopteri, 20 Celledoni, 21 Djasiman, 22 lai, 23 Mozdok, 25 Portland-vere Sinaloa, 26 Hardjobovis, H-89, 27 Icterohaemorrhagiae Palo Alto.

APENDICE II Valores hematológicos de crías de lobos marinos en las 11 colonias

<i>ISLOTES</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
GB	10	5.75	2.36
GR	10	2.01	0.38
HGB	10	715	0.85
HTO Campo	10	51.0	5.89
HTO Lab	10	426.8	5.29
VCM	10	259.95	40.97
HCM	10	37.20	10.71
CHCM	10	7219	11.01
PT	10	5.29	0.48
Neutrof	10	76.50	8.86
Bandas	10	070	0.82
Linfos	10	20.10	10.89
Monos	10	2.20	2.04
Eosin	10	0.50	0.71

<i>FSI</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
GB	10	8.4	3.1
GR	10	2.0	0.4
HGB	9	8.0	1.2
HTO Campo	10	47.5	6.6
HTO Lab	9	33.0	16.2
VCM	9	243.5	51.6
HCM	9	40.0	8.0
CHCM	9	60.8	5.7
PT	10	5.2	0.3
Neutrof	10	71.9	9.9
Bandas	10	0.6	1.3
Linfos	10	25.7	10.2
Monos	10	0.9	1.2
Eosin	10	0.9	1.7

<i>SPN</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
GB	10	5.63	2.64
GR	10	1.93	0.69
HGB	1	7.0	1.15
HTO Campo	10	53.4	9.58
HTO Lab	10	49.03	8.43
VCM	1	290.16	0
HCM	1	36.27	0
CHCM	1	80.0	0
PT	0	0	0
Neutrof	10	69.30	9.41
Bandas	10	0.60	0.70
Linfos	10	25.40	9.38
Monos	10	2.60	2.46
Eosin	10	2.10	2.51

<i>SPM</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
GB	7	6.51	2.02
GR	7	2.30	0.35
HGB	0	0	0
HTO Campo	8	47.0	4.00
HTO Lab	7	44.21	8.64
VCM	0	0	0
HCM	0	0	0
CHCM	0	0	0
PT	0	0	0
Neutrof	7	71.43	7.89
Bandas	7	1.00	1.53
Linfos	7	22.14	8.19
Monos	7	1.50	0.57
Eosin	7	3.14	0.80

<i>SE</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
GB	10	5.7	1.6
GR	10	1.9	0.3
HGB	2	6.5	0.7
HTO Campo	10	47.3	4.9
HTO Lab	10	42.5	7.7
VCM	2	249.6	47.7
HCM	2	32.1	1.8
CHCM	2	77.5	10.6
PT	2	5.6	78.0
Neutrof	10	6.2	23.6
Bandas	10	0.8	1.0
Linfos	10	27.9	17.3
Monos	10	4.6	6.1
Eosin	10	2.5	1.5

GB x 10³
 GR x 10⁶
 HB g/dl
 VCM fl
 HCM pg
 CHCM %
 PT mg/dl
 Neutrófilos %
 N. Bandas %
 Linfocitos %
 Monocitos %
 Eosinófilos %

Rasito	N	Media	SD
GB	10	7.33	3.28
GR	10	1.79	1.08
HGB	10	9.05	0.98
HTO Campo	10	54.0	4.90
HTO Lab	8	42.48	5.83
VCM	10	356.95	117.72
HCM	10	59.04	17.60
CHCM	10	60.8	9.42
PT	10	5.80	0.73
Neutrof	10	68.56	9.46
Bandas	10	0.78	0.97
Linfos	10	27.56	10.71
Monos	10	2.11	3.59
Eosin	10	1.00	0.87

Partido	N	Media	SD
GB	10	7.25	2.44
GR	10	1.50	0.21
HGB	10	9.65	0.94
HTO Campo	10	37.20	3.65
HTO Lab	9	41.69	5.43
VCM	10	251.88	31.17
HCM	10	65.58	10.28
CHCM	10	38.66	2.94
PT	10	6.02	0.75
Neutrof	10	68.50	8.81
Bandas	10	1.00	1.05
Linfos	10	26.20	8.12
Monos	10	3.20	2.49
Eosin	10	1.10	1.60

Granito	N	Media	SD
GB	9	4.9	0.7
GR	9	1.8	0.5
HGB	10	10.4	1.6
HTO Campo	10	43.5	5.2
HTO Lab	10	45.0	8.4
VCM	9	250.4	51.1
HCM	9	62.2	12.5
CHCM	9	40.3	2.2
PT	10	5.2	0.2
Neutrof	10	71.7	9.6
Bandas	10	0.3	0.7
Linfos	10	20.4	8.0
Monos	10	3.6	2.8
Eosin	10	4.0	3.3

Cantiles	N	Media	SD
GB	9	6.77	5.53
GR	9	2.19	0.44
HGB	9	9.67	1.64
HTO Campo	9	38.33	7.37
HTO Lab	9	43.90	10.22
VCM	9	177.86	30.01
HCM	9	45.10	5.88
CHCM	9	39.77	4.10
PT	9	5.40	0.76
Neutrof	9	74.00	8.12
Bandas	9	0.67	1.00
Linfos	9	22.33	8.08
Monos	9	1.44	0.53
Eosin	9	1.56	1.67

Lobos	N	Media	SD
GB	10	9.94	1.53
GR	10	2.28	0.49
HGB	10	8.40	1.65
HTO Campo	10	37.50	3.98
HTO Lab	9	41.11	13.41
VCM	10	170.10	3245
HCM	9	46.67	13.34
CHCM	10	45.78	7.21
PT	10	5.16	0.32
Neutrof	10	62.90	24.0
Bandas	10	2.10	5.95
Linfos	10	31.20	23.47
Monos	10	1.70	1.34
Eosin	10	2.10	3.00

Consag	N	Media	SD
GB	9	5.30	2.91
GR	9	1.81	0.46
HGB	0	0	0
HTO Campo	9	41.0	1.05
HTO Lab	7	38.14	7.27
VCM	0	0	0
HCM	0	0	0
CHCM	0	0	0
PT	0	0	0
Neutrof	9	72.11	8.19
Bandas	9	0.89	1.36
Linfos	9	22.33	7.78
Monos	9	1.78	1.56
Eosin	9	2.89	1.36