



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“IDENTIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE
POLIMERASA Y ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL PATOGENICO DE
HERPESVIRUS EN DELFINES NARIZ DE BOTELLA (*Tursiops sp.*)
MANTENIDOS EN CAUTIVERIO EN QUINTANA ROO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARÍA TERESA VENCES FERNÁNDEZ

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA
COASESORA: DRA. MARÍA ALEJANDRA AYANEGUI ALCÉRRECA



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Identificación por reacción en cadena de polimerasa y análisis del
 posible papel patogénico de herpesvirus en delfines nariz de botella
 (Tursiops sp.) mantenidos en cautiverio en Quintana Roo"

Que presenta la pasante María Teresa Vences Fernández
 Con número de cuenta: 302775347 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 19 de Noviembre de 2010

- PRESIDENTE MC. Raúl Mar Cruz
- VOCAL Dr. Guillermo Valdivia Anda
- SECRETARIO MVZ. Gerardo López Islas
- 1er SUPLENTE Dra. Cynthia González Ruíz
- 2º SUPLENTE MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo

[Handwritten signatures of the board members]

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN216005.

Cátedra de Investigación FESC: IN. 2.14. Y CONS 210

Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE
200707

El trabajo fue realizado con el equipo e instalación de:

Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria
en Salud Animal de la FESC, Campo 4

Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

AGRADECIMIENTOS

A mi tío, Javier Fernández Ramírez, te dedico mi carrera con todo el corazón. Al principio dudaste que fuera una buena idea, con el tiempo te diste cuenta que podría hacer algo bueno con ella, pero lo mejor de todo fue que antes de partir al cielo me demostraste que te sentías orgulloso de mí; mil gracias por haber existido y por dejarme conocerte. Tú me enseñaste que los sueños se pueden hacer realidad con amor, trabajo, esfuerzo, ánimo, perseverancia, ganas y con humildad, también me enseñaste que llorar no es malo, que la sensibilidad no es lo mismo que la debilidad, gracias por todo Tío Pancho. Odio que te hayas ido, nos haces mucha falta a todos. Te amo y te extraño con todas mis fuerzas.

Mi carrera y tesis te la dedico a ti, mamá, porque me has enseñado a ser independiente, constante, responsable, me das consejos, me has dejado ser, nunca me dejas caer y porque a pesar de lo que sea, siempre estas a mi lado para acurrucarme en tus brazos y secar mis lágrimas cuando lo necesito. Sin tu apoyo y enseñanzas no confiaría en mí. Gracias por heredarme la fortaleza que te caracteriza, gracias por darme la vida, gracias por la vida que me has dado y gracias por la familia que tengo. Te amo.

A mi hermano, Joel, al principio una distancia tan grande nos separaba en todos los sentidos, de pronto al compartir momentos tan intensos se acortó esa distancia, ahora te agradezco que siempre has estado presente en mi vida, creciendo juntos, apoyándome y sobretodo porque crees en mí y en lo que hago. Una vez más te agradezco por entrar en mi mundo y por permitirme entrar al tuyo. Te amo gordo y siempre te extraño.

A todos mis tíos Fernández y familia, primos y primas, les agradezco el amor, los consejos, las bromas, los juegos, la fraternidad, la unión, las lágrimas y sobretodo el ejemplo que me han dado, ahora sé que debo caminar hacia el frente sin mirar atrás, esforzarme por las cosas que quiero, que al caer debo de levantarme, creer en mí, tener fé, confiar en los demás, preocuparme por los que están a mi alrededor, agradecer por las cosas que tengo, hacer las cosas por gusto y no por obligación. Lo más importante es que la distancia no ha sido impedimento para compartir todo esto. Los amo.

Tía Muñe, gracias por todo lo que hemos compartido, por preocuparte siempre por mi bienestar, por demostrarme tu amor y por acompañarme en momentos tan difíciles, sin ti no hubiera sido posible salir completa de ese hospital hace 4 años. Gracias por estar tan cerca a pesar de la distancia y muchas gracias por ser mi segunda madre.

Tía Chabe gracias por tu cariño, por tu tiempo, por haber compartido momentos fuertes, por no dejarme sola, por acompañarme en momentos importantes y por ayudarme en muchas ocasiones que te necesité.

Tío Carlos, antes no estaba muy segura, pero ahora sé que cuento contigo, gracias por acercarte a mí sin que yo te lo pidiera, por escuchar mis inquietudes y por aconsejarme el día que te diste cuenta de mi malestar.

Tío Armando, gracias por animarme a echarle ganas siempre, por compartir conmigo tu cariño, tu creatividad y por enseñarme que si uno no persigue sus sueños puede dejar de ser feliz.

Daniel, te agradezco especialmente, porque confiaste en mí y en mi carrera desde el primer momento, gracias por todos los momentos que compartimos, risas, un baile, juegos, enojos y peleas bobas como de hermanos, pues eso somos, hermanos. Gracias por creer en mí Danielukillis.

A mis tíos Vences, Tío Jaime y familia, Tía Cristina e hijos, gracias por no olvidarme a pesar de la distancia y los años que dejamos de vernos, le doy gracias al cielo por encontrarlos.

Tío Jaime, regresaste a mi vida en un momento increíble, cuando un golpe tan fuerte me desplomó, de pronto tú estabas ahí para amortiguarlo, pero lo mejor de todo es que estoy completamente segura que lo seguirás haciendo. Rossy, gracias por cuidar a mi tío y por el cariño que me das. René, gracias por compartir conmigo tu tiempo, tu hermosa familia, tu vida y tu ser. Los amo y los extraño, pero ahora sé donde los puedo encontrar y tengo la seguridad de que están bien.

Gracias a la gente que constituye esta maravillosa universidad, la UNAM, a la cual jamás pensé que podría amar con tanto fervor. Muchas gracias a los profesores que hacen que el nombre de la FES Cuautitlán sea grande, lo cual me hace sentir orgullosa de pertenecer a ella. Mi agradecimiento especial para el Dr. Jorge Tórtora y el Dr. Jorge “George Harrison” López por dedicar a sus alumnos un esfuerzo constante, porque fueron sinceros y porque me divertí mucho con ellos.

Dr. Valdivia, gracias por asesorarme para la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de trabajar con una especie que ha llamado mi atención desde hace mucho tiempo.

A la Dra. Alejandra Ayanegui Alcérreca. Ale, gracias por dejarme conocerte, por tus consejos, por compartir conmigo tu tiempo, tus conocimientos, tus pensamientos, tu buena vibra, tus experiencias y muchas más gracias por prestarme tu hombro cuando lo necesité para llorar.

César Cuenca Verde, gracias porque nunca te negaste a ayudarme, por no desesperar, por compartir tu experiencia conmigo, por escucharme cada que tenía una crisis emocional, por demostrarme tu cariño y por darme tu amistad con los ojos cerrados, sabes que eres correspondido.

Doctores Nacho Soto y Cris Mercado, mil gracias por brindarme su tiempo, su ayuda y por soplar junto conmigo esos nubarrones llenos de dudas.

Dr. Juan Carlos del Río, gracias por tus palabras alentadoras y por hacerme sentir importante en momentos de absoluta depresión en los que sentía que el mundo estaba sobre mis hombros, sabes que TQMMM.

Doc. Gerardo Garza Malacara, gracias por no dejarme caer por la borda de la ignorancia clínica mientras abordaba el barco de la investigación, por compartir su tiempo, su amistad, consejos, apoyo, conocimiento y también por ayudarme con las cosas que están en sus manos.

Les agradezco a todos los que me regalaron su amistad y que compartieron parte de su vida conmigo.

A la bola, Diego, mi mugre y mi primer amigo en la universidad, Cecci, nunca dejemos de reír, Sal, Chío, Karla, Moni, Gibran, y Sandro, compañeros de recreación y los primeros en demostrarme que los amigos de la universidad son únicos; finalmente los intereses que nos unieron al inicio nos separaron poco a poco, cuando cada quien decidió seguir un camino distinto. Gracias por los hermosos momentos que pasamos juntos.

A los seis, en orden de formación, Marco capricornio, Marco fresa, Chos, Itz y Lana, porque a pesar de ser tan diferentes, fue el primer y único equipo en mi vida que ha funcionado a la perfección para trabajar, para comer, para preparar comida y para divertirnos, cada uno me ha ofrecido una experiencia de vida muy distinta, pero siempre lo tomo de la mejor manera, gracias por todos los buenos momentos, por su amistad, por su apoyo, compañía y muchísimas más gracias por dejar a su corazón latir. ¡No tienen idea cuanto los quiero!

Marco Arteaga, gracias por la sinceridad que siempre ha existido entre nosotros, por llorar conmigo, por estar siempre para escucharme, por compartir conmigo tus sentimientos, tus problemas, tus lugares favoritos, por prestarme a toda tu hermosa familia y por dejarme demostrarte que los milagros sí existen. Te amo y sabes que cuentas conmigo y con mi amistad incondicional.

Alan Coria, a pesar de nuestro carácter tan diferente un día nos logramos compenetrar tan bien, que llegamos a ser los mejores amigos. Te agradezco todos absolutamente todos los momentos que compartimos; a pesar de nuestros altibajos me encanta haberte conocido. Sabes perfectamente que te amo y también sabes que no cambiaría tu amistad por nada.

Migue, que siempre me regañas cuando me ves llorando, gracias por preocuparte.

Liz pelo rojo y Ere, por darme la bienvenida cuando llegué al laboratorio 3 ofreciéndome su amistad y sinceridad desde el primer momento en que nos conocimos. Kike, muchas gracias por ayudarme con los PCR's, por soportarme, además de compartir conmigo tu conocimiento, tu tiempo, tu buen humor y tu buena vibra. A Betty, Juanjo, Richard, Tamara, Ana, Karina, Hadad, algunos por ser compañeros del mismo "dolor", pero les agradezco más por hacer más amenos mis meses de tesista y dar su opinión para resolver mis dudas cuando todo me salía mal.

Rock... que más decirte... Gracias por escucharme y por platicar, pero muchas más gracias por escuchar mis consejos para “ser feliz”, estoy segura de que nos conocimos para ser mejores personas, la verdad a pesar todos nuestros disgustos, me agrada conocerte, eres de esas personas han enriquecido mi vida de algún modo.

Emm, gracias por hacer magia conmigo, por un momento logramos que el mundo desapareciera para existir sólo nosotros dos, esa magia me ayudó a esclarecer un poco el significado de esa cosa tan compleja que la gente llama amor.

En esta travesía de casi 7 años, cruzaron por mi camino muchas personas que me han inspirado de formas muy particulares, compartimos muchas experiencias buenas y malas, gracias a eso aprendí algo de cada uno de ustedes e individualmente me han ayudado a ser mejor persona. Es imposible nombrar a todos los involucrados en esta travesía, pero agradezco a todos y cada uno de los que estuvieron presentes en este tiempo, algunos que ya no están, otros que siguen a mi lado y otros que aunque están en algún lugar del mundo, ya no están a mi lado. Nadie se me olvida, sólo que no es posible mencionar a todos los que han influido en mí para ser mejor persona y para poder finalizar esta pequeña parte de mis sueños.

En esencia lo que deseo es agradecer a todos los seres vivos que estuvieron para mí y conmigo. Gracias Tutsi, tu mirada jamás me hubiera dejado desistir. Gracias infinitas a todas las almas inocentes que prestaron su vida y su cuerpo para mi aprendizaje, así como para mi formación profesional y personal.

Por último y no por eso es el menos importante, le doy gracias a ese ser supremo por todo absolutamente todo lo que ha conformado mi vida, mi entorno y mi ser.

AHORA ME TOCA VOLAR, PERO NO MUY ALTO PORQUE SI CHOCO CON EL CIELO PODRÍA CAER ABRUPTAMENTE... AUNQUE ESTOY COMPLETAMENTE SEGURA DE QUE HABRÁ ALGUIEN PARA AMORTIGUAR EL GOLPE... ¿O NO?

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
▪ Evaluación de citología vaginal y de semen	3
▪ Cultivo celular	4
▪ Reacción en Cadena de la Polimerasa	4
▪ Herpesvirus	5
▪ Antecedentes	9
OBJETIVOS	11
▪ Objetivo general	
▪ Objetivos específicos	
JUSTIFICACIÓN	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
▪ Obtención de las muestras	13
▪ Citopatología vaginal y de semen	14
▪ Cultivo celular	14
▪ Estandarización de PCR	15
RESULTADOS	23
▪ Citología vaginal y de semen	23
▪ Cultivo celular	23
▪ Estandarización de PCR	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

La salud de los cetáceos en cautiverio es importante, debido a que hoy en día es ilegal capturarlos de vida libre, por lo tanto se deben mantener en óptimas condiciones evitando enfermedades que comprometan la vida de los animales y su reproducción. La medicina preventiva es la que más se emplea en este tipo de animales, de tal modo que como su nombre lo indica, las enfermedades se deben prevenir y no esperar a que se presenten.

En una población donde se comienzan a tener problemas de reproducción en más de un animal es muy posible pensar que un virus esté presente, más aún si lo que se presenta son abortos y mortinatos seguro se piensa en herpesvirus, por el parecido morfofisiológico que tienen los mamíferos marinos con los mamíferos terrestres. En este trabajo se realizaron tres diferentes métodos para diagnosticar herpesvirus en delfines nariz de botella (*Tursiops spp.*), con la finalidad de poder realizar un diagnóstico rápido, eficaz y en una etapa temprana de la enfermedad impidiendo consecuencias letales.

Se obtuvieron muestras de lavado vaginal, exudado vaginal, semen y de hígado de neonato. Se realizaron frotis de los exudados vaginales y semen, para observar la citología y posibles patologías al microscopio, se realizó el conteo de las células en cada laminilla, se tipificaron según su morfología, se determinó en que etapa del ciclo estral se encontraban y no se observó inflamación.

Cada muestra se inoculó sobre una monocapa de células Vero contenida al fondo de cada pozo en placas para cultivo celular y se observaron al microscopio durante diez días; las células no presentaron cambios citopáticos sugerentes de herpesvirus, así que se realizó un segundo pase a nuevas placas y se realizó el mismo procedimiento sin presentar cambios citopáticos.

Se realizó la extracción de ADN de los controles (Aujeszky e IBR), de las muestras originales y de las células cosechadas al final de cada ensayo de cultivo celular para estandarizar una PCR anidada, utilizando iniciadores y condiciones publicadas en la literatura. A pesar de que se ha publicado varias veces el diagnóstico de herpesvirus en cetáceos por medio de PCR, en este trabajo no se pudo estandarizar la prueba.

INTRODUCCIÓN

La reproducción de cetáceos mantenidos en cautiverio, ha cobrado gran importancia debido a factores biológicos, ambientales, legales y económicos. La mayoría de los cetáceos en cautiverio son del orden *Cetacea*, del suborden *Odontoceti* y pueden ser divididos en dos familias taxonómicas: *Delphinidae* y *Monodontidae*, el delfín nariz de botella (*Tursiops* sp.) es el más común dentro de la familia *Delphinidae*. Su nombre común es: Delfín mular, tonina, tursión y delfín nariz de botella. (Jefferson et al. 2008, John et al., 2008).

En los cetáceos, los datos sobre los parámetros subclínicos o subletales reproductivos son limitados. (Jefferson et al., 2008) La muerte fetal y la mortalidad dentro de los primeros 3 meses después del nacimiento son problemas importantes en los programas de reproducción en cautiverio de delfines nariz de botella (*Tursiops* sp.), sin embargo las causas de estos problemas no son bien conocidas. (Esperón et al., 2009)

Debido a que los delfines poseen sistemas orgánicos estructurados morfológicamente similares a los de los mamíferos terrestres, con algunas variantes de organización, conformación, tamaño y ultraestructura orgánica específica de las adaptaciones a su medio de vida, presentan patologías de origen viral, parasitarias, bacterianas, fúngicas y neoplásicas en la misma medida que los animales de vida terrestre. (Arias et. al, 2008) Las enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en cetáceos (del tracto reproductor, viabilidad fetal y eficiencia reproductiva) se han asociado a diversas etiologías como bacterias, virus, protozoarios, hongos y sustancias tóxicas. (Esperon et al., 2008)

A partir de los estudios realizados en vivo y post mortem con los animales varados se obtienen datos, los cuales permiten establecer registros del estatus sanitario de los ecosistemas marinos, así como el nivel de salud que gozan las poblaciones de cetáceos, los posibles contaminantes de las aguas, su efecto en estas especies y en las poblaciones de animales asociados, tanto a su alimentación como al mismo sistema ecológico al que pertenecen (Arias, et. al, 2008), además de tomar en cuenta que están expuestos a desechos industriales, agrícolas y urbanos, lo cual aumenta el riesgo para las poblaciones de cetáceos (Esperón et al., 2008).

Evaluación de citología vaginal y de semen

Los hallazgos normales en una evaluación citológica pueden incluir varios factores (Fig. 1).

Fig. 1. Hallazgos normales y rangos de referencia en muestras vaginales

Componentes	Muestra
	Vaginal
Preservación Morfológica	Buena- excelente
Celularidad	Bajo- moderado
Detritus no celulares	Bajo
Inflamación	0-5
Neutrófilos	0-5
Linfocitos	0-5
Macrófagos	0-5
Eosinófilos	0-5
Células Plasmáticas	0-5
Mastocitos	0-5
Bacterias	Ausente- moderado
Hongos	Ausente- poco
Protozoarios	Ausente
Nasitrema	Ausente

Los valores numéricos son para células por campo

VARELA et al., 2007

(Varela et al., 2007)

En una muestra de citología vaginal, se pueden encontrar además una variedad de células escamosas en diferentes etapas de desarrollo, también puede haber bacterias y leucocitos en diferentes grados. En perras estos datos se utilizan para monitorear el ciclo estral. Varela et al. (2007) hace analogías con las células de la vagina de caninos y de especies marinas, debido a que no hay estudios sobre la evaluación de citología vaginal en delfines. También podría ayudar un muestreo de frotis variando tiempos para monitorear la celularidad.

Un muestreo de sangre semanal o bisemanal en delfines nariz de botella ha indicado un patrón de ciclo estral o de estacionalidad. Pero no se ha correlacionado el nivel hormonal con los cambios celulares. Los ensayos utilizando la evaluación citológica en conjunto con niveles hormonales en sangre pueden ser muy útiles para determinar el estado del ciclo estral. (Varela et al., 2007)

En el semen fresco se examinan varios factores que determinan la calidad del semen entre estos el pH, volumen, color, consistencia, motilidad, viabilidad y cantidad de espermatozoides por mililitro además de la morfología. (Cowell et al. 2007)

Cultivo celular

La línea celular Vero es de tipo adherente, es decir, células en monocapa que se fijan al material plástico de un frasco o placa, estas se deben desprender de esa superficie antes de ser utilizadas, para evitar que la cantidad de células sobrepase la capacidad de la superficie que las contiene y afecte al cultivo celular. Las células adherentes derivan de órganos como músculo, hígado, células nerviosas, riñón, etc., y no presentan movilidad en el organismo. Para el cultivo de líneas adherentes normalmente se utiliza el Medio mínimo esencial (MEM) como medio para aportar los nutrientes necesarios a las células. (Morgan et al., 1993)

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) abarca la síntesis específica y exponencial de una región predeterminada de ADN por medio del uso de dos pequeños fragmentos de ADN específicamente diseñados (iniciadores, primers u oligonucleótidos), que forman las dos terminales de la molécula de ácido nucleico que se va a amplificar. Las reacciones de amplificación por PCR son altamente específicas, la especificidad es determinada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de los iniciadores complementando a las secuencias presentes en la molécula a amplificar en el ADN diana. Una vez hibridados al ADN destinado, los iniciadores proveen la doble cadena con terminación 3'-hydroxyl requerida por el ADN termoestable dependiente de ADN polimerasas para empezar la síntesis de una nueva cadena de ADN.

La amplificación por PCR en un proceso cíclico donde la muestra de ADN es inicialmente desnaturalizada para debilitar y separar la cadena de doble hélice en cadenas simples. Esto se logra por calentamiento de la muestra de ADN en un ambiente acuoso, usualmente a temperatura de 94°C por 30 segundos a 5 minutos. Posteriormente la hibridación de los iniciadores de oligonucleótidos específicos a cada cadena es lograda por la disminución de temperatura de la reacción mezclada con la hibridación de los iniciadores por ciclos repetidos (annealing) (T_m) que es usualmente establecida entre 40 y 65°C (dependiendo del diseño de

secuencias de oligonucleótidos usados como iniciadores). Después de la hibridación del iniciador, la temperatura se aumenta a 72°C aproximadamente y todo el ciclo se repite predeterminadamente varias veces. Después de cada ciclo de replicación cada nueva cadena doble de molécula de ADN (conocida como amplicon o amplicon) contiene secuencias terminales complementarias a las secuencias de los iniciadores utilizados. Este proceso permite a cada amplicon servir como plantilla para la replicación en los siguientes ciclos de PCR, resultando en duplicación teórica (amplificación exponencial) del número de moléculas diana durante cada ciclo. (Van Pelt-Verkuil, et al., 2008)

Herpesvirus

Los viriones de herpesvirus son lábiles y no sobreviven bien fuera de un organismo, por lo que generalmente se requiere de contacto físico para su transmisión, el hacinamiento, los aerosoles y los estornudos son importantes sistemas de transmisión. Los herpesvirus sobreviven de generación en generación mediante infección latente aún en pequeños grupos de hospederos. Muchos herpesvirus son específicos de especie debido a que han coevolucionado, pero algunos pueden afectar a especies diferentes. (Murphy et al., 1999, Fenner et al., 1992)

Propiedades de los herpesvirus

Los herpesvirus son los virus ADN más largos que usan enzimas de la célula hospedera para funciones importantes como expresión y replicación del genoma viral. Taxonómicamente se han descrito tres subfamilias, alfa (virus citolítico de crecimiento rápido), beta (produce agrandamientos celulares citomegálicos de crecimiento lento) y gamma (se desarrollan en los linfocitos y causan procesos neoplásicos), diferenciadas originalmente en base a sus propiedades biológicas tal como rangos de hospederos, longitud de sus ciclos, efectos en las células del hospedador y tipos de infecciones latentes establecidas. Actualmente se identifican de acuerdo a su similitud genómica.

Todos los herpesvirus tienen forma icosaédrica, son envueltos por una envoltura lipídica llamada nucleocápside, la cual se deriva de la membrana de la célula huésped, su tamaño varía entre 120 y 200 nm de diámetro y tiene una doble cadena lineal de ADN en un rango de 125 kb a 230 kb.

Una característica importante de los herpesvirus de aves y mamíferos es su habilidad para establecer estado de latencia. En estado latente son demostrables múltiples copias de ADN viral como episomas (libre en el núcleo celular) sin síntesis activa de proteínas virales ni precursores. Frecuentemente los alphaherpesvirus llegan a estar latentes en neuronas del ganglio craneal o sacro, los betaherpesvirus en glándulas secretoras, riñones y gammaherpesvirus en células linfoides. (Patel et al., 2008) (Smolarek, 2005) (Fenner et al, 1992) (Epsy et.al, 1998). (Voyles, 2002)

Replicación viral

La nucleocápside del virus se adsorbe con la membrana celular por medio de la glucoproteína de los peplómeros de la envoltura o por endocitosis, entra a la célula, en este momento se libera ADN-proteína que pasa al núcleo.

La polimerasa II dependiente de ADN celular transcribe tres clases de ARN α (inmediato), β (precoz) y γ (tardío).

Cuando el ARN α es procesado a ARNm se traduce a α proteínas que inician la transcripción de ARN β el cual se traduce en β proteínas y es así como comienza la replicación del ADN vírico, donde se utilizan las proteínas α y β así como de la célula hospedadora y comienza de nuevo, el resultante ARNm γ se traduce en proteínas γ . Gran parte de las proteínas α y β son enzimas, mientras que las γ son estructurales.

El ADN recién sintetizado se introduce en cápsides inmaduras preformadas, la síntesis de ADN, ARN y proteínas propias de la célula cesan de 3 a 5 horas después de la infección.

La maduración conlleva a la concentración del ADN en nucleocápsides y la asociación de éstas con zonas alteradas de la porción interna de la membrana nuclear, de este modo adquiere la envoltura al salir del núcleo.

Para la salida de la célula los viriones maduros se acumulan dentro de vacuolas citoplásmicas y pueden ser liberados lentamente por fusión de la membrana vacuolar y exocitosis, o por citolisis.

Los cuerpos de inclusión eosinófilicos son intranucleares y se pueden observar en tejido y en cultivos celulares fijados y teñidos. (Murphy et al., 1999, Fenner et al, 1992)

Patogenia e Inmunidad

Después de una infección primaria, el virus se vuelve latente en una forma episomal en células específicas, la reactivación del virus ocurre generalmente por inmunodeficiencia o supresión del huésped. Las infecciones con herpesvirus ocurren en los primeros días de vida. (Epsy et al., 1998)

La transmisión de herpesvirus está asociada con el contacto estrecho de superficies húmedas, pero también está asociada con aerosoles.

Muchos alfa herpesvirus producen lesiones localizadas, principalmente de mucosas de tracto respiratorio, genital y de la piel; se caracterizan por la producción secuencial de vesículas, pústulas y úlceras superficiales que se recubren de una pseudomembrana y curan tras 10-14 días, sin formar costras. (Fenner et al., 1992)

La infección generalizada por alfa herpesvirus se caracteriza por focos necróticos en casi todos los órganos o tejidos, se puede observar en animales jóvenes (de menos de 3 meses de edad) infectados en ausencia de anticuerpos maternos. En animales más grandes la viremia asociada a células mononucleares puede dar paso al virus a través de la placenta causando aborto. Los beta herpesvirus están relacionados a procesos generalizados y respiratorios mientras que los gamma herpesvirus pueden dar lugar a tumores. (Fenner et al., 1992)

La reactivación del virus puede ser subclínica debido a que los lugares afectados como la mucosa nasal y genital no se observan fácilmente. Los alfa herpesvirus se eliminan en las secreciones nasal, oral o genital. Algunos beta herpesvirus y gamma herpesvirus se liberan a través de los epitelios continuamente.

La infección neonatal por herpesvirus se adquiere durante uno de los periodos que comprenden: dentro del útero, en el parto o postparto. La infección intrauterina puede ocurrir de forma ascendente o por una ruta transplacentaria, pero son poco comunes, la más común es la que ocurre en el momento del parto esto es de 85 a 90% de los casos. La infección intrauterina a pesar de ser menos común está asociada con la forma más severa; comúnmente

causa enfermedad multisistémica aunque puede provocar sólo lesiones en piel y ojos. El nacimiento prematuro es común cuando tienen infección por herpesvirus neonatal, la mitad de los infectados nacen prematuramente. El 80% de los neonatos no tratados mueren de neumonía y/o coagulopatía intravascular diseminada más comúnmente. Los rangos de bilirrubina y enzimas hepáticas podrían indicar asociación de la enfermedad con el hígado. (Studahl et al., 2006)

Diagnóstico

Es importante recordar el retraso en el tratamiento de herpesvirus neonatal puede incrementar morbilidad y mortalidad de los individuos, de modo que si existe la mínima posibilidad de haber contraído la enfermedad, se debe dar tratamiento mientras se da el diagnóstico definitivo. (Studahl et al., 2006)

El diagnóstico se realiza por medio de microscopía electrónica de raspados vesiculares y cortes de tejidos. El aislamiento y la caracterización del virus se realiza mediante cultivo celular y PCR

Los herpesvirus se multiplican fácilmente en cultivos celulares procedentes de las especies hospedadoras naturales, pero mediante adaptación del virus, puede ampliarse la gama de cultivos celulares receptivos, menos en los betaherpesvirus que son más receptivas las células de hospederos naturales. Los alfa herpesvirus producen rápidamente efectos citopáticos, como sincitios y cuerpos de inclusión eosinofílicos en las células infectadas. Mientras que los beta y gammaherpesvirus causan los mismos daños pero de aparición lenta. (Fenner et. Al, 1992)

Por medio de PCR anidado orientado al gen DNA Polimerasa utilizando iniciadores degenerados publicados por Van de Vanter et al. (1996) que dan como resultado una amplificación de 215 a 235 pares de bases en la mayoría de los herpesvirus. (Smolarek, 2005) Se les llama iniciadores degenerados porque con ellos es posible diagnosticar herpesvirus en varias especies incluyendo especies marinas.

Antecedentes

Se conoce que las infecciones por herpesvirus han afectado tres familias de cetáceos *phocoenidae*, *monodontidae* y *delphinidae*, éstas han ocurrido desde hace al menos tres décadas. (Van Bresse et al., 1999).

Se han documentado infecciones por herpesvirus en gran cantidad de animales vertebrados terrestres, a pesar de que son pocos los reportes de esta enfermedad en cetáceos existe evidencia como encefalitis en marsopas (*Phocoena phocoena*), dermatitis en belugas (*Delphinapterus leucas*) y en delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*). (Blanchard et al. 2001)

Recientemente en 1995 y 1999 se han asociado alphaherpesvirus a infecciones fatales en dos delfines nariz de botella que pudieron ser de animales con baja respuesta inmune (costa este de EUA). (Blanchard et al. 2001) (Patel et al., 2008) (Smolarek, 2005) Otra posibilidad es que los hospederos naturales pueden ser especies diferentes a los delfines nariz de botella y que estos casos representen infecciones atípicas dentro de un huésped aberrante. (Blanchard et al. 2001)

Algunos investigadores encontraron papilomas linguales y carcinomas de células escamosas, en delfines *Tursiops truncatus* de vida libre y en cautiverio. En algunos casos un solo individuo presentó neoplasias histológicamente mezcladas de papilomas y carcinomas de células escamosas, que se desarrollaron como malignos a partir de una lesión papilomatosa benigna, esto se asocia con gammaherpesvirus y papilomavirus en conjunto, herpesvirus se puede transmitir sexualmente asociada con disfunción inmunológica. En las costas de Florida estas neoplasias ocurren con frecuencia epidémica. (Bossart, 2007)

Encontraron delfines varados con lesiones ovaladas de 6cm de largo en la piel, excepto por las lesiones de la piel no mostraban ningún signo de enfermedad, el diagnóstico fue una infección de herpesvirus. (Harzen, et al., 1997)

Una cría de delfín (*Stenella frontalis*) varado, encontrado vivo presentaba lesiones macroscópicas en la piel el diagnóstico fue una infección causada por herpesvirus, posteriormente murió y al realizar el examen histopatológico se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares en sus diferentes órganos. (Arias et al, 2008).

Dos estudios evaluaron la seroconversión en mujeres durante el embarazo y encontraron que entre 16 y 20 de cada 1000 mujeres seronegativas adquirieron el Herpes simplex humano en algún momento durante el embarazo. Esto es significativo, ya que el riesgo es mayor para un neonato que nace por el canal vaginal en una madre de infección genital primaria que un neonato que nace de una madre con reactivación de la infección por herpesvirus simplex. (Studahl et al., 2006)

A partir de lesiones en piel de mamíferos marinos, se ha aislado exitosamente el herpesvirus en cultivos celulares de células de delfín. (Cornelis et. al, 2009)

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar herpesvirus como etiología asociada a problemas reproductivos de los delfines (*Tursiops sp.*) mantenidos en cautiverio en Cancún Quintana Roo.

Objetivos específicos

Obtener muestras de semen, secreciones y raspados vaginal de delfines (*Tursiops sp.*) mantenidos en cautiverio.

Realizar en frotis el diagnóstico citopatológico a partir de muestras de semen y exudados vaginales de delfín (*Tursiops spp.*).

Procesar las muestras obtenidas mediante técnicas de aislamiento viral sobre cultivos de células Vero y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para la posible identificación de herpesvirus.

Correlacionar los resultados de las pruebas de citopatología vaginal y de semen con el aislamiento viral en células Vero y con la PCR.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial hay pocos estudios de la presencia de herpesvirus en cetáceos en particular en delfines nariz de botella (*Tursiops spp.*) mantenidos en cautiverio, por lo que es importante estandarizar distintas pruebas de diagnóstico para herpesvirus en animales no domésticos. En cautiverio es muy importante determinar el estado de salud de los animales debido a su gran importancia para los programas de reproducción y conservación ya que es ilegal actualmente en México capturar animales de vida libre.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se muestrearon 34 delfines nariz de botella (*Tursiops spp*) de dos delfinarios, ubicados en Cancún (21°N 86°O) y en Cozumel (20°N 86°O), Quintana Roo. El número de animales se determinó por la disponibilidad de los mismos, las muestras fueron tomadas por los médicos responsables como parte de un proceso de diagnóstico sobre casos de mortinatos o abortos.

Se realizó un estudio epidemiológico observacional transversal. Fue observacional ya que se examinó directamente la población de delfines con el propósito de describirla sin participar; y transversal ya que se recopiló información epidemiológica sobre las características de salud de la población de delfines, incluyendo individuos sin signos así como individuos con signos previos, con el objetivo de hacer la descripción de la población afectada en el momento de la toma de las muestras. (Ruiz y Morillo, 2005)

Obtención de las muestras

Durante un estudio paralelo se obtuvieron las muestras para desarrollar este trabajo. Para tomar las muestras se utilizaron dos hisopos por delfín, se retrajeron los pliegues genitales y se introdujo un hisopo directamente a la parte trasera de la abertura vaginal dirigiéndolo craneodorsalmente evitando la fosa del clítoris para evitar la contaminación, rotándolo gentilmente contra la pared vaginal, se retiró el hisopo enseguida se rotó lentamente sobre un portaobjetos de acuerdo a Varela et al. (2007) y se fijó la muestra con citospray, otro hisopo tomado con las mismas condiciones se colocó en medio Stuart. Se obtuvieron 20 frotis de citología vaginal y 20 muestras de exudado vaginal, además de 3 muestras de lavado vaginal obtenidas con solución salina fisiológica, y una muestra de leche que se tomó directamente durante una examinación médica fuera del agua. Se tomaron 8 muestras de semen las cuales se obtuvieron de delfines entrenados para eyacular, se tomó una gota de cada muestra para realizar 8 frotis de semen fijados en portaobjetos y el resto se colocó en medio de transporte Stuart y una muestra de semen obtenida de una pajilla de semen congelado utilizando una gota para un frotis de semen y el resto colocado en medio Stuart. Todas las muestras se transportaron por vía aérea en una caja de unicel con tapa a la UIMSA y se almacenaron a

temperatura ambiente hasta su utilización. (Van Elk et. al, 2009) También se procesaron 2 muestras de hígado de 2 crías muertas al nacimiento remitidas a DIVET ® y congeladas hasta su utilización. Para facilitar el manejo de las muestras durante el desarrollo del trabajo se fueron numerando progresivamente conforme se obtuvieron (Tabla 1).

Citopatología vaginal y de semen

Todos los frotis obtenidos se tiñeron con la técnica de Papanicolaou de acuerdo al manual del laboratorio DIVET ® (Tabla 2) y se realizó una evaluación citológica de acuerdo a Varela et al. 2007. La observación de las células fue realizada empleando un microscopio óptico (Olympus BX60) a 400x y a 1000x para observar con mayor detalle de acuerdo a Varela et al., 2007. Se realizó un conteo del tipo de células por campos a 400x hasta completar 100 células, esto se realizó tres veces por frotis para calcular un promedio de los tres conteos. Además se tomaron fotografías (cámara Evolution VF color) para realizar una comparación.

En el semen se evaluó la morfología de los espermatozoides utilizando un microscopio óptico (Olympus BX60) a 400x y a 1000x de acuerdo a Allen (1992).

Cultivo celular

A cada muestra obtenida en medio Stuart y a cada muestra de hígado ya macerado se le agregaron de 3 a 5 ml de PBS estéril, se mezclaron con un hisopo, se congelaron en Nitrógeno líquido (N₂) se descongelaron en baño María a 37°C. Este procedimiento se repitió 4 veces.

El sobrenadante de cada muestra se filtró con filtros de 0.22µ (Millipore ®) y se depositó en un tubo Eppendorf para utilizarlo enseguida.

Como controles positivos para cultivo celular y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó el virus de Aujeszky donado por el Dr. Carlos Ignacio Soto Zárata y el M. C. Crisóforo Mercado Márquez del laboratorio 4, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el virus fue aislado e identificado en el CENASA (Centro Nacional de Diagnóstico en Salud Animal) como cepa Minnesota. También se empleó un virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) identificado en el laboratorio de diagnóstico DIVET ®.

Se procesaron 4 botellas de cultivo de 25cm² conteniendo una monocapa de riñón de mono verde africano (Vero) al 90-100% de confluencia, se tripsinizaron, se recuperó un volumen total de 36 ml de suspensión con MEM al 5% y células. Se depositaron 3ml por pozo en 4 placas para cultivo celular de 12 pozos (COSTAR®) hasta obtener 70 a 80% de confluencia de células.

Se dejaron como control negativo dos pozos por placa a los cuales se les agregaron 500 µl de PBS, se inocularon 500µl de las muestras filtradas en el resto de los pozos y como control positivo se inocularon 500µl de virus Aujeszky y 500µl de virus de IBR en dos pozos más. Se esperaron 3h para la adsorción, se agregaron 2ml de MEM al 3% a cada pozo, se incubaron a 37°C con CO₂ y se hizo una revisión diaria durante 10 días en el microscopio invertido (VELAB Microscopes) para documentar los cambios citopáticos. Todos los procesos que involucraron manejo de cultivo celular fueron desarrollados y mantenidos bajo condiciones de esterilidad.

Posterior a los 10 días de observación, se lisaron las monocapas de células por medio de congelación a -20°C y descongelación a 37°C, repitiendo este paso de 2 a 3 veces, se recuperó el contenido de cada placa y se depositó en tubos eppendorf para ser procesados por PCR y realizar un segundo cultivo en células Vero.

Se separaron 500 µl del lisado de cada pozo del primer cultivo para repetir la inoculación en un segundo cultivo. El ensayo se desarrolló en forma idéntica al antes descrito y el material obtenido también fue utilizado para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada.

Estandarización de PCR

Las muestras obtenidas desde el filtrado, además de las de cultivo celular, se sometieron a la extracción de ADN con un kit para extracción de ADN de células sanguíneas de Quick Gene (QG-mini80 Fujifilm) y también se realizaron 3 técnicas de extracción manual de ADN utilizada por Van de Vanter et al. (1996), la segunda fue la utilizada por Ausubel et al. (2005) y Davis et al. (1994) y la tercera fue utilizada por Taberlet y Bouvet (1991) con algunas modificaciones. Se procedió a realizar el análisis por medio de una PCR de acuerdo a Smolarek et al. (2006).

Debido a que se realizó una PCR anidada se corrieron dos reacciones. Los iniciadores utilizados fueron: FP1, FP2, RP1, FP3 y RP2 (Tabla 3). (Van de Vanter et al. 1996) (Smolarek, 2005), (Van Elk et. al, 2009)

En la primera reacción de PCR se agregaron 4 µl de muestra y 400nM de los iniciadores FP1, FP2 y RP1, 100mM de dNTPs, 2mM de MgCl₂ y 2U de Taq Polimerasa (Tabla 4). En la segunda reacción se agregaron los iniciadores FP3 y RP2 a una concentración de 400 nM y 2 µl de producto de la primera reacción. Las condiciones fueron las que utilizaron Smolarek et al. (2006) (Tabla 5) y se utilizó un termociclador PTC- 100 (Programmable Thermal Controller, MJ research.inc). Además se realizaron otros PCR's anidados con la misma mezcla de reactivos pero cambiando las condiciones. (Tablas 6 y 7)

Para la presentación más clara de las PCR's realizadas y las variables modificadas, se realizó una tabla que se dividió en tres, cada PCR se numeró y se explicaron las modificaciones que se fueron realizando (Tablas 8, 9 y 10).

Se corrieron 8µl del producto del segundo PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Invitrogen ®) a 80 voltios, en una cámara de electroforesis horizontal (Wealtec Elite 300) con bromuro de etidio (0.5 g/ml) (Invitrogen ®) y se visualizaron los fragmentos de ADN con luz UV (Syngene). (Smolarek 2005, Smolarek et al. 2006)

Se corrió un gel de agarosa al 1% con los iniciadores restituidos directamente para observar la concentración de ADN.

Tabla 1. Identificación de muestras.

Número de Identificación de la muestra	Nombre de delfin	Muestra	Identificación de la muestra del primer cultivo celular	Identificación de la muestra del segundo cultivo celular
1	Asia	EV y F	35	69
2	Cozumel	EV y F	36	70
3	España	EV y F	37	71
4	Fiji	EV y F	38	72
5	Honiara	EV y F	39	73
6	Oceanía	EV y F	40	74
7	Solei	EV y F	41	75
8		LV	42	76
9	Aphrodita	EV y F	43	77
10	Athena	EV	44	78
11	Atlantis	EV y F	45	79
12	Atlas	EV y F	46	80
13	Electra	EV y F	47	81
14	Esparta	EV y F	48	82
15	Marina	EV y F	49	83
16	Nautica	EV y F	50	84
17	Nike	EV y F	51	85
18	Olympia	EV y F	52	86
19	Simo	EV y F	53	87
20	Troya	EV y F	54	88
21	Ashin	S	55	89
22	Alex	S y F	56	90
23	Mercurio	S y F	57	91
24	Mincho	S y F	58	92
25	Sidney	S y F	59	93
26	Squalo	S y F	60	94
27	Ajitzi	S y F	61	95
28	Pax	S y FSC	62	96
29	Amizcle	S y F	63	97
30	Cría 1 de Solei		64	98
31	Cría 2 de Fiji		65	99
32		Leche	66	100
33	Cría 1 de Solei	Hígado	67	101
34	Cría 2 de Fiji	Hígado	68	102

EV Exudado vaginal, S semen, F frotis, FSC frotis de semen congelado, LV lavado vaginal

Tabla 2. Tinción de Papanicolaou

Reactivo	Tiempo
Agua de la llave	10 pases
Alcohol 96°	10 pases
Alcohol 80°	10 pases
Alcohol 50°	10 pases
Agua destilada	10 pases
Hematoxilina	2 minutos
Agua corriente	3 pases
Agua ácida	3 pases
Agua corriente	10 pases
Alcohol 50°	10 pases
Alcohol 80°	10 pases
Alcohol 96°	10 pases
OG 6	2 minutos
Alcohol 96°	10 pases
Alcohol 96°	10 pases
EA 65	4 minutos
Alcohol 96°	10 pases
Alcohol 96°	10 pases
Alcohol absoluto	10 pases
Alcohol Xilol	10 pases
Xilol	10 pases
Resina	10 pases

Manual de procedimientos del laboratorio DIVET ®

Tabla 3. Iniciadores

Iniciador	Secuencia	Longitud	Amplificado
FP1	5'- GAY TTY GCI AGY YTI TAY CC -3'	20	-
FP2	5'- TCC TGG ACA AGC AGC ARI YSG CIM TIA A -3'	28	
RP1	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACI CCY TT -3'	26	
FP3	5'- TGT AAC TCG GTG TAY GGI TTY ACI GGI GT -3'	29	215-235 pb
RP2	5'- CAC AGA GTC CGT RTC ICC RTA IAT -3'	24	

FP (forward primer), RP (reverse primer) (Van de Vanter et. al, 1996), (Smolarek, 2005), (Van Elk et. al, 2009)

Tabla 4. Mezcla de Reactivos para PCR

Reactivo	Concentración
dNTPs	100Mm
MgCl ₂	2Mm
primer FP1	400nM
primer FP2	400Nm
primer RP1	400Nm
primer FP3	400Nm
Primer RP2	400nM
Taq Polimerasa	2 unidades

Smolarek (2005). Todos los reactivos fueron de Invitrogen ®

Tabla 5. Condiciones de la primera PCR anidada realizada

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Incubación inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94° C	20 segundos	55
Anillamiento	46° C	30 segundos	55
Extensión	72° C	30 segundos	55
Extensión final	72° C	10 minutos	1

Las mismas condiciones se utilizaron en la primera y segunda reacción de acuerdo a Smolarek y col. (2006)

Tabla 6. Condiciones de la segunda PCR anidada realizada

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94° C	30 segundos	45
Anillamiento	46° C	60 segundos	45
Extensión	72° C	60 segundos	45
Extensión final	72° C	7 minutos	1

Las mismas condiciones se utilizaron en la primera y segunda reacción de acuerdo a Van de Vanter y col. (1996) y Cornelis et. al (2009)

Tabla 7. Condiciones de la tercera PCR anidada realizada

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95° C	45segundos	35
Anillamiento	50 ° C	45segundos	35
Extensión	72 ° C	45segundos	35
Extensión final	72° C	10 minutos	1

Las mismas condiciones se utilizaron en la primera y segunda reacción

Tabla. 8 Variables modificadas en las reacciones de PCR de la 1 a la 4

	Reactivos	Concentración	1	2	3	4		
	Buffer	1x	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl		
	MgCl ₂	250 mM	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl		
	dNTP's	2mM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl		
	Taq	1 U	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl		
1 ^a Reacción	FP1	400 nM	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl	sí	-	--
	FP2	400 nM	2 µl	2 µl	2 µl		sí	--
	RP1	400 nM	2.75 µl	2.75 µl	2.75 µl	sí	sí	--
2 ^a reacción	FP3	400 nM	3 µl	3 µl	3 µl	--	--	Sí
	RP2	400 nM	1.75 µl	1.75 µl	1.75 µl	--	--	Sí
	Triton	1%	--	--	--	--		
	PCR anidado	--	sí	sí	sí	sí	sí	No
	Ciclos	--	55	55	55	55		
	Extracción ADN	--	Máquina	Máquina	Máquina	Máquina		
	Muestras	--	Controles y muestras	Controles y muestras	controles	Control		

1. Se realizó como lo describió Smolarek 2005 con algunas modificaciones.
2. Se aumentó la cantidad de producto de la primera reacción agregada a la segunda reacción de 2µl a 4 µl
3. Se corrieron sólo los controles positivos y negativos sin modificaciones.
4. Se corrieron por separado los iniciadores forward y reversos con los controles positivos
 FP1 – RP1 + controles positivos
 FP2 – RP1 + controles positivos
 FP3 – RP3 + controles positivos

Tabla 9. Variables modificadas en las reacciones de PCR de la 5 a la 8

	Reactivos	Concentración	5	6	Concentración	7	8
	Buffer	1x	2.5µl	2.5µl	1x	2.5µl	2.5µl
	MgCl ₂	250 mM	2.5 µl	2.5 µl	250 mM	2.5 µl	2.5 µl
	dNTP's	2mM	1 µl	1 µl	2mM	1 µl	1 µl
	Taq	1 U	0.2 µl	0.2 µl	1 U	0.2 µl	0.2 µl
1ª Reacción	FP1	1:10	5 µl	5 µl	1:100	5 µl	5 µl
	FP2	1:10	5 µl	5 µl	1:100	5 µl	5 µl
2ª Reacción	RP1	1:10	5 µl	5 µl	1:100	5 µl	5 µl
	FP3	1:10	5 µl	5 µl	1:100	5 µl	5 µl
	RP2	1:10	5 µl	5 µl	1:100	5 µl	5 µl
	triton	1%	--	--	1%	--	--
	PCR anidado	--	si	si	--	sí	Sí
	Ciclos	--	45	55	--	45	55
	Extracción ADN	--	Máquina	Máquina	--	Máquina	Máquina
	Muestras	--	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	--	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O

5. Se corrigió la concentración de los iniciadores 1:10 y se corrió PCR a 55 ciclos
6. Se corrigió la concentración de los iniciadores 1:10 y se corrió PCR a 45 ciclos
7. Se corrió PCR con la concentración de los iniciadores 1:100 a 55 ciclos
8. Se corrió PCR con la concentración de los iniciadores 1:100 a 45 ciclos

Tabla 10. Variables modificadas en las reacciones de PCR de la 9 a la 17

	Reactivos	Concentración	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Buffer	1x	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl
	MgCl ₂	250 mM	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
	dNTP's	2mM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1.25 µl	1.25 µl
	Taq	1 U	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
1 ^a Reacción	FP1	400 nM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	FP2	400 nM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	RP1	400 nM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
2 ^a reacción	FP3	400 nM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	RP2	400 nM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	triton	1%	--	0.25 µl	0.25 µl	--	--	--	--	--	--
	PCR anidado	--	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
	Ciclos	--	Stecl	55	45	45	55	55	45	45	55
	Extracción ADN	--	Máquina	Máquina	Máquina	Manual (L3)	Manual	Manual (Van de Vanter)	Manual	Manual (L4)	Manual
	Muestras	--	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, H ₂ O	Aujeszky, IBR, Vacuna herpes felino, H ₂ O	Aujeszky, IBR, Vacuna herpes felino, H ₂ O

9. Se corrió con el ciclo mostrado en la tabla 7
10. Se le agregó triton al 1% a las dos reacciones de PCR y se corrió a 55 ciclos
11. Se le agregó triton al 1% a las dos reacciones de PCR y se corrió a 45 ciclos
12. Se realizó la extracción manual de acuerdo a Van de Vanter y col. (1996) y se corrió PCR a 45 ciclos
13. Se realizó la extracción manual de acuerdo a Van de Vanter y col. (1996) y se corrió PCR a 55 ciclos
14. Se realizó la extracción manual con el protocolo de Ausubel y col. (2005) y Davis y col (1994). y se corrió PCR a 55 ciclos
15. Se realizó la extracción manual con el protocolo de Ausubel y col. (2005) y Davis y col (1994). y se corrió PCR a 45 ciclos
16. Se realizó la extracción manual a los controles positivos y se agregó la vacuna de FVR de acuerdo a Taberlet y Bouvet (1991) y se corrió PCR a 55 ciclos
17. Se realizó la extracción manual a los controles positivos y se agregó la vacuna de FVR de acuerdo a Taberlet y Bouvet (1991) y se corrió PCR a 45 ciclos

RESULTADOS

Citología vaginal y de semen

Se realizó la identificación celular en comparación con las fotografías mostradas por Varela y col. (2007) (Fig. 2, 3, 4) Se reportaron los resultados del promedio y tipo de células por cada frotis (Tabla. 11) y se realizó una gráfica de las proporciones de células ordenada de acuerdo al porcentaje de células epiteliales cornificadas (Fig. 5). En ninguno de los frotis se observó la presencia de eritrocitos, los neutrófilos y linfocitos se vieron de manera escasa (Tabla 11). No se encontraron cuerpos de inclusión en los núcleos, ni en el citoplasma celular y no se visualizaron bacterias.

En las muestras de semen no se encuentran anomalías en la morfología de los espermatozoides incluyendo el frotis de semen congelado, con excepción de la muestra 27 en la que no se encontraron espermatozoides en el frotis.

Cultivo celular

En el primer ensayo de inoculación de las muestras en Cultivo Celular (monocapa células Vero) en placas, se encontraron todos los pozos con las muestras 35 a la 66 con apariencia normal los primeros 9 días. Las células con las muestras 67 y 68 se observaron con células vacuoladas al primer día y al sexto día se desprendió la monocapa observando cúmulos de células desde el noveno día. El décimo día absolutamente todos los pozos se observaron con cúmulos con apariencia de células agregadas incluyendo los pozos controles. El virus de Aujeszky causó efectos citopáticos que se visualizaron a las 24h y se hizo un segundo pase obteniendo efectos citopáticos nuevamente a las 24h. El virus de IBR no causó efecto citopático en ninguno de los dos ensayos.

En el segundo ensayo las células inoculadas con el producto del primer cultivo no se observaron con efectos citopáticos. Durante los primeros 9 días todos los pozos incluyendo los controles se observaron con apariencia normal, pero el décimo día se observaron cúmulos de células agregadas en todos los pozos incluyendo los controles.

Estandarización de PCR

En las primeras dos reacciones se visualizaron bandas en todas las muestras, aún en las muestras originales de los delfines. se presenta sólo una fotografía debido a que las reacciones 1 y 2 (Tabla 8) se visualizaron de la misma manera en el gel (Fig. 6). En las reacciones 3 y 4 (Tabla 8) se visualizaron bandas inclusive en los controles negativos (Fig. 7). En el resto de las reacciones (Tabla 9 y 10) los geles se visualizaron sin banda a partir de la corrección de la concentración de los iniciadores que se realizó en la reacción 5 (Fig. 8).

Al correr por electroforesis los iniciadores directamente en el gel, las bandas no se visualizaron con la misma intensidad, de modo que no se encontraron a la misma concentración de ADN (Fig. 9).

Fig. 2 Morfología de las células observadas en los frotis de los exudados vaginales

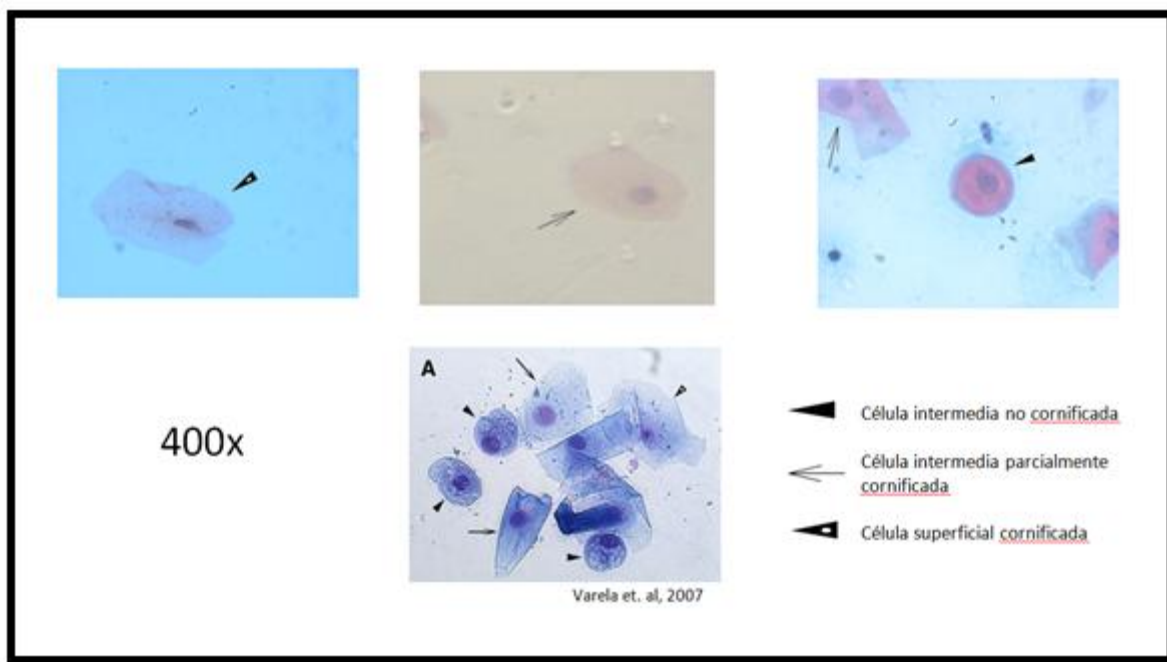


Fig. 3_Morfología de las células observadas en los frotis de los exudados vaginales

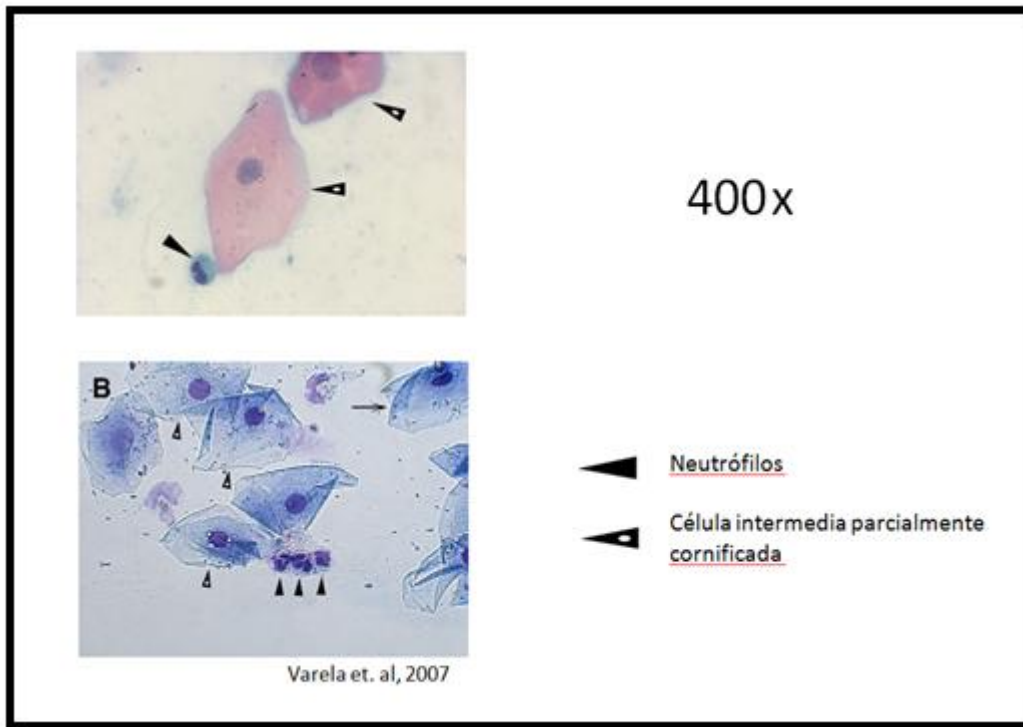


Fig. 4 Morfología de las células observadas en los frotis de los exudados vaginales

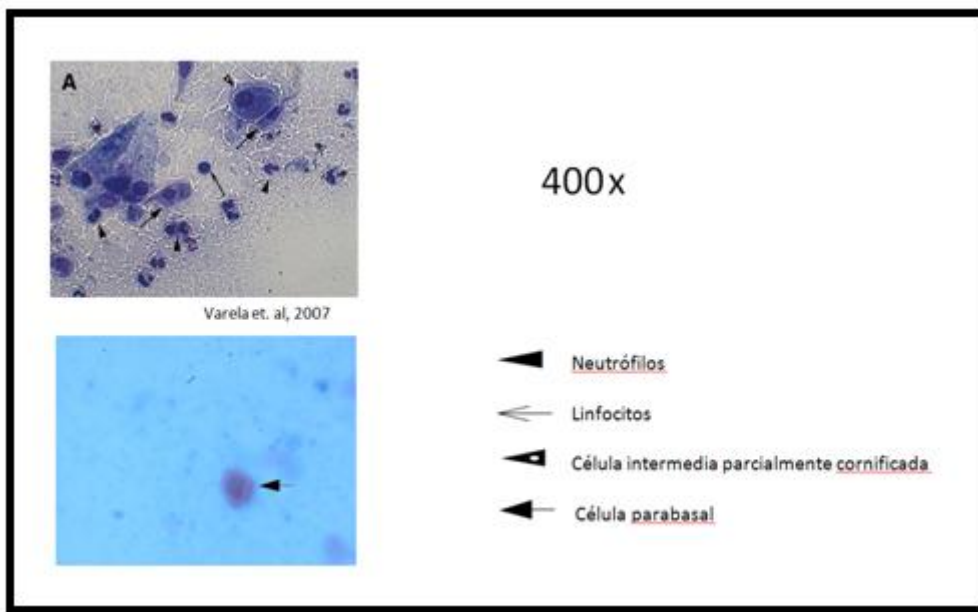
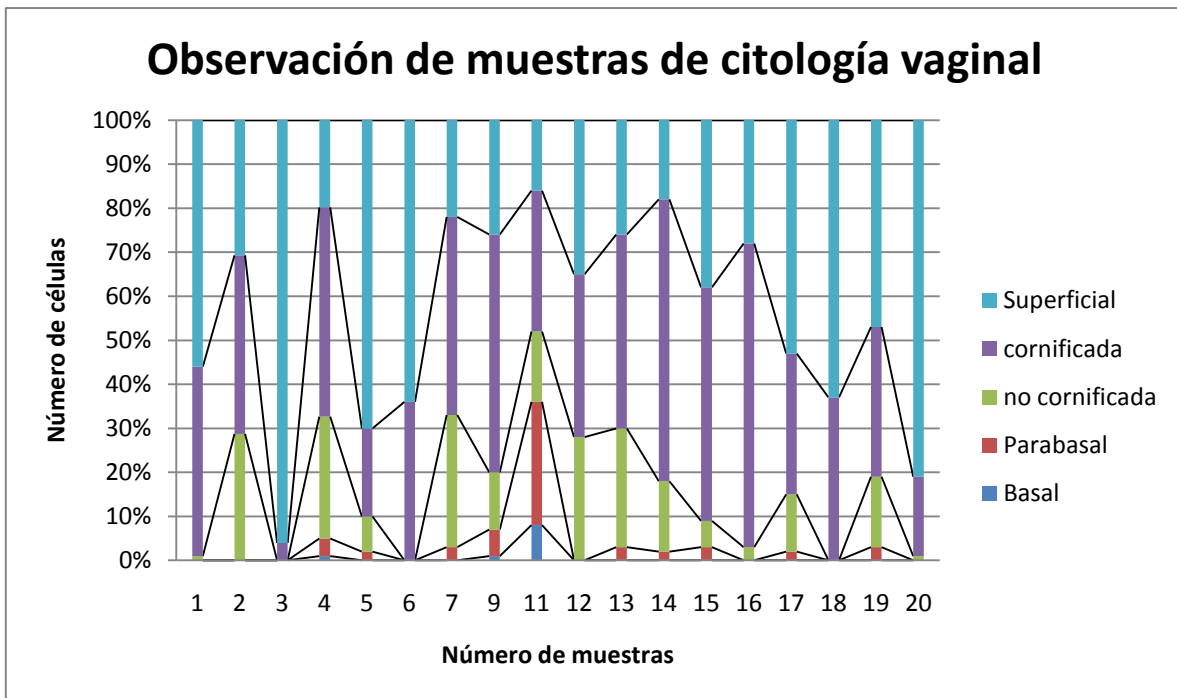


Tabla 11. Resultados de la observación en muestras de citología vaginal por frotis con tinción de Papanicolau.

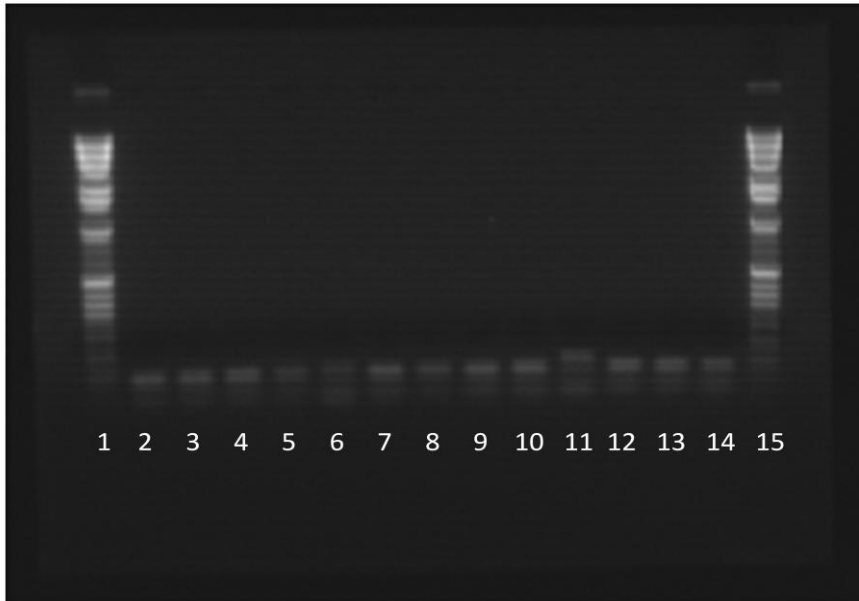
Muestra	Células (%)					Observaciones
	Basales	Parabasales	Intermedias		Superficiales	
			No cornificadas	Cornificadas		
1	0	0	1	45	54	Bacterias escasas
2	0	0	31	39	30	Bacterias escasas
3	0	0	0	3	97	Muy pocas células en el frotis
4	1	4	27	46	22	Mucina (++), neutrófilos moderados
5	0	2	9	18	71	Sin observaciones
6	0	0	2	32	66	Sin observaciones
7	0	6	30	43	21	Sin observaciones
9	1	4	18	48	29	Neutrófilos escasos, mucina (++)
11	7	26	14	36	17	Mucina escasa
12	0	0	26	40	34	Neutrófilos escasos
13	0	2	32	43	23	Mucina (++)
14	0	2	14	63	21	Mucina (+-)
15	0	3	6	52	39	Mucina (++)
16	0	0	5	67	28	Neutrófilos escasos, mucina (+)
17	0	2	12	34	52	Mucina (+-)
18	0	0	0	33	67	Bacterias escasas
19	0	3	16	36	45	Neutrófilos escasos
20	0	0	0	18	82	Mucina (+++)

Fig. 5 Resultados de la observación de las muestras de citología vaginal ordenada por las células superficiales.



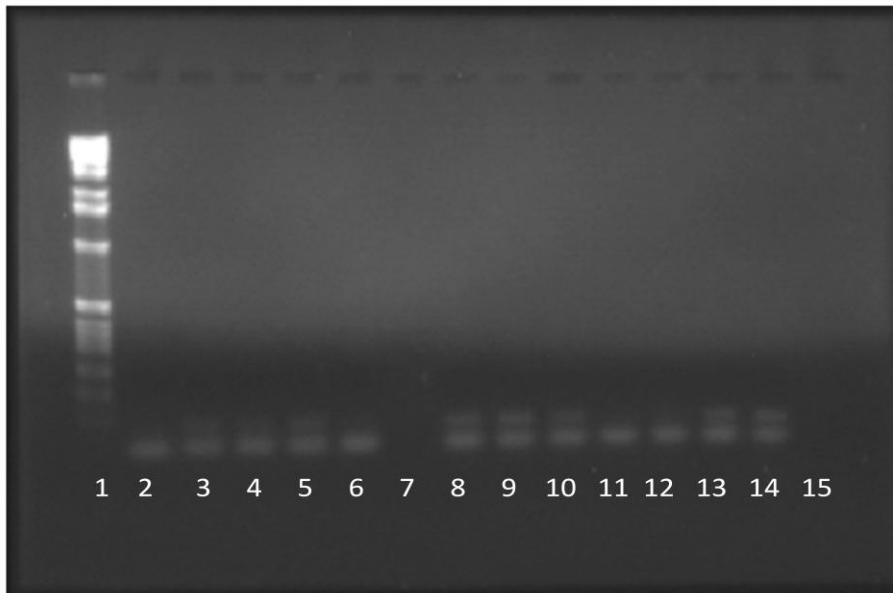
El número de células es el promedio calculado a partir de tres conteos realizados en forma aleatoria por frotis.

Fig. 6 Fotografía de los amplificados obtenidos durante los experimentos 1 y 2



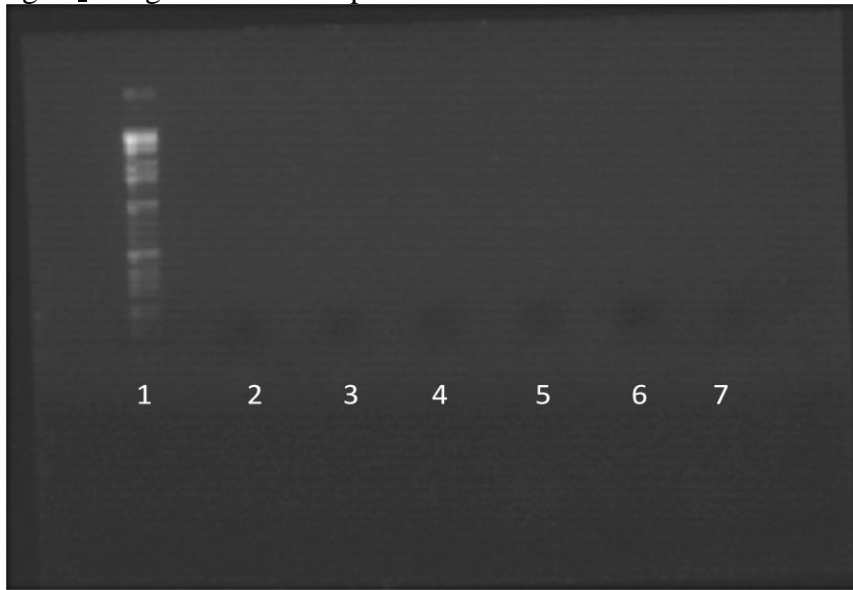
1 y 15. Marcador 1 kbp, 2. Aujeszky, 3. Aujeszky céls, 4. Aujeszky 2º cultivo, 5. Aujeszky céls 2º cultivo, 6. IBR, 7. IBR 2º cultivo, 8. Aujeszky, 9. Aujeszky céls, 10. Aujeszky 2º cultivo, 11. Aujeszky céls 2º cultivo, 12. IBR, 13. IBR 2º cultivo, 14. Agua

Fig. 7 Fotografía de los amplificados obtenidos durante las reacciones 3 y 4



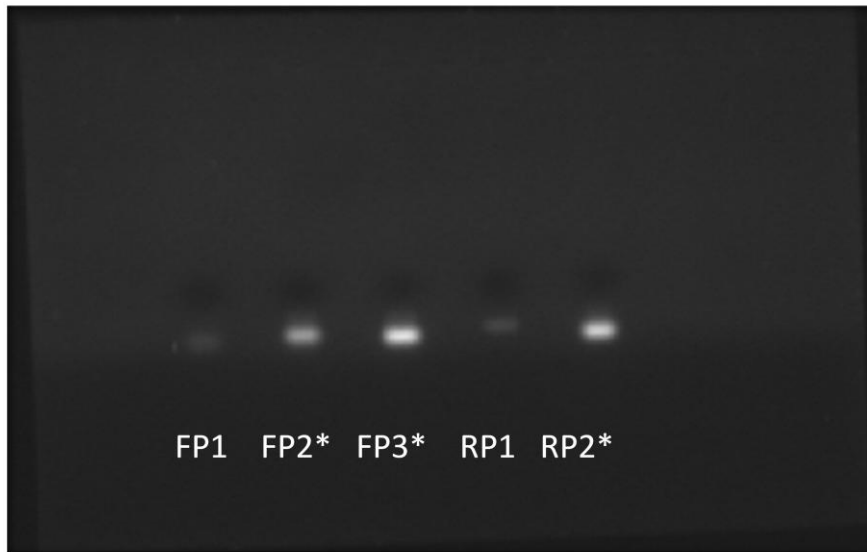
1. Marcador 1 kbp, 2. MEM, 3. Células, 4. Control 1er cultivo, 5. Control 2do cultivo, 6. Agua inyectable 7. Nada, 8. Aujeszky, 9. Aujeszky células, 10. Aujeszky 2º pase, 11. Aujeszky céls 2º pase, 12. IBR, 13. IBR células, 14. IBR

Fig. 8. Fotografía de los amplificados obtenidos durante las reacciones 9 a 17



1. Marcador de 1kbp, 2-5 Controles positivos, 6 y 7 controles negativos

Fig. 9 Fotografía del corrimiento electroforético de los iniciadores empleados en los experimentos



FP2, FP3 Y RP2 se observan más concentrados

DISCUSIÓN

La obtención de las muestras para este trabajo, se realizó en una población de 41 delfines nariz de botella (*Tursiops spp*), formada por 20 machos y 21 hembras ya que las crías no se muestrearon a causa de su inmadurez sexual, se obtuvieron 34 muestras, debido a la disponibilidad de los delfines, además se obtuvieron 28 frotis para poder realizar la correlación de los resultados de la citopatología de los frotis con los resultados de la inoculación de las 34 muestras en cultivo celular. Una de las muestras de semen, así como un frotis fueron obtenidos de semen congelado, ya que en el delfinario además utilizan la inseminación artificial como tecnología de reproducción asistida, la cual de acuerdo a Heide et al. (2007) sirve para propagar la especie, amplificar el progreso genético, controlar enfermedades, disminución de costos, para tratar la infertilidad, así como para determinar el sexo deseado. Todas las muestras se transportaron por vía aérea en una caja de unicel cerrada, para evitar cambios súbitos de temperatura y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización. Asimismo se incluyeron dos muestras de dos crías de delfines nariz de botella (*Tursiops spp.*) muertas procedentes de un mortinato y de un aborto, remitidas inmediatamente después de su muerte al laboratorio de diagnóstico DIVET ® con el fin de realizar las pruebas diagnósticas de la causa de la muerte como una rutina médica.

Para identificar la citopatología vaginal y del semen se realizó la tinción de Papanicolaou. De Buen et al. (2001) menciona que en la actualidad la tinción de Papanicolaou es la más utilizada para citología diagnóstica, sin embargo Fields (2006) menciona que se ha demostrado que no sólo es útil en la detección de cáncer sino que se puede utilizar para encontrar otros tipos de patologías como infecciones por virus. Después de teñir los frotis se realizó la observación al microscopio, no se observó ninguna anormalidad en las células, ni se encontraron datos de inflamación. En algunos de los frotis se encontraron neutrófilos y bacterias en cantidad escasa, lo cual es normal en frotis de citología vaginal. La presencia de neutrófilos es normal en algunas etapas del ciclo estral, por lo que ninguno de los animales presenta indicios de inflamación local en el tracto reproductivo (Tabla. 11). De acuerdo a Varela et al. (2007) la presencia moderada de neutrófilos, linfocitos y bacterias es normal en un frotis vaginal de delfin (*Tursiops spp.*). De Buen et al. (2001) menciona que en los frotis se pueden observar células involucradas en procesos inflamatorios, con frecuencia los leucocitos

se asocian a inflamación ocasionada por bacterias, algunas veces por hongos, parásitos y virus. Para observar una patología en un frotis de citología vaginal es crucial conocer la morfología y celularidad normal de las células en un frotis sano. En este trabajo no se encontraron cuerpos de inclusión en los núcleos ni en el citoplasma. Fields (2006) menciona que los cuerpos de inclusión y los sincitios son indicativos, pero no son específicos de virus. Es importante determinar las etapas del ciclo estral para poder identificar problemas reproductivos y en su caso prevenirlos antes de la gestación. Las células vaginales se diferenciaron y se identificaron en base a lo reportado para la citología vaginal de perra y además se hizo la comparación de las células vaginales de los frotis de delfín (*Tursiops spp.*) obtenidos para este trabajo con las fotografías de la citología vaginal de *Tursiops sp.* mostradas por Varela et al. (2007) (Fig. 1, 2, 3). De acuerdo con los resultados del conteo de células vaginales, los tipos de células de cada frotis (Tabla. 11) y la gráfica (Fig. 5), se determinó que todas las hembras se encuentran en diferente etapa del ciclo estral por lo cual no hay sincronía en el ciclo. Varela et. al (2007) describen el ciclo estral del delfín nariz de botella (*Tursiops spp.*) según el tipo predominante de células, en proestro se encuentra una mezcla de células epiteliales parabasales, intermedias y superficiales en cantidades iguales, eventualmente se observan neutrófilos y eritrocitos, el estro se caracteriza por la presencia de células superficiales principalmente, éstas en cetáceos no pierden su núcleo a diferencia de las células de las perras, en el diestro se encuentran células superficiales disminuidas de cantidad 20% y las parabasales e intermedias aumentan su cantidad del 10 al 50%, se pueden ver neutrófilos y eritrocitos. En el anestro se observan predominantemente células parabasales e intermedias y es posible la presencia de bacterias y neutrófilos en escasa cantidad.

En los frotis de semen fresco y en el de semen congelado los espermatozoides se encontraron morfológicamente normales, no se encontraron leucocitos sugerentes de inflamación. En el frotis de la muestra 27 no se encontraron espermatozoides, pero tampoco se observaron células anormales, ni se encontraron neutrófilos sugerentes de inflamación. La ausencia de espermatozoides en el semen de este delfín ya había sido notado con anterioridad (comunicación personal). Van Bressem y col. (2000) han reportado en *Tursiops truncatus*, múltiples lesiones en tracto genital como testículos deformes y flácidos, además de testículos disminuidos de tamaño en un delfín de 23 años de edad que producía semen con azoospermia. De acuerdo a Allen (1992) la fertilidad podría disminuir si existe menos del 80% de

espermatozoides normales, Cowell y col. (2007) mencionan que conforme aumenta el porcentaje de las anormalidades en el semen disminuyen la calidad del semen y el potencial de reproducción. Trigo (1998) asocia en especies domésticas la ausencia de espermatozoides con criptorquidismo, hipoplasia del testículo, degeneración del epitelio testicular, atrofia testicular, lesiones vasculares del testículo, aumento de la temperatura por inflamación, aplasia del epidídimo, lesiones obstructivas o con estrés, además la ausencia de espermatozoides puede indicar lesiones causadas por agentes tóxicos. Se ha determinado que este delfín es infértil ya que ha sido imposible su reproducción, cabe destacar que el semen para esta muestra fue utilizado directamente del animal. En los frotis examinados los espermatozoides se encontraban fijados, por esta razón se realizó únicamente la observación de la morfología, pero lo ideal según Allen (1992) es realizar exámenes completos de semen para analizar pH, volumen, color, consistencia, motilidad, viabilidad y concentración además de la observación morfológica de los espermatozoides en el semen fresco. Roberts et al. (2009) recomiendan varios exámenes del individuo para poder establecer un diagnóstico definitivo y acercarse a un tratamiento adecuado, recomiendan repetir la recolección de dos a tres veces para observar las variaciones en cada muestra, realizar un examen de orina para descartar que los espermatozoides se estén desviando a la vejiga y ultrasonido para observar próstata, conductos deferentes y vesículas seminales.

El hígado de dos crías muertas fue remitido al laboratorio de diagnóstico DIVET®, en los estudios realizados por ellos se reportó la presencia de hepatocitos con cuerpos de inclusión intranucleares, integrando este hallazgo con el momento de la muerte de estas crías, se sugirió herpesvirus como posible etiología. Arias et al. (2008), Blanchard et al. (2001), Van Elk et al. (2009), Esperón et al. (2008) y Smolarek (2005, 2006) han documentado herpesvirus en delfines nariz de botella (*Tursiops spp.*). Las infecciones por herpesvirus pueden ocurrir en el útero grávido y en el neonato en el nacimiento, es muy peligroso debido a que ni el feto ni el neonato son inmunocompetentes. (Avgil and Ornoy, 2006) Está demostrado que los herpesvirus son específicos de especie (Esperón, 2008), sin embargo Blanchard et al. (2001) mencionan durante su investigación que los delfines infectados con herpesvirus pudieron ser hospedadores aberrantes, esto quiere decir que no era herpesvirus específico de delfines, asimismo Martina et al. (2006) reportaron que al infectar monos verdes africanos con herpesvirus de una especie marina, este virus no se podría considerar específico de delfines.

Existen otras etiologías causantes de aborto y mortinatos en delfines nariz de botella, como menciona González et al. (2010) la infección de brucelosis en cetáceos es causada por *Brucella ceti* la cual puede pasar desapercibida en hospederos no gestantes y sin exámenes diagnósticos previos a la gestación, esta bacteria causa aborto, y en machos epididimitis y orquitis. De Buen (2001) señala que en la citología vaginal de perra, *Brucella sp.* es la bacteria más reportada en procesos de inflamación, además es posible que se observen los microorganismos y abundantes neutrófilos. Sedlák et al. (2006). han encontrado anticuerpos contra *Neospora caninum* en *Tursiops truncatus*, *Neospora caninum* es un parásito asociado con abortos en ganado. Nollens et al. (2009) identificaron enterovirus en delfines nariz de botella, la infección por enterovirus es asociada a signos como fiebre, enfermedades gastrointestinales, meningitis, miocarditis, miopatías inflamatorias, aborto y ampollas mucocutáneas.

Las muestras se filtraron con membranas de 0.22 μ (Millipore ®) antes de inocular en el cultivo celular con la finalidad de eliminar bacterias, hongos y parásitos que pudieran contaminar las células.

Para el cultivo celular se utilizaron células Vero (células de riñón de mono verde), en las cuales Fields (2006) menciona que se han obtenido resultados positivos, es decir, se observan efectos citopáticos dentro de las 24-48 horas después de inocular herpesvirus de diferentes especies. El primer ensayo de cultivo celular inoculado con las muestras filtradas de exudado vaginal y de semen de delfín dio resultados negativos, es decir que no se observaron efectos citopáticos. Los virus utilizados como control positivo en cultivo celular fueron herpesvirus de cerdos, con el fin de observar los efectos citopáticos característicos de herpesvirus que de acuerdo con Fields (2006) son sincitios y cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares; Aujeszky, que es un herpesvirus de cerdo, causó efectos citopáticos en menos de 24 horas. Murphy et al. (1999) menciona que para el aislamiento primario de un virus, la elección del cultivo celular es importante. Martina et al. (2006) observaron que existen diferentes líneas celulares susceptibles que se pueden infectar con éxito al inocular herpesvirus. Murphy et al. (1999) mencionan que para un virus en primoaislamiento se utilizan células de la misma especie animal, de este modo se pueden recuperar algunos herpesvirus inoculados en una monocapa celular en la que no se hayan visualizado efectos citopáticos. Murphy et al. (1999)

aseguran existe la posibilidad de que no se observen efectos citopáticos en un cultivo celular, incluso aunque el virus haya sido obtenido directamente de tejidos infectados de un animal enfermo, además menciona que cuando está en estado latente el virus se pueden realizar cocultivos de monocapa celular de tejidos explantados de la especie proveniente, en el caso de herpesvirus de delfín se necesitaría un explante del ganglio del nervio trigémino. Van Elk et al. (2009) lograron el primer reporte de inoculación exitosa de herpesvirus de delfín en cultivo celular de células de delfín. En nuestro experimento, se realizó un segundo pase, donde se inocularon todas las muestras cosechadas del primer cultivo, incluyendo las muestras que dieron resultados negativos, con la finalidad de observar efectos citopáticos. En el segundo pase en algunos pozos se observaron sin cambios citopáticos. Las células inoculadas con las muestras de hígado se tuvieron un efecto citotóxico visualizándose vacuoladas en la primera inoculación. Según Freshney (2005) la vacuolización de las células indica que no se encuentran sanas o que se ha producido por citotoxicidad. En el segundo se observaron sin cambios citopáticos. Los cúmulos observados en todos los pozos se debieron a envejecimiento de las células. Freshney (2005) menciona que si la densidad de células alcanza un nivel en el que el sustrato se termina o cuando la concentración de células excede de la capacidad del medio, el crecimiento celular se detiene o se reduce. Martina y col. (2006) mencionan que en el caso de que la inoculación del herpesvirus en cultivo celular resulte negativa, se confirma su presencia por medio de PCR.

Para realizar la PCR a los controles, se realizaron tres métodos de extracción de ADN a los virus de Aujeszky e IBR, uno con kit y máquina de extracción y dos métodos manuales, la primera extracción manual se realizó de acuerdo a Van de Vanter et al. (1996), y la segunda extracción manual se realizó con el protocolo modificado de Ausubel et al. (2005) y Davis et al. (1994) en la cual se incluyó la vacuna de Rinotraqueítis viral felina (FVR). El ADN se visualizó por el método de electroforesis. Las bandas de ADN extraído con kit no se observaron claramente, pero con los métodos manuales sí se observaron bandas evidentes, buen indicio de la presencia de ADN en las muestras.

Para el diagnóstico de herpesvirus se intentó realizar PCR anidado, la técnica elegida fue desarrollada por Van de Vanter et al. (1996), esta PCR amplifica una región dentro del gen de la DNA polimerasa de la familia de los herpesvirus. Los iniciadores utilizados durante el

presente trabajo fueron reportados por primera vez por Van de Vanter et al. (1996) y se consideran degenerados (Tabla 3), se llaman así porque se utilizan para diagnosticar el herpesvirus en varias especies incluyendo especies marinas y terrestres, algunos oligonucleótidos cambian en la secuencia del virus de cada especie, así que los iniciadores se modifican para que se pueda unir más de uno. Se realizó la PCR anidada con los iniciadores reportados por Van de Vanter et al. (1996) (Tabla 3), con las condiciones descritas por Smolarek (2005), mismas que Blanchard et al. (2001), Smolarek et al. (2006) y Esperón et al. (2008) utilizaron para diagnosticar herpesvirus en cetáceos específicamente y con las condiciones que desarrollaron Van de Vanter et al. (1996) para herpesvirus de diferentes especies terrestres, mismo que utilizó Van Elk (2009) para diagnosticar herpesvirus en delfines nariz de botella (Tabla 4, 5 y 6). En el gel se observaron bandas, los controles positivos y negativos posterior a la PCR amplificaron bandas la misma altura. (Fig. 6) Aunque Aujeszky e IBR no afectan a la misma especie, en teoría amplifican igual, pues Van de Vanter et al. (1996) indican que los iniciadores abarcan con excelente sensibilidad un gran espectro de DNA polimerasas, pero el agua no debía amplificar por ninguna razón. Se concluyó que la concentración de los iniciadores era el problema así que por esta razón se corrigió la concentración de los iniciadores. La explicación para la visualización de bandas inespecíficas de todos los productos, según Van Pelt-Verkuil et al. (2008) es que la hibridación no específica es causada por varias situaciones, menciona que las bandas inespecíficas sugieren que el cálculo de la concentración de los iniciadores se realizó mal y que se encuentran en exceso.

Se realizó la PCR con la corrección en la concentración de los iniciadores y con las mismas condiciones utilizadas anteriormente (Tabla 5 y 6). En las reacciones a partir de la corrección de la concentración los geles se visualizaron sin banda. (Fig. 8) Al no observar bandas en los intentos pasados se realizó nuevamente PCR anidada pero con nuevas condiciones se aumentó la temperatura de hibridación y se disminuyeron los ciclos (Tabla 7) que según Van Pelt-Verkuil et al. (2008) son utilizadas usualmente en la mayoría de las PCR's. La temperatura de hibridación puede estar muy baja y podría causar una hibridación parcial del iniciador. Van Pelt-Verkuil et al. (2008) señala que para optimizar la hibridación de los oligonucleótidos de los iniciadores a cada banda y disminuyendo el número de ciclos se aumenta la temperatura de hibridación. De igual modo no se observaron bandas en el gel. (Fig. 8)

Para aumentar la astringencia de la reacción se le agregó tritón al 1% a las reacciones de la PCR anidada para aumentar la especificidad de la reacción y se corrió a 55 ciclos (Tabla 5) y a 45 ciclos (Tabla 6). Van Pelt-Verkuil et al. (2008) menciona que para aumentar la especificidad de las reacciones de PCR se utilizan detergentes algunas veces.

De este modo se pensó nuevamente en la concentración de los iniciadores, así que los iniciadores se corrieron por electroforesis directamente en el gel, las bandas no se visualizaron con la misma intensidad, de modo que no se encontraron a la misma concentración de ADN (Fig. 9). una manera más adecuada de realizar la evaluación de los iniciadores hubiera sido por medio de la densitometría sobre el gel, sin embargo en el momento del estudio el sistema utilizado en el laboratorio para ello no estaba funcionando.

Debido a que los protocolos seguidos en la estandarización de PCR anidada para diagnosticar herpesvirus en este trabajo han sido utilizados en diferentes referencias bibliográficas por Blanchard et al. (2001), Smolarek et al. (2006) Van Elk et al. (2009), Esperón et al. (2008) y Van de Vanter et al. (1996) se descartó el fallo en los protocolos. La preparación de los iniciadores también puede ser la falla de la estandarización. La adición del tritón, además del aumento en la cantidad de ciclos y temperatura se realizó para aumentar la astringencia a la reacción. Dejando de esta manera como única opción de error a los iniciadores, los cuales según, Van Pelt-Verkuil et al. (2008) durante una reacción con poca astringencia pueden no unirse o pueden causar una hibridación cruzada con secuencias que no embonan perfectamente y se disminuye esta posibilidad prolongando el número de ciclos de hibridación además de la disminución en la temperatura durante la hibridación. Van Pelt-Verkuil, (2008) también menciona que el diseño de los iniciadores puede influir en la reacción.

Por esta razón no fue posible correr ninguna de las muestras originales e inoculadas en células, por medio de PCR, así que Se sugiere seguir estandarizando con un nuevo conjunto de iniciadores.

CONCLUSIONES

La comparación de la citología vaginal de delfín (*Tursiops spp.*) con la citología vaginal de perra sirvió para identificar las células normales de delfín, las cuales son muy parecidas morfológicamente, pero el tamaño es mayor. La observación de la citopatología vaginal conociendo la citología normal fue de ayuda diagnóstica para poder descartar la presencia de inflamación en tracto genital a causa de virus.

La correlación de la ausencia de efectos citopáticos en las células Vero con la ausencia de inflamación en los frotis de citología vaginal y espermática, indican que el tracto reproductor de los animales examinados se encuentra libre de problemas infecciosos causados por herpesvirus.

No fue posible estandarizar la técnica de PCR, la preparación de los iniciadores fue el problema principal, ya que exceptuando los iniciadores y su concentración, se modificaron las variables que causan problemas de amplificación de ADN con mayor frecuencia en PCR sin obtener resultados positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen W. Edward, Fertility and obstetrics in the dog, Blackwell Scientific Publications, London, 1992, Pp. 48-52
2. Arias León Gabriela, Mariani di Lena Miguel A., Cornejo Uzcátegui Lius, Bermudez García Víctor, Ramírez Medina Oneyda, Estudio de infección sistémica por herpesvirus complicada con *Cryptosporidium spp.* en un delfín manchado del atlántico (*Stenella frontalis*. Cuvier, 1829), Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. XVIII, N° 3, Venezuela, 2008, Pp. 243-252
3. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., Current Protocols in Molecular Biology, 1st Edition, John Wiley & Sons Inc., USA, 2005.
4. Blanchard Terrell W., Nancy T. Santiago, Thomas P. Lipscomb, Richard L. Garber, Wayne E. Mcfee, and Susan Knowles, Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in atlantic bottlenose dolphins, Journal of Wildlife Diseases, 37(2), USA, 2001, Pp. 297–305
5. Bossart Gregory D, Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees, exposures to viruses, pollutants may lead to diseases, sometimes involving immune dysfunctions, among marine mammals, Microbe / Volume 2, USA, 2007, Pp. 544-549
6. Cowell Rick L., Ronald D. Tyler, James H, Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, Edit. Mosby Third edition, USA, 2007, Pp. 369- 387
7. Davis LG, Kuehl WM, Battey JF, Basic methods in molecular biology. 2nd edition, Appleton & Lange, Connecticut, USA, 1994.
8. De Buen de Argüero, Citología diagnóstica veterinaria, Edit. Manual moderno, México, 2001, Pp. 19-30
9. Epsy Mark J., Mitchell P. Shawn, Persing David H., Smith Thomas F, Diagnostic virology protocols, Chapter 7, Herpesviruses, edited by Stephenson John R., Warnes Alan, Humana Press, EUA, 1998, Pp. 89-102
10. Esperón F., Fernández A., Sánchez-Vizcaíno J. M., Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands, Diseases of aquatic organisms, Vol. 81, Spain, 2008, Pp. 73–76

11. Varela René A., Schmidt Kimberly, Goldstein Juli D, Evaluation of Cetacean and Sirenian Cytologic Samples Veterinary clinics, Exotic animal practice, N° 10, USA, 2007, Pp. 79-130
12. Fenner Frank, Bachman Peter A. et al., Virología Veterinaria, Edit. Acribia, España, 1992 Pp. 349-387
13. Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins; Fifth Edition, USA, 2006, Pp. 569, 573,2570
14. Freshney R. Ian, Culture in animal cells, fifth edition, Edit. Wiley Liss, USA, 2005 Pp. 375-577
15. González-Barrientos R., Morales J.-A., Hernández-Mora G., Barquero-Calvo E., Guzmán-Verri C., Chaves-Olarte E., Moreno E., Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*, Journal of Comparative Pathology, Volume 142, Issue 4, Costa Rica, 2010, Pp 347-352
16. Nollens Hendrik H., Rivera Rebecca, Palacios Gustavo, Wellehan James F.X., Saliki Jeremiah T., Caseltine Shannon L., et al., New recognition of Enterovirus infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) Veterinary Microbiology, Volume 139, Issues 1-2, USA, 2009, Pp. 170-175
17. Harzen and Stefan, Brunnick Barbara J., Skin disorders in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), resident in the Sado estuary, Portugal, Aquatic Mammals, 23.1, USA, 1997, Pp. 59–68
18. Heide Schatten y Gheorghe M. Constantinescu, Comparative Reproductive Biology, Chapter 7, Artificial Insemination by G. Althouse, Blackwell, Australia, 2007, Pp. 159-170
19. Jefferson Thomas A., Webber Marc. A, Pitman Robert L, Marine Mammals of the World, Academic Press, Canada, 2008, Pp. 9,15 - 27, 216-223
20. John Pierce Wise, Sandra S. Wise, Scott Kraus, Fariba Shaffiey, Marijke Grau, Tania Li Chen et al., Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung and testes fibroblasts, Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 650, Issue 1, USA, 2008, Pp. 30-38
21. Martina Byron E., Verjans Georges M.G.M., Kuiken Thijs, Van Amerongen Geert, Osterhaus Albert D.M.E, In vitro and in vivo replication of seal gammaherpesviruses in cells of multiple species, Microbes and Infection, 9, Netherlands, 2007, Pp. 40-46

22. Morgan Sara J, Darling David C., Cultivo de células animales, Edit. Acribia, España, 1993, Pp. 27-147
23. Murphy Frederick A. et al., Veterinary Virology, 3a Edición, Academic Press, USA, 1999, Pp. 301-325
24. Patel J.R., Heldens J.G.M., Review of companion animal viral diseases and immunoprophylaxis, Vaccine, 27, 2009, Pp. 491–504.
25. Petrie A; Watson P, Statistics for veterinary and animal sciences, Blackwell Science, London. 1999, Pp. 215-217, 101-112, 133-135.
26. Radin M. Judith, Maxey L.Wellman, Interpretación de la Citología Canina y Felina, Clinical Handbook Series, The Gloyd Group. Inc., Argentina, 1998, Pp. 11-29
27. Roberts Matthew, Jarvi Keith, Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertile man, *Can Urol Assoc J.* 3(6) Canadá, 2009 Pp.479-485.
28. Ruiz Álvaro, Morillo Luis E., Epidemiología Clínica, Edit. Médica Panamericana, España, 2004, Pp. 197-279
29. Saliki Jeremiah T., Emily J. Cooper, David S. Rotstein, Shannon L. Caseltine, D. Ann Pabst, William A. McLellan, Pamela Govett, Craig Harms, Kara A. Smolarek, and Carlos H. Romero, A Novel Gammaherpesvirus Associated with Genital Lesions in a Blainville's Beaked Whale (*Mesoplodon densirostris*) *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), USA, 2006, Pp. 142–148
30. Sedlák K., Bártová E., Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals, *Veterinary Parasitology*, Volume 136, Issues 3-4, USA, 2006, Pp. 223-231
31. Smolarek Benson K., Charles A. Manire, Ruth Y. Ewingc, Jeremiah T. Saliki, Forrest I. Townsend, Bernhard Ehlers f, Carlos H. Romero, Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales, *Journal of Virological Methods* 136, USA, 2006, Pp. 261–266
32. Smolarek Benson K., Molecular identification and genetic characterization of cetacean herpesviruses and porpoise morbillivirus, A thesis presented to the graduate school of the university of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science, University of Florida, USA, 2005, Pp. 1-49

33. Studahl Marie, Cinque Paola and, Tomas Bergström, Herpes simplex viruses, Edit. Taylor & Francis Group, EUA, 2006, Pp. 395-415
34. Taberlet P, Bouvet J. A Single plucked Feather as a source of DNA for bird gen studies. Laboratoire d'Ecologie et de génétique des populations, Université Joseph Fourier, 1991
35. Thrusfield M., Veterinary Epidemiology 3rd, Blackwell Publishing, London, 2005, Pp. 266-269.
36. Trigo Tavera F., Patología Sistémica Veterinaria. 3^a ed., Edit. Interamericana, México, D.F., 1998, Pp. 159-205
37. Van Bresseem, M.-F., Van Waerebeek, K., Raga, J.A., A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics, Dis. Aquat. Organ. 38, USA, 1999, Pp. 53–65.
38. Van Bresseem, M.-F., Van Waerebeek, Siebert U., Wünschmann A., Chávez-Lisambart L. and Reyes J. C., Genital Diseases in the Peruvian Dusky Dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*), J. Comp. Path., Vol. 122, Perú, 2000, Pp. 266–277
39. Van De Vanter Donald R., Warrenner Paul, Bennett Lindsely, Schultz Emily R., Coulter Silvija, Garber Richard L., M. Rose Timothy, Detection and Analysis of diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR, Journal Of Clinical Microbiology, USA, 1996,34 (7) Pp. 1666-1671
40. Van Elk Cornelis E., Van de Bildt Marco W. G., De Jong Antonius A. W., Osterhaus Albert D. M. E, Kuiken Thijs, Genital herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology, Journal of Wildlife Diseases, 45(4), Netherlands, 2009, Pp. 895–906
41. Van Pelt-Verkuil Elizabeth, van Belkum Alexander, Hays, John P, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Edit. Springer, Netherlands, 2008, Pp. 1-22, 63-104
42. Varela René A. Varela Schmidt Kimberly, Goldstein Juli D., Bossart Gregory, Evaluation of Cetacean and Sirenian Cytologic Samples, Veterinary Clinics Exotic animal practice, USA, 2007, Pp. 79-130
43. Voyles Bruce A., The biology of viruses, 2nd Edition, Mc Graw Hill, New York, USA, 2002, Pp. 184- 186

44. Wanke M. M., Gobello C., Reproducción en caninos y felinos domésticos, Edit. Intermédica, Argentina, 2006, Pp. 14-24