



---

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**Identificación por microscopía electrónica de  
transmisión de aislamientos de Herpesvirus de  
delfines (*Tursiops truncatus*) de vida libre, en la  
región marina de Campeche.**

**TESIS PROFESIONAL**  
**que para obtener el título de:**  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**  
**ERIDANI NOEMI ORTUÑO DE LA O**

***Asesor: Dr. Guillermo Valdivia Anda***  
***Coasesor: M. en C. Sofía González Gallardo***

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

U. N. A. M.  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



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

DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**"IDENTIFICACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE AISLAMIENTOS DE HERPESVIRUS DE DEFINES (Tursiops truncatus) DE VIDA LIBRE, EN LA REGIÓN MARINA DE CAMPECHE".**

Que presenta la pasante: **ERIDANI NOEMI ORTUÑO DE LA O**

Con número de cuenta: **30659884-7** 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 ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de enero de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez	
<b>VOCAL</b>	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
<b>2do SUPLENTE</b>	M. en C. Tiziano Santos Morín	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art. 127 RFP)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, “Máxima Casa de Estudios” de toda la educación superior y del desarrollo científico y tecnológico de México. Por darme la oportunidad de formar parte de esta comunidad, con todas las responsabilidades que ello implica, tanto con nuestra institución, en la comunidad y en el país.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que ha sido durante este tiempo mi casa, el lugar donde me formé y que me ha proporcionado un cúmulo de recuerdos que me hace ver que todo lo que he vivido ha contribuido a que sea mejor persona, mejor estudiante, mejor amiga y mejor hija. Gracias por todos los retos, los conocimientos y las experiencias otorgadas, que me han hecho crecer y que ahora me siento preparada para enfrentar el presente y poder plantearme nuevos objetivos, tanto en lo personal como en lo profesional.

Mi gratitud a todos mis profesores, quienes dieron parte de sí mismos para transmitirme conocimientos y aptitudes indispensables para mi desarrollo profesional. A mis compañeros y amigos que han sido soporte y me han acompañado en este trayecto, que han sido testigos y cómplices del esfuerzo y dedicación necesarias para llegar hasta este punto, les agradezco su cariño y su impulso.

A mi asesor Dr. Guillermo Valdivia Anda por ser un excelente profesor y mentor; por el tiempo otorgado para que este proyecto culminara en buenos resultados y por la confianza depositada en mí. A mi coasesor M. en C. Sofía

González Gallardo por darme las herramientas necesarias y el apoyo para llevar a cabo esta investigación. De igual manera a mis sinodales, que me compartieron su tiempo para mejorar este trabajo.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de los proyectos: Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IT224311-3 y Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE 200707

El trabajo fue realizado gracias al equipo e instalación del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4 y del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la FESC, Campo 1.

Se agradece al Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®) por proporcionar las muestras empleadas en este trabajo.

Al M. en C. César Cuenca Verde por el apoyo técnico prestado para la adecuada realización del trabajo.

Gracias al Programa de Fortalecimiento Académico de los Estudios de Licenciatura (PFEL), en el que fui becaria del periodo de enero 2009 a junio 2013.

Gracias al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IT224311-3, en el que fui becaria del período de julio a diciembre de 2013.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

## DEDICATORIA

A Dios por colmarme de bendiciones en cada etapa de mi vida, guiarme, fortalecer cada paso que doy y nunca separarse de mí.

*Je t'aime, Seigneur, tu es ma force. Le Seigneur est pour moi un roc, un refuge où je suis en sûreté. Mon Dieu est pour moi un rocher où je suis à l'abri du danger, un bouclier qui me protège, une forteresse où je suis sauvé. Ps. 18:1-2*

A mis padres por su apoyo incondicional en un gran proceso...

Papounet, gracias por tu excelente ejemplo y ayuda constante. Por compartirme de tu conocimiento y tiempo. Por tu dulce esfuerzo, paciencia y amor.

Mamounette, gracias por tu complicidad y tierna ayuda. Por tu dedicación, ejemplo y comprensión. Por esa seguridad que siempre me proporcionas y por todo tu amor.

A mis hermanos por sus consejos, apoyo y compañía...

Moisés, gracias por tu ayuda, tu tiempo y porque siempre me escuchas. Por acompañarme en momentos difíciles y también disfrutar conmigo las bendiciones de Dios.

Felipe, gracias por tu ejemplo y tus enseñanzas. Por ser ese duro y tierno pilar que siempre necesito. Por tus cuidados, por la confianza y motivación constante ante todo.

Dany, gracias por tu paciencia y complicidad. Por las alegrías y locuras que compartimos. Por tu ayuda y compañía en cada momento. Por las ocurrencias y risas. Por enseñarme a disfrutar todo.

A ustedes papas y hermanos, que por su amor y enseñanzas he podido alcanzar muchas metas en diversas áreas de mi vida. Ahora gracias a su confianza terminé una etapa (Alfalfa II), que sé que es el comienzo de un reto más.

A Lizzy, por ser esa inspiración, compañía y motivación que me encanta cuidar.

A mis amigas Belén, Laura y Xochitl por su amistad durante tantos años.  
Gracias por su confianza. Gracias por esos momentos que disfrutamos.  
Gracias por todo.

A ustedes gymgrlz (familia Ward) por enseñarme a disfrutar todo con  
disciplina y pasión.

“Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar”

Eugene Ware.



ÍNDICE DE CONTENIDO	Pág.
1. Introducción	12
1.1. El delfín mular o delfín nariz de botella	12
1.2. Herpesvirus	15
1.3. Patogenia	17
1.3.1. Entrada del virus	17
1.3.2. Proteínas no glicosiladas del virión importantes en la infección	18
1.3.3. Liberación del ADN viral	18
1.3.4. Replicación viral	18
1.3.5. Ensamblaje de la cápside	18
1.4. Infección activa y latencia	19
1.5. Psiconeuroinmunología (PNI)	20
1.6. Microscopía Electrónica de Transmisión	21
1.7. Nanopartículas de quitosan	21
1.8. Inmunofluorescencia directa	22
2. Antecedentes	23
3. Objetivos	24
4. Justificación	24
5. Equipo y Material Utilizados	24
6. Métodos y Procedimientos de Análisis	25
6.1. Tinción negativa de sobrenadantes de cultivo celular	25
6.2. Preparación de tejidos con tinción para corte fino: doble tinción electroconductiva	26
6.2.1. Inclusión en resina epóxica EPON 812	26
6.2.2. Microtomía	27
6.2.3. Tinción para corte fino: doble tinción electroconductiva	29
6.3. Técnica de Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de sobrenadantes de cultivo celular).	30
6.4. Técnica de Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de tejido).	30
7. Resultados	32

7.1.	Microscopía Electrónica de Transmisión de sobrenadantes de cultivo celular.	32
7.2.	Microscopía Electrónica de Transmisión de piel.	38
7.3.	Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de sobrenadantes de cultivo celular).	41
7.4.	Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de tejido).	43
8.	Discusión	46
9.	Conclusiones	52
10.	Recomendaciones	53
11.	Referencias Bibliográficas	54

FIGURAS Y TABLAS	Pág.
Tabla 1. Proporción de óxido de propileno y resina para la infiltración de los tejidos con resina epóxica EPON 812.	26
Tabla 2. Relación de tiempo y temperatura dentro de la estufa para la correcta polimerización de los tejidos.	27
Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 001.	32
Figura 2. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 001.	33
Figura 3. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 001.	33
Figura 4. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 015.	34
Figura 5. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 015.	34
Figura 6. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 015.	35
Figura 7. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 008.	35
Figura 8. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 008.	36
Figura 9. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: 003.	36
Figura 10. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: sobrenadante de cultivo celular con nanopartículas de quitosan.	37
Figura 11. Microfotografía electrónica de transmisión. Muestra: sobrenadante de cultivo celular con nanopartículas de quitosan.	37
Figura 12. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	38
Figura 13. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	38

Figura 14. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	39
Figura 15. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	39
Figura 16. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	40
Figura 17. Microfotografía electrónica de transmisión de piel.	40
Figura 18. Inmunofluorescencia directa. Muestra: 001.	41
Figura 19. Inmunofluorescencia directa. Muestra: 015.	42
Figura 20. Microfotografía con contraste de fase e inmunofluorescencia. Muestra: 008.	42
Figura 21. Inmunofluorescencia directa. Muestra: 003.	43
Figura 22. Microfotografía de inmunofluorescencia directa en corte histológico de piel.	43
Figura 23. Microfotografía de inmunofluorescencia directa en corte histológico de piel.	44
Figura 24. Epidermis con lesiones por herpesvirus.	44
Figura 25. Epidermis con lesiones por herpesvirus.	44
Figura 26. Microfotografía de cultivos celulares por medio de microscopio invertido.	45
Figura 27. Lesiones por herpesvirus.	52

## INTRODUCCIÓN

### EL DELFÍN MULAR O DELFÍN NARIZ DE BOTELLA

Los cetáceos son mamíferos que pueden vivir en agua dulce o salada, según la especie a la que pertenezcan, lo cual crea interacción con todos los elementos que rodean a las especies animales, tanto de vida silvestre como doméstica, incluyendo la exposición a enfermedades. Estos cetáceos, al igual que los mamíferos terrestres, poseen sistemas orgánicos estructurados morfológicamente similares, con algunas variantes de organización, conformación, tamaño y ultra estructura orgánica específica, las cuales constituyen adaptaciones a su medio de vida. Por esta razón, pueden presentar patologías asociadas a etiologías parasitarias, bacterianas, virológicas, fúngicas y neoplásicas entre otras. Esto puede manifestarse en la misma medida que en los animales de vida terrestre, e inclusive, muchas de estas enfermedades están asociadas a infecciones de tipo zoonóticas y sus variantes (zoonosis, ciclozoonosis, metazoonosis, saprozoonosis, amphixenosis, etc) (Cawardine, 2004).

El estudio de los mamíferos marinos cobra gran importancia debido a su abundancia, tamaño y posición trófica, por lo que pueden tener un gran impacto sobre la estructura y función de los ecosistemas marinos en zonas determinadas (Chilvers *et al.*, 2003, Young *et al.*, 2002). Estos animales se consideran como centinelas que proporcionan la información necesaria para prever una respuesta temprana a condiciones potencialmente riesgosas y permitir un manejo más efectivo de los recursos (Bossart 2006, Reddy *et al.* 2001, Well *et al.* 2004).

La aparición de nuevas enfermedades que afectan a estas especies es una alerta acerca del deterioro que padece la salud de los océanos (Marine Mammal Commission, 2004). Estos fenómenos pudieran responder al llamado «síndrome de estrés ambiental», asociado al desequilibrio ecológico producido por la actividad humana y a los efectos del cambio climático (Bossart 2007, Simmonds *et al.*, 2009). El desconocimiento de los patrones de salud de estos animales podría potencialmente afectar el bienestar de la humanidad (Bossart 2006).

El delfín mular, también llamado delfín nariz de botella o toninas (*Tursiops truncatus*), es una especie que pertenece al Reino *Animalia*, Phylum *Chordata*, Clase *Mammalia*, Orden *Cetartiodactyla*, Suborden *Odontoceti* y Familia *Delphinidae* (Hammond *et al.*, 2013). Es un delfín con una aleta dorsal alta con una amplia base, situada a mitad camino entre el hocico y la cola. El

color es gris oscuro en el dorso y gris claro en el vientre. Pesan 150-350 kg y tienen una longitud máxima de aproximadamente 4 m, siendo los machos más grandes que las hembras. Se alimentan de calamares, camarones, anguilas y una gran variedad de peces. El delfín mular generalmente viaja en grupos de docenas, pero han sido avistados en grupos de varios cientos. El tamaño del grupo se ve afectado por la estructura del hábitat y tiende a aumentar con la profundidad del agua. Los miembros del grupo interactúan estrechamente y son muy cooperativos en la alimentación, protección y las actividades de la guardería. Estos delfines emiten numerosos sonidos y son probablemente buenos ecolocalizadores y muy comunicativos (WAZA, 2013).

La taxonomía del género *Tursiops* ha sido algo confusa debido a la variación geográfica, y es muy posible que algunas especies sean reclasificadas en un futuro. Si bien hace unos años la mayoría de los investigadores coincidieron en que hay una sola especie, *Tursiops truncatus*, con un número de formas regionales, tales como *T. Gilli* (California y la costa del Pacífico mexicano), *T. Nuuanu* (en alta mar del Pacífico, especialmente en el Pacífico Oriental Tropical) y *T. aduncus* (Sudáfrica, Australia), la opinión dominante es que en la actualidad hay dos especies de delfines mulares: el delfín mular del Atlántico (*Tursiops truncatus*) y el delfín mular del Indo-Pacífico (*Tursiops aduncus*) (Hammond *et al.*, 2013).

De las más de 30 especies de delfines que existen, ésta es la más común y más conocida de la familia. Esto se debe a que, con frecuencia, se mantiene en cautiverio, por su naturaleza sociable y su inteligencia (Bearzi *et al.*, 2004).

La UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) considera el estatus de conservación global del delfín mular de preocupación menor, aunque se desconoce su tendencia poblacional. Se estima que la población mundial está formada por unos 600.000 individuos (Perrin *et al.*, 2009). El océano Pacífico es la zona con poblaciones más grandes, donde hay alrededor de 226.200 individuos en el Pacífico este tropical (Wade, 1993), unos 168.000 en el Pacífico noroeste (Miyashita, 1993), unos 3.215 en las aguas que rodean el archipiélago de Hawaii (Barlow, 2006) y unos 2.273 en aguas de California, Oregón y Washington (Forney 2007). En el océano Atlántico, los números no son tan grandes, pero se estima que viven unos 123.762 individuos en la costa este de Norteamérica, alrededor de unos 52.000 en el golfo de México, unos 12.600 en las costas atlánticas europeas y unos 1.000 alrededor de las Islas Faroe. La población del Mar Negro se estima en varios miles de individuos aunque no se conoce el número exacto. En el Mediterráneo

no hay estimaciones concretas, pero estudios realizados en el oeste de la cuenca han estimado la presencia de unos 7.654 individuos alrededor de las Islas Baleares (Forcada *et al.*, 2004) y unos 584 en el mar de Alborán (Cañadas, 2006). Se cree que la población total estaría formada por unos 10.000 individuos (Reeves *et al.*, 2006) y que habría disminuido considerablemente durante las últimas décadas. Estos hechos han llevado a la UICN a clasificar el estatus de conservación del delfín mular en el Mediterráneo de vulnerable.

El delfín mular está protegido por diversos convenios internacionales, por ejemplo se encuentra en el apéndice II del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES), que incluye a las especies que no necesariamente están amenazadas con la extinción, pero en las que el comercio debe de ser controlado para evitar un uso incompatible con su supervivencia, también por el apéndice II de la Convención de Especies Migratorias (CMS) y por el Acuerdo sobre la Conservación de los Cetáceos del Mar Negro, Mediterráneo y el Área Atlántica adyacente (ACCOBAMS). Además están protegidos también por la legislación de muchos de los países mediterráneos. Esta protección ha conllevado el desarrollo de centenares de Áreas Marinas Protegidas en distintos países. De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 está considerado como sujetas a protección especial (PROFEPA, 2013).

Para asegurar la conservación de esta especie es muy importante que los estudios científicos permitan ampliar los conocimientos que se tiene sobre la especie, mediante estudios a mayor escala. La falta de conocimiento puede ser muy perjudicial, ya que puede retrasar la adopción de medidas de conservación importantes o afectar a la eficacia de las ya existentes. Es necesario que los diferentes estados contribuyan y tengan la voluntad política de establecer medidas para mitigar las amenazas causadas por la acción humana (Bearzi *et al.*, 2004).

Resulta de especial interés el estudio de un grupo de enfermedades que, aun cuando no son capaces de provocar una alta mortalidad, afectan de manera significativa las poblaciones de delfines nariz de botella en diferentes áreas del planeta, disminuyendo su capacidad de reproducción y con ello el número de individuos, con la consecuente afectación de los ecosistemas. (Cruz *et al.*, 2011).

Dentro de esas enfermedades se encuentran las virales, de las cuales uno de los virus más comunes son los herpesvirus.

## HERPESVIRUS

Los herpesvirus son virus ADN, envueltos y que afectan a diversas especies animales, incluyendo al ser humano.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha clasificado a los herpesvirus en 3 subfamilias, basándose en sus propiedades biológicas: *Alfa*, *beta* y *gamma*herpesvirinae.

- *Alfaherpesvirinae*: Tienen un rango variable de posibles huéspedes, ciclo reproductivo relativamente corto, crecimiento fácil en cultivo, eficiente destrucción celular y alta capacidad para establecer latencia principalmente en ganglios sensoriales. Existen 2 géneros: *Simplexvirus* (HSV-1 y 2, entre otros), y *Varicellovirus* (VZV, pseudorabia y herpes equino 1).
- *Betaherpesvirinae*: Tienen un rango de huésped muy estrecho. El ciclo reproductivo es lento y crecen lentamente en cultivos. La célula infectada puede aumentar mucho de tamaño (citomegalia). El virus puede permanecer en latencia en glándulas secretoras, células linfoides, riñón y otros tejidos. Existen 2 géneros: *Cytomegalovirus* (HCMV) y *Muromegalovirus* (citomegalovirus murino).
- *Gammaherpesvirinae*: *In vitro*, todos los miembros de este grupo replican en células linfoblásticas, aunque en algunos casos pueden lisar células fibroblásticas o epiteliales. Existen virus específicos de linfocitos T y B. Se suele inducir la fase de latencia. Existen 2 géneros: *Lymphocryptovirus* (EBV) y el *Rhadinovirus* (herpesvirus saimiri).

Esta clasificación de subfamilias de acuerdo a características de crecimiento en tejidos y células y el genoma, los *alphaherpesvirinae* son los más citopáticos, los *gammaherpesvirinae* son los más lentos y se integran fácilmente a los cromosomas de las células hospedadoras y, finalmente los *betaherpesvirinae*, comparten características de ambos grupos (Fields *et al.*, 1996).

Por definición, todos los miembros de la familia *Herpesviridae* cuentan con una arquitectura que incluye: Un genoma con ADN de doble cadena lineal; cápside; un material amorfo que rodea la cápside denominado tegumento y una envoltura lipídica con glicoproteínas virales en la superficie. El virión puede tener hasta 35 proteínas, conteniendo incluso enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de ADN y procesamiento proteico. Su tamaño varía



desde los 120 hasta 300 nm (Fields *et al.*, 1996). Esta variación depende, en parte, del grosor del tegumento y del estado de la envoltura, pudiendo variar de unos herpesvirus a otros e incluso, dentro de la misma especie (Bascones, 2009).

Las proteínas del virión se encuentran en diferentes estructuras virales; 6 de ellas están presentes en la nucleocápside y entre unas 10 a 20 están presentes en el tegumento, 10 en la envoltura, principalmente glicoproteínas, las cuales varían entre las diferentes especies. Un pequeño número están asociadas con el ADN en el núcleo (core) (Gómez, 2013).

La estructura del virión consta de:

- **ADN:** el material genético de los herpesvirus consiste en una cadena doble de ADN lineal, pero que se circulariza inmediatamente luego de ser liberado de la cápside en el núcleo de la célula infectada, por mecanismos todavía desconocidos. El ADN tiene un tamaño aproximado entre 120 y 230 kilopares de bases (kbp), dependiendo de las secuencias repetitivas internas y terminales que pueda tener el virión.
- **CORE:** contiene el ADN viral que en algunos casos está asociado a una estructura proteínica.
- **CÁPSIDE:** es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros, en su interior se encuentra el material genético del virus. Es una de las estructuras características de todos los herpesvirus. Su tamaño varía de 100 a 110nm de diámetro y 162 capsómeros, tanto pentámeros como hexámeros, normalmente constituida a partir de 6 proteínas.
- **TEGUMENTO:** es un grupo de proteínas que recubre el espacio entre la envoltura y la nucleocápside de todos los herpesvirus. El tegumento generalmente contiene proteínas que ayudan en la replicación del ADN viral y la evasión de la respuesta inmune, por lo general con la inhibición de la señalización en el sistema inmune y la activación de los interferones. El tegumento es generalmente puesto en libertad poco después de la infección en el citoplasma. Este término lo introdujo Roizman y Furlong en 1974, para describir la estructura entre la cápside y la envoltura. Aparece como fibrosa en tinción negativa.

- ENVOLTURA: es una estructura con apariencia típica trilaminar, pues proviene de membranas celulares parcialmente modificadas. Por lo tanto, la envoltura contiene lípidos y numerosas espículas formadas por proteínas (glicoproteínas) virales de aproximadamente 8 nm de tamaño. El número de glicoproteínas varía, por ejemplo, Virus herpes humano 1 (HSV-1) contiene por lo menos 11 diferentes (Campbell *et al.*, 2005).

Entre las características biológicas de todos los herpesvirus cabe destacar las siguientes:

1. Todos los herpesvirus codifican para un gran número de enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidina quinasa, sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), síntesis del ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y procesamiento de proteínas (proteína quinasa, etc.).
2. La síntesis del ADN y el ensamblaje de la cápside ocurre en el núcleo.
3. La producción de la progenie viral va siempre acompañada de la destrucción celular. Las células diana de infección pueden variar enormemente. Mientras unas infectan neuronas, otras pueden infectar linfocitos u otros tipos celulares distintos.
4. Estos virus son capaces tras una infección aguda, de producir latencia en el huésped infectado, durante la cual, sólo un muy pequeño número de transcritos virales son producidos (Fields *et al.*, 1996).

## PATOGENIA

### **Entrada del virus**

Consiste en 2 eventos principales independiente de pH: Unión a la superficie celular y fusión con la membrana plasmática.

Inicialmente dos proteínas glicosiladas, gB y gC, se unen a un residuo de heparán sulfato (proteoglicano de la superficie celular). Al parecer otra proteína glicosilada (gD) juega también un papel en este paso. Posteriormente se produce la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática de la célula, implicándose las glicoproteínas gB, gD, gH y gL (Thiry *et al.*, 1986).

### **Proteínas no glicosiladas del virión importantes en la infección**

Además de las glicoproteínas involucradas en la entrada, hay otros componentes del virión implicados en el desarrollo de la infección: proteínas de membrana no glicosiladas como la denominada vhs U<sub>L</sub>41, que está implicada en la inducción de la inhibición de la síntesis de proteínas del huésped, destruyendo la mayoría de los ARN mensajeros para permitir al virus hacerse totalmente cargo de la maquinaria de síntesis de proteínas y aumentar la eficiencia en la producción de virus.

Otra proteína importante es la proteína quinasa U<sub>L</sub>13, con función no del todo conocida, pero cuya ausencia bloquea la infección.

### **Liberación del ADN viral**

Una vez en la célula, la cápside atraviesa los poros nucleares y libera el DNA en el nucleoplasma. Probablemente, el citoesqueleto celular colabora con el transporte al núcleo.

Dentro de la célula infectada, la RNA polimerasa celular tipo II puede producir hasta 50 tipos diferentes de mRNA que están organizados en 3 bloques: Inmediatamente tempranos (*alfaherpesvirinae*), tempranos (*betaherpesvirinae*) y tardíos (*gammaherpesvirinae*).

### **Replicación viral**

La replicación viral está más estudiada en el Virus del Herpes Simple (VHS). En células infectadas, se detecta síntesis de DNA a las 3 horas postinfección, la cual continúa durante otras 12 horas. Esta síntesis se realiza en el núcleo celular.

### **Ensamblaje de la cápside**

El ensamblaje se produce en el núcleo. Tampoco se conoce muy bien todo el proceso. El DNA viral se empaqueta en una cápside preformada que contiene la proteasa viral. Al empaquetar el DNA, éste sufre un proceso por el cual vuelve a ser lineal.

La cápside con el DNA se une a la membrana interna nuclear y antes de pasar al espacio perinuclear, el virión adquiere la envuelta para luego perderla en la membrana externa nuclear. Se supone que de aquí el virus pasa al retículo endoplásmico, adquiriendo, de nuevo, la membrana. El

proceso siguiente tampoco se conoce del todo. Algunos autores apuntan que el virión pasa al citoplasma atravesando, desde aquí, la membrana plasmática. Otros proponen que el virus maduro pasa al aparato de Golgi y de aquí sale como si se tratara de una proteína que se secreta (Trono et al., 1998).

## INFECCION ACTIVA Y LATENCIA

En el sistema se produce una restricción de la expresión del genoma viral y un establecimiento de latencia. Estos periodos de latencia pueden alternar con reactivación viral (por causas no del todo claras).

PhD. Bryan R. Cullen ha definido la latencia como *la* infección improductiva y reversible de una célula por un virus capaz de replicarse. Casi todos los herpesvirus son capaces de volverse latentes, lo cual se puede considerar como un estado que puede durar toda la vida (Roizman, 1994).

La latencia comprende varias propiedades importantes de los herpesvirus.

- Deben evadir con éxito la respuesta inmunitaria del huésped.
- Deben ser capaces de insertar su genoma en las células del cuerpo, y, que el genoma se mantenga en la célula infectada en estado latente (Thiry, 1986).

Este comportamiento es fácil de ejecutar para los virus neurotrópicos (*alfaherpesvirinae*), los cuales infectan las células que no se dividen, como las neuronas. Pero es más difícil para los herpesvirus linfotrópicos (*gammaherpesvirinae*), los cuales infectan células que se dividen o células en mitosis, como las células B. En este último caso, el virus requiere un origen especializado de la replicación viral, para asegurarse que su genoma es reproducido y retenido en las células hijas, después de la división celular (Wagner, 2003).

Los herpesvirus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Prácticamente, todas las especies animales poseen algún virus de esta familia (Fields *et al.*, 1996).

Se han aislado más de 200 tipos de herpesvirus a partir de mamíferos; de ellos, sólo algunos infectan a mamíferos marinos. Todos los aislamientos e identificaciones en mamíferos marinos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han realizado en animales varados o en animales de vida libre, y hasta la fecha, no ha sido posible involucrarlos como la causa de muerte en estos

animales. En este sentido, se considera a los herpesvirus de los animales y del humano como específicos de especie (Maness *et al.*, 2011).

### PSICONEUROINMUNOLOGÍA (PNI)

Durante los últimos años, la Psiconeuroinmunología, que es el estudio de la interacción entre la conducta, función neural y endocrina y los procesos inmunes, ha desarrollado un campo de investigación interdisciplinario. Previamente desconocidas e insospechadas conexiones entre el cerebro y el sistema inmune (SI) proveen una fundamentación para 2 importantes observaciones:

1. Que la manipulación de las funciones neural y endocrina altera la respuesta inmune (RI), y que la estimulación antigénica, que induce una RI, conduce a cambios en la función neural y endocrina.
2. Que los procesos conductuales son capaces de influir en la reactividad inmunológica y de este modo, el estatus inmune de un individuo tiene consecuencias en su comportamiento (Ader, 1993).

Los organismos vivientes tienen la capacidad de ajustarse a una cantidad, variedad e intensidad de estímulos siempre y cuando estos oscilen dentro de un rango que no altere la homeostasis del organismo. Si la cantidad y calidad de estos estímulos está por debajo o por encima de ese rango, el equilibrio se ve perturbado y ésta deficiencia o exceso puede ser considerado como estrés, el cual es generalmente multifactorial (Chelmicka, 1998).

La inmunidad celular tiene dos misiones, protección frente a la infección y mantener en estado inactivo el herpes latente. La explicación de la relación entre estrés y aumento de los anticuerpos contra el herpesvirus es que el estrés suprime la inmunidad celular, lo cual permite al virus latente volverse activo (Yada, 2002).

Puesto que el sistema inmunológico juega un papel fundamental en la protección frente a las infecciones, la alteración de sus componentes por los virus puede exacerbar la gravedad de la infección o predisponer a superinfecciones por otros agentes víricos y no víricos. En las infecciones víricas pueden presentarse una inmunodeficiencia adquirida específica y una inmunosupresión generalizada. Muchos virus son capaces de replicarse en los macrófagos y se ha demostrado que otros se replican en las células T, específicamente células T activadas. Algunos Herpesvirus se

replican improductivamente en las células B, transformándolas y alterando sus funciones. Igualmente, cuando el sistema inmune está inhibido por factores endógenos o exógenos se pueden reactivar infecciones latentes por *Herpesvirus*, *Adenovirus* o *Parvovirus*. (Reidarson H. Thomas. 2010).

### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

La microscopía electrónica de transmisión (MET) permite la observación de muestras en cortes ultrafinos. En este tipo de microscopía se dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar la MET debe cortarse la muestra en capas finas (nanómetros). Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces (Isenberg, 1998).

La MET puede ser usada para el diagnóstico de enfermedades de origen microbiano, aunque su principal aplicación es en investigación. La MET provee detalles ultraestructurales de éstos, los cuales son útiles para la identificación y análisis de virus, bacterias, parásitos y hongos. El mayor aporte de la MET es la identificación de agentes virales, por la capacidad de aumento. Si bien la MET es un método muy útil en la identificación rápida y la investigación de casos nuevos de origen infeccioso viral, la explotación completa de su potencial requiere de una aplicación temprana y coordinada con otros procedimientos de diagnóstico (Bozzula, 1997).

La MET es una herramienta valiosa de diagnóstico microbiológico y de investigación tanto en medicina humana como en veterinaria y su alcance se puede incrementar con la aplicación de otros métodos. La microscopía electrónica ha sido empleada para la identificación rápida de virus en tejidos, la caracterización de partículas virales y para la caracterización de las lesiones provocadas en las células y tejidos por las infecciones virales (González, 2003).

### NANOPARTICULAS DE QUITOSAN

El quitosán es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N- desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. Se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos y en la ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (v. gr.

HemCon®). (Higuera-Ciapara *et al.*, 2007). Más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas. (Orive *et al.*, 2005).

Otras funciones mucho más especializadas son reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras (Goycoolea *et al.*, 2009).

Es especialmente relevante que estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud (Teijeiro-Osorio *et al.*, 2008). En el presente trabajo se utilizó como medio de “sostén” de partículas virales para la observación en MET.

Se ha citado la capacidad del quitosán para penetrar en forma eficiente en las células y distribuirse en forma homogénea en el medio intracelular independientemente de su composición. Esto ha permitido encapsular estructuras como el ADN, para penetrar en forma eficiente al interior de las células para realizar estudios de transfección en un modelo celular y cuantificar la expresión protéica. (Goycoolea *et al.*, 2009).

### INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La inmunofluorescencia o técnica de anticuerpos fluorescentes es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo hecha visible por la incorporación de un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína o tetrametil rodamina) al anticuerpo, y una vez hecha la reacción, se expone a la luz ultravioleta emitida por el microscopio para ser evidenciado por el fenómeno de fluorescencia. La muestra clínica que presuntamente contiene antígenos del microorganismo bajo estudio, es puesta en contacto con un anticuerpo dirigido contra dicho microorganismo conjugado con fluoresceína. Si el antígeno esperado está presente se formará un complejo antígeno-anticuerpo. La reacción positiva en forma de fluorescencia verde manzana puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Se ha empleado como técnica para detección de moléculas de complemento, cuantificación de inmunoglobulinas,

diagnóstico de enfermedades cutáneas, observación de biopsias, diagnóstico de neoplasias, detección de virus, bacterias, hongos, etc (Fiorentino *et al.*, 1994).

#### ANTECEDENTES:

Los aislamientos de herpesvirus en delfines se han caracterizado, principalmente, como parte de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Maness *et al.*, 2011) y en algunos casos de la subfamilia *Betaherpesvirinae*. Se han aislado herpesvirus del cerebro de una marsopa común varada, de la mucosa peneana de una marsopa común, de úlceras esofágicas en belugas y marsopa común, de dermatitis generalizada en hembras de belugas juveniles varadas y de puntos negros en el hocico de delfines oscuros en libertad. Con excepción de los cuadros clínicos de encefalitis por herpesvirus en la marsopa común, las otras lesiones estaban localizadas en piel y mucosa únicamente, sin evidencia de diseminación sistémica (Rehtanz *et al.*, 2012).

Se han aislado herpesvirus de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, de lesiones graves de pene y vagina; de delfines en cautiverio en Holanda y Francia (Van Elk *et al.*, 2009).

En otro trabajo se logró identificar una lesión sistémica por Herpesvirus asociada a Morbilivirus, incluso con lesión en encéfalo (Soto *et al.*, 2012).

En algunas ocasiones, las infecciones por herpesvirus también se han relacionado a problemas reproductivos y hepáticos en mamíferos marinos (Goldstein *et al.*, 2004). O incluso, se han asociado filogenéticamente a los herpesvirus del bovino involucrado en la enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) (Maness *et al.*, 2011).

El uso de la inmunofluorescencia como técnica de diagnóstico específica, ha tenido relevante importancia en mamíferos acuáticos. En un trabajo previo realizado en el proyecto de evaluación de la salud de delfines de vida libre en la zona de Campeche, en la Laguna de Términos, se tomaron muestras de espiráculo, vagina, piel y sangre y a partir de las muestras vaginales se lograron dos aislamientos de herpesvirus, identificados mediante inmunofluorescencia empleando un conjugado comercial antiherpesvirus canino (Zinsser, 1994).

La MET se ha utilizado como método de diagnóstico en mamíferos acuáticos. En 1986, se aislaron partículas virales de ballenas beluga varadas en el río St. Lawrence, en Canadá, las cuales fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión. (Martineau *et al.*, 1988).



Se describió, también, la papilomatosis de lesiones genitales en delfines nariz de botella, donde se realizó una descripción clínica, histopatológica y ultramicroscópica de las lesiones. La descripción anatomopatológica permitió definir las lesiones orogenitales como típicas de una papilomatosis, lo que se corroboró con la observación de partículas virales por microscopía electrónica de transmisión. (Chamizo *et al.*, 2011).

## OBJETIVOS

1. Estandarizar la técnica de tinción negativa para microscopía electrónica en sobrenadantes de cultivos celulares infectados con Herpesvirus de delfín.
2. Determinar la morfología y tamaño de partículas virales en el cultivo, empleando microscopía electrónica de transmisión.
3. Identificar por MET partículas virales en biopsias de piel de delfines de vida libre.

## JUSTIFICACIÓN

Los herpesvirus afectan a la fauna silvestre protegida de nuestro país que ya han sido identificados y descritos en otros países; sin embargo, en México no encontramos un reporte documentado.

En otras especies de fauna silvestre también se ha utilizado la MET como herramienta de diagnóstico; en delfines no ha sido empleada ampliamente por lo que su uso dependerá de las facilidades para llevarla a cabo. En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán existen equipos para llevar a cabo estas técnicas de diagnóstico.

## EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADOS

- a. Cámara de incubación
- b. Material de cristalería (matraces, vasos de precipitado, pipetas, probetas, cajas de Petri, tubos de ensaye, etc.)
- c. Microscopio óptico (Carl Zeiss) y microscopio estereoscópico (ELVAR)

- d. Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM-100S)
- e. Ultramicrotomo
- f. Muestras de piel de delfín
- g. Sobrenadantes de cultivos celulares

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS

Se utilizaron tres sobrenadantes de cultivo celular derivados de células de riñón de bovino MDBK infectadas con herpesvirus aislados de delfín. También fue empleado un purificado viral obtenido por ultracentrifugación. Ambos fueron proporcionados por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).

Se emplearon muestras de lesiones en piel sugestivas de ser causadas por herpesvirus, que fueron donadas por el laboratorio DIVET®; las cuales constituyeron el producto de una investigación diagnóstica llevada a cabo en la Laguna de Términos, en Campeche, durante el año 2011. A esta muestra se le practicó la técnica de inmunofluorescencia para herpesvirus, resultando positiva.

### I. Tinción negativa de sobrenadantes de cultivo celular

Los sobrenadantes de cultivo de células infectadas se fijaron con Karnosky y posteriormente se depositó una gota sobre papel parafilm. Se colocaron sobre la gota 2 rejillas de cobre de 200 MES marca STI con membrana durante 20 minutos. Después se tomaron las rejillas y se les retiró el exceso de fijador con papel filtro, se depositaron en una gota de agua destilada y por último, en una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH de 7.2) durante un minuto. A las rejillas se les retiró el exceso de colorante con papel filtro.

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, observadas y fotografiadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100S).

El mismo procedimiento fue realizado para una muestra que contenía el virus purificado del cultivo viral, adsorbido en nanopartículas de Quitosan, como un intento de fijarlas a un soporte y

contrastarlas para la MET. Las partículas de Quitosan fueron preparadas y donadas por la Dra Patricia Miranda Castro del Laboratorio de Biotecnología, campo 1 FESC, UNAM.

Se tomaron fotografías de un estándar de tamaño de partícula de 60nm (Sigma®) como referencia para describir las estructuras observadas en las muestras.

## II. Preparación de tejidos con tinción para corte fino: doble tinción electroconductiva

Se obtuvo la muestra, lo más limpia y conservada posible, con un diámetro de 2 a 3 mm<sup>2</sup> y se fijó por inmersión en solución de Karnovsky. Se eliminó el exceso de fijador mediante tres lavados con amortiguador de fosfatos, con cambios de 10 a 15 minutos, cada uno.

Posteriormente se realizó la posfijación con tetróxido de osmio durante dos horas y se eliminó el exceso de tetróxido con tres lavados usando amortiguador de fosfatos (pH=7.2).

La deshidratación se llevó a cabo haciendo pasar los tejidos a través de soluciones acuosas de etanol, en concentraciones que iban desde 30, 40, 50, 60,70, 80,90, 95 y 100%, con tiempos de incubación de 10 minutos en cada concentración de alcohol y 30 minutos en alcohol al 100%.

### Inclusión en resina epóxica EPON 812

La infiltración se realizó con mezclas de óxido de propileno y resina en las siguientes proporciones:

Óxido de Propileno	Resina	Tiempo
2	1	60 minutos a temperatura ambiente
1	2	60 minutos a temperatura ambiente

Tabla 1. Proporción de óxido de propileno y resina para la infiltración de los tejidos con resina epóxica EPON 812.

Los tejidos fueron colocados en los moldes y rellenados con resina recién preparada. Se etiquetaron y fueron colocados en la estufa, manteniendo el siguiente orden de incremento de temperatura hasta su completa polimerización:

Tiempo en horas	1	1	2	1
Temperatura	36°C	45°C	50°C	60°C

Tabla 2. Relación de tiempo y temperatura dentro de la estufa para la correcta polimerización de los tejidos.

### Microtomía

Se utilizaron cuchillas de vidrio para la obtención de las secciones ultrafinas. Estas cuchillas de vidrio se obtienen fácilmente y se descartan cuando ya no cortan satisfactoriamente. Se fabricaron utilizando el cortador de cuchillas L.K.B. BROMMA 7800; el procedimiento se efectuó rompiendo un vidrio especial, de tal manera que se obtuviese un borde afilado cortante.

Estas barras fueron lavadas previamente con detergente y abundante agua. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente y con ayuda de una pipeta, se dejó correr acetona en los bordes con filo, antes de ser colocadas en el aparato cortador de cuchillas.

Una vez obtenidas y seleccionadas las cuchillas, se procedió a realizarles el bote, el cual consiste en cortar una banda de masking-tape y pegarla alrededor del filo de la cuchilla, evitando tocar el filo mientras se coloca el bote; cuidando, asimismo, que el plano del filo y el bote queden al mismo nivel para no tener dificultad al tratar de obtener la imagen de espejo en el microtomo (al llenar con agua destilada el bote de la cuchilla) y, de esta manera, al hacer incidir en él el haz de luz con el corte flotando en el baño de agua, se pudiese saber el grosor de éste, de acuerdo al color del corte que refleje. Para corte fino recogimos los dorados, plateados y grises en la rejilla.

Los tacos de inclusión fueron sometidos a una preparación previa antes de situarlos en un ultramicrotomo para ser cortados. La forma de los tacos quedó determinada por la forma del molde en que se coloca la resina. Estas formas son, por lo general, de prismas cuadrangulares o cilindros (cápsulas *beem*).

La cápsula se quitó con ayuda de una navaja y se procedió a la operación de tallado de los tacos de inclusión con ayuda del microscopio estereoscópico (ELVAR), para lo cual se requirió de un adiestramiento muy meticuloso y un pulso firme para formar, en la punta del taco donde está el tejido, una cara de pirámide. Para comenzar a tallar un taco de inclusión se comenzó por situarlo perfectamente acoplado a una mordaza, sobresaliendo el taco un poco; para ello, con ayuda de una navaja delgada, se rebajó el taco con cortes inclinados con respecto a su eje longitudinal por el lado opuesto a donde estaba el tejido hasta casi llegar a él, luego se procedió a hacer otro corte del lado opuesto del taco y otros más o menos perpendiculares a los primeros dos, de tal manera que en la punta del taco se formase una pirámide trunca.

Una vez obtenida la cara de pirámide y con el fin de facilitar el corte y que éste no fuera muy grande, se eliminó el exceso de resina, con ayuda de la cuchilla y el ultramicrotomo. Luego se procedió a realizar cortes en la cara de la pirámide del bloque, con el fin de pulirla. Una vez pulida, se hicieron cortes semifinos y cortes ultrafinos. Los cortes semifinos se recogieron y se colocaron en portaobjetos limpios y desengrasados con alcohol y se fijaron a éste por calor sobre la platina; luego fueron teñidos con azul de toluidina, aplicando la solución de toluidina sobre el corte en la platina hasta que se formara un halo alrededor de éstos; entonces fueron lavados a chorro de agua. Los secamos y observamos en el microscopio óptico para seleccionar el corte de fase.

Los cortes ultrafinos obtenidos fueron recogidos sobre las rejillas de cobre y secados a temperatura ambiente; posteriormente fueron teñidos utilizando la técnica de doble tinción electroconductiva de Reynolds y, finalmente, observados y fotografiados en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-100S).

Una vez obtenido el corte, el color que reflejaba la luz al incidir sobre el corte que flotaba en el pozo con agua, nos indicó el grosor que tenía, obteniendo cortes de menos de 100 nm (indicativos en color dorado) que son considerados ultrafinos y los cortes que estaban alrededor de 200 nm (en color azul) son más gruesos (corte de fase), los cuales se observaban en el microscopio óptico (Carl Zeiss).

El corte de fase, ya teñido con azul de toluidina, se observó en el microscopio óptico ya que nos proporcionó información referente a la muestra de tejido que estábamos trabajando; sus características, nos orientaron sobre la zona correcta de la lesión y nos ayudó a evaluar si la cara de pirámide era del tamaño adecuado.

### Tinción para corte fino: doble tinción electroconductiva de Reynolds

Una vez obtenidos los cortes ultrafinos (cortes color dorado), se colocaron sobre una rejilla y se realizó la tinción electroconductiva.

Se colocó una gota de solución de acetato de uranilo sobre una hoja de parafilm, en una caja petri (preparando una cámara húmeda, adicionando unas gotas de agua destilada dentro de la caja petri y fuera del parafilm).

Se flotó sobre la gota de tinte la rejilla con los cortes hacia abajo, de tal manera que quedaron en contacto con el líquido del tinte, durante 5 minutos.

Se lavaron las rejillas, pasándolas sucesivamente por tres baños de metanol durante 5 minutos haciendo movimientos de arriba hacia abajo evitando los movimientos circulares.

Se secaron las rejillas con papel filtro y se colocaron en una caja petri.

Seguidamente, se procedió a la tinción con plomo, se preparó la cámara húmeda colocando unas gotas de agua en papel filtro y se colocó sobre ellos unas lentejas de hidróxido de sodio (NaOH) para eliminar el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) del ambiente que podía reaccionar con el plomo y formar carbonato de plomo, el cual es una contaminación en el proceso de tinción.

Sobre una hoja de parafilm se puso una gota de la tinción de Reynolds, dentro de la cámara húmeda, y se colocaron las rejillas con los cortes hacia abajo de manera que quedaran flotando en contacto con el colorante durante 5 minutos.

Se lavaron las rejillas con agua destilada previamente sometida a ebullición, con movimientos de arriba hacia abajo y evitando hacer movimientos circulares. Se repitió esto en los tres baños durante 5 minutos cada uno; se secaron las rejillas con papel filtro y se colocaron en el porta-rejillas. Enseguida se secaron en la estufa a 37 °C y se observaron al microscopio electrónico de transmisión, obteniendo algunas fotografías de las muestras.

Finalmente, los rollos se revelaron y se digitalizaron, procediendo a la selección de las fotografías, en las que se observaron estructuras importantes para ser interpretadas (González, 2003).

III. Técnica de Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de sobrenadantes de cultivo celular).

Para la inmunofluorescencia directa sobre cultivo celular, las células fueron cultivadas sobre laminillas (Cell culture coverslip, sterile, Thermanox Plastic 13mm diámetro, marca NUNC). Posteriormente, se infectaron con los aislados virales y se incubaron durante 72 horas a temperatura de 37°C. Después de la incubación, las laminillas se retiraron y se adhirieron a un portaobjetos con resina, dejando hacia arriba la cara de la laminilla que contenía las células infectadas. Las laminillas se enjuagaron con solución amortiguada de fosfatos (conocido también por sus siglas en inglés como PBS), con un pH de 7.2, y se fijaron con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se dejaron secar 10 minutos a 37°C en ambiente seco.

La tinción fue realizada adicionando 15 µl del conjugado (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD) por 30 minutos a 37°C, en cámara húmeda.

La laminilla con las células se enjuagó con Buffer de enjuague, pH 9.0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.119%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.022%, NaCl 8.55%). Se eliminó el exceso de líquido de la laminilla.

Finalmente, se adicionó medio de montaje FA (Glicerol/Buffer de enjuague, pH9.0, 50/50) y se realizó la observación microscópica en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Se obtuvieron fotografías para su posterior análisis.

IV. Técnica de inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de tejido).

La muestra de piel fue incluida en bloques de parafina, los cuáles fueron sometidos a cortes (0.2 micras) y montados sobre el portaobjetos por el laboratorio DIVET®. El corte de tejido fue desparafinado y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La laminilla fue posteriormente fijada con acetona –metanol (75/25) a temperatura ambiente por 20 minutos.

La tinción se realizó adicionando 15 µl del conjugado (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD) por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

La laminilla con el corte del tejido se enjuagó gentilmente en Buffer de enjuague, pH 9.0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.119%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.022%,  $\text{NaCl}$  8.55%). Se eliminó el exceso de líquido de la laminilla.

Finalmente se adicionó medio de montaje FA (Glicerol/Buffer de enjuague, pH9.0, 50/50) y se realizó la observación microscópica en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Se obtuvieron las correspondientes fotografías para su posterior análisis (Ledbetter *et al.*, 2009).



## RESULTADOS

Las fotografías tomadas de las muestras donde se llevó a cabo la observación de las partículas virales en los cultivos y en piel, por inmunofluorescencia y por microscopía electrónica de transmisión, se muestran en las siguientes figuras. Se agruparon de acuerdo a la técnica realizada.

### I. Microscopía electrónica de transmisión de sobrenadantes de cultivo celular.

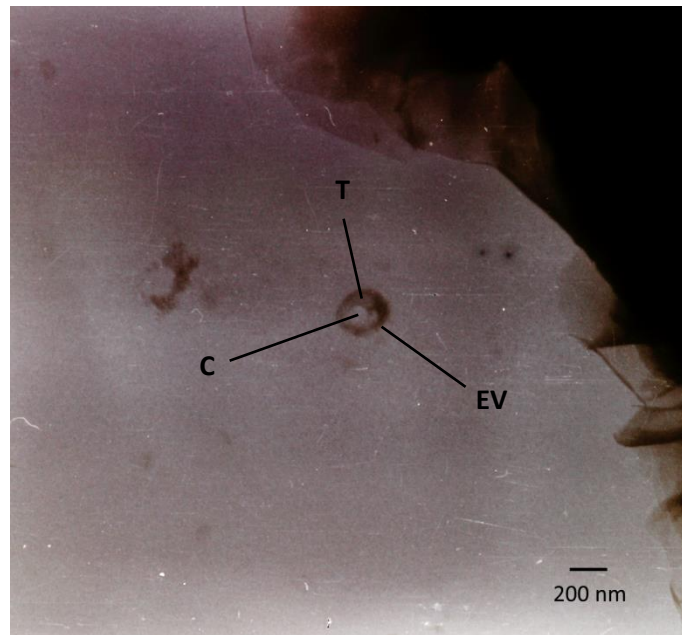


Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia la cápside (C), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 110 nm de diámetro y virión de 276 nm de diámetro. Muestra: 001. Magnificación: 15,000 X.

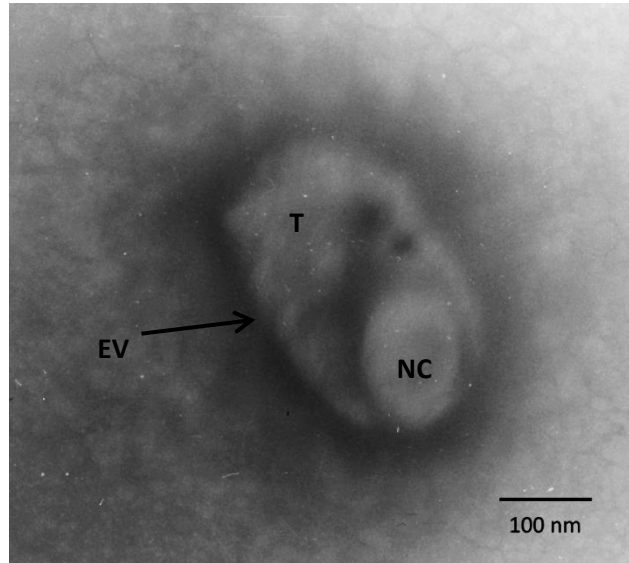


Figura 2. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia una nucleocápside (NC), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 104 nm de diámetro y virión de 183 nm de diámetro. Muestra: 001. Magnificación: 30,000 X.

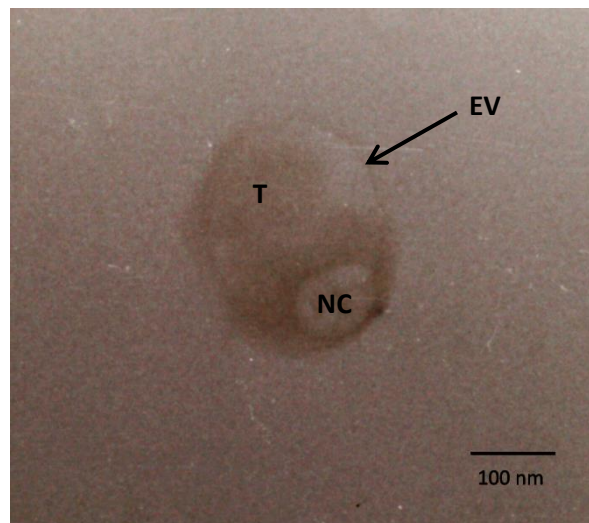


Figura 3. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia una nucleocápside (NC), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 100 nm de diámetro y virión de 200 nm de diámetro. Muestra: 001. Magnificación: 30,000 X.

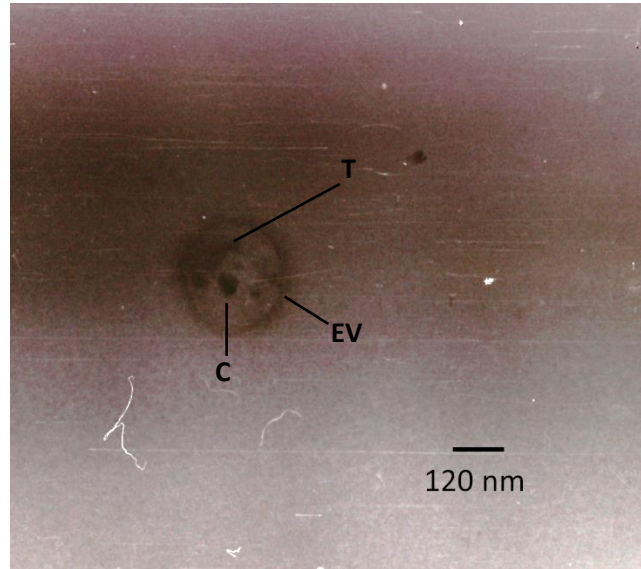


Figura 4. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia la cápside (C), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 102 nm de diámetro y virión de 216 nm de diámetro. Muestra: 015. Magnificación: 15,000 X.

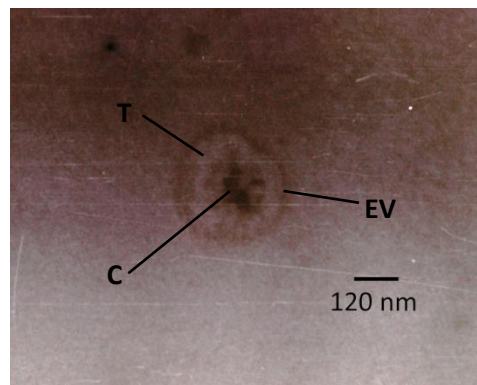


Figura 5. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia la cápside (C), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 114 nm de diámetro y virión de 288 nm de diámetro. Muestra: 015. Magnificación: 15,000 X.

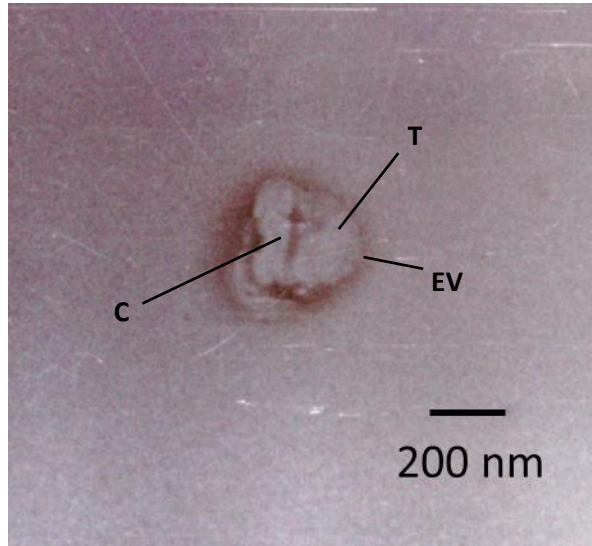


Figura 6. Microfotografía electrónica de transmisión en la que se pueden observar estructuras virales. Se aprecia la cápside (C), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 100 nm de diámetro y virión de 280 nm de diámetro. Muestra: 015. Magnificación: 15,000 X.

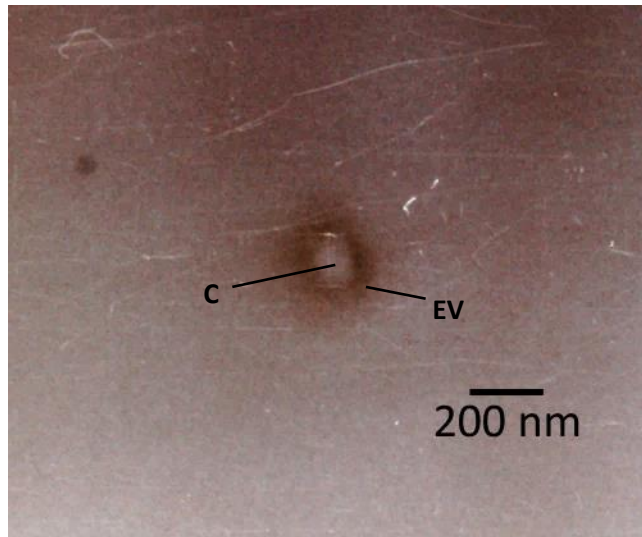


Figura 7. Microfotografía electrónica de transmisión en la que se pueden observar estructuras virales. Se aprecia la cápside (C) y la envoltura viral (EV). Cápside de 101 nm de diámetro y virión de 206 nm de diámetro. Muestra: 008. Magnificación: 25,000 X.

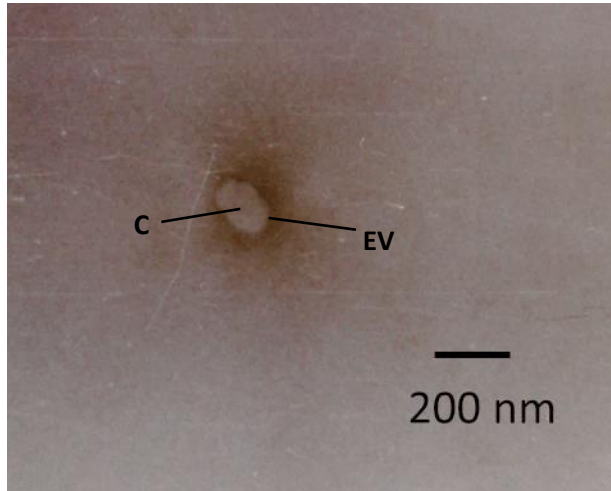


Figura 8. Microfotografía electrónica de transmisión en la que se pueden observar estructuras virales. Se aprecia la cápside (C) y la envoltura viral (EV). Cápside de 96 nm de diámetro y virión de 128 nm de diámetro. Muestra: 008. Magnificación: 20,000 X.

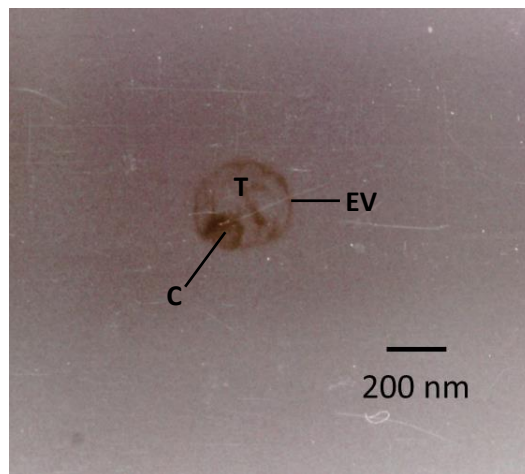


Figura 9. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan estructuras virales. Se aprecia una cápside (C), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). Cápside de 111 nm de diámetro y virión de 296 nm de diámetro. Muestra: 003. Magnificación: 15,000 X.

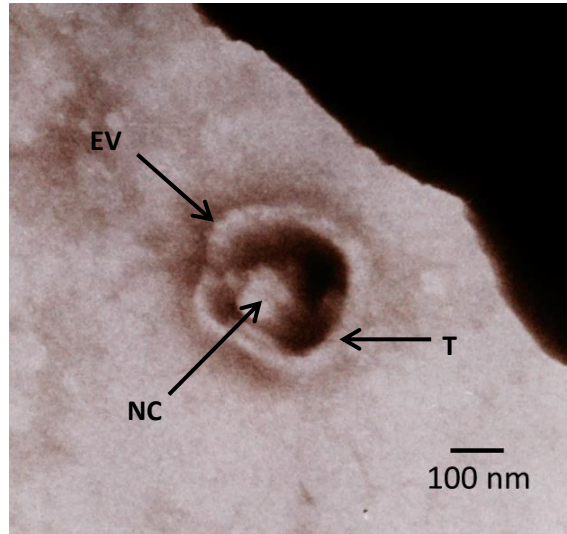


Figura 10. Microfotografía electrónica de transmisión donde se pueden observar algunas estructuras virales. Se aprecia una nucleocápside (NC), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). La cápside es de 103 nm de diámetro y el virión de 320 nm de diámetro. Muestra: sobrenadante de cultivo celular con nanopartículas de Quitosan. Magnificación: 20,000 X.

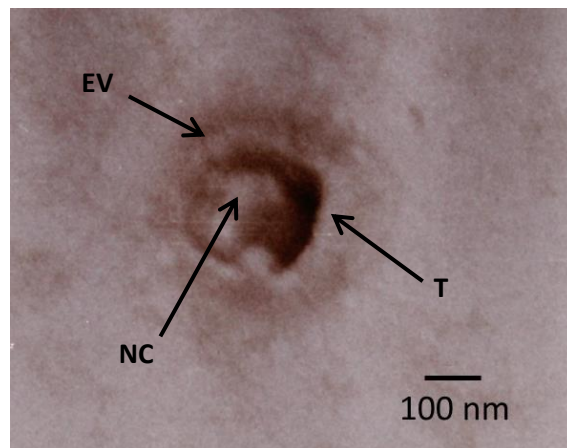


Figura 11. Microfotografía electrónica de transmisión en la que se presentan algunas estructuras virales. Se aprecia una nucleocápside (NC), el tegumento (T) y la envoltura viral (EV). La cápside de 100 nm de diámetro y el virión de 280 nm de diámetro. Muestra: sobrenadante de cultivo celular con nanopartículas de Quitosan. Magnificación: 20,000 X.



II. Microscopía electrónica de transmisión de piel.

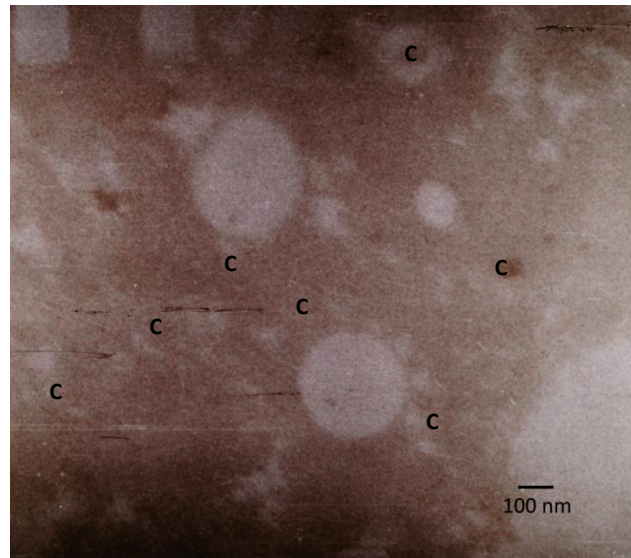


Figura 12. Microfotografía electrónica de transmisión donde se muestran cápsides virales (C) con diámetro de 80 a 108 nm con una envoltura electrodensa; presentando morfología ligeramente hexagonal. Técnica de doble tinción electroconductiva con acetato de uranilo y citrato de plomo. Magnificación: 20,000 X.

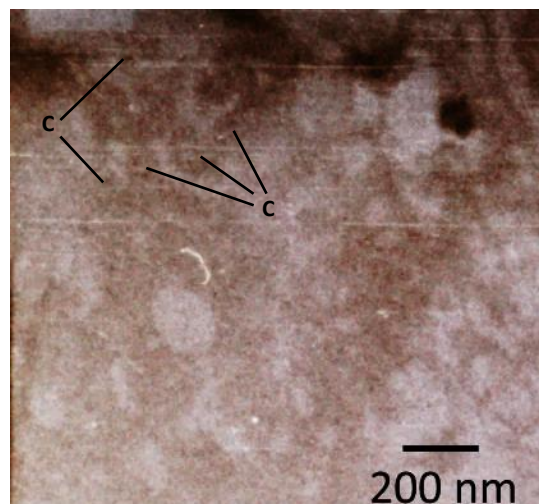


Figura 13. Microfotografía electrónica de transmisión donde se muestran cápsides virales (C) con diámetro de 100 nm con una envoltura electrodensa; presentando morfología ligeramente hexagonal. Técnica de doble tinción electroconductiva con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Magnificación: 20,000 X.

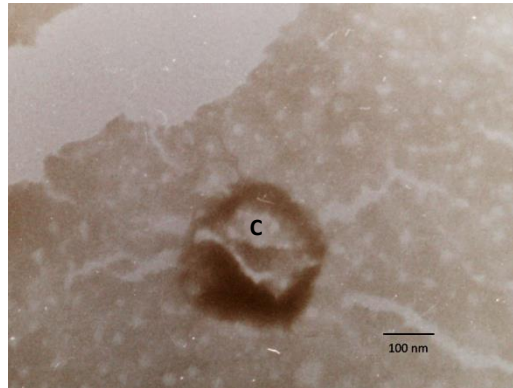


Figura 14. Microfotografía electrónica de transmisión donde se muestra una cápside viral (C) con diámetro de 100 nm con una envoltura electrodensa. Virion de 256 nm. Técnica de doble tinción electroconductiva con acetato de uranilo y citrato de plomo. Magnificación: 30,000 X.

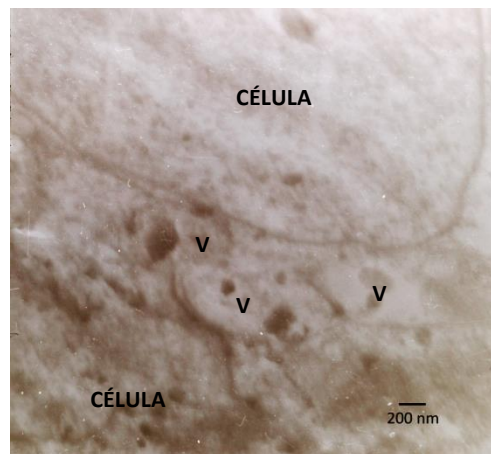


Figura 15. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observa alrededor de la célula partículas virales (V) de morfología ligeramente icosaédrica de 200 nm de diámetro. Magnificación: 20,000 X.



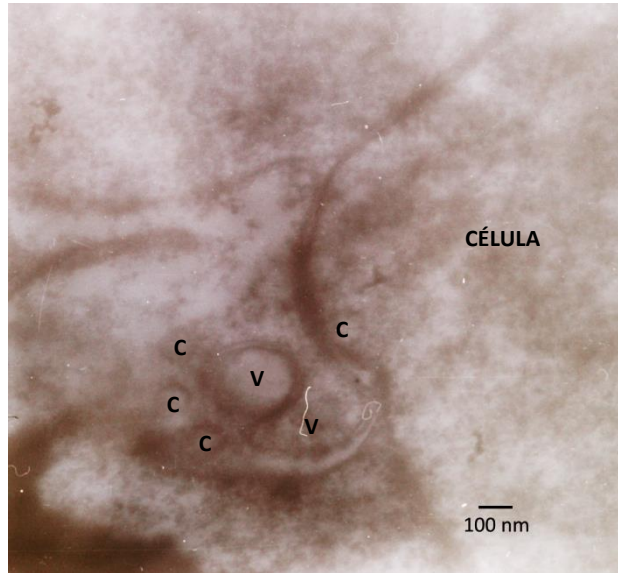


Figura 16. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observan, alrededor de la célula, partículas virales (V) de 300 nm de diámetro, algunas cápsides (C) de 100 nm de diámetro; las cuales se aprecian en proceso de invaginación; mientras otras se observan en vacuolas. Magnificación: 20,000 X.

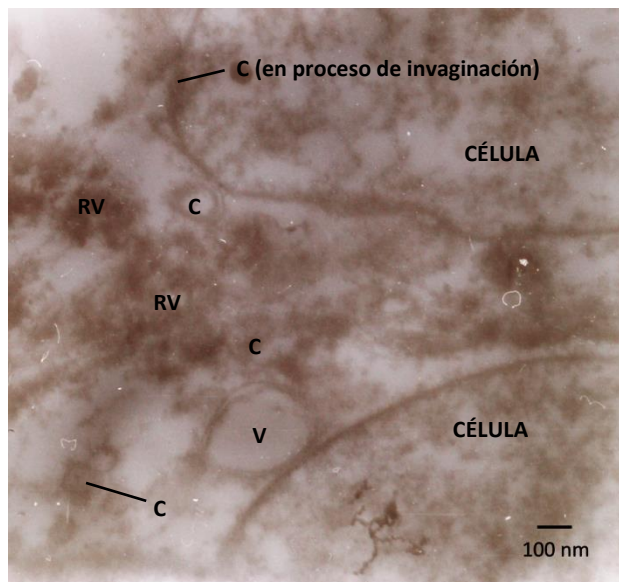


Figura 17. Microfotografía electrónica de transmisión donde se observa, alrededor de la célula, una partícula viral (V) de 260 nm de diámetro, algunas cápsides (C) de 103 a 105 nm de diámetro y residuos virales agrupados (RV). Magnificación: 15,000 X.

III. Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de sobrenadantes de cultivo celular).

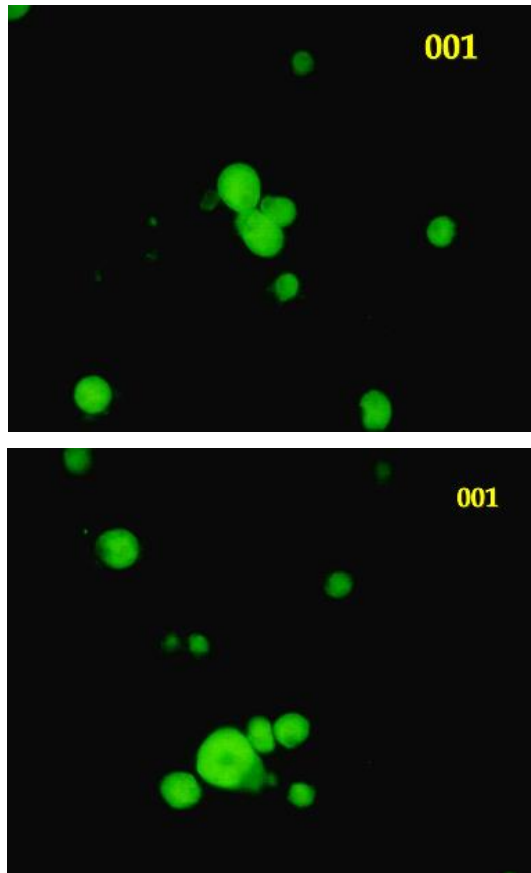


Figura 18. Inmunofluorescencia directa con conjugado de herpesvirus canino. Reacción positiva al infectar células de la línea MDBK con herpesvirus aislados de delfín (48 horas postinfección). Muestra: 001. 400X.

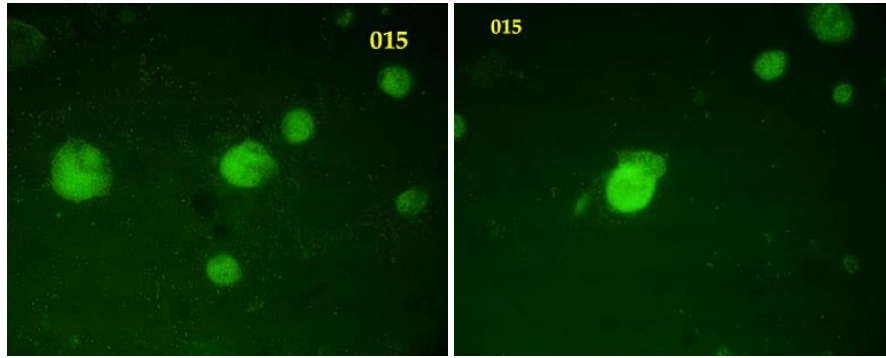


Figura 19. Inmunofluorescencia directa con conjugado de herpesvirus canino. Reacción positiva al infectar células de la línea MDBK con herpesvirus aislados de delfín (48 horas postinfección). Muestra: 015. 400X.

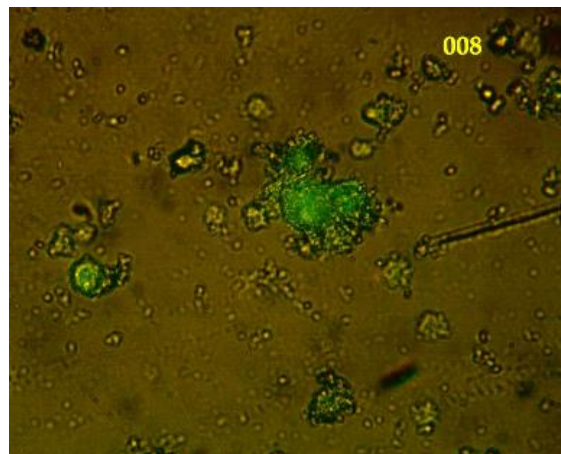


Figura 20. Microfotografía con contraste de fase e inmunofluorescencia directa con conjugado de herpesvirus canino. Reacción positiva al infectar células de la línea MDBK con herpesvirus aislados de delfín (48 horas postinfección). Muestra: 008. 400X.

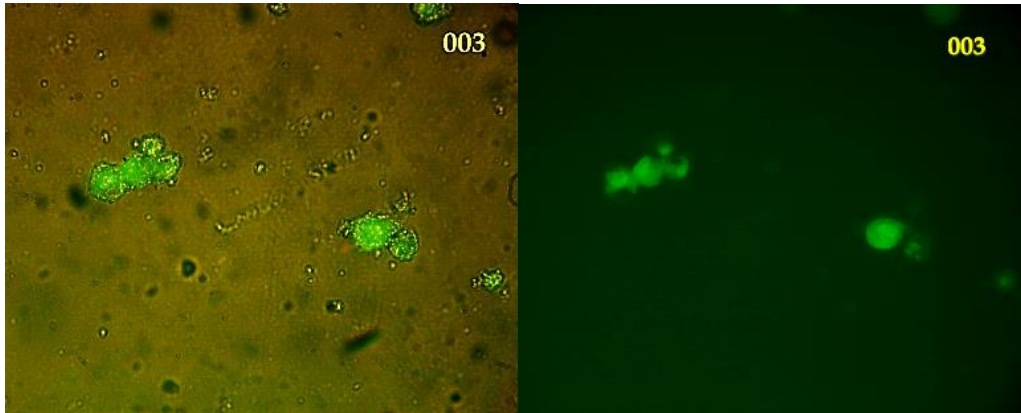


Figura 21. Inmunofluorescencia directa con conjugado de herpesvirus canino. Reacción positiva al infectar células de la línea MDBK con herpesvirus aislados de delfín (48 horas postinfección). Muestra: 003. 400X.

IV. Inmunofluorescencia directa contra herpesvirus canino (a partir de tejido).

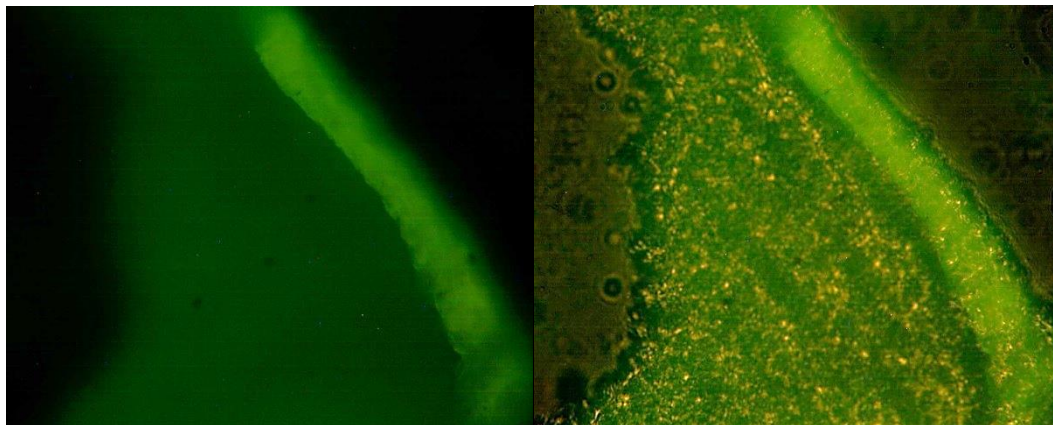


Figura 22. Microfotografías de reacción positiva de un corte histológico de piel de delfín preparado por inmunofluorescencia directa utilizando un conjugado de herpesvirus canino (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD). 100X.

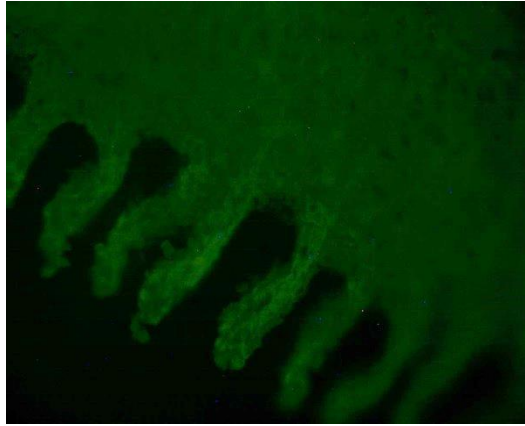


Figura 23. Microfotografía de reacción positiva de un corte histológico de piel de delfín preparado por inmunofluorescencia directa utilizando un conjugado de herpesvirus canino (Antisuero anti-CHV1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD). 200X.

También, se observaron lesiones hiperplásicas de epidermis en cortes histopatológicos; los cuales fueron proporcionados por el laboratorio DIVET®, que sugieren una lesión parecida a la producida por herpesvirus.

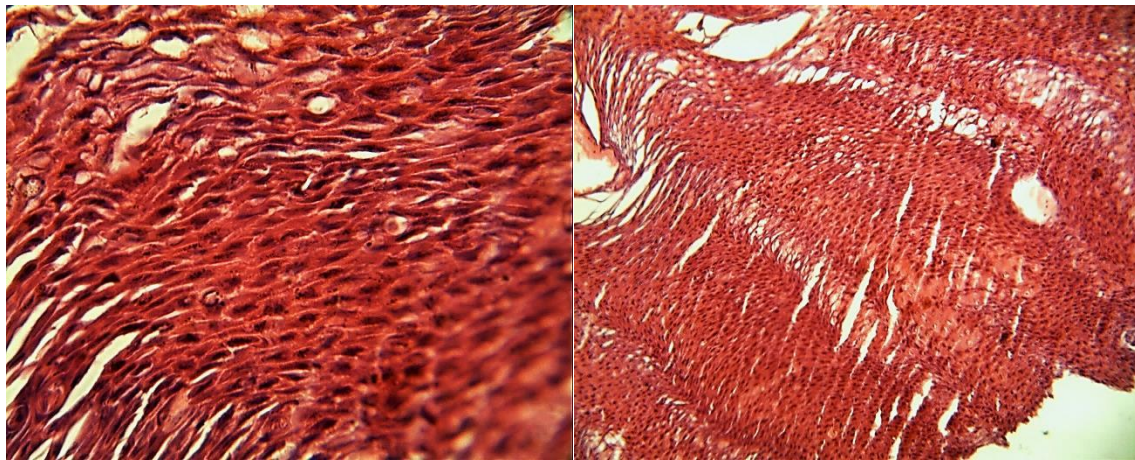


Figura 24. Epidermis. 400x

Figura 25. Epidermis. 100x

Se muestra un desorden en la arquitectura celular, células epiteliales grandes y poligonales con bordes bien definidos, citoplasmas eosinofílicos y grandes, núcleos basófilos ubicados en el centro y ovalados.



Los daños en las células se confirmaron con los efectos citopáticos, como agrandamiento celular (AC), desprendimiento (D) y cambios citolíticos (CC) que se observaron en las fotografías de los cultivos celulares, proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la UIM de la FESC.

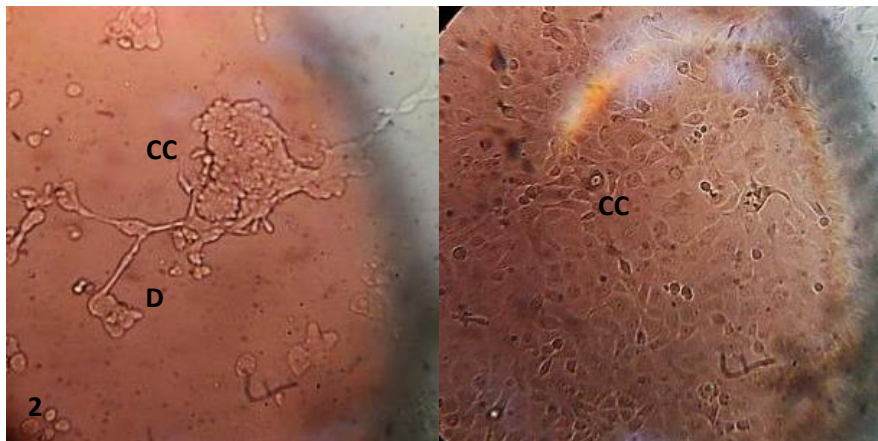
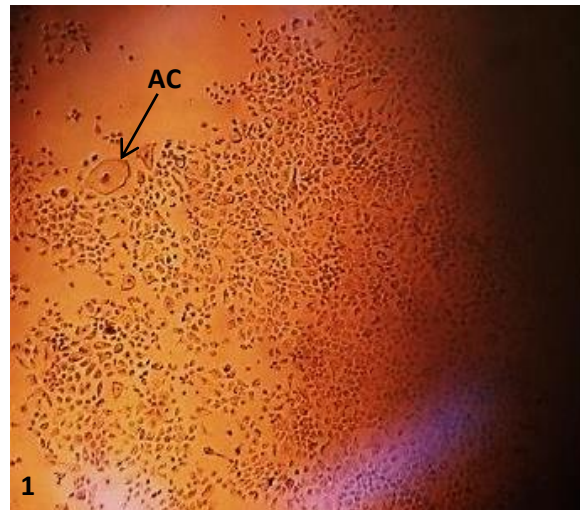


Figura 26. Microfotografía de cultivos celulares por medio de microscopio invertido.  
(1). Células de la línea MDBK a las 48 horas postinfección. Cambios citopáticos. 100X.  
(2). Células de la línea MDBK a las 72 horas postinfección. Formación de sincitios. 400X.

## DISCUSIÓN

Se realizó la identificación de las partículas virales empleando conjugados inmunofluorescentes desarrollados para canino. La reacción positiva y negativa en los controles, confirmaron que se trataba de un herpesvirus (figuras N°18, N°19, N°20 y N°21 en sobrenadantes de cultivo celular; y figuras N°22 y N°23 en piel).

Se ha descrito en la bibliografía que todos los miembros de la familia de los herpesvirus comparten características antigénicas, aunque no de especificidad de hospedador. El salto en la barrera de especies es responsable de gran parte de las enfermedades emergentes y reemergentes en el mundo; en la actualidad, no están completamente esclarecidos los mecanismos involucrados en la restricción de un agente hacia un(os) hospedero determinado(s) ni en los procesos necesarios para que éste cruce la barrera de especie e invada un nuevo hospedero. Los saltos hacia nuevas especies, generalmente se manifiestan con una alta morbilidad y mortalidad en la especie nueva, acarreando grandes pérdidas económicas, en un determinado ecosistema y en múltiples ocasiones causando pérdida de vidas humanas. Por su parte, las especies exóticas en cautiverio, presentes tanto en los hogares como en los parques zoológicos y centros de conservación, se han convertido en uno de los principales factores de riesgo para la emergencia y reemergencia de enfermedades en poblaciones animales y humanas, y por tanto se hace necesario que se evalúen las infecciones que puedan tener potencial para realizar el llamado “salto” y acarrear graves consecuencias tanto para poblaciones animales como humanas (Ruíz y Villamil, 2008). Los herpesvirus son una familia viral altamente específica de especie (Büchen, 2006); sin embargo, algunos de ellos pueden llegar a infectar otras especies diferentes a su hospedero natural, causando graves enfermedades y en algunos casos la misma muerte (Ruíz y Villamil, 2008). Además los virus pueden presentar similitudes en la composición antigénica (cruce antigénico) (Shors, 2009), por lo que un anticuerpo específico puede unirse a otro tipo viral de la misma familia; mientras exista dicho cruce. Por esta razón se utilizó el conjugado inmunofluorescente para canino, por la inexistencia de uno específico para herpesvirus de delfín.

En la actualidad la inmunofluorescencia se aplica con éxito en la investigación de gran cantidad de microorganismos (bacterias, espiroquetas, virus, hongos, levaduras y parásitos), para lo que se usa la inmunofluorescencia directa, y en la determinación de anticuerpos específicos contra estos

microorganismos, en donde la inmunofluorescencia indirecta tiene mayor aplicación (Calderón, 2007).

Es una técnica rápida de detección de antígenos, que se utiliza en el diagnóstico de enfermedades virales y autoinmunes (Brock, 1988). Otras de sus ventajas son que pequeñas cantidades de organismos o antígenos se encuentran fácilmente, estos procedimientos no requieren esterilidad y la posibilidad de dar un diagnóstico correcto es alta (Fiorentino *et al.*, 1994).

La inmunofluorescencia se ha utilizado como prueba alternativa para la confirmación diagnóstica de diversas infecciones. Es recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como prueba confirmatoria alternativa por su alta sensibilidad y especificidad (Valverde *et al.*, 1997).

En un estudio de detección de herpesvirus canino se demostró una alta reacción entre el anticuerpo y antígenos virales presentes en las células infectadas, esos resultados señalan inequívocamente la presencia del virus, por lo que se concluye que la inmunofluorescencia es una prueba confirmatoria eficiente en el diagnóstico de infecciones virales (Navarro, 2003). Por lo que se eligió como técnica de confirmación posterior a la MET que se realizó en las muestras.

Con las mismas muestras se realizó el análisis del virus por PCR, donde se sugiere que se trata de herpesvirus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, aunque esto deberá ser confirmado por secuenciación del fragmento de la Polimerasa (Angeles, 2013).

Para la preparación de las muestras para MET, fue necesario tener una serie de cuidados especiales, ya que ésta requiere de gran precisión para que los resultados sean los correctos, empezando con el tipo de fijador, el amortiguador, el posfijador y los solventes que se utilizaron para la deshidratación, el tipo de membranas y el tipo de resinas para la inclusión. Todo ello dependiendo de las características propias de cada muestra, se ajustaron los cambios pertinentes para que la muestra pueda ser estudiada en MET. Por el trabajo detallado que se debe realizar para esta técnica, resulta una excelente opción como prueba de diagnóstico de diversas enfermedades. Se utilizó la MET ya que permite una mayor capacidad de aumento que la microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), además de permitir el estudio de diversas estructuras en una muestra, no solo las superficiales como en el caso de la SEM (Ojeda, 1997).



La partícula madura del herpesvirus consta de una nucleocápside que contiene el genoma viral y las proteínas asociadas (core), el tegumento que rodea la nucleocápside y la envoltura viral, la cual es derivada de la membrana de la célula del hospedero y en la que están incorporadas las glicoproteínas de membrana codificadas por el virus. Las fotografías obtenidas mediante MET (figuras N°2, N°3, N°5 y N°10) muestran dichas características, por lo que podemos presumir que se trata de herpesvirus.

Dado que su envoltura es relativamente flexible, la forma del virión no es siempre la misma y su diámetro estimado varía de 120 a 300 nm (Fields *et al.*, 1996). En ella se encuentran los peplómeros, cuya función es la adsorción y la penetración en la célula hospedadora. En la envoltura se encuentran varias glicoproteínas, algunas encargadas de la adherencia y otras de la fusión. Además, en la envoltura se induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Los resultados obtenidos en cuanto a estructura y tamaño coinciden con los presentados por autores como Roizman y Knipe (2001), que describen estas características a través de la microscopía electrónica de transmisión. Su cápside icosaédrica de 100 nm de diámetro está compuesta por 162 capsómeros de los cuales, 150 son hexagonales (hexámeros) y 12 son pentagonales (pentámeros). Alrededor de la cápside y bajo la envoltura se encuentra el tegumento, material amorfo a veces asimétrico (Wagner, 2003).

Respecto al uso de nanopartículas de quitosán, los resultados permitieron demostrar que las nanopartículas ayudan a observar los viriones con mayor precisión y facilitan su identificación en el campo visual. Esto se debe a la capacidad de adsorción que tienen las nanopartículas de quitosán, formando un tipo de membrana donde se depositan los viriones y permiten su correcta visualización (figuras N°10 y N°11). Al parecer funciona como un “aglutinador inespecífico” de partículas virales, además de proporcionar un contraste con los electrones de la MET.

La partícula vírica contacta con receptores de la célula hospedadora. Las glicoproteínas de la envoltura viral contribuyen a que el virus penetre en el citoplasma por la fusión de la envoltura con la membrana citoplasmática de la célula hospedadora, o bien por la formación de vacuolas fagocíticas en cuyo interior se encuentra el virión, como se observa en las fotografías de tejido con células infectadas (figuras N°15, N°16 y N°17).

En el presente trabajo fue posible observar partículas sugerentes de herpesvirus por medio de MET (ejemplo en figuras N°2, N°3, N°4, N°5 y N°10) y demostrar su presencia en la piel de los

delfines de vida libre (figuras N°12, N°15 y N°16). Estos hallazgos sugieren la infección por herpesvirus en los delfines de vida libre; aunque las partículas víricas de tipo herpesvirus son lábiles y no tienen una buena supervivencia fuera del organismo infectado. En general, su transmisión requiere un contacto directo, principalmente un contacto físico que conlleve la aposición de epitelios húmedos, así como la entrada directa a mucosa, especialmente los estornudos y aerosoles de corto alcance que son importantes sistemas de transmisión en delfines. Los herpesvirus sobreviven de una generación a la siguiente mediante el establecimiento de infecciones latentes, a partir de las cuales los virus se reactivan y diseminan periódicamente, y en el caso de algunos Betaherpesvirus y Gammaherpesvirus, la diseminación vírica puede ser continua. Muchos Alphaherpesvirus producen lesiones localizadas, principalmente de la mucosa de los tractos respiratorio, genital y piel, caracterizada por la producción secundaria de vesículas, pústulas y úlceras superficiales que se recubren de una pseudomembrana y curan de 10 a 14 días, normalmente sin que se formen costras. Al parecer, en todas las infecciones producidas por herpesvirus existe una infección persistente y una eliminación de virus periódica o continua. Durante las infecciones por herpesvirus se generan respuestas inmunes mediadas, tanto por anticuerpos (Ac) como por células. Los Ac neutralizantes están dirigidos principalmente contra la glicoproteína de la envoltura (Maness *et al.*, 2011).

Son varios los casos en los cuales se han descrito infecciones por herpesvirus en cetáceos, siendo su principal vía de transmisión el contacto directo entre animales, y se ha demostrado como partículas de tipo herpesviral en lesiones de piel principalmente, así como en sistema respiratorio (neumonía intersticial en focos) e infecciones sistémicas (Smolarek-Benson *et al.*, 2006).

Las lesiones herpéticas en piel de delfines se describen generalmente circulares de hasta 2 cm. de diámetro y pueden parecer levemente deprimidas con un aspecto blanquecino o estar elevadas y proliferantes. Los centros de algunas lesiones se encuentran necróticos o pueden contener crecimientos verrugosos (Esperón, 2008).

El microscopio electrónico de transmisión es un equipo sofisticado que funciona al alto vacío, en donde la imagen que se obtiene está dada por los electrones que son transmitidos a través de la muestra, por lo que es necesario que sea de un grosor menor de 100 nm para obtener una buena resolución, pero debido a la interacción entre los electrones de alta energía, la muestra requiere estar protegida con metales pesados para que soporten dicha interacción; debido a dichas

características se requiere que las muestras que sean observadas al microscopio electrónico de transmisión cumplan con las siguientes características: no puede ser observada al microscopio ningún material vivo, o que contenga agua, porque el sistema funciona al alto vacío y además se debe proteger contra el haz de electrones; por la interacción que la muestra tendrá con electrones de alta energía puede ser destruida y que además las muestras tengan el grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos y así poder tener una imagen con buena resolución (González, 2003).

En la actualidad la infección por herpesvirus continúa siendo de gran importancia por las especies que afecta y la capacidad del virus para transmitirse de un individuo a otro. Por lo tanto, el estudio del virus es fundamental para entender la patogénesis y control de la enfermedad. Este tipo de estudios permiten identificar los agentes etiológicos y las similitudes o diferencias de los virus de delfines con otros herpesvirus en otras especies de animales, entender las manifestaciones clínicas y desarrollar técnicas que se puedan aplicar y permitan controlar la infección, y por ende, la patogenia (Maness *et al.*, 2011).

Consecuentemente, la comprensión de la patogénesis del herpesvirus puede conducir a un mejor entendimiento de las características de crecimiento de las diferentes cepas de virus en cultivos celulares y su presentación en los animales. Estos conocimientos son fundamentales para combatir una enfermedad presente en los delfines, tema en el cual se pretende abarcar aspectos epidemiológicos y moleculares, en un campo poco explorado en la investigación en el país para promover la conservación de la especie. Las diferencias adaptativas de estos animales a su medio hacen que no sean extrapolables los datos de otras especies más conocidas como gran parte de las especies terrestres. En este contexto resulta importante aproximarse al medio en el cual los cetáceos desarrollan su actividad diaria, controlando las emisiones de contaminantes, y en consecuencia, su repercusión en la salud de estos animales. Por esta razón sería recomendable hacer estudios de posibles enfermedades en las poblaciones de cetáceos que transitan y/o habitan en aguas mexicanas, a través de seguimiento a varamientos vivos y muertos de estos especímenes en las costas, así como estudios de impacto ambiental en los ecosistemas acuáticos (Reidarson, 2010).

Los cetáceos no son los únicos en enmascarar los signos de enfermedad. Son animales muy sociales, si presentan signos de alguna enfermedad, en vez de separarse del resto del grupo,

tienden a quedarse cerca de otros animales enfermos, lo que puede agravar el cuadro o aumentar la transmisión de las enfermedades. Debido al ambiente acuático en el que viven, es difícil observar algunos signos clínicos como vómitos, diarrea, hematuria, lesiones en el cuerpo y abscesos (Reidarson, 2010).

Por todo lo anterior es indispensable recurrir a pruebas diagnósticas de laboratorio para controlar y favorecer el pronóstico de la enfermedad. Es importante tener el seguimiento de cada individuo, interacción con otros animales y entrenadores, así como su historia clínica para un diagnóstico oportuno de enfermedades (Reidarson, 2010).

Existen pocos informes de infecciones de herpesvirus en mamíferos marinos. La mayoría de los ellos son morfológicos, donde el diagnóstico se basa solo en la simple patología (Baker, 1992), histopatología e inmunohistoquímica (Kennedy *et al.*, 1992) o microscopía electrónica de transmisión (MET) (Martineau *et al.*, 1988, Van Bresseem *et al.*, 1994).

Las herramientas de diagnóstico molecular son esenciales para establecer la clasificación taxonómica del herpesvirus cetáceo. La amplificación de regiones conservadas de ADN dentro del gen de la polimerasa del herpesvirus (VanDevanter *et al.*, 1999) y del gen de término, ha sido posible utilizando técnicas de PCR universales (Hargis *et al.*, 1999).

El análisis detallado y secuencial de los resultados obtenidos, ha proporcionado nuevos informes de alfaherpesvirus en delfín mular (*Tursiops truncatus*) (Blanchard *et al.*, 2001, Manire *et al.*, 2006, Smolarek - Benson *et al.*, 2006), y gammaherpesvirus en el delfín mular, delfín gris (*Grampus griseus*), cachalote enano (*Kogia sima*) y en zifio de Blainville (*Mesoplodon densirostris*) (Saliki *et al.*, 2006, Smolarek - Benson *et al.*, 2006).

Apariencia de lesiones de herpesvirus, las cuales se han reportado, se han visto asociadas a Papillomavirus, Morbillivirus o enfermedades fúngicas. (UCM, 2011)



Figura 27. Lesiones por herpesvirus. Proyecto Sanidad Marina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 2011.

## CONCLUSIONES

Del estudio y las observaciones realizadas se pueden destacar los siguientes hechos:

La partícula viral observada de los cultivos celulares tuvo un tamaño promedio de 243 nm de diámetro y cápsides de 104 nm de diámetro.

La partícula viral observada en piel tuvo un tamaño promedio de 254 nm de diámetro y cápsides de 100 nm de diámetro.

La morfología encontrada y el tamaño correspondieron con un herpesvirus.

Los resultados de positividad en Inmunofluorescencia y la morfología en MET corroboran que se trata de un herpesvirus, que junto con el análisis paralelo de PCR, se sugiere que se trata de herpesvirus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*.

Se determinó que el virus cruza antigénicamente con el herpesvirus canino tipo 1

Siguiendo la técnica de S. González Gallardo (2003) se obtuvieron los resultados deseados, identificando estructuras sugerentes de herpesvirus, lo que fue confirmado por la técnica de inmunofluorescencia que es específica, usando un conjugado que se unió al antígeno

Se utilizó el quitosan en la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Este compuesto se utilizó como medio que formó una partícula donde se adsorbieron las partículas virales y ayudó a mejorar su identificación y análisis estructural.

Los cortes de piel (biopsias) permitieron observar la presencia de partículas virales dentro de las células de la epidermis. La presencia del virus se confirmó con pruebas de inmunofluorescencia y con estudios histopatológicos del tejido proporcionados por el laboratorio DIVET®.

#### RECOMENDACIONES

La determinación de la subfamilia del herpesvirus encontrado, deberá ser confirmada por secuenciación del fragmento de la Polimerasa y otros genes la pertenencia al grupo de alfa herpesvirus;

En el presente trabajo no se pudo determinar si el virus está participando en una infección activa, se encuentra en forma de infección latente o crónica, o solo se encontraron las partículas en las secreciones como contaminantes, se sugiere realizar estudios más profundos para aclarar la participación del virus como patógeno en los delfines.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ader, R., Cohen, N. 1993. Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. *Ann Rev Psychol.* 44: 53-85.
2. Aguilar, C.H., Rodríguez, R.A., Medina, C.A., Gutiérrez, D.C., Naranjo, T. R. 2001. Detección del virus herpes simple tipo I por inmunofluorescencia directa en córneas nativas y transplantadas con leucomas postherpéticos. *Rev Mex Oftalmol.* 75(1): 24-27.
3. Angeles, S.J. 2013. Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de herpesvirus en muestras de delfines (*Tursiops spp.*). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, México.
4. Baker, J.R. 1992. Skin disease in wild cetaceans from British waters. *Aquat Mamm.* 18:27–32.
5. Barlow, J. 2006. Cetacean abundance in Hawaiian waters estimated from summer/fall survey in 2002. *Marine Mammal Science.* 22(2):446-464.
6. Bascones-Martínez, A, Pousa-Castro, X. 2009. Herpesvirus. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
7. Bearzi, G., Holcer, D., Notarbartolo Di Sciara, G. 2004. The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* 13:363-379.
8. Bellière, E.N., Esperón, F., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Fernández, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2010. Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007. National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Valdeolmos, Spain.
9. Blanchard, T.W., Santiago, N.T., Lipscomb, T.P., Garber, R.L., Mcfee, W.E., Knowles, S. 2001. Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. *J Wildl Dis.* 37:297–305.

10. Bossart, G.D. 2006. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. Oceanography Society. Rockville, USA.
11. Bossart, G.D. 2007. Emerging Diseases in Marine Mammals: from Dolphins to Manatees. Microbe. Oceanography Society. Rockville, USA.
12. Bozzula, B. 1997. Electron microscopy. Principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett Publishers. London, UK.
13. Brock, D. 1988. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. Biología de Microorganismos. Prentice Hall, New Jersey. 13: 488-489.
14. Brown, J.C. 1992. Estructura del herpesvirus mediante microscopía electrónica. Univ. Va. USA.
15. Büchen-Osmond, C. 2006. Equid herpesvirus. The Universal Virus Database. Ed., Columbia University. New York, US.
16. Byron, E.M., Georges, M.G., Verjans, A., Thijs, K., Geert, A., Osterhaus A.D. 2007. In vitro and in vivo replication of seal gammaherpesviruses in cells of multiple species. Microbes and Infection. Rotterdam, Netherlands. 9: 40-46
17. Calderón, P.R.V. 2007. Inmunología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.
18. Campbell, R. 2005. Biología, séptima edición. Editorial Panamericana. Berkeley, California, USA.
19. Cándida, D., Reina, J. 2012. Utilidad de la inmunofluorescencia directa en el diagnóstico rápido y específico de conjuntivitis por adenovirus. Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España.
20. Cañadas, A., Hammond, P. S. 2006. Model-based abundance estimates for bottlenose dolphins off southern Spain: implications for conservation and management. Journal of Cetacean Research and Management. 8(1):13-27.
21. Carwardine, M. 2004. Ballenas, delfines y marsopas. Ediciones Omega, S.A. 2ª reimpresión. Barcelona, España.



22. Chamizo, E. Medell, M. Cruz, D. Odelsa, A. Rodríguez, S. Barrera, M. 2011. Características anatomopatológicas de lesiones orogenitales en delfines *Tursiops truncatus*. CubaZoo, Cuba.
23. Chelmicka-Schorr, E., Amason, B.G. 1988. Nervous System-Immune System Interactions. En: Waksman BH, Bodis-Wolner I, Heyer E. Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. New York, USA.
24. Cheville, F. 1994. Ultrastructural pathology and introduction to interpretation. Ames Iowa: State University Press, USA.
25. Chilvers, B.L., Corkeron, P.J. 2003. Abundance of Indo-Pacific bottlenose dolphins, *Tursiops aduncus*, off point Lookout, Mar Mamm Sci. Queensland, Australia.
26. Cruz, D., Ancheta, O., Rodríguez, S., Matos, M., González, L., Gutiérrez. N., Guevara, C. 2004. Papilomatosis genital en delfines *T. truncatus*. Correlación de Microscopia Óptica y Electrónica. Acuario Nacional de Cuba, Escuela Latinoamericana de Medicina, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Instituto de Nefrología Abelardo Buch. La Habana, Cuba.
27. Cruz, D., Barrera, M. 2011. Frecuencia de lesiones en genitales de delfines *Tursiops truncatus* de la Cayería Norte Central de Cuba. Acuario Nacional de Cuba, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). La Habana, Cuba.
28. Esperón, F., Fernández, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2008. Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands. Ed. Michael Moore, Woods Hole, Massachusetts, USA.
29. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. 1996. Fields Virology. 3ª Edición. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA.
30. Fiorentino, G.S., Gutiérrez, F.M.F., Rueda, A.N.S., Rodríguez, R.J.A. 1994. La inmunología en el diagnóstico clínico. Centro Editorial Javeriano. CEJA. Bogotá, Colombia.
31. Forcada, J., Gazo, M., Aguilar, A., Gonzalvo, J., Fernandez-Contreras, M. 2004. Bottlenose dolphin abundance in the NW Mediterranean: addressing heterogeneity in distribution. Marine Ecology Progress Series. 275:275-287.

32. Forney, K.A. 2007. Preliminary estimates of cetacean abundance along the U.S. west coast and within four National Marine Sanctuaries during 2005. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-406. 27.
33. Fraser, C.M. 2008. Manejo, cría y enfermedades de los mamíferos marinos. Manual Merck de Veterinaria. Editorial Océano/Centrum. 4<sup>ta</sup> Ed. en español. Barcelona, España. 1194-1205.
34. Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Gulland, F.M.D., Rowles, T., Harvey, J.T., Allen, S.G., King, D.P., Aldridge, B.N., Stott, J.L. 2004. The transmission of phocine herpesvirus-1 in rehabilitating and free-ranging Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) in California Veterinary Microbiology 103: 131-141.
35. Gómez, G.B. 2013. Laboratorio de Virología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.
36. González, F.M. 2001. Actividades realizadas sobre cetáceos 1998-2000. Serie Informes Técnicos DGF/IT/396, Dirección General de Fauna-MARNR. Caracas, Venezuela.
37. González, G.S., Ruíz, V.M.R., Hernández, B.E.M. 2003. Guía de Microscopía Electrónica. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.
38. Goycoolea, F.M., Remuñán-López, C.M., Alonso, J. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Laboratorio de Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, México.
39. Hammond, P.S., Bearzi, G., Bjorge, A., Forney, K.A., Karkzmarski, L., Kasuya, T., Perrin, W.F., Scott, M.D., Wang, J.Y., Wells, R.S., Wilson, B. 2012. *Tursiops truncatus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
40. Hargis, A.M., Ginn, P.E.J., Mansell, E.K.L., Garber, R.L. 1999. Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol.* 10: 267–274.
41. Higuera-Ciapara, I., Toledo-Guillén, A.R., Goycoolea, F.M. 2007. Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. *Argüelles-Monal W M,*

Campana S and Mada A, Proceedings of the IV Iberoamerican Chitin Symposium. Iberoamerican Chitin Society, Natal, Brasil.

42. Isenberg, G. 1998. Modern Optics, Electronics and High Precision Techniques in Cell Biology. Springer-Verlag, Berlin, German.
43. Kennedy, S., Lindstedt, I.J., McAliskey, M.M., McConnell, S.A., McCullough, S.J. 1992. Herpesviral encephalitis in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Zoo Wildl Med.* 23:374–379.
44. Latson, F.E., James, F.X., Wellehan, J. 2011. Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses *Veterinary Microbiology.* 149(1-2):23-29.
45. Leatherwood, S., Reeves, R.R., Foster, L. 1983. Suborden odontoceti. The toothed whale, dolphins and porpoise. *The Sierra Club Handbook of Whales and Dolphins.* Sierra Club Books. 1st Ed. California, U.S.A.
46. Ledbetter, E.C. et al. 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Vet Microbiol.* Jul 2; 138 (1-2): 98-105.
47. Luna, B.A., Valdez, P.R., Romano, P.M., Galindo, M.F. 2012. Comportamiento de mantenimiento y niveles de cortisol de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas. *Veterinaria México.* 43.
48. Maness, H.T.D., Nollens, H.H., Jensen, E.D., Goldstein, T., LaMere, S., Childress, A., Sykes, J., St. Leger, J., Lacave, G., Latson, F.E., Wellehan, J.F.X. 2011. Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. *Veterinary Microbiology.*
49. Manire, C.A., Smolarek, K.A., Romero, C.H., Kinsel, M.J., Clauss, T.M., Byrd, L. 2006. Proliferative dermatitis associated with a novel alphaherpesvirus in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med.* 37: 174–181.
50. Marine Mammal Commission. 2004. Annual Report to Congress. Marine Mammal Commission, Bethesda, MD.
51. Martineau, D., Lagace, A., Bèland, P., Higgens, R., Armstrong, D., Shugart, L.R. 1988. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec. Canada. *J Comp Pathol.* 98:287–311.
52. Miyashita, T. 1993. Abundance of dolphin stocks in the western North Pacific taken by the Japanese drive fishery. Report of the International Whaling Commission. 43:417-437.

53. Navarro, C.B., Celedon, M., Pizarro, J. B. 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 en Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
54. Ojeda, S.J.L. 1997. Métodos de microscopía electrónica de barrido en biología. Universidad de Cantabria, D. L.
55. Orive, G., Carcaboso, A.M., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Pedraz J.L. 2005. Biocompatibility evaluation of different alginates and alginatebased microcapsules. *Biomacromolecules*. 6: 927-931.
56. Patela, R.J.G.M., Heldensb, T., Bakonyic, M., Rusvaic. 2012. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control, *Review J Vaccine*. 30: 1767– 1781.
57. Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M. 2009. *Encyclopedia of marine mammals*. Second edition. Academic Press. United States of America.
58. Poole, J.P., Owens-Frank, C.J. 2003. *Introducción a la Nanotecnología*. Editorial Reverté. Barcelona, España.
59. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. 2014. México. [www.profepa.gob.mx](http://www.profepa.gob.mx)
60. Pupo, A.M., Hermida, D.C., Morier, D.L., García, I.S., Resik, A.S. 1997. Anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen el virus herpes simple (HSV) y su posible aplicación al diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. *Rev Cubana Med Trop*. Cuba.
61. Randall, W.S.D., Scott, M.D. 1981. *Bottlenose Dolphin Tursiops truncatus*. Montagu. USA.
62. Reddy, M., Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. 2001. Marine Mammal as sentinels of Ocean Health. Leslie Dierauf, *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. CRC Academic Press, Inc.
63. Reeves, R.R., Notarbartolo Di Sciara, G. 2006. The status and distribution of cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain. 64.
64. Rehtanz, M., Gregory, D., Bossart, P.A., Fair, J.S., Reif, S.G., Jenson, A.B. 2012. Papillomaviruses and herpesviruses: Who is who in genital tumor development of free-

- ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)? *Veterinary Microbiology*. 160: 297–304.
65. Reidarson, H., Thomas, D.V.M. 2010. *Medicina en Cetáceos para Zoo and Wild Animal Medicine* 5<sup>th</sup> ed. Traducido por Tania Monreal Pawlowsky y Tenesoya Pawlowsky Santana, USA.
66. Roizman, B., Knipe, D.M. 2001. *Herpes Simplex Viruses and Their Replication*. In *Fields Virology*. Fourth edition. Knipe DM and Howley PM, Editors. USA: Lippincott Williams & Wilkins. USA.
67. Ruíz, S.J., Villamil, J.L.C. 2008. Enfermedades Emergentes y Barrera de Especies: Riesgo del Herpesvirus Equino 9. *Rev. salud pública*. 10 (5):840-847.
68. Saliki, J.T., Cooper, E.J., Rotstein, D.S., Caseltine, S.L. 2006. A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *J Wildl Dis*. 42:142–148.
69. Shors, T. 2009. *Virus: estudio molecular con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
70. Simmonds, M.P., Elliott, W.J. 2009. Climate change and cetaceans: concerns and recent developments. *J Mar Biol Assoc UK*.
71. Smolarek-Benson, K.A., Manire, C.A., Ewing, R.Y., Saliki, J.T., Townsend, F.I., Ehlers, B., Romero, C.H. 2006. Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *J Virol Methods*. 136:261–266.
72. Soto, S., Gonzalez, B., Willoughby, K., Maley, M., Olvera, A., Kennedy, S., Domingo M.A., Domingo, M. 2012. Systemic Herpesvirus and Morbillivirus Co-Infection in a Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) *J. Comp. Path.* 146: 269-273.
73. Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., Alonso, M.J. 2008. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
74. Thiry, E., Dubuisson, J., Pastoret, P.P. 1986. Patogenia, latencia y reactivación de las infecciones provocadas por herpesvirus. *Rev. sec. tech. Off. int. Epiz.* 5 (4): 829-836.

75. Thiry, J., Thiry, E. 2008. El Herpesvirus es altamente prevalente. *Mundo Vet.* No. 214.
76. Trono, D., Cullen, B. 1998. *Cell. Nature Medicine.* University of Rochester Medical Center USA. 4:1368.
77. Valverde, A., Romero, S., Cabeza, C. 1997. Inmunofluorescencia indirecta como prueba alternativa para la confirmación diagnóstica de infección por VIH en el Perú. *Rev Med Exp.* 14 (1).
78. Van Bresseem, M.F., Van Waerebeek, K., Garcia, G.A., Dekegel, D., Pastoret, P.P. 1994. Herpes-like virus in dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. *Mar Mamm Sci.* 10:354–359.
79. VanDevanter, D.R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus PCR. *J Clin Microbiol.* 34:1666–1671.
80. Van Elk, C.E., Van de Bildt, M.W.G., De Jong, A.A.W., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T. 2009. Genital herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. *Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association.* 45(4): 895–906.
81. Vázquez, N.G., Echeverría, O. 2000. *Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas.* Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Distrito Federal, México.
82. Wade, R.P., Gerrodette, T. 1993. Estimates of cetacean abundance and distribution in the Eastern Tropical Pacific. *Report of the International Whaling Commission.* 43:477-493.
83. Wagner, E.K. 2003. UC Irvine Virus Center. Scottish Genome Centre, Massachusetts Institute of Technology. University of California, USA.
84. WAZA (World Association of Zoos and Aquariums). 2013. United for Conservation. Rotterdam, Netherlands.
85. Well, R.S., Rhinehardt, H.L., Hansen, L.J., Sweeney, J.C., Townsend, F.I., Stone, R. 2004. Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: developing a health monitoring system. *EcoHealth.* 1: 246-54.
86. Yada, T., Nakanishi, T. 2002. Interaction between endocrine and immune system in fish. *Int Rev Cytol.* 220: 35-92.

87. Young, R.F., Phillips, H.D. 2002. Primary production required to support bottlenose dolphins in a salt marsh estuarine creek system. *Mar Mamm Sci*.
88. Zinsser. 1994. Diagnóstico Viral Rápido. *Microbiología*. 20ed. Editorial Médica Panamericana.