

Artículo Primario

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GAMMAHERPESVIRUS ASOCIADO A LESIONES GENITALES DE DELFINES *TURSIOPS TRUNCATUS*

¹Danilo Cruz, ²Maritza Barrera, ²Majela Rodríguez, ³Vivian Kouri, ³Yudira Soto, ⁴Damyr Rodríguez.

¹ Acuario Nacional de Cuba. danioloc@acuaronacional.cu

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba

³ Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Cuba

⁴ Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana.

Resumen. Entre las enfermedades virales de más reciente diagnóstico que afectan a los delfines se describe la incidencia de los gammaherpesvirus en lesiones vaginales y peneanas severas. Con el objetivo de realizar la identificación molecular del virus asociado a las lesiones en genitales de delfines *Tursiops truncatus* de la cayería norte central de Cuba, se realizaron biopsias de lesiones genitales de 17 delfines entre los años 2005 – 2010, previa anestesia del área con lidocaína al 2 %. A dichas muestras se les extrajo el DNA para el diagnóstico molecular de herpesvirus mediante PCR. Se pudo detectar la presencia del genoma viral de herpesvirus en 9 de las muestras lo que representó un 53% del total de las lesiones en estudio. A partir de los productos amplificados se secuenció un fragmento del gen de la polimerasa viral de herpesvirus en ambos sentidos empleando los mismos cebadores que se utilizaron para las reacciones de amplificación y se realizaron arboles filogenéticos con lo que se identificó la presencia de gammaherpesvirus como agente etiológico de las lesiones. Este hallazgo constituye el primer reporte de la presencia de herpesvirus a partir de lesiones genitales en delfines *Tursiops truncatus* en Cuba y el segundo en la costa Atlántica.

Palabras clave: Herpesvirus; DeHV; delfín nariz de botella; *Tursiops truncatus*; neoplasia; desarrollo de tumor

GAMMAHERPESVIRUS MOLECULAR IDENTIFICATION ASSOCIATED TO *Tursiops truncatus* DOLPHINS GENITAL LESSIONS

Abstract. Among the viral diseases of recent diagnosis that affect dolphins are described the gammaherpesvirus incidence in severe genitals lesions. With the objective to do the molecular identification to the associated virus to *Tursiops truncatus* dolphins from the central-north Cuban keys, some biopsies were doing to 17 dolphins from 2005 - 2010, previous lidocaine anesthesia 2% to the area. The DNA was taking out form the samples to the molecular diagnosis to the herpesvirus through PCR. It was highlighted the presence of the herpesvirus viral genome in nine of the samples what means the 53% of the total studied lesions. From the amplified products, a fragment of the gen of herpesvirus viral polimerasa was taking in sequence in both senses using the same primer that were used to the amplification reactions, the filogenetic trees were doing, was identified the presence of gammaherpesvirus as etiologic agent of the lesions. This discovery is the first report of the presence of herpesvirus through genital lesions in *Tursiops truncatus* dolphins in Cuba and the second in the Atlantic coast.

Key words: Herpesvirus; DeHV; bottlenose dolphin; *Tursiops truncatus*; neoplasia; tumor development.

INTRODUCCIÓN

Los cetáceos marinos de forma general y en particular los delfines *Tursiops truncatus* son especies sensibles a un gran número de enfermedades, dentro de las cuales las enfermedades virales se cuentan entre las de mayor frecuencia ya que al menos nueve familias de virus han sido reportadas en estos mamíferos (Van Bresse, *et. al.*, 2009 y Bossart, 2011) a pesar que su diagnóstico se dificulta, entre otras razones, por su hábitat acuático, la dificultad de su manipulación, así como el alto costo de las investigaciones que se realizan en estas especies.

Entre las enfermedades virales de más reciente diagnóstico que afectan a los delfines se describe la incidencia de los gammaherpesvirus en lesiones vaginales y peneanas severas (Romero, 2005; Saliki, *et. al.*, 2005; Smoralek, *et. al.*, 2006; Miyoshi, *et. al.*, 2011; Maness, *et. al.*, 2011; Rethanz, *et. al.*, 2012 y Cruz, *et. al.*, 2014). La observación de cuerpos de inclusión intranucleares de herpesvirus en lesiones papilomatosas en cetáceos marinos, determinada con el empleo de microscopía electrónica (Martineau, *et. al.*, 1988 y Manire, *et. al.*, 2005) también se asoció a la presencia de lesiones compatibles con la enfermedad, tanto cutáneas (Van Bresse, *et. al.*, 1994) como de mucosas (Lipscomb, *et. al.*, 1996 y Romero, 2005).

En la actualidad se han desarrollado varios procedimientos para la detención de genoma viral en muestras de tejidos, pero es la técnica de PCR la más comúnmente empleada en el diagnóstico de herpesvirus. La especificidad en su diagnóstico permite genotipificación y los análisis filogenéticos de los agentes determinados (Schmitt y Henderson, 2005).

Este trabajo se trazó como objetivo realizar la identificación molecular de virus asociado a las lesiones en genitales de delfines *Tursiops truncatus* de la cayería norte central de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron biopsias de lesiones genitales de 17 delfines entre los años 2005 - 2010, previa anestesia del área con lidocaína al 2%, mediante un ponche de 5 mm realizado sobre la lesión tumoral. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente a -80°C para el diagnóstico molecular en el Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA), situado en la Provincia Mayabeque.

A las secciones de tejido se les añadió 500 μL de PBS 1X para rehidratar el tejido y se dejaron a 4°C durante 2h. Posteriormente se cortaron con bisturí, se centrifugaron durante 5min a 12000g a una temperatura de 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en tampón de digestión (10mM Tris-HCl (pH 8.8), 5mM EDTA (pH 8.0), 0,5% SDS y 1mg/mL de proteinasa K en agua destilada) (TE 1X, 0.5% SDS y 1mg/mL) y se incubó toda la noche a una temperatura de 56°C . Se les añadió 1 volumen de fenol saturado con TRIS-HCL, pH 7.8 (500 μL), se agitaron manualmente durante 5min a 6000g y se tomó la fase superior (este paso se repitió 3 veces). Luego se trataron con 500 μL de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó 5min manualmente y se separaron las fases mediante centrifugación durante 5min a 6000g. La fase superior se pasó a otro tubo donde se procedió a la precipitación del ADN empleando 50 μL de acetato de sodio 3M, pH 5,5 y 1ml de etanol absoluto frío. Se incubaron durante 1h a -80°C y posteriormente se centrifugó durante 15min a 13,200g a 4°C . El sobrenadante se desechó y el precipitado fue lavado con etanol al 70% 1ml. Se volvió a centrifugar a 15min a 13,200g a 4°C . El precipitado fue secado al aire. El ADN fue resuspendido en 50 μL de TE 1X y fue almacenado a -20°C .

Con el fin de su utilización como control de amplificación por PCR, utilizando este mismo procedimiento, se extrajo el ADN del sobrenadante de células de riñón de bovino infectadas con la cepa E8 de herpesvirus bovino 1(BHV 1).

Para la detección de herpesvirus del delfín se utilizó un PCR anidado con un juego de cebadores consenso para herpesvirus, diseñados por Van Devanter, *et. al.*, (1996) de acuerdo a secuencias motifs conservadas del gen viral que codifica para la ADN polimerasa de diferentes especies herpesvirales (DFA: GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC, ILK: TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA, KG1: GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT, TGV: TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT, IYG: CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT). El perfil de la reacción de PCR en la primera y la segunda reacción fue: 10min. a 94°C seguido de 45 ciclos (30seg. a 94°C , 60seg. a 46°C y 60seg. a 72°C) y una incubación final de 7min. a 72°C . En la reacción se utilizaron 2 μL de ADN en la 1^o reacción y 5 μL en la 2^oreacción.

Los reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 50 μL de mezcla que contenía Go Taq Polimerase Green master mix 1X, Promega, (1,5mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 2.5 U/50 μL de GoTaq DNA polimerasa) 1 μM de cada cebador y 2 -5 μL de ADN molde con una concentración entre 100 y 200ng/50 μL . Como control negativo de la reacción se sustituyó el ADN molde por el mismo volumen de agua libre de nucleasas (Promega). Se utilizó dimethyl sulfoxido (DMSO) al 5% como aditivo en la reacción. Para la incubación de las reacciones se utilizó un termociclador MJ-ResearchTM. Como control positivo de la reacción de PCR, se utilizó el ADN de BHV1 (chequeado previamente por PCR con cebadores específicos a dicho virus).

Los productos de PCR con 1X de tampón de carga azul-naranja (Promega) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las corridas se realizaron en tampón TBE 0.5X a un voltaje constante de 100 V por 30min. en cámara de electroforesis (Ecogen) y fuente (Amersham Pharmacia Biotech EPS 601). Para determinar la talla aproximada de los productos fue incluido un patrón de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega) con un rango de tallas de 250-10000pb y 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) con un rango de tallas de 100-12000pb. Las bandas se visualizaron a una longitud de onda de 312nm en un transiluminador (Uvitec) y se fotografiaron en GelVue UV Transilluminatiator (SYNGENE) para registrar los resultados.

Los productos de la amplificación por PCR se purificaron desde el gel de agarosa mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según las recomendaciones del proveedor. Se secuenció un fragmento de 215–315pb del gen de la polimerasa viral de herpesvirus en ambos sentidos empleando los mismos cebadores que se utilizaron para las reacciones de amplificación. Para las reacción de secuenciación se preparó una mezcla constituida por: 1 µL de cada uno de los cebadores de secuencia, 8µL de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminador Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit, de Beckman Coulter, USA), 5µL de ADN purificado y 6µL de H₂O, hasta completar 20µL de reacción. Para esta reacción se realizaron 50 ciclos de 96°C por 30seg, 50°C durante 20seg y 60°C por 4min.

Una vez concluida la reacción de secuencia, se realizó la purificación de la misma siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial DTCS Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, EU). La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQ™8800 utilizando el procedimiento de análisis de datos crudos para productos de PCR.

Las secuencias obtenidas para cada muestra, correspondientes al fragmento del gen de la polimerasa de herpesvirus se ensamblaron y editaron utilizando el programa Sequencher™ Version 4.10 (Genes Codes Corporation, USA), usando como referencia secuencias de ambos virus obtenidas en el gen Bank. Al final se obtuvieron secuencias consensos para cada uno de los virus estudiados. El análisis inicial de las secuencias obtenidas se realizó mediante análisis por Blast en el sitio web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> usando como referencia secuencias del virus obtenido en el GenBank. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas utilizando el programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Los alineamientos fueron rectificadas por inspección visual.

A partir de las secuencias obtenidas se realizaron las inferencias filogenéticas entre las especies de herpesvirus. Se estimó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos, utilizando los criterios informativo de Akaike (AIC) (Akaike, 1974) y bayesiano (BIC), implementados en los programa jModelTest v. 0.1.1 (Posada, 2008).

Para generar los árboles filogenéticos se utilizaron tres criterios de reconstrucción: Neighbor joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) máxima verosimilitud (MV) (Felsenstein, 1981) y Bayesiano (Yang y Rannala, 1997). Los árboles NJ se construyeron usando el programa MEGA 5.04. (Tamura, *et. al.*, 2011). Para las secuencias nucleotídicas se utilizó la distancia GTR con las correcciones para la heterogeneidad en los patrones de sustitución entre los sitios inferidos en el jModelTest.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo detectar la presencia del genoma viral de herpesvirus en 9 de las muestras lo que representa un 53% del total de las lesiones en estudio. La visualización de las bandas se correspondieron con una talla de aproximadamente 400pb (Figura 1).

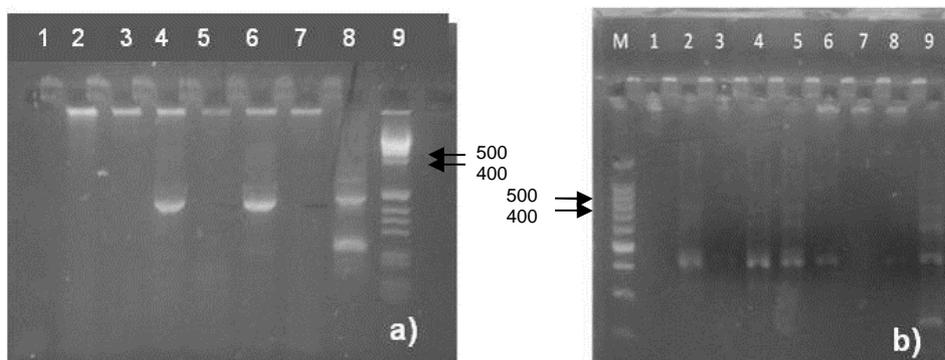


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% usando los cebadores de Van Devanter, *et. al.*, (1996) en 13 de las muestras analizadas. a) Línea 1: control negativo, línea 2: 0609, línea 3: SN01, línea 4: 0419, línea 5: 0230, línea 6: 0618, línea 7: SN02, línea 8: control positivo (ADN-BoHV-1), línea 9: marcador de peso molecular. b) M: Patrón de peso molecular 100pb, línea 1: control negativo, línea 2: 0903, línea 3: 0902, línea 4: 0904, línea 5: 0906, línea 6: 0910, línea 7: 0901, línea 8: 0933, línea 9: control positivo (ADN-BoHV-1).

Van Elk, *et. al.*, (2009) en un estudio similar con una n=36 individuos mantenidos bajo condiciones controladas en diferentes parques acuáticos de Europa que poseían lesiones genitales, encontró por PCR que en 9 de estos se diagnosticara herpesvirus para un 25% de positividad.

Los productos de PCR positivos a herpesvirus fueron purificados y se obtuvo un amplicón de alrededor de 700 pb (Figura 2).

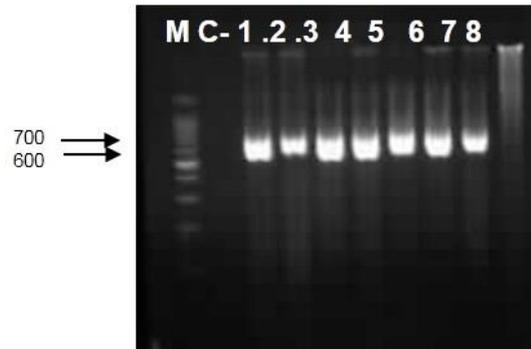


Figura 2. Productos del PCR general de herpesvirus con los cebadores DFA y KG1 purificados para secuenciar. Línea M: marcador de peso molecular (100 pb Promega). C-: Control negativo (agua); Línea de 1al 7: productos de PCR de las muestras de ADN de 0419, 0618, 0903, 0904, 0906, 0910, 0933; Línea 8 ADN de piel de delfín sano como control negativo 0901.

A partir de los fragmentos amplificados y con el uso de los cebadores DFA y KG1 se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de un fragmento de 651pb del gen de la polimerasa de herpesvirus que fueron enviadas a la base de datos Genbank.

Al realizar el análisis de comparación de secuencias obtenidas con el empleo de la herramienta BLASTn se pudo comprobar una alta identidad con *Tursiops truncatus* herpesvirus (AY952778.1 y AY952777.1) y *Tursiops truncatus* gammaherpesvirus (AY949831.1) que fueron aislados por Smoralek, *et. al.*, (2006) a partir de lesiones genitales de ejemplares de la costa Atlántica de los E.U (Tabla I).

Tabla I. Resumen del análisis por BLASTn de las secuencias obtenidas de Herpesvirus en la base de datos del GenBank.

MUESTRAS	IDENTIDAD MÁXIMA (%)	No. GENBANK	ESPECIE VIRAL
0903	95	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
0419	95	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
0904	91	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
0906	90	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
0618	89	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY949831.1	<i>T. truncatus</i> gammaherpesvirus
0910	91	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY952777.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY949831.1	<i>T. truncatus</i> gammaherpesvirus
0933	88	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY952777.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY949831.1	<i>T. truncatus</i> gammaherpesvirus
1001	99	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY952777.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY949831.1	<i>T. truncatus</i> gammaherpesvirus
1002	99	AY952778.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY952777.1	<i>T. truncatus</i> herpesvirus
		AY949831.1	<i>T. truncatus</i> gammaherpesvirus

Para los datos de herpesvirus, el modelo de evolución propuesto por el programa jModelTest v. 0.1.1 fue GTR (Tavaré, 1986) con corrección gamma para las tasas de variación entre sitios (parámetro de corrección $\alpha=4.745$ cuando se analizaron todas las secuencias de herpesvirus y $\alpha=0.431$ para las solo gammaherpesvirus).

El análisis filogenético realizado por los tres métodos de reconstrucción NJ, MV y Bayesiano; mostró resultados esencialmente iguales por lo que los resultados obtenidos se representaron en un mismo árbol. Las muestras 0906, 0419, 0903, 1001, 0904, 0910, 0518 y 0933 se ubican topológicamente en el mismo nodo donde se agrupan los gammaherpesvirus documentados en los cetáceos, lo que nos permite identificar las secuencias obtenidas en este trabajo dentro del grupo de los gammaherpesvirus, agrupándose en un mismo nodo con otras gammaherpesvirus de *T. truncatus* referidas en la literatura (Figura 3) donde forman un grupo monofilético con las gammaherpesvirus de delfines en general.

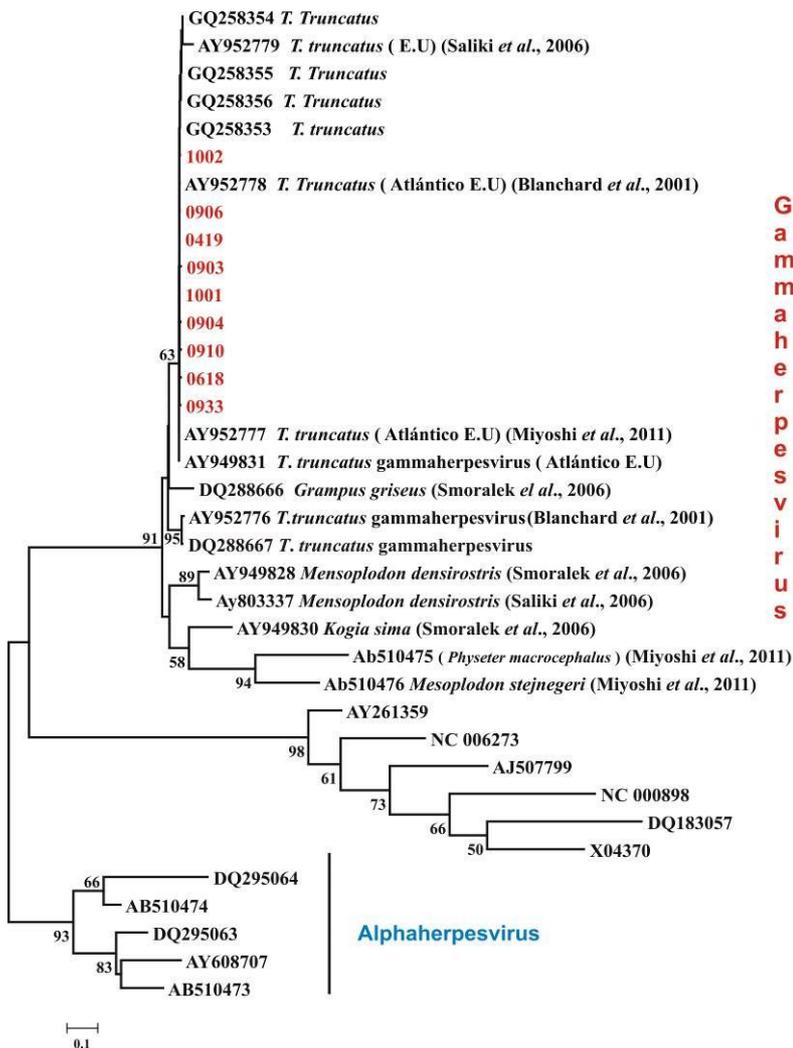


Figura 3. Árbol de relaciones filogenéticas realizado a partir de las secuencias obtenidas de herpesvirus de *T. truncatus* (0906, 0419, 0903, 1001, 0904, 0910, 0518 y 0933) y las secuencias de referencias de herpesvirus de cetáceos, estimado por el método de reconstrucción de máxima verosimilitud (MV). Los números en las ramas representan los valores de robustez, mayores del 50%, de los nodos estimados por *bootstrap* (con 10000, 100 réplicas para NJ y MV respectivamente) y valor de probabilidad posterior a partir de 10500 árboles muestreados en el caso de Bayesiano.

La secuenciación de los fragmentos de amplificación obtenidos, el análisis mediante BLASTn y el análisis filogenético permitió identificar la presencia de gammaherpesvirus *Tursiops truncatus* en lesiones genitales de delfines de la costa norte central de Cuba.

Acerca de la determinación gammaherpesvirus a partir de lesiones genitales en estos animales, son escasos también los estudios, solo se documentan en las costas de Perú (Van Bresse, *et. al.*, 1994) y en el Atlántico de los Estados Unidos (Romero, 2005; Saliki, *et. al.*, 2005 y Smolarek, *et. al.*, 2006), en animales bajo condiciones controladas de tipo acuario en Europa (Van Elk *et. al.*, 2009) y recientemente a partir de animales varados en las costas de Japón (Miyoshi, *et. al.*, 2011).

El alto número de animales afectados se relaciona sin dudas con la etiología viral de la enfermedad, así como con la consideración de la vía venérea como su principal forma de transmisión (Cruz y Barrera, 2011). Este resultado podría incrementarse si se tiene en cuenta que un número indeterminado de animales que no fueron estudiados pudiera cursar con enfermedad subclínica (Antonsson, *et. al.*, 2000 y Antonsson y Hansson, 2002), cuyos signos solo aparecen bajo condiciones favorables para la multiplicación del agente (Nicholls y Stanley, 2000 y Bossart, *et. al.*, 2001).

Los cambios en los ecosistemas costeros, muy en relación con la actividad humana, así como los cambios globales, pueden estar asociados a una elevación de las condiciones de estrés en los animales (Bossart, 2007; Simmonds y Elliott, 2009 y Bossart, 2011) que traen por consecuencia la aparición de numerosas enfermedades virales, por lo que el efecto acumulativo de estos pudiera explicar la elevación en la prevalencia de animales con lesiones genitales asociadas a herpesvirus.

CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de *Tursiops truncatus* gammaherpesvirus asociados a lesiones en genitales de delfines.
2. Las secuencias de herpesvirus obtenidas tienen mucha similitud entre ellas y con otras secuencias reportadas en delfines de herpesvirus de *Tursiops truncatus*.

REFERENCIAS

1. Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control** 19:716-723.
2. Antonsson, A., O. Forslund, G. Ekberg, G. Sterner, y B. G. Hansson. 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. **Journal of Virology** 74: 11636-11641.
3. Antonsson, A., y B. G. Hansson. 2002. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses, which are closely related to their human counterparts. **Journal of Virology** 76: 12537-12542.
4. Bossart G. D. 2007. **Emerging Diseases in Marine Mammals: from Dolphins to Manatees**. Microbe / Volume 2 (11).
5. Bossart G. D. 2011. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. **Vet Pathology**, 48 (3), pp 676-690.
6. Bossart, G. D., S. J. Decker y R. Y. Ewing. 2001. Cytopathology of cutaneous viral papillomatosis in the killer whale (*Orcinus orca*). En: Pfeiffer C (Ed.), **Molecular and Cell Biology of Marine Mammals**, Krieger Publishing Co., Melbourne, FL, pp: 213 – 223.
7. Cruz, D., y M. Barrera. 2011. Frecuencia de lesiones en genitales de delfines *Tursiops truncatus* de la cayería norte central de Cuba. **Revista de Salud Animal** 33:190–196.
8. Cruz D., Rodríguez M., Barrera M., Kouri V., Loidy Z., Soto Y., Hernández D. and Rethanz M. 2014. Concurrent Papillomavirus- and Herpesvirus-Infection in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the Cuban Coast. **Marine Mammal Science**. Vol. 30 (4), pp 1748-7692
9. Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **J. Mol. Evol.** 17. 368-376.
10. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41: 95-98.
11. Lipscomb, T. P., P. L. Habecker, D. M. Dambach y L. Schoelkopf. 1996. Genital herpes infection in a male harbor porpoise. En: **Proceedings of the International Association for Aquatic Animal Medicine**, 17.
12. Maness, H.T.D, H.H. Nollens, E.D. Jensen, T. Goldstein, S. LaMere, A. Childress, J. Sykes, J. St. Leger, G. Lacave, F. Ed Latson y J.F.X. Wellehan. 2011. Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, 149, pp.23-29.

13. Manire, C. A., K. A. Smolarek, C. H. Romero, M. J. Kinsel, T. M. Clauss y L. Byrd. 2005. Proliferative dermatitis associated with a novel alphaherpesvirus in an Atlantic bottlenose, *Tursiops truncatus*. **Proceedings of the Florida Marine Mammal Health Conference II** April 7-10. University of Florida.
14. Martineau, D., A. Lagace, P. Beland, R. Higgins, D. Armstrong y L. R. Shugart. 1988. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. **Journal of Comparative Pathology**. 98. 287-311.
15. Miyoshi, K., S. Nishida, E. Sone, Y. Tajima, M. Makara, M. Yoshioka, M. Nakamura, T.K. Yamada y H. Koike. 2011. Molecular Identification of Novel Alpha- and Gammaherpesviruses from Cetaceans Stranded on Japanese Coasts Molecular Identification of Novel Alpha- and Gammaherpesviruses from Cetaceans. **Zoological Science**, 28(2), pp.126-133.
16. Nicholls, P. K. y M. A. Stanley. 2000. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet. Immunol.* **Immunopathol.** 73(2):101-27.
17. Rehtanz, M., G. D. Bossart, P. A. Fair, J. S. Reif, S.-J. Ghim and A. B. Jenson. 2012. Papillomaviruses and herpesviruses: Who is who in genital tumor development of freeranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)? **Veterinary Microbiology** 160:297–304.
18. Romero, H. C. 2005. Mucosal and cutaneous lesions associated with viral infections in cetaceans, pinnipeds and sirenians. **Proceedings of the Florida Marine Mammal Health Conference II** April 7-10. University of Florida.
19. Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.
20. Saliki, T. J., J. E Cooper, S. D. Rotstein, L. S. Casaltine, D. A. Pabst, A. W., McLellan, P. Govet, C. Harms, A. K. Smolarek y H. C. Romero. 2005. A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). **Proceedings from the 36th Annual Conf. of the International Association of Aquatic Animal Medicine Seward, A. K.**
21. Schmitt, B. y Henderson, L. 2005. Diagnostic tools for animal diseases. **Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.** 24(1): 243:250.
22. Simmonds, M. P y Elliott, W. J. 2009. Climate change and cetaceans: concerns and recent developments. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 89 (1), 203–210.
23. Smolarek Benson K. A, C.A Manire, R. Y Ewing, J. Saliki, F. Townsend, B. Ehlers, C. Romero. 2006. Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. **J. Virol. Methods** 136:261-266.
24. Tamura, K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, y S. Kumar. 2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted).
25. Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Pp. 57-86 in R.M. Miura, ed. *Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis.* **Amer. Math. Soc., Providence, RI.**
26. Van Bresse M. F, J. A Raga, G. Di Guardo, P. Jepson, P. Duignan, U. Siebert, T. Barrett, M. C. de Oliveira, I. Moreno, S. Siciliano, A. Aguilar y K. Van Waerebeek 2009 Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Dis Aquat Organ** 86 (2): 143–157.
27. Van Bresse M. F., K. Van Waerebeek, A. García-Godos, D. Dekegel y P. P. Pastoret. 1994. Herpes-like virus in dusky dolphins *Lagenorhynchus obscurus* from coastal Peru. **Marine Mammal Science**. 10. 354-359.
28. Van Devanter, D. R., P. Warrener, L. Bennett, E. R. Schultz, S. Coulter, R. L. Garber y T. M. Rose. 1996. Detection and analysis of di- verse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 34: 1666– 1671.
29. Van Elk. C. E, M. W. G. van de Bildt, A.A.W. de Jong, A. D. M. E. Osterhaus, y T. Kuiken. 2009. Genital herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. **Journal of Wildlife Diseases**. 45 (4), pp. 895–906
30. Yang Z y B Rannala. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences A Markov Chain Monte Carlo method. **Mol. Biol. Evol.** 14. 717-724.