



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Biológicas

**RESPUESTAS DEL ELEFANTE MARINO DEL NORTE (*Mirounga angustirostris*) A DESAFIOS INMUNES EN UN CONTEXTO DE HISTORIA DE VIDA**


Opción de titulación:  
**Tesis individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
maestro en Ciencias biológicas

**Presenta:**  
Lic. en Microbiología Nami del Rosario Morales Durán

Dirigido por:  
Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse  
Presidente

  
Firma

Dr. Carlos A. López González  
Secretario

  
Firma

Dra. Olga Patricia García Obregón  
Vocal

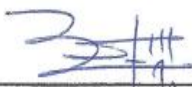
  
Firma

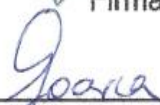
Dr. Fernando R. Elorriaga Verplancken  
Suplente

  
Firma

Dr. Jorge Contreras Garduño  
Suplente

  
Firma

  
Dra. C.S. Juana Elizabeth Elton Puente  
Directora de la Facultad de Ciencias  
Naturales

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2018  
México

## Resumen

La función del sistema inmune es dinámica y depende de muchos factores que determinan la eficiencia de su respuesta, por lo que en algunas ocasiones se ve comprometida cuando compite por recursos con otras funciones fisiológicas costosas, tales como el crecimiento y la reproducción. Lo anterior implica una reasignación de los recursos disponibles. En poblaciones naturales esta distribución depende del contexto ambiental y ontogenético en el cual se encuentran los individuos. Recientemente, se determinó que para los pinnípedos otáridos el costo de las respuestas inmunes varía según la etapa del desarrollo temprano y que el grado de urbanización del ambiente también influye en esas respuestas. Los pinnípedos otáridos se caracterizan por un periodo de lactancia larga con fuerte inversión materna donde el aporte de nutrientes y energías se extiende a lo largo del desarrollo. En contraste, en los fócidos la lactancia dura poco. Por ejemplo, la lactancia del elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*) dura menos de un mes, el destete es abrupto y las crías permanecen por más de dos meses sin alimentarse. En esta tesis se analizaron respuestas inmunes innatas de crías de elefante marino de Norte en el contexto de su historia de vida temprana. Entre inicios de febrero y finales de marzo de 2017, se colectaron muestras de 40 crías destetadas en las colonias de reproductivas del archipiélago de San Benito, en el Pacífico Norte Mexicano. Las crías fueron muestreadas en dos etapas, una al momento del destete, y otra a los 34 días post-destete. En cada ocasión, cada cría fue desafiada con fitohemaglutinina (PHA) para medir la respuesta inflamatoria. Se exploró la relación de la respuesta a PHA con diferentes indicadores de recursos energéticos, el sexo y el territorio en el cual nacieron las crías. También se midió la capacidad del suero de las crías para inhibir a la bacteria *E.coli* en ambas etapas del muestreo. Se encontraron diferencias en la respuesta a PHA entre muestreos, siendo mayor en la etapa de recién destetada (Rango Wilcoxon,  $W=1024$ ,  $p=0.0001$ ). En la etapa de destete tardío la inflamación fue explicada por la capa de grasa lateral (GLM,  $F_{1,32}=4.539$ ,  $R^2=0.124$ ,  $p=0.0409$ ) y por la masa corporal (GLM,  $F_{1,32}=4.668$ ,  $R^2=0.127$ ,  $p=0.038$ ). La inhibición bacteriana también presentó diferencias entre ambas etapas y ésta fue mayor para la etapa de recién destetados (Rango Wilcoxon,  $W=938$ ,  $p=0.0003$ ). La inhibición del crecimiento bacteriano varió entre machos y hembras en crías recién destetadas (Rango Wilcoxon,  $W=238$ ,  $p=0.042$ ), siendo mayor la capacidad de inhibir a la bacteria *E. coli* en las hembras. Este estudio aporta información empírica sobre los factores que afectan la respuesta inmune durante etapas críticas de la historia de vida de las crías del elefante marino del Norte.

**Palabras clave:** Elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, sistema inmune, PHA, inhibición bacteriana, historia de vida.

## Abstract

The immune system is dynamic and depends on various factors, which will influence the effectiveness of responses. Thus, responses can be compromised by a competition for energetic resources among costly physiological processes, such as growth and reproduction, which leads to differential allocation of available resources. In natural populations, the distribution of resources depends on the environmental and ontogenetic context of individuals. Recently, it was reported that for otariid pinnipeds the cost of implementing immune responses varies according to the developmental stage, and that environmental factors, such as urbanization, also impacts responses. Otariids have long nursing periods and marked maternal investment, where nutrients and energetic resources are passively transferred to the pups during their early development. In contrast, in phocids, nursing is short. For instance, northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) suckle for less than a month, weaning is abrupt and pups remain on land for more than two months without any food. This thesis investigated innate immune responses of northern elephant seal pups along their early life history. Between early February and late March, 2017, 40 weaned pups were sampled in breeding colonies of the San Benito archipelago, in the Mexican North Pacific. The pups were sampled at two time points, at the first day of weaning, and 34 days after weaning. At each sampling point, pups were challenged with phytohemagglutinin (PHA) to assess responsive inflammation. I investigated the relationship between the PHA response and various measures of available, sex, and the territory of birth. I also examined the bactericide activity of serum against *E. coli*. I found that the response to PHA varied between sampling points, being more marked in newly weaned pups than in older pups (Rango Wilcoxon,  $W=1024$ ,  $p=0.0001$ ). In older pups, inflammation was explained by the blubber depth (GLM,  $F_{1,32}=4.539$ ,  $R^2=0.124$ ,  $p=0.0409$ ) and body mass (GLM,  $F_{1,32}=4.668$ ,  $R^2=0.127$ ,  $p=0.038$ ). Serum bacterial inhibition also varied between sampling points, being higher for newly weaned pups (Rango Wilcoxon,  $W=938$ ,  $p=0.0003$ ). Bacterial inhibition varied between sexes in newly weaned pups (Rango Wilcoxon,  $W=238$ ,  $p=0.042$ ), being highest in females. This study shows empirical evidence of the factors that can impact innate immune responses during critical stages of early development of the northern elephant seal.

**Key words:** Northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*, immune system, PHA, bacterial inhibition, life history.

"Si he logrado ver más lejos,  
ha sido porque he subido a hombros de gigantes".

Isaac Newton

## **Declaratoria de autoría**

Declaro que el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado por mí, a excepción de aquellas secciones que formaron parte de colaboraciones, mismas que se indican explícitamente en el texto.

Confirmando que las ideas originales aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dado crédito al trabajo de otros mediante el uso adecuado de las referencias.

Esta copia se ha sometido a la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el entendido de que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado.

## **Dedicatorias**

Para todos los seres queridos que de alguna forma contribuyeron para poder realizar esta tesis.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, y a la Facultad de Ciencias Naturales, el apoyo dado para completar el programa de la Maestría en Ciencias Biológicas. Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Maestría (número 454044) por la que pude realizar la tesis. Esta tesis fue financiada por el Fondo para el Fortalecimiento a la Investigación UAQ (FOFI 2015-2017) “Efecto de las alteraciones climático-oceanográficas sobre el estado neonatal nutricio y de salud de pinnípedos del Pacífico Mexicano”.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>20</b>
1. Teoría de historia de vida .....	20
2. El sistema inmune .....	21
3. El sistema inmune innato .....	24
4. El sistema Inmune adaptativo .....	34
5. Inmunidad neonatal.....	37
6. Ecoinmunología .....	39
a) Canjes energéticos relacionados con las respuestas inmunes .....	40
b) Dimorfismo sexual en las respuestas inmunes.....	42
c) Efecto del estrés sobre las respuestas inmunes.....	43
7. El modelo de estudio: el elefante marino del Norte ( <i>Mirounga angustirostris</i> ) .....	45
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>125</b>



<b>ANEXO II.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO Iii.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>143</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso hematopoyético, origen de los diferentes tipos celulares del sistema inmune, imagen tomada de Owen et al., 2013.....	23
Figura 2. Diferentes mecanismos de ataque de los neutrófilos, imagen modificada de Kolaczowska y Kubes (2013).....	26
Figura 3. Cascada de la respuesta inflamatoria (Patel and Patel, 2015).....	31
Figura 4. Diferentes vías de activación del sistema del complemento (figura modificada de(Tegla et al., 2011).....	34
Figura 5. Elefante marino adulto. Se puede observar su probóscide y la piel arrugada y más gruesa del cuello. ....	46
Figura 6. Harén en el cual se puede observar la presencia de dos machos, uno cerca del agua y el otro en la periferia del harén.....	48
Figura 7. Hembra y cría de elefante marino del Norte. La cría tiene aproximadamente tres días de vida. ....	50
Figura 8. Cría del elefante marino del Norte recién destetada. ....	52
Figura 9. Mapa del archipiélago de San. Benito. Se conforma de tres islas volcánicas: San Benito Oeste, San Benito Medio y San Benito Este. Imagen tomada de (Elorriaga-Verplancken, 2015).....	57
Figura 10. Forma de inocular la bacteria en la caja de Petri con LB sólido.....	61
Figura 11. Forma correcta de colocar los discos en la caja Petri. ....	62
Figura 12. Ejemplo de fotografía útil para el análisis fotogramétrico de una cría de elefante marino del Norte. ....	65
Figura 13. Representación gráfica de las medidas obtenidas con fotogrametría en una cría de elefante marino del Norte. ....	66
Figura 14. Ejemplo de digitalización de la fotografía de una cría de elefante marino del Norte (identificación de cría: 26).....	68
Figura 15. Masa obtenida con el modelo 1 en comparación con el modelo propuesto por Bell et al (1997). ....	69

Figura 16. Comparación de la masa obtenida con los modelos propuestos para crías del elefante marino del Norte.....	69
Figura 17. Respuesta a la inoculación con PHA en la membrana interdigital de crías de elefante marino del Norte con respecto al periodo de destete.....	71
Figura 18. Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> , (0 días recién destetados y 34 días post-destete). ....	72
Figura 19. Ejemplo de la inhibición del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> , de cuatro muestras y un control (M1 = 0 días recién destetados, M3 = 34 días post-destete). ....	72
Figura 20. Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la masa en crías de elefante marino del Norte a los 34 días post-destete.....	75
Figura 21. Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la masa en crías de elefante marino del Norte recién destetadas. ....	75
Figura 22. Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la capa de grasa lateral en la etapa de recién destetados (0 días) de las crías del elefante marino del Norte.....	76
Figura 23. Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la capa de grasa lateral en la etapa de post- destete (34 días) de las crías del elefante marino del Norte.....	76
Figura 24. Respuesta da la inoculación con PHA en hembras (H) y machos (M) de crías de elefante marino del Norte recién destetadas. ....	80
Figura 25. Respuesta da la inoculación con PHA en hembras (H) y machos (M) de crías de elefante marino del Norte a los 34 días post destete.....	80
Figura 26. Cambio en el grosor de la membrana interdigital en respuesta a PHA en crías hembras (H) y machos (M). ....	81
Figura 27. Inhibición sérica del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> en crías macho (M) y hembra (H) en la etapa de recién destetados. ....	81
Figura 28. Inhibición sérica del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> en machos (M) y hembras (H) durante la etapa post-destete. ....	82

Figura 29. Cambio en la inhibición del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> en crías del elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M). .....	82
Figura 30. Respuesta PHA de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanas y clínicamente anormales recién destetados. ....	83
Figura 31. Respuesta a PHA de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanas y clínicamente anormales a los 34 días post-destete. ....	84
Figura 32. Respuesta a la inhibición sérica del crecimiento bacteriano de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanos y clínicamente anormales recién destetados.....	84
Figura 33. Respuesta a la inhibición sérica del crecimiento bacteriano de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanos y clínicamente anormales 34 días post destete. ....	85
Figura 34. Respuesta a PHA en la etapa de recién destetados (0 días) de las crías de acuerdo a los diagnósticos clínicos. IAA=Infección aguda/probable absceso, IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales. ....	85
Figura 35. Respuesta a PHA en la etapa de 34 días post-destete de las crías de acuerdo a diagnósticos clínicos. IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales. ....	86
Figura 36. Respuesta a la inhibición sérica de <i>E. coli</i> en crías de elefante marino del Norte recién destetados de acuerdo a diagnósticos clínicos. IAA=Infección aguda/absceso probable, IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales. ....	86
Figura 37. Respuesta a la inhibición sérica de <i>E. coli</i> en la etapa de 34 días post-destete de las crías de acuerdo a diagnóstico clínicos. IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales.....	87
Figura 38. Relación entre los niveles de hierro en suero y la respuesta a PHA en crías recién destetadas. ....	87
Figura 39. Correlación entre los niveles de hierro en suero y la respuesta a PHA en crías a los 34 días del destete.....	88

Figura 40. Correlación entre los niveles de hierro en suero y la inhibición de la bacteria <i>E. coli</i> a los 0 días del destete. ....	88
Figura 41. Correlación entre los niveles de hierro en suero y la inhibición de la bacteria <i>E. coli</i> a los 34 días del destete. ....	89
Figura 42. Mapa del Archipiélago de San Benito en la cual se puede observar los diferentes territorios del muestreo, así como la distancia en metros (m) entre ellos. Mapa elaborado con ArcMap 10.1 por el M. en C. Luis Alberto Soto García. ....	91
Figura 43. Territorio 4, se puede observar que el sustrato arena que se encuentra en este territorio. ....	92
Figura 44. Territorio 3 que tiene sustrato canto rodado.....	93
Figura 45. Crías de elefante marino del Norte practicando sus primeros nados en charcas cercanas al harén en el cual nacieron. ....	95
Figura 46. Crías de elefante marino del Norte descansando sobre la playa. ...	96
Figura 47. Conteo de crías en los diferentes territorios (T= número de territorio). ....	96
Figura 49. Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino del Norte en las etapas del muestreo.....	127
Figura 50. Capa de grasa lateral de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.....	128
Figura 51. Capa de grasa lateral de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.....	128
Figura 52. Masa escalar de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo. ....	129
Figura 53. Gravedad específica del plasma de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo . ....	129
Figura 55. Señal isotópica $\delta^{15}\text{N}$ de las vibrisas de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo. ....	130
Figura 57. Masa de crías de elefante marino recién macho (M) y hembras (H) durante el destete tardío.. ....	131

Figura 59. Capa de grasa lateral de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas. ....	132
Figura 60. Capa de grasa lateral de crías de elefante marino del norte machos (M) y hembras (H) en el destete tardío (34 días).....	133
Figura 61. Cambio en la capa de grasa lateral de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo. ....	133
Figura 62. Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas. ....	134
Figura 63. Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), en el destete tardío.....	134
Figura 64. Cambio en la capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino de acuerdo al sexo. H= hembras, M= machos.....	135
Figura 65. Condición corporal de las crías de elefante marino, machos (M) y hembras (H) recién destetadas. ....	135
Figura 66. Condición corporal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), durante el destete tardío.....	136
Figura 67. Cambio en la condición corporal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), entre las etapas de muestreo. ....	136
Figura 68. Masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas. ....	137
Figura 69. Masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) durante el destete tardío .....	137
Figura 70. Cambio en la masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo.....	138
Figura 71. Gravedad específica del plasma de crías de elefante marino hembra (H) y macho (M) al inicio del destete.....	138
Figura 73. Cambio en la gravedad específica del plasma de crías de elefante marino hembra (H) y macho (M) entre las etapas de muestreo. ....	139
Figura 74. Concentración de glucosa en suero de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetados.....	140

Figura 75. Concentración de glucosa en suero de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) en el destete tardío. ....	140
Figura 76. Cambio en la concentración de glucosa sérica de crías de elefante marino en machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo.....	141
Figura 77. Señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) al inicio del destete (0 días).....	141
Figura 78. Señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) en el destete tardío. ....	142
Figura 79. Cambio en la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) entre etapas de muestreo. ....	142
Figura 81. Condición clínica de enfermos de las crías del elefante marino del Norte durante el destete tardío.....	144

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Modelos para la estimación de la masa.....	67
Cuadro 2. Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de recién destetados.....	74
Cuadro 3. Indicadores de recursos energéticos correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de post- destete. Nota. El asterisco indica significancia estadística. ....	74
Cuadro 4. Cambio en los Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de recién destetados.....	77
Cuadro 5. Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de <i>E. coli</i> por el suero de las crías del elefante marino del Norte, en la etapa de recién destetados. ....	78
Cuadro 6. Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de <i>E. coli</i> por el suero de las crías del elefante marino del Norte, en la etapa de 34 días post-destete. ....	78
Cuadro 7. Cambio en los Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de <i>E. coli</i> por el suero de las crías del elefante marino del Norte.....	79
Cuadro 8. Características de las zonas y territorios de muestreo. T=número de territorio (1-7), Z=número de zona (1 y 2). ....	90
Cuadro 9. Tipo de sustrato en zona y territorio .....	93
Cuadro 10. Densidad poblacional para cada territorio de muestreo a los 0 días del destete.....	94
Cuadro 11. Densidad poblacional para cada territorio de muestreo a los 34 días post- destete.....	94
Cuadro 12. Efecto de la densidad poblacional sobre la respuesta a PHA y la inhibición sérica del crecimiento bacteriano a los 0 y 34 días post-destete. ....	97



Cuadro 13. Efecto de los territorios sobre la respuesta a PHA y la inhibición sérica del crecimiento bacteriano a los 0 y 34 días post-destete. El asterisco denota significancia estadística.....	97
Cuadro 14. Cuadro de correlación de Pearson de los indicadores de recursos en las crías recién destetadas (0 días).....	125
Cuadro 15. Cuadro de correlación de Pearson de los indicadores de recursos en las crías recién destetadas (0 días).....	126
Cuadro 16. Resultados de los análisis sanguíneos de las crías del elefante marino del Norte. El asterisco denota significancia estadística .....	143

## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos a una gama de factores exógenos, como patógenos, contaminantes y cambios ambientales, los cuales comprometen la supervivencia y el mantenimiento de su especie a lo largo de su carrera evolutiva. Entre los mecanismos de defensa que contrarrestan a esos factores, el sistema inmune juega un papel fundamental (Acevedo-Whitehouse y Duffus, 2009). La función del sistema inmune es dinámica y depende de muchos factores que determinan la eficiencia de su respuesta, por lo que en algunas ocasiones se ve comprometida cuando compite por recursos con otras funciones fisiológicas costosas, tales como el crecimiento y la reproducción (Brock et al., 2013; French et al., 2009; Graham et al., 2006; Ortiz et al., 2003; Vera-Massieu et al., 2015). Esta competencia implica una reasignación de recursos entre las diferentes funciones fisiológicas que los requieren (French et al., 2009). En poblaciones de vida silvestre la distribución diferencial de recursos depende del contexto ambiental en el cual se encuentran los individuos. Se han realizado diversos estudios que tratan de entender los factores que afectan las respuestas inmunes en poblaciones de vida silvestre, así como los costos que provoca la interacción parásito-hospedero (Brock et al., 2013; French and Moore, 2008; Vera-Massieu et al., 2015). Sin embargo, aún se tienen pocos estudios empíricos como para poder generalizar acerca de los canjes energéticos en diferentes contextos ecológicos, ontogénicos y filogenéticos.

Recientemente se determinó que para los pinnípedos otáridos el costo de las respuestas inmunes varía según la etapa del desarrollo temprano (Vera-Massieu et al., 2015) y que el grado de urbanización del ambiente también influye en esas respuestas (Brock et al., 2013). Estos pinnípedos se caracterizan por tener un periodo largo de lactancia que puede durar hasta dos años, con fuerte inversión materna (Newsome et al., 2006), donde el aporte de nutrientes y energías se extiende a lo largo del desarrollo. En contraste, los pinnípedos fócidos tienen historias de vida muy diferentes. Por ejemplo, en el elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*) la lactancia dura 27-28 días y el destete es abrupto (Reiter et al., 1978; Riedman y Le Boeuf, 1982), por lo que es plausible que las respuestas inmunes de las crías de los fócidos sean más dependientes de su condición corporal o recursos energéticos disponibles que lo

observado para los otáridos, y que sean influenciadas por la asignación de recursos maternos, que a su vez pudieran variar de acuerdo al sexo de las crías, la fuerte presión de selección a la cual se ven sometidas y el estrés provocado por interacciones con animales adultos en las colonias reproductivas (Reiter *et al.*, 1978; Riedman y Le Boeuf, 1982). Es por esto que investigar los canjes energéticos para el mantenimiento y activación del sistema inmune en una especie caracterizada por una lactancia corta, y alta demanda de recursos energéticos para el crecimiento rápido es interesante en un contexto ecológico. En particular, este tipo de estudios permitiría poner a prueba hipótesis sobre canjes energéticos y diferencias inter-sexo en las inversiones en el sistema inmune, como se esperaría en el marco de la teoría de historia de vida (revisado en Rauw, 2012). Además, se generarían datos que a futuro podrían ser comparados con los ya reportados para otras especies de pinnípedos cuyas historias de vida son marcadamente diferentes. Esta tesis tiene como objetivo explorar la relevancia de la inversión estratégica de los recursos que las crías obtuvieron durante la lactancia en etapas posteriores al destete para las respuestas inmunes innatas durante el desarrollo temprano.

## ANTECEDENTES

### 1. Teoría de historia de vida

La teoría de historia de vida es el marco conceptual mediante el cual se estudia la variedad de estrategias utilizadas por los organismos para maximizar su supervivencia y su reproducción. Estas estrategias abarcan características como el crecimiento, el desarrollo, la maduración, la estrategia reproductiva, el número de crías, y la estrategia de lactancia, entre otros. También trata de explicar cómo los organismos optimizan estos caracteres cuando se enfrentan a diferentes desafíos relacionados con el contexto ecológico en el cual se encuentran. Las estrategias usadas están determinadas por la etapa del ciclo de vida de los organismos y constreñidas por la historia evolutiva (Flatt y Heyland, 2011).

La optimización de los caracteres de historia de vida, dadas las limitaciones y las compensaciones intrínsecas y extrínsecas de un organismo, es el resultado de los diferentes desafíos ecológicos (e.g. parasitismo, disponibilidad de alimentos, cambios ambientales, etc.). Estos desafíos pueden comprometer caracteres fisiológicos claves que afectan la supervivencia y capacidad reproductiva de un organismo, es decir, la adecuación o eficacia biológica (Møller y Alatalo, 1999; Stearns, 1989). Este compromiso fisiológico se da porque los recursos energéticos disponibles para un organismo suelen ser limitados en condiciones naturales. Por lo tanto, se dan canjes (*trade-offs*, en inglés) entre los caracteres fisiológicos, frecuentemente de forma mutuamente excluyente. Los canjes favorecen la adecuación y con ello, garantizan la permanencia de las especies (Møller y Alatalo, 1999; Stearns, 1989).

La teoría de historia de vida plantea que los organismos no pueden maximizar la supervivencia y la fecundidad al mismo tiempo, debido a limitaciones fisiológicas o ecológicas, es decir, que un mayor esfuerzo reproductivo implicará un costo en términos de supervivencia a corto o a largo plazo (Flatt y Heyland, 2011). Los canjes que se dan en términos de los recursos energéticos benefician o perjudican a los organismos, dependiendo de las condiciones en las cuales se encuentren (Stearns, 1989). Maximizar la supervivencia y la reproducción sin tener un factor limitante en alguna etapa del ciclo de vida, llevaría a los organismos a volverse una suerte de “demonios darwinianos”. Sin embargo, en la naturaleza esto no es posible debido a que los

recursos son limitados y las características de historia de vida están sujetas a diversos factores limitantes (Fabian y Flatt, 2012; Flatt y Heyland, 2011; Stearns, 1989).

Además de los recursos disponibles, la genética es otro factor importante que influye sobre los caracteres de historia de vida, dado que para cada carácter puede existir variación genética subyacente. Algunos fenotipos serán más favorecidos que otros bajo las condiciones existentes, lo que incrementará la frecuencia de esos genotipos en la población (Fabian y Flatt, 2012; Flatt y Heyland, 2011). Además, algunos genotipos serán más plásticos que otros en términos del fenotipo que expresan en ambientes determinados. Esto se conoce como plasticidad fenotípica. La plasticidad puede ser representada mediante expresiones matemáticas conocidas como normas de reacción que relacionan a los diferentes fenotipos que produce un genotipo en términos del ambiente en el que se encuentra el individuo (Fabian y Flatt, 2012)

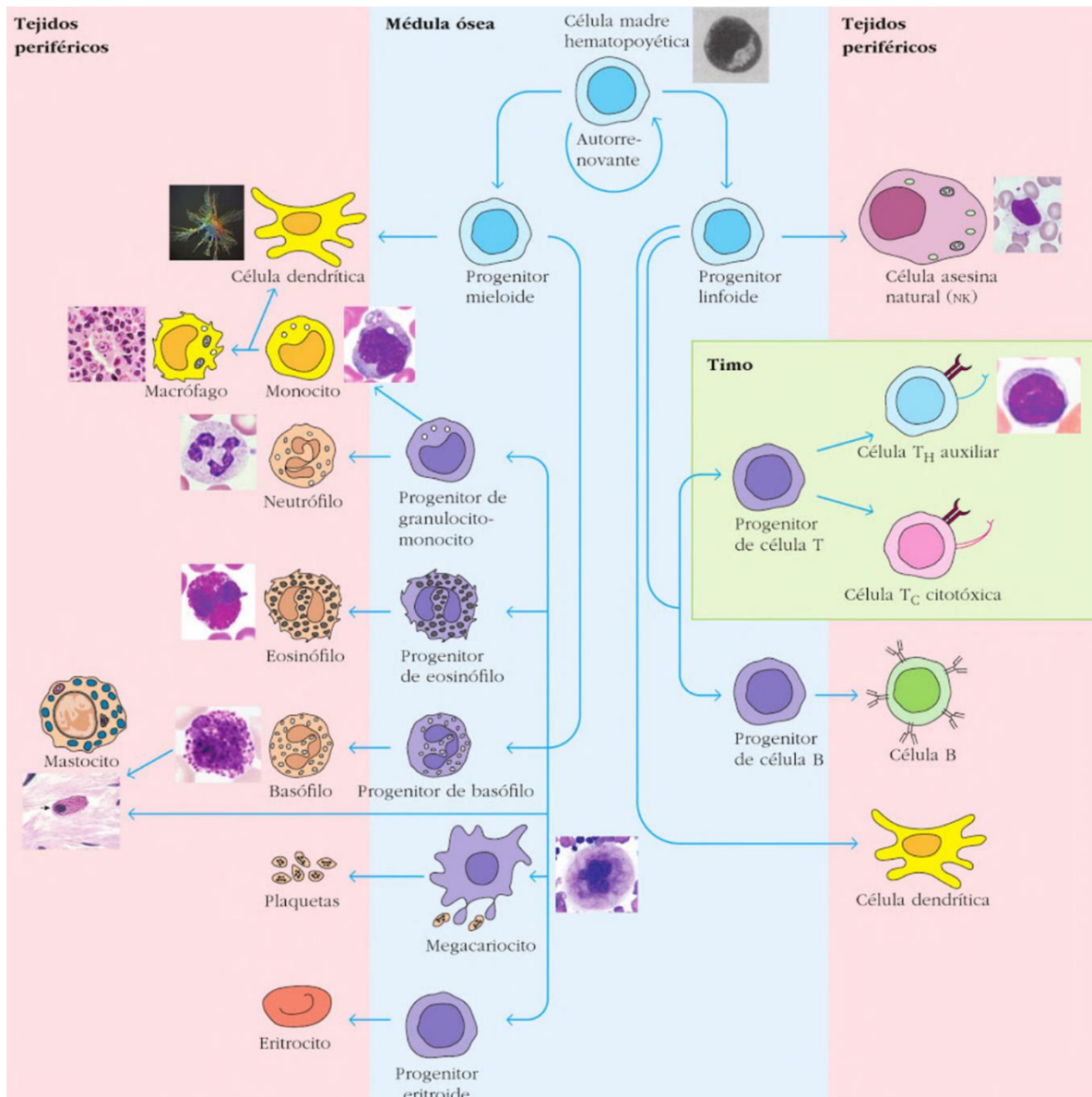
## **2. El sistema inmune**

El sistema inmune comprende todos los efectores que participan en la defensa de un organismo en contra de agentes foráneos o moléculas propias alteradas (Hasselquist y Nilsson, 2012). Se caracteriza por tener cuatro funciones principales I) reconocimiento inmunitario, II) contención de la infección y/o eliminación, III) regulación de las respuestas y, IV) memoria inmunitaria en el caso de los vertebrados gnatostomados (Janeway et al., 2009).

El sistema inmune de los vertebrados gnatostomados se divide convencionalmente en innato y adaptativo (Medzhitov, 2007). La diferencia entre ambos estriba en la habilidad de generar “memoria” de los antígenos que se han reconocido en infecciones a lo largo de la vida, y diversificar las respuestas relacionadas con este reconocimiento antigénico. Las respuestas inmune innatas se basan en el reconocimiento rápido de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y suelen activar a los efectores que conforman a las respuestas adaptativas (Janeway, 1992). En particular, algunos efectores celulares del sistema inmune innato conocidos como células presentadoras de antígenos (i.e. células dendríticas y macrófagos) fagocitan a los patógenos y presentan antígenos derivados de estos patógenos

a los linfocitos. Estos se encargan de montar una respuesta adaptativa con capacidad de memoria (Owen et al., 2013).

Los efectores celulares de ambas ramas del sistema inmune se conocen genéricamente como leucocitos. Estos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor pluripotencial que se diferencia en una célula de origen linfoide o mieloide. Cada linaje se diferenciará en células especializadas; la célula progenitora linfoide se diferencia en linfocitos T, B y células NK, y la célula progenitora mieloide se diferencia en neutrófilos, monocitos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y basófilos. Este proceso de diferenciación y maduración se lleva a cabo en la médula ósea y en órganos linfoides como el bazo, el timo y placas linfoides intestinales (Fig. 1) (Janeway, 1992; Owen et al., 2013).



**Figura 1.** Proceso hematopoyético, origen de los diferentes tipos celulares del sistema inmune, imagen tomada de Owen et al., 2013.

### **3. El sistema inmune innato**

La inmunidad innata es la principal línea de defensa para la mayoría de las especies animales, y muchas de ellas cuentan únicamente con esta rama del sistema inmune para defenderse de los patógenos y agentes dañinos que comprometan su salud. Además, durante etapas tempranas del desarrollo de los mamíferos, suele ser esta la rama activa del sistema inmune, ya que otros efectores aún son inmaduros (Dowling y Levy, 2014; Prabhu Das et al., 2011). Los efectores del sistema inmune innato detectan características generales y poco variables de los patógenos invasores, por lo que la respuesta es menos específica y suele actuar con mayor rapidez. Se conforma de un conjunto de proteínas y células especializadas que reconocen características particulares de los patógenos y en consecuencia activan diversos mecanismos para contrarrestarlos. Este tipo de defensas está presente en organismos vertebrados e invertebrados y son necesarias para la activación de la respuesta adaptativa (Alberts et al., 2002).

La inmunidad innata se compone de varios tipos celulares que están especializados en realizar funciones que ayudan a contrarrestar la infección por patógenos. En los vertebrados, las células del sistema inmune innato son las células NK, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y basófilos (Iwasaki y Medzhitov, 2010; Janeway et al., 2009). A excepción de las células NK, las demás células tienen como progenitora una célula madre de origen mieloide.

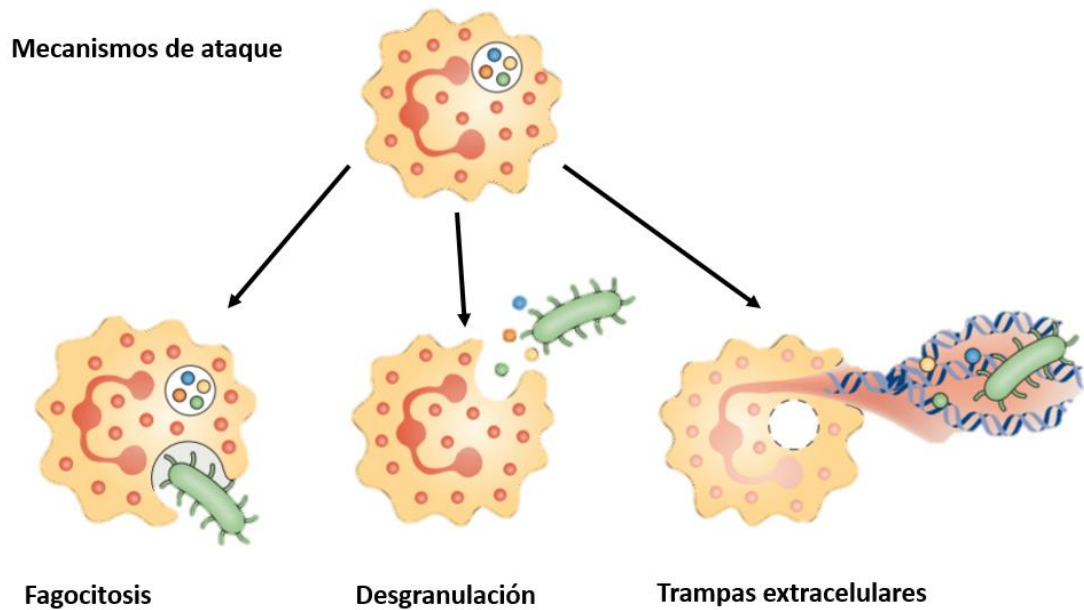
#### **a) Los granulocitos**

Los granulocitos son células leucocitarias que incluyen a los neutrófilos, basófilos, mastocitos, eosinófilos, que comparten características morfológicas comunes como un núcleo multilobulado que los diferencia de los linfocitos y macrófagos que tienen el núcleo redondo. El citoplasma de los granulocitos contiene grandes cantidades de gránulos de origen enzimático, además de otras sustancias vasoactivas que participan en la destrucción de los patógenos después de la fagocitosis, o en la activación extracelular de otras respuestas, mismas que se describirán más adelante (Owen et al., 2013).



Los neutrófilos, que se caracterizan por ser fagocitos polimorfonucleares, son los leucocitos más abundantes en la sangre, representando entre el 50 y el 70% de los leucocitos circulantes. En la sangre, los neutrófilos maduros tienen un diámetro aproximado de 7-10  $\mu\text{m}$ , cuentan con núcleo segmentado separado por filamentos que parecen hebras y tienen gránulos primarios y secundarios, así como vesículas secretoras en el citoplasma (Kolaczkowska y Kubes, 2013; Owen et al., 2013; Winkelstein et al., 1998). Los gránulos primarios azurofílicos se componen de mieloperoxidasa (MPO), los gránulos secundarios contienen lactoferrina y los gránulos terciarios se componen de gelatinasa y contienen metaloproteínasa 9 de matriz (Kolaczkowska y Kubes, 2013).

Estas células son de las primeras en responder cuando hay procesos de inflamación, y los mecanismos mediante los cuales eliminan a los patógenos y células muertas son variados (Fig. 2.). Estos mecanismos incluyen la fagocitosis, un proceso intracelular que consiste en la ingesta de un agente patógeno seguido de la encapsulación en el fagosoma y su destrucción por medio de mecanismos dependientes de dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NADP}^+$ ), especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas antibacterianas como catepsinas, defensinas, lactoferrina y lisozima. Estas proteínas son dirigidas hacia el fagosoma o degranuladas hacia el medio extracelular (Brinkmann et al., 2004; Kolaczkowska y Kubes, 2013). Finalmente, los neutrófilos también pueden eliminar patógenos por medio de la formación de trampas extracelulares conocidas como NETs. Estas trampas están formadas por cromatina desconcentrada y por proteínas como lactoferrina, catepsinas, elastasas y mieloperoxidasa que son liberadas de los gránulos que se encuentran adjuntos al ADN, a través de un proceso llamado netosis (Brinkmann et al., 2004). Esta liberación es inducida por especies reactivas de oxígeno, diversos microorganismos como virus, bacterias, hongos, complejos antígeno-anticuerpo y lipopolisacáridos. Las trampas inmovilizan a los patógenos y así evitan su propagación, además de facilitar la fagocitosis y la muerte de los microorganismos (Brinkmann et al., 2004; Kolaczkowska y Kubes, 2013).



**Figura 2.** Diferentes mecanismos de ataque de los neutrófilos, imagen modificada de Kolaczowska y Kubes (2013).

Los conteos de neutrófilos sanguíneos son útiles para diagnosticar procesos de infección. Por ejemplo, números incrementados de neutrófilos suelen indicar infecciones bacterianas agudas, mientras que una disminución marcada en el número de neutrófilos en la sangre se asocia a infecciones crónicas (Winkelstein et al., 1998).

Los basófilos son granulocitos con núcleos polimórficos, que contienen grandes gránulos llenos de proteínas basófilas, así como mediadores de la inflamación como la histamina, heparina y factores eosinófilos quimiotácticos, que son mediadores de la hipersensibilidad que se liberan luego de la unión inmunoglobulinas tipo IgE a receptores en la membrana celular (Winkelstein et al., 1998). Los basófilos en conjunto con los eósinófilos, son la población efectora circulante común en procesos de alergias y reacciones de hipersensibilidad, además de tener otras funciones, menos comprendidas a la fecha, las cuales están relacionadas con la regulación de otros efectores inmunes (Chirumbolo et al., 2017).

Los eosinófilos son granulocitos de mayor tamaño que los neutrófilos. Estos cuentan con un núcleo bilobular y contienen gránulos ricos en proteínas catiónicas, principalmente la proteína básica mayor 1 (MBP1), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada de eosinófilos (EPX) y la peroxidasa de eosinófilo (EPX). Son células efectoras relacionadas con respuestas inflamatorias (Weller y Spencer, 2017). En la sangre se encuentran en menor cantidad que los otros leucocitos circulantes, ya que representan menos del 5%; sin embargo, se pueden encontrar en mayor número en los tejidos. Su número incrementa cuando ocurren infecciones por parásitos helmintos (Owen et al., 2013) y durante procesos alérgicos (Holt, 1998; Weller y Spencer, 2017). Estas células sintetizan diferentes citoquinas, por lo que su función no solamente es la degranulación citotóxica, sino la participación en diferentes funciones como la remodelación tisular, además de tener ciertas propiedades bactericidas (Weller y Spencer, 2017). Son capaces de liberar redes similares a las de los neutrófilos, aunque los componentes de estas redes difieren (Rosenberg et al., 2012).

#### **b) Células inmunes mononucleares**

Además de los granulocitos, el sistema inmune innato también comprende a las células mononucleares. De estos, los monocitos constituyen aproximadamente el 5 al 10 % de todos los leucocitos circulantes. Estas cuentan con características morfológicas que los distinguen de los demás leucocitos, como su forma y su tamaño heterogéneo, núcleo ovalado o en forma de riñón, vesículas citoplasmáticas y citoplasma abundante. A pesar de estas características, distinguir su morfología en frotis sanguíneos puede ser complicado (Auffray et al., 2009). Cuando estas células migran hacia el tejido se diferencian en macrófagos (Owen et al., 2013). Al igual que los granulocitos, los monocitos se generan en la médula ósea y en el bazo, esto último mediante un proceso conocido como hematopoyesis extramedular (Richards et al., 2012).

Los monocitos tienen una gran cantidad de receptores *scavenger* que se caracterizan por el reconocimiento de PAMPs. Cuando son estimulados,

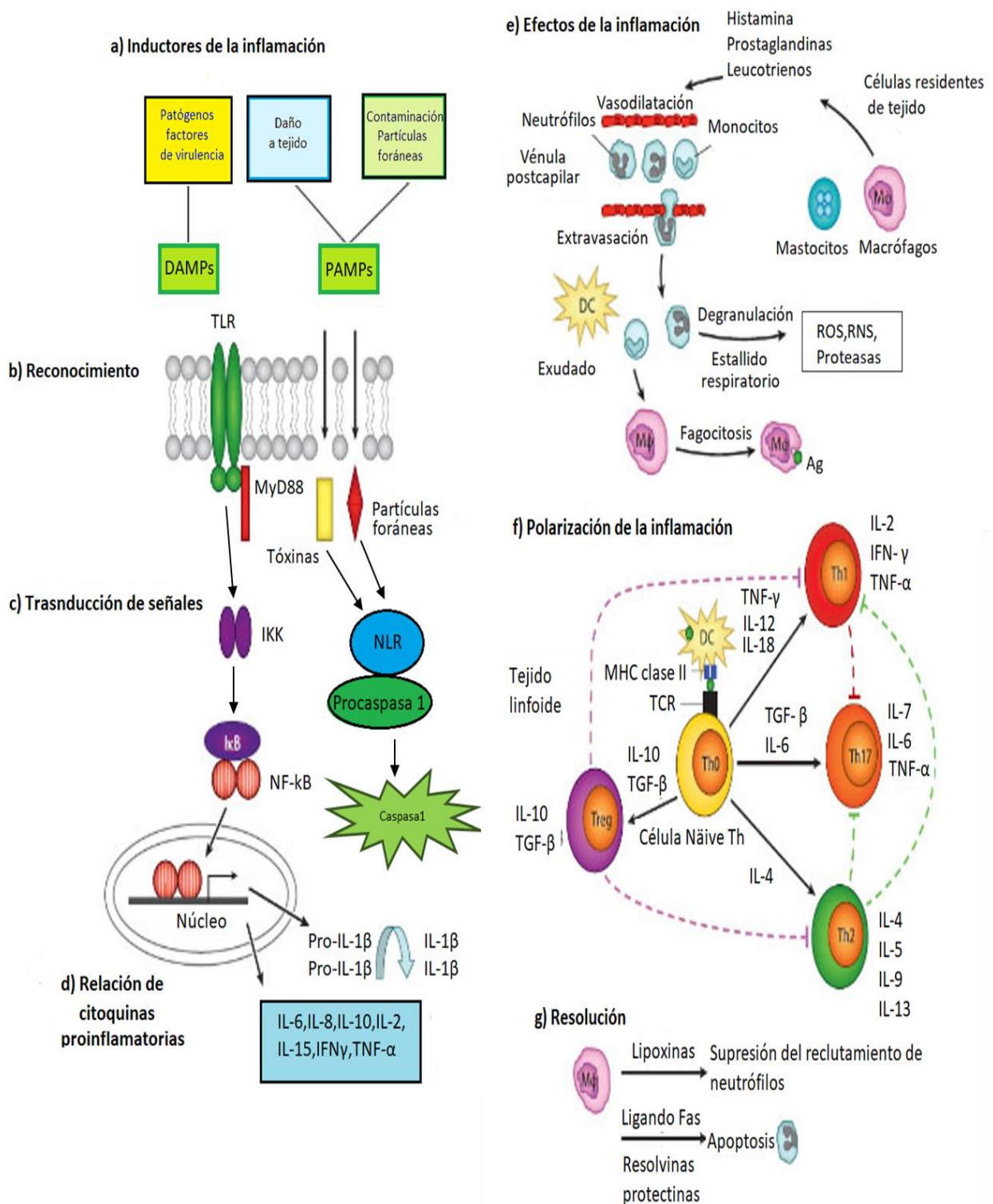
producen grandes cantidades de ROS, factores del complemento y óxido nítrico (NO). Una de las funciones más relevantes de los monocitos es que después de fagocitar patógenos presentan antígenos a los linfocitos T. Esto lo hacen por medio de péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) que tienen en su membrana celular (Gordon y Taylor, 2005; Owen et al., 2013). Además del reconocimiento de patógenos, juegan un papel importante en la eliminación de células apoptóticas y compuestos tóxicos (Auffray et al., 2009), y en la reparación y regeneración tisular (Winkelstein et al., 1998). La alta plasticidad que presentan los macrófagos les confiere la capacidad de respuesta a diferentes estímulos ambientales, lo que provoca cambios en su fisiología y movilización, y pueden tener efecto tanto en respuestas innata como en respuestas adaptativas (Gordon y Taylor, 2005; Mosser y Edwards, 2008)

Las células dendríticas son células fagocíticas y presentadoras de antígenos derivadas del mismo progenitor que da origen a los monocitos. Estas células participan tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, ya que estimulan presentan antígenos a los linfocitos T (Sallusto et al., 1995; Alvarez et al., 2008) y ayudan en la generación de anticuerpos primarios al activar a los linfocitos B (Auffray et al., 2009; Stockwin et al., 2000). A diferencia de los monocitos, son pocas las células dendríticas circulantes, y en general se observan en los tejidos, a los que migran cuando hay procesos inflamatorios. Morfológicamente, tienen diferentes procesos citoplasmáticos lo cual da como resultado una forma de estrella con extensiones membranosas que son similares a las células del sistema nervioso (Owen et al., 2013).

### **c) Respuesta inflamatoria**

La inflamación es un proceso esencial en la defensa del huésped frente a infecciones y daño mecánico (Abdulkhaleq et al., 2018). La respuesta a inflamación se compone de tres procesos principales como lo son la detección del daño, la inducción de la respuesta inflamatoria y la síntesis de los mediadores posteriores para su regulación. Estos procesos desencadenan una serie de eventos que se caracterizan por ser organizados y dinámicos que involucran tanto respuestas celulares, vasculares y secreciones humorales (Fig.3) (Abdulkhaleq et al., 2018; Freire y Van Dyke, 2013; Vergnolle, 2003). Dentro de las respuestas celulares los neutrófilos y los macrófagos son las primeras células en llegar al sitio de inflamación. Estas células son capaces de reconocer la invasión de agentes extraños por medio de los receptores de reconocimiento de patrones intracelulares (PRR), estos receptores son los encargados del reconocimiento de PAMPs que están presentes en la mayoría de los microorganismos o de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Owen et al., 2013). Los receptores de PAMPs más estudiados a la fecha son conocidos como tipo Toll (TLR). Estos receptores transmembranales son capaces de reconocer ácidos nucleicos de virus, así como lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos bacterianos y están muy conservados entre los organismos, desde insectos hasta humanos (Dempsey et al., 2003). La activación de los receptores Toll induce la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), e interleucinas (e.g. IL-1 y IL-6), que coordinan las respuestas inflamatorias a nivel local y sistémico, además de promover la vasodilatación, lo que permite que proteínas séricas y más leucocitos sean reclutados al sitio de infección (Schnare et al., 2001). También se da un aumento del factor sanguíneo III, el cual ayuda a activación de la cascada de la coagulación para prevenir la propagación de la infección por el torrente sanguíneo (Kawai y Akira, 2010; Schnare et al., 2001). Las interleucinas IL-1 $\beta$  y IL-6, activan a los hepatocitos e inducen la síntesis de proteínas de fase aguda como las colectinas y pentraxinas, que participan en la activación del sistema del complemento y ayudan a la opsonización de los patógenos, lo que promueve su fagocitosis (Kawai y Akira, 2010; Schnare et al., 2001).

Las respuestas inflamatorias pueden ser agudas (con efectos a corto plazo) y crónicas (con efectos a largo plazo) y de manera normal suele ser fuertemente regulada para evitar inmunopatologías (Owen et al., 2013). Una vez que los neutrófilos o macrófagos son activados por el reconocimiento de PAMPs o DAMPs, se liberan moléculas que actúan como quimio-atrayentes y que, junto con factores vaso-activos, desencadenan un incremento local del flujo sanguíneo en el tejido dañado. Una vez que incrementó la permeabilidad capilar, los fagocitos y neutrófilos migran hacia la zona de daño para provocar la muerte de los patógenos presentes o eliminar a las células muertas por daño tisular. Esto restringe el que los patógenos migren e infecten otra zona del cuerpo y así controlar el daño (Owen et al., 2013; Suárez y Buelvas, 2015). La inflamación también es relevante porque acaba por activar a efectores del sistema inmune adaptativo (Nathan, 2002; Owen et al., 2013; Suárez y Buelvas, 2015).



**Figura 3.** Cascada de la respuesta inflamatoria (modificado de Patel y Patel, 2015).

#### **d) El complemento**

El sistema del complemento se caracteriza por ser el puente entre la respuesta innata y la adaptativa. Se compone por un grupo de 40 proteínas séricas que se encuentran en forma de zimógenos (Owen et al., 2013). Este sistema realiza diferentes funciones dentro de las cuales se encuentra la activación de respuestas inflamatorias, la opsonización de agentes extraños y la activación del complejo de ataque a membrana (MAC). El complemento también realiza funciones antiinflamatorias, sus proteínas se unen a complejos inmunes y a células apoptóticas, lo que provoca que sean eliminados de los tejidos dañados y de la circulación (Nesargikar et al., 2012; Owen et al., 2013). La mayoría de los componentes de este sistema son sintetizados por los hepatocitos, aunque algunos de sus componentes pueden ser sintetizados por otro tipo de células como macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, gastrointestinales y células del tracto genitourinario. Estos componentes constituyen cerca del 15% de la proteína globulina que se encuentra en el plasma sanguíneo (Owen et al., 2013).

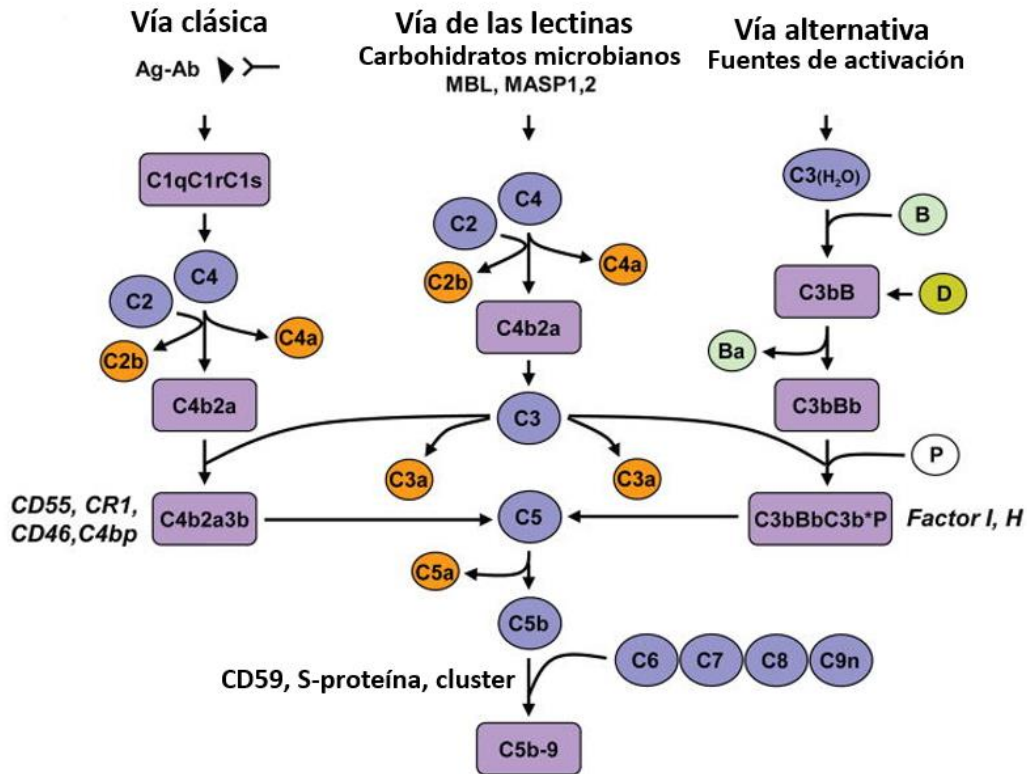
Existen tres vías que activan al sistema de complemento (Fig. 4). Primero, está la vía clásica, que comienza con la formación de complejos antígeno-anticuerpo, particularmente anticuerpos IgM e IgG. La formación de estos complejos provoca cambios conformacionales en la región constante (Fc) del anticuerpo, que es la que no se une al antígeno. Con ello se expone el sitio de unión a una de las moléculas del complemento, C1, que es un complejo formado por C1q, dos moléculas C1r, y dos moléculas C1s. El complejo antígeno-anticuerpo se une a la fracción C1q, lo que activa a las dos moléculas de C1r que a su vez activan a las dos moléculas de C1s. Estas se encargan de hidrolizar un fragmento de C4, formado por las subunidades C4a y C4b; C4b se une a C2, que se divide por medio de C1s en dos fragmentos y se forma el complejo C4b2a (también llamado C3 convertasa) que hidroliza a C3 en las subunidades C3a y C3b (Arumugam et al., 2006; Nesargikar et al., 2012; Owen et al., 2013). La formación de C3b es de gran importancia debido a que esta molécula realiza diversas funciones que ayudan a la eliminación de patógenos al unirse a las membranas de los microorganismos, lo que favorece su eliminación por las células fagocíticas, un proceso llamado opsonización. C3b también puede unirse a complejos antígeno-anticuerpo solubles, lo que provoca que los complejos



sean fagocitados o que sean transportados al hígado para su eliminación. Cuando C3b se une a la enzima C4b2a forma el complejo C4b2a3b, y esta divide a otra molécula del complemento, C5, en dos fragmentos (C5a y C5b). C5b inicia la formación del MAC, lo que daña las membranas de los microorganismos y ocasiona su muerte por lisis celular (Arumugam et al., 2006; Nesargikar et al., 2012; Owen et al., 2013). La vía clásica también puede ser activada por otras señales que son indicadoras de que el organismo se encuentra en algún peligro como la proteína C reactiva, proteínas que provienen de virus, etc. (Nesargikar et al., 2012).

La vía alternativa forma parte del sistema inmune innato y no requiere de la formación del complejo de antígeno (Owen et al., 2013). Esta vía inicia cuando C3 es hidrólizada, lo que provoca su unión al factor B y la formación del complejo soluble C3Bb, el cual funciona como una C3 convertasa. A partir de este momento la cascada del complemento es igual que la vía clásica (Arumugam et al., 2006; Nesargikar et al., 2012; Owen et al., 2013).

Finalmente, está la vía de las lectinas que se caracteriza porque utiliza lectinas que reconocen carbohidratos específicos de microorganismos. Particularmente se ha demostrado que la lectina de unión a manosa (MLB) es capaz de reconocer además de la manosa, reconoce N-acetil glucosamina, D-glucosa y L-fucosa. La MLB se expresa de manera continua en el hígado, existen tres proteínas que se asocian a la MLB, que se conocen como MASP (1-3), la proteína MASP-2 divide C4 y C2 para formar C3 convertasa y a partir de esta conversión se siguen los mismos pasos que en la vía clásica para la activación de MAC y las demás funciones del complemento (Arumugam et al., 2006; Nesargikar et al., 2012; Owen et al., 2013).



**Figura 4.** Diferentes vías de activación del sistema del complemento (Modificado de Tegla et al., 2011).

#### 4. El sistema Inmune adaptativo

Debido al enfoque de esta tesis, solo se mencionarán brevemente a los efectores del sistema inmune adaptativo. Esta rama se compone de los linfocitos T y B, que, a diferencia de las células del sistema inmune innato, carecen de receptores codificados vía la línea germinal. Este sistema es reciente en términos evolutivos, ya que apareció hace aproximadamente 500 millones de años en los peces con mandíbulas y sus descendientes (gnatostomados). Existe un repertorio extremadamente diverso de receptores de los linfocitos T y B, que reconocen antígenos foráneos y antígenos endógenos alterados. La diversidad de receptores se genera por un proceso de recombinación de tres genes, conocidos como VDJ, durante el desarrollo de estas células en la médula ósea. Cada linfocito combina un segmento de cada uno de los tres genes, lo que forma un receptor diferente en cada linfocito. El número de combinaciones es infinito, pero al darse procesos de destrucción de linfocitos autoreactivos durante la

maduración en el timo, se reduce la diversidad combinatoria a cerca de  $10^{18}$ , y cada linfocito tiene una combinación diferente. Cuando uno de los linfocitos reconoce un antígeno se da un proceso de expansión clonal, que deriva en miles de linfocitos idénticos en circulación (Davis y Bjorkman, 1988). La alta diversidad genética de los efectores del sistema inmune adaptativo ha permitido la capacidad de generar una respuesta específica contra diversos antígenos y tener capacidad de memoria para aumentar su eficiencia ante un segundo desafío (Ward y Rosenthal, 2014).

Los linfocitos son las principales células que participan en la respuesta inmune adaptativa. Su origen proviene de la línea germinal linfoide y conforman cerca del 20 al 40% de los leucocitos circulantes, además de representar el 99% de las células que se encuentran en la linfa. Una de las características distintivas de las poblaciones de linfocitos T y B son las proteínas de superficie que expresan, y que se denominan cúmulo de diferenciación o designación (CD), además de los receptores de membrana específicos antes mencionados, que son conocidos como TCR Y BCR, respectivamente (Owen et al., 2013). Los BCR también pueden ser secretadas, y en ese caso se conocen como anticuerpos, mismos que circulan en el cuerpo y al reconocer antígenos específicos recubren a los patógenos, con lo que ayudan a promover la fagocitosis (Alberts et al., 2002).

Además de los linfocitos T y B, hay otras células derivadas del progenitor linfoide. Estas son conocidas como células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). Las células NK carecen de receptores generados mediante diversidad combinatoria (Owen et al., 2013).

### **a) Linfocitos T**

Los linfocitos T son liberados del timo y migran hacia la circulación sanguínea para ingresar a órganos linfoides secundarios como nódulos linfáticos regionales y placas linfoides. Los receptores TCR, mencionados anteriormente, se unen a las moléculas del MHC expresadas en la membrana de otras células, con lo que inicia la activación de estos linfocitos (Dempsey et al., 2003; Owen et al., 2013).

Cuando las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas, están activas, producen diferentes señales químicas que activan y diferencian a los linfocitos T en dos líneas celulares, las células T auxiliares ( $T_H$ ) y las células T citotóxicas ( $T_C$ ) que se diferencian por las glicoproteínas que expresan en membrana,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  respectivamente (Dempsey et al., 2003; Owen et al., 2013). Las células  $CD4^+$  reconocen el antígeno presentado por el MHC-II de las células presentadoras de antígenos, con lo que inicia la activación y proliferación celular y se pueden diferenciar en diversos subtipos que producen citoquinas, eliminan patógenos o activan a los linfocitos B (Dempsey et al., 2003). En contraste, los linfocitos  $CD8^+$  se unen a antígenos presentados por el MHC-I, expresado en todas las células nucleadas, y se diferencian en células citotóxicas (Owen et al., 2013).

### **b) Linfocitos B**

Los linfocitos B se caracterizan porque sus receptores de membrana (BCR, como ya se mencionó arriba). Son moléculas de inmunoglobulinas que se unen a antígenos específicos, y pueden estar unidos a la membrana o ser secretados a la circulación sanguínea. Al igual que los linfocitos T, cada linfocito B expresa un determinado BCR con especificidad única. Cuando los linfocitos B están activados se diferencian en células plasmáticas, las cuales se especializan en secreción de anticuerpos, o en células de memoria, que son almacenadas en los nódulos linfáticos (Owen et al., 2013). Este proceso de diferenciación se da por comunicación con los linfocitos T  $CD4^+$  (Yuseff et al., 2013).

### **c) Células NK**

Las células NK son linfocitos que no expresan receptores antigénicos en la membrana y participan en respuestas inmunes innatas y adaptativas (Owen et al., 2013). Son células especializadas en la defensa contra patógenos intracelulares como virus y contra células malignizadas, ya que inducen la apoptosis de las células infectadas o transformadas. Esto lo hacen por medio de receptores activadores e inhibidores que reconocen ligandos propios y ajenos (Medzhitov, 2007; Owen et al., 2013). También pueden eliminar células dendríticas inmaduras, por lo cual también actúan como reguladores de la respuesta inmune (Bostik et al., 2010).

Las células NK cuentan con gránulos citotóxicos; si las células somáticas carecen de MHC clase I en su membrana, serán lisadas. También expresan receptores de la Fc de las inmunoglobulinas, por lo que pueden destruir patógenos cubiertos de anticuerpos (Owen et al., 2013).

## **5. Inmunidad neonatal**

La capacidad de defensa inmune de los organismos varía con la edad, por lo que hay etapas ontogénicas en las que se suele ser menos eficiente en la implementación y mantenimiento de una respuesta inmune, sobre todo las etapas de desarrollo temprano, que van desde la etapa embrionaria, la fase neonatal y la infancia (Dowling y Levy, 2014). Los neonatos y lactantes nacen con un sistema inmune adaptativo inmaduro, y suelen depender más de su sistema inmune innato y de la inmunidad pasiva materna para protegerse contra infecciones a las que se encuentren expuestos (PrabhuDas et al., 2011). Sin embargo, incluso los efectores innatos pueden funcionar de manera subóptima (PrabhuDas et al., 2011; Dowling y Levy, 2014) debido a mecanismos de inmunotolerancia, esencial para permitir que se establezca la microbiota. Por ejemplo, estudios realizados en humanos demuestran que la producción de citoquinas aumenta rápidamente entre el nacimiento y los dos años de edad, y hay mayor producción de interleucina 10 y 17 y de células de ayuda (T<sub>H</sub>17) en respuesta a la estimulación de los TLR por PAMPs, lo que provoca una disminución de la producción de células pro-inflamatorias T<sub>H</sub>1. Las células NK

de los neonatos tampoco funcionan como en etapas adultas, ya que producen pocos gránulos citotóxicos, lo que contribuye a que los infantes sean más susceptibles a infecciones virales (Guilmot et al., 2011). Incluso, el mayor porcentaje de la mortalidad por infecciones a nivel mundial es en niños menores de cinco años, particularmente en individuos que no recibieron leche materna o que no tienen una nutrición adecuada (Carr, 2000; Dowling y Levy, 2014).

Además de la inmadurez fisiológica por el desarrollo, la inmunidad de los neonatos puede ser afectada por diversas condiciones extrínsecas. Por ejemplo, se sabe que la función y producción de los neutrófilos varían considerablemente en los neonatos que han pasado por algún proceso de estrés (Owen et al., 2013). Estudios realizados en roedores neonatos, demostraron que en condiciones de estrés, la actividad de los neutrófilos frente a un desafío bacteriano es más lenta debido a que hay pocos neutrófilos de reserva y pocas poblaciones de células progenitoras de neutrófilos inactivos en la médula ósea (Carr, 2000). En humanos, el estrés también provoca alteraciones en el funcionamiento de la actividad fagocítica de los neutrófilos de neonatos, así como la reducción en la liberación de péptidos antimicrobianos y en la producción de las especies reactivas de oxígeno, alteraciones en la formación de NETs y decremento en la adherencia de los neutrófilos a PAMPs (Dowling y Levy, 2014). Es por esto que la influencia del sistema inmune materno durante la gestación fetal y la colonización microbiana posnatal desempeña un papel fundamental en la inducción, el entrenamiento, mantenimiento y la función del sistema inmune de las crías (Dowling y Levy, 2014).

## 6. Ecoimmunología

La ecoimmunología es una disciplina integrativa que surgió recientemente a raíz de diversas investigaciones que comenzaron a relacionar la importancia de los factores ambientales y evolutivos en el sistema inmune, y a explicar las variaciones entre las respuestas inmunes de los individuos en este contexto (Demas y Nelson, 2011). Uno de los grandes avances de la ecoimmunología fue integrar al sistema inmune como una característica importante en la historia de vida de los individuos, debido a los altos costos, restricciones e interacciones complejas que están implicados en las respuestas inmunes (Downs et al., 2014). Los costos metabólicos que se derivan de la exposición a algún desafío inmune son difíciles de caracterizar (Lochmiller y Deerenberg, 2000). Cuando un organismo se enfrenta con un patógeno, el costo real de la infección no se estima por el daño directo del parásito hacia el hospedero, sino en los costos que se imponen en la activación y el mantenimiento de la respuesta inmune del huésped, y a la pérdida de esos recursos por parte de otros procesos fisiológicos (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Downs et al., 2014). Se ha propuesto que debe haber compensación en la obtención de recursos energéticos, pero no siempre se observa esto, sobre todo en poblaciones silvestres en las cuales el acceso a nutrientes es limitado (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Moret y Schmid-Hempel, 2000). Uno de los principales objetivos de la ecoimmunología es entender los factores intrínsecos y extrínsecos que provocan cambios en la efectividad del sistema inmune y en la susceptibilidad, resistencia, y tolerancia de los organismos (Demas y Nelson, 2011). Esto incluye las variaciones que existen en un contexto ambiental en el cual se encuentran los organismos.

La ecoimmunología está enmarcada en el contexto de la teoría de historia de vida, que se abordó en la primera parte del presente capítulo. A continuación, se presentarán aspectos de la ecoimmunología que son relevantes para la presente tesis.

### **a) Canjes energéticos relacionados con las respuestas inmunes**

El sistema inmune es considerado un carácter de historia de vida, ya que el mantenimiento y la activación de una respuesta inmune contra algún agente patógeno es costosa, por lo que puede competir por recursos contra otras características como la supervivencia y la reproducción (Demas y Nelson 2011; Downs et al., 2014). Se ha propuesto que cuando los organismos enfrentan un desafío inmune, debido a que las respuestas son energéticamente demandantes, esto puede provocar un canje o compensación que afecta directamente otra característica o proceso fisiológico del individuo (Verhulst et al., 1999). En el caso de la reproducción, expresar caracteres sexuales secundarios requiere de una alta inversión de recursos pues son de gran importancia en la elección de pareja y en el éxito reproductivo del individuo que los requiera, sobre todo en especies sexualmente dimórficas (Folstad y Karter, 1922; Verhulst et al., 1999). Sin embargo, estos caracteres se pueden ver comprometidos cuando la distribución de los recursos tiene que ser reasignada para montar y mantener una respuesta inmune (Folstad y Karter, 1922). La longevidad es otro carácter importante que está estrechamente relacionada con la reproducción y el sistema inmune. Estudios realizados en aves de diversas especies demostraron que la variación en la esperanza de vida puede ser un factor para determinar la asignación de recursos entre éstos dos caracteres, debido a que las aves con una esperanza de vida corta invierten menos en su respuesta inmune innata en comparación con aquellas aves que tienen una longevidad mayor, ya que la probabilidad de aparearse después es más alta en comparación con las que viven un periodo corto (Tieleman et al., 2005).

La reproducción suele ser altamente costosa y se sabe que la función del sistema inmune se ve reducida durante la reproducción en diferentes especies debido a que incrementa la demanda por recursos durante el proceso de cortejo, defensa territorial, el embarazo, el cuidado parental, entre otros (Demas et al., 1997; Mauget et al., 1997). Por ejemplo, un estudio demostró modificaciones conductuales y fisiológicas durante la etapa reproductiva en el gorrión *Passer domesticus*, provocadas por la exposición a los lipopolisácaridos (LPS) de *Escherichia coli*. Específicamente, se observaron alteraciones en el éxito



reproductivo y en la masa corporal de los padres, así como alteraciones en la alimentación de las crías (Bonneaud et al., 2003).

Los canjes pueden ser más evidentes cuando los individuos se encuentran en mala condición corporal, o si los recursos son escasos, lo que incrementa la susceptibilidad de los individuos a las enfermedades (Houston et al., 2007). En estas situaciones, la asignación óptima de recursos hacia el sistema inmune disminuye a medida que escasean las reservas energéticas. Como ejemplo, se ha visto que al disminuir las concentraciones de proteína en la dieta de ratones infectados con el nematodo *Trichuris muris*, no hubo alteración en su masa corporal, pero sí en su crecimiento y en su capacidad de eliminar a los nematodos, en contraste con aquellos ratones cuya dieta era alta en proteínas (Michael y Bundy, 1992). Esto también se ha demostrado en estudios realizados con aves (Klasing, 1998), y en invertebrados. Por ejemplo, un estudio con abejorros, *Bombus terrestris*, desafiados con LPS durante un estado de inanición reportó que la supervivencia se redujo significativamente entre un 50 y 70 % con estas condiciones (Moret y Schmid-Hempel, 2000), y se demostró que para las larvas de *Drosophila melanogaster*, montar una respuesta inmune disminuye su adecuación, y altera su crecimiento y desarrollo (Hoang, 2002). En conjunto, los canjes energéticos provocados por algún desafío inmune, pueden tener una connotación importante en su historia de vida.

Para los mamíferos marinos hay poca información respecto a la ontogenia del sistema inmune y los caracteres de historia de vida dentro de un contexto ecológico. Entre los estudios realizados, se han reportado cambios en la respuesta inflamatoria de crías de lobo marino de California, *Zalophus californianus*, durante tres etapas de su desarrollo temprano. La inflamación dependía del contexto de las crías, donde a los dos meses la respuesta era influida por la condición corporal de las crías, mientras que a los cinco meses dependía de la ocurrencia de procesos infecciosos concomitantes (Vera-Massieu et al., 2015). Se propuso que las reservas energéticas de las crías, cuando dependen exclusivamente de la leche materna, son un factor limitante en la respuesta inmune, mientras que las crías de mayor edad, quienes cuentan con un sistema inmune más desarrollado y comienzan a incluir algunas presas

en su dieta, ya se enfrentan a agentes infecciosos y su respuesta inflamatoria se relaciona con estos procesos (Vera-Massieu et al., 2015). Otro estudio realizado en una especie filogenéticamente cercana, el lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, demostró que el estrés de origen antrópico impacta el funcionamiento de diversos efectores inmunes (Brock et al., 2013).

El cuidado parental y la lactancia son otros caracteres de la historia de vida de los individuos y son de gran importancia para el funcionamiento del sistema inmune de las crías. Existe gran variación en las estrategias de cuidado parental y lactancia, siendo larga para algunas especies y extremadamente corta para otras. En los pinnípedos fócidos la lactancia suele ser más corta que en los pinnípedos otáridos; lo que supone presiones selectivas diferentes para ambas familias. Un estudio realizado durante la lactancia de focas de puerto, *Phoca vitulina*, adultas y crías demostró que la función de los linfocitos y los niveles del anticuerpo IgG de y los efectos parecen provocados por el estrés al que están sometidas y a los cambios hormonales asociados a la lactancia y al estro, mientras que en las crías, la funcionalidad de los linfocitos y los niveles de IgG son inferiores al nacer y más altos al final de la lactancia, lo que implica diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades cuando se requiere la inversión de recursos en otras funciones de acuerdo al contexto en el cual se encuentren los organismos (Ross et al., 1993).

## **b) Dimorfismo sexual en las respuestas inmunes**

Se sabe que en algunas especies existen diferencias en las respuestas inmunes entre sexos. Una explicación es la que propone la hipótesis de la desventaja en la inmunocompetencia (ICHH, por sus siglas en inglés). Esta hipótesis describe que la expresión de caracteres sexuales secundarios impacta a la competencia del sistema inmune. Este efecto está mediado por andrógenos que tienen un efecto de inmunosupresión (Folstad y Karter, 1992). Sin embargo, el efecto también puede deberse a la reasignación de los recursos energéticos, sobre todo en aquellos casos en que se ha demostrado una inmunosupresión en los machos sin la intervención de hormonas sexuales (Folstad y Karter, 1992). Otra opción de control endócrino son los glucocorticoides, las hormonas secretadas en

respuesta al estrés (Roberts et al., 2004). La ICHH sirve de marco para entender las señales honestas de caracteres sexuales secundarios bajo selección sexual. Por ejemplo, la golondrina común *Hirundo rustica*, se caracteriza porque los machos tienen las plumas de la cola muy largas, y este ornamento está bajo selección sexual, ya que las hembras tienen preferencia por aquellos machos con colas largas (Saino y Møller, 1996). De ser una señal honesta, la cola larga indicaría que se trata de un “buen macho”, ya que solamente los machos de buena calidad podrían darse el lujo de invertir en ambos procesos fisiológicos y resistir la presión de los patógenos (Hamilton y Zuk, 1982; Møller y Alatalo, 1999). Sin embargo, también puede haber señales deshonestas. Por ejemplo, se demostró que frente a un desafío inmune con glóbulos rojos de cordero los machos que poseen una cola más larga tienen niveles bajos de gamma globulina en comparación con los machos que tenían la cola más corta, lo que sugiere que el tamaño de la cola como carácter sexual impone un compromiso entre reproducción y el sistema inmune de estas aves, tal y como sugiere la ICHH. Otros estudios, sin embargo, no han encontrado evidencia que sustente esta hipótesis, particularmente en especies en las que el dimorfismo sexual no es tan evidente (Nowak et al., 2018).

### **c) Efecto del estrés sobre las respuestas inmunes**

El estrés es un proceso fisiológico caracterizado por alteraciones en la homeostasis que, de no ser resueltas en un tiempo corto, pueden alterar el funcionamiento del sistema inmune (Black, 2002; Segerstrom y Miller, 2004). Existen dos tipos de estrés; el agudo que es una respuesta benéfica debido a que proporciona a los individuos mecanismos de protección frente a un entorno adverso, y el crónico. Este último puede provocar alteraciones y daños perjudiciales en la salud (Vitlic et al., 2014).

Durante el estrés se activan dos ejes, el Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), y el circuito simpático-medular (SAM). La activación del eje HPA induce la secreción de hormona corticotropina (CRH), que a su vez estimula a la hormona adenocorticotrópica (ACTH) y ésta a su vez estimula a las glándulas suprarrenales que son las encargadas de secretar glucocorticoides, como el cortisol (Vitlic et al., 2014). Por otro lado, el circuito SAM estimula la síntesis y liberación de catecolaminas como la adrenalina y la noradrenalina por parte de la médula de la glándula adrenal (Vitlic et al., 2014). Hay evidencia de que la síntesis prolongada de glucocorticoides puede suprimir al sistema inmune – en particular, las respuestas pro-inflamatorias – y provocar alteraciones en sus efectores (Sorrells y Sapolsky, 2007). Al contrario, el estrés agudo no provoca inmunosupresión, sino una activación del sistema inmune (Viswanathan y Dhabhar, 2005; Vitlic et al., 2014).

Al reducir las respuestas pro-inflamatorias, el estrés crónico puede incrementar la severidad de las enfermedades infecciosas y la ocurrencia de transformaciones neoplásicas. Sin embargo, también puede exacerbar enfermedades alérgicas y autoinmunes (Segerstrom y Miller, 2004). Una posible explicación de este efecto dual es que el estrés crónico provoca cambios en las células Th al alterar la expresión de las citoquinas que producen y por eso puede desencadenar un efecto inmunosupresor o uno inmunoinductor. Existe evidencia experimental de estos efectos. Por ejemplo, se demostró un aumento en los leucocitos totales circulantes en ratones bajo estrés crónico en comparación con el grupo control (Viswanathan y Dhabhar, 2005), y otro estudio realizado en humanos demostró que durante eventos de estrés sostenido hubo una disminución en la producción del interferón gama (IFN- $\gamma$ ) y un aumento en los niveles de IL-10 (Marshall et al., 1998).

## **7. El modelo de estudio: el elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*)**

El elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, se distribuye en el hemisferio norte, desde la costa de Baja California, México, hasta el oeste de las islas Aleutianas en Alaska, sus territorios reproductivos abarcan las islas y penínsulas de California, EE.UU, y Baja California, México (Elorriaga-Verplancken, 2015; Le Boeuf y Laws, 1994).

A principios de 1800 y hasta finales de 1860 el elefante marino del Norte era cazado para la recolección de grasa, lo cual provocó que hacia finales de 1870 la especie fuera considerada en peligro de extinción (Bartholomew y Hubbs, 1960). Con base en esto, los gobiernos de México y de los Estados Unidos de Norteamérica tomaron medidas para proteger y conservar la especie. Estas medidas han tenido gran éxito en la recuperación: en el 2014 se reportó la existencia de cerca de 21 colonias en México y en el Sur de California, con una población entre 210,000–239,000 individuos (Elorriaga-Verplancken, 2015; Lowry, 2014; Spraker et al., 2014).

Después del elefante marino del sur, *Mirounga leonina*, del hemisferio sur el elefante marino del Norte es la segunda especie más grande del orden Pinnípeda. La especie presenta un marcado dimorfismo sexual en el tamaño corporal y en los caracteres sexuales secundarios, ya que los machos adultos son más grandes (5.03 a 6.71 m con un peso aproximado de 2,300 kg) que las hembras adultas (2.65 a 2.82 m con un peso entre 360 y 710 Kg), tienen una probóscide nasal y piel gruesa rojiza y rugosa en la parte inferior y lateral del cuello (Fig. 5) (Le Boeuf y Laws, 1994).



**Figura 5.** Elefante marino adulto. Se puede observar su probóscide y la piel arrugada y más gruesa del cuello.

Como se comentaba anteriormente, en las especies sexualmente dimórficas los caracteres secundarios que presentan los machos se consideran indicadores de la cantidad de recursos disponibles, así como la aportación de “buenos genes” que pueden garantizar la supervivencia de la descendencia (Møller y Alatalo, 1999). Se ha demostrado que las hembras eligen a los machos de acuerdo a los indicadores honestos de su calidad (Gao et al., 2016; Kutzer y Armitage, 2016; Neff y Pitcher, 2005). Es por ello que los machos de muchas especies se ven sometidos a la competencia entre machos para poder tener mayor éxito reproductivo. Las dos especies de elefante marino son un claro ejemplo de especies sujetas a una alta competencia reproductiva, ya que además de su marcado dimorfismo sexual y apareamiento poligínico, los machos tienen un comportamiento agresivo con fuertes peleas con las que establecen su jerarquía social y dominancia sobre las hembras (*Lindenfors et al., 2002*).

Para el elefante marino del Norte hay cinco categorías de machos: machos adultos (8 a 12 años), machos sub adultos 1 (4 años), machos sub adultos 2 (5 años), machos sub adultos 3 (6 años) y machos sub adultos 4 (7 años) (Le Boeuf y Law, 1994). Los machos adultos llegan a las playas a principios de diciembre y compiten con otros machos poder establecer su territorio. Cuando un macho domina a otro, el macho dominado mantiene una distancia de 5 a 7 m y esta jerarquía se mantiene hasta mediados de marzo. Cuando arriban las hembras a las playas, los machos las mantienen en su territorio durante toda la etapa de reproducción, que continúa hasta mediados de marzo (Le boeuf, 1972). Las hembras se agregan y en conjunto con el macho alfa o macho dominante forman un harén, sin embargo entre mayor sea la población de hembras, los machos subordinados y machos sub-adultos comienzan a aproximarse y en ocasiones logran introducirse al territorio y aparearse con algunas hembras, sobre todo con aquellas que se encuentran en la periferia del harén (Le Boeuf, 1972; Le Boeuf y Law, 1994), como se puede observar en la Fig. 6. Un harén puede estar formado por alrededor de 100 hembras o más. Cuando se establece la jerarquía, el macho alfa mantiene alejado a los subordinados por medio de vocalizaciones que realiza con la cabeza y cuello elevados con el apoyo de sus antebrazos (Le Boeuf y Law, 1994). Estas vocalizaciones son señales de advertencia y mantienen alejados a los machos intrusos.



**Figura 6.** Harén en el cual se puede observar la presencia de dos machos, uno cerca del agua y el otro en la periferia del harén.

El ayuno estacional es una característica importante de la historia de vida de los elefantes marinos. Al ayunar los machos maximizan la preservación de sus genes a través de las generaciones, ya que si se alejaran del harén para alimentarse, otros machos tendrían la oportunidad de aparearse con las hembras, así que un macho alfa depende de su capacidad de permanencia en tierra por hasta 100 días sin alimentarse (Emlen y Lewis, 1977). Por otra parte, las hembras logran transmitir a las crías una gran cantidad de energía por medio de la leche en muy poco tiempo, sin que requieren dejar a su cría en la playa para buscar alimento, en contraste con los otáridos. Esto les da la ventaja de librarse en un corto plazo de la cría y prepararse para futuros descendientes (Emlen y Lewis, 1977; Le Boeuf y Law, 1994; Reiter et al., 1978).



Las hembras gestan por primera vez entre los 3 y 6 años de edad y a partir de este momento tienen una cría anual hasta su muerte, con una longevidad promedio de aproximadamente 20 años. En contraste, los machos comienzan su etapa reproductiva entre los 8 y 12 años de edad, con una esperanza de vida de 13 a 14 años. Se sabe que las hembras que se reproducen por primera vez entre los 4 y los 5 años de edad tienen mayor éxito reproductivo en comparación con las hembras primíparas de 3 años (Le Boeuf y Law, 1994). Sin embargo, no parece haber diferencias en crías de hembras primíparas (4 y 5 años) y crías de mamás con mayor edad (Huber, 1987). Por otro lado, otros estudios han demostrado que la experiencia materna, independientemente de la edad, puede ser un factor que determine la supervivencia de las crías (Riedman y Le Boeuf, 1982).

Las colonias reproductivas suelen estar en zonas aisladas, se caracterizan por ser playas planas, con pendientes graduales o en forma de relieve (Le Boeuf y Law, 1994). Los elefantes marinos del Norte suelen preferir sustratos arenosos y éstas playas son las que suelen habitarse primero y las que presentan mayor demanda en las etapas de pre-reproducción o muda. Los animales de menor dominancia empiezan a utilizar las playas que contienen canto rodado y al final, las playas rocosas. Los elefantes marinos del Norte suelen buscar humedad para termoregular, por lo que el sustrato de arena y canto rodado es de mucha utilidad para que los animales adultos y las crías arrojen sobre su espalda arena y rocas pequeñas para refrescarse en los días calurosos. Además, las playas de arenas favorecen su desplazamiento (Le Boeuf y Law, 1994). La especie realiza dos migraciones anuales que varían de acuerdo al sexo y la edad (Elorriaga-Verplancken, 2015).

Las hembras que arriban a las islas a mediados de diciembre están preñadas y, en promedio, en 6 días dan a luz a una cría (Fig. 7). Después de que las crías son destetadas (lo que ocurre aproximadamente 28 días después de haber nacido) las hembras regresan al mar por un periodo de 70 días para alimentarse, antes de regresar a tierra durante un mes para mudar su pelaje. Una vez completada la muda, regresan al mar donde permanecen hasta por ocho meses previo a regresar a las playas para volver a dar a luz a las nuevas crías.

Los machos permanecen hasta cuatro meses en el mar después del periodo de reproducción, y regresan a tierra durante un mes en verano para mudar el pelaje antes de regresar al mar durante cuatro meses previos al inicio de la temporada de apareamiento (Le Boeuf y Law, 1994).

La filopatría no es tan marcada en esta especie como en otros pinnípedos. Sin embargo, cerca del 71% de las hembras que nacieron en la Isla de Año Nuevo en 1970, regresaron a dar a luz a su primera cría en la misma colonia en la cual habían nacido. Cuando no logran establecerse en los lugares de nacimiento, buscan territorios aledaños a su colonia de origen (Reiter et al., 1981). Esto generalmente es provocado por el incremento de la densidad poblacional, ya que las hembras buscan proteger a sus crías de aplastamiento por parte de machos o inclusive de daños físicos provocados por mordeduras de otras hembras (Reiter et al., 1981).



**Figura 7.** Hembra y cría de elefante marino del Norte. La cría tiene aproximadamente tres días de vida.

Las crías del elefante marino comienzan a meterse al agua dos semanas después de haber sido destetados, esta interacción les permite aprender a nadar y a bucear en aguas poco profundas que suelen estar cerca de la colonia en la cual nacieron (Le Boeuf y Law, 1994; Riedman y Le Boeuf, 1982). Permanecen en tierra hasta que alcanzan los 3 meses y medio, momento en el que abandonan la colonia. En otoño aproximadamente 4 o 5 meses después de su primer viaje al mar, regresan a tierra por un mes y retornan al mar por otros 4 o 5 meses. Ambos sexos realizan dos viajes al mar por año hasta que llegan a la pubertad. Al alcanzar la edad reproductiva, los machos ya no regresan en otoño y permanecen en el mar por aproximadamente 11 meses, después de ello el comportamiento de macho adulto es adquirido y su duración en el mar disminuye a 8 meses (Le Boeuf y Law, 1994; Riedman y Le Boeuf, 1982).

Las crías al nacer pesan en promedio de 30 a 42 kg y miden aproximadamente 1.25 m. Después del destete las crías pesan hasta 127.3 + 15.9 kg (Ver Figura 8) (Rea y Costa, 1992). Comparativamente, son más grandes que las crías del elefante marino del sur (121 kg), lo que se debe a la duración de la etapa de lactancia, que es mayor en crías del elefante marino del Norte: 28 días en comparación con los 23 días del elefante marino del Sur (Le Boeuf y Law, 1994).

El traumatismo provocado por aplastamiento de machos adultos es una de las principales causas de muerte de las crías, seguido por inanición ocasionado por un mal cuidado materno durante el periodo de lactancia, y finalmente, las infecciones y anomalías congénitas (Spraker et al., 2014). En el caso de enfermedades infecciosas se ha reportado la presencia de diferentes bacterias en crías como *E. coli*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (Spraker et al., 2014).



**Figura 8.** Cría del elefante marino del Norte recién destetada.

El cuidado parental de los mamíferos varía en términos de inversión y tiempo (Reiter et al., 1978). Sin embargo, se sabe que la mayoría de las especies presentan una transición gradual entre la dependencia alimenticia y la protección por parte de los padres, y es común que continúe la inversión parental en las crías después de que se da el destete hasta la etapa juvenil. Esto se ha reportado para roedores, rumiantes, carnívoros y primates (Reiter et al., 1978). No obstante, existe el extremo opuesto, en el cual no se proporciona ninguna inversión parental después de la etapa de lactancia, como es el caso del elefante marino del Norte, el elefante marino del Sur y la foca gris *Halichoerus grypus* (Anderson et al., 1975; Laws, 1956; Le Boeuf et al., 2000) en los cuales la transición es abrupta, y posterior a éste el cuidado parental desaparece por completo. En estas especies, la supervivencia y la obtención del alimento post-destete dependerá completamente de las crías, por lo que las crías experimentan una situación de estrés constante y han tenido que desarrollar diferentes estrategias que les permiten mantenerse con vida y aprovechar al máximo la lactancia.

Las estrategias de las crías suelen ser diferentes entre machos y hembras. Por ejemplo, el robo de leche de crías destetadas hacia otras hembras adultas que aún están amamantando a su cría es mayor en los machos que en las hembras (Reiter et al., 1978).

El periodo posterior al cese del cuidado materno es un punto crítico para la supervivencia de las crías, ya que son vulnerables a depredadores, cambios ambientales y exposición a patógenos; además, los nutrientes con los que cuentan son limitados (Reiter et al., 1978). También se ha reportado que las crías nacidas de madres con experiencia tienen mayor probabilidad de sobrevivir que aquellas crías de madres primerizas (Riedman y Le Boeuf, 1982). Es por estos factores que las crías se ven sometidas a una fuerte presión de selección durante este periodo de ayuno prolongado (Champagne et al., 2012).

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la información que se tiene sobre enfermedades en poblaciones naturales es escasa (Thompson et al., 2010). Se han realizado diversos estudios que tratan de entender los factores que afectan la respuesta inmune en poblaciones naturales, así como los costos que provoca la interacción parásito hospedero y la implementación de respuestas inmunes (Brock et al., 2013; Vera-Massieu et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios sobre los factores que limitan las respuestas inmunes en una especie caracterizada por un periodo corto de lactancia e inversión parental, como es el caso del elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*). Mucho menos se ha explorado esta relación en un contexto ecológico.

## HIPÓTESIS

### Hipótesis 1

El destete de las crías repercute en su respuesta inmune.

**Predicción:** Las crías recién destetadas tendrán mejor respuesta inmune que las crías en etapa de destete tardío.

### Hipótesis 2

La disponibilidad de recursos energéticos afecta la respuesta inmune innata de las crías.

**Predicción:** La respuesta inmune innata de las crías será mayor en las crías que tengan más recursos energéticos.

### Hipótesis 3

La respuesta inmune innata de las crías es diferente entre sexos.

**Predicción:** Los machos tendrán mejor respuesta inmune innata que las hembras

### Hipótesis 4

El estado de salud de las crías afecta la respuesta inmune innata inducida.

**Predicción:** La respuesta inmune innata de las crías enfermas, con heridas o con inflamación será menor que la de las crías sanas.

### Hipótesis 5

La densidad poblacional y tipo de territorio afecta la respuesta inmune innata de las crías.

**Predicción:** La respuesta inmune innata de las crías que nacen en territorios con densidad poblacional alta es menor que la observada en territorios de baja densidad poblacional si una mayor densidad poblacional ocasiona estrés en las crías.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Explorar los factores que influyen en la variación de la respuesta inmune de crías del elefante marino del Norte.

### **Objetivos específicos**

Determinar si la respuesta inmunológica varía de acuerdo a la etapa del desarrollo temprano de las crías del elefante marino.

Determinar si los recursos energéticos influyen en la eficiencia y la magnitud de las respuestas inmunológicas en las crías de elefante marino.

Esclarecer si existe variación de las respuestas inmunológica entre sexos en las crías del elefante marino.

Explorar la relevancia del territorio en el cual nacieron las crías en las respuestas del sistema inmunitario de las crías del elefante marino

Examinar la importancia de la densidad poblacional, como indicador indirecto de estrés, en las respuestas inmunológica de las crías del elefante marino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **a) Sitio de muestreo**

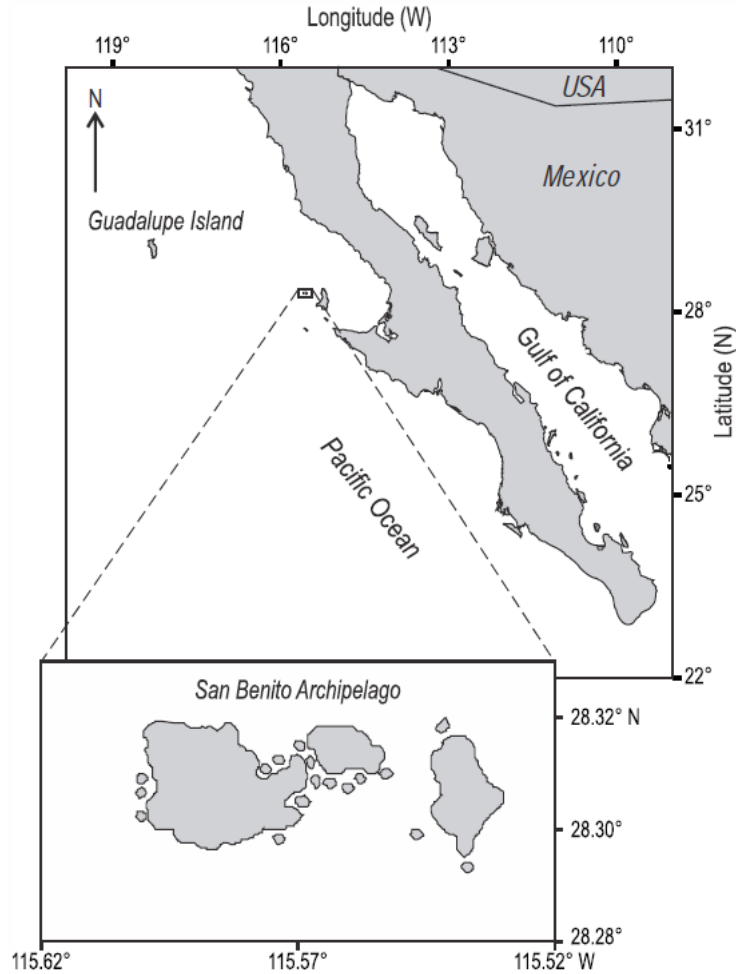
Este estudio se llevó a cabo en el archipiélago de San Benito. Este sitio se encuentra a 140 kilómetros al Oeste de la península de Baja California y se compone por tres islas; la isla del Oeste formada por 386 hectáreas, la isla Medio con 44 hectáreas y la isla del Este con 142 hectáreas (Fig. 9), con una altitud máxima de 1204 m sobre el nivel del mar.

El Archipiélago de San Benito tiene un clima árido con lluvias predominantes en invierno, su vegetación es escasa y está compuesta por matorral desértico. Cuenta con 53 especies de plantas de las cuales tres son endémicas y seis insulares. Es considerado el sitio de con mayor abundancia de aves marinas en todo el Pacífico oriental debido a que llegan a anidar anualmente más de dos millones de aves marinas de trece diferentes especies (DOF: 07/12/2016). También habita una especie de reptil y en sus alrededores habitan especies marinas de gran interés comercial como el abulón azul, *Haliotis fulgens*, y la langosta roja, *Panulirus interruptus*. Estos se encuentran bajo concesión exclusiva desde hace más de 70 años por la cooperativa pesquera Pescadores Nacionales de Abulón (PNA).

El archipiélago de San Benito también es de gran importancia para los pinnípedos de México. Esto es porque es el único lugar en el cual coexisten cuatro especies de pinnípedos; el elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*; la foca común, *Phoca vitulina*; el lobo marino de California, *Zalophus californianus*; y el lobo fino de Guadalupe, *Arctocephalus philippii townsendi* (Elorriaga-Verplancken, 2015).

Las islas que conforman al archipiélago se encuentran dentro de una Reserva de la Biosfera en la región conocida como Islas del Pacífico de la Península de Baja California, decretado en el 2016 (DOF: 07/12/2016).





**Figura 9.** Mapa del archipiélago de San. Benito. Se conforma de tres islas volcánicas: San Benito Oeste, San Benito Medio y San Benito Este. Imagen tomada de (Elorriaga-Verplancken, 2015).

### ***b) Marcaje de animales***

Durante la primera semana del trabajo de campo, diariamente, entre las 6:00 y las 18:00 horas, se visitaron las colonias y se realizaron observaciones de las hembras adultas y de las crías. Se llevaron registros sobre la presencia de crías y ubicaciones en la colonia. Se marcaron con peróxido de hidrógeno a todas las crías que se encontraban con sus madres. Para esto se utilizaba un palo que permitiera acercarse a su lomo. La marca tenía como finalidad que se pudiera revisar, cada día, si las crías seguían con sus madres. En el momento en que ya no estaba presente la madre, la cría era considerada recién destetada. En ese momento, cada cría era capturada y contenida de manera manual para realizar la toma de datos morfométricos y muestras biológicas.

### **c) Colecta de datos morfométricos**

Se capturaron 40 crías del elefante marino del Norte durante dos etapas del desarrollo temprano (recién destetadas y a los 34 días, antes de la primera muda de piel) en seis territorios de apareamiento en el archipiélago de San Benito, Baja California (28.30°N, 115.56°W) durante la temporada reproductiva de 2017. Para cada territorio se registró el tipo de sustrato y la orientación.

Para cada cría se registró el sexo, y se colocaron aretes de plástico que tenían una identificación numérica única en cada aleta posterior. Se pintó el mismo número en el lomo de la cría con peróxido de hidrógeno. En cada muestreo se tomaron medidas de longitud estándar y diámetro axilar. Debido al tamaño de las crías y a las condiciones del muestreo, no fue posible pesarlas. Sin embargo, se obtuvieron dos medidas del grosor de la capa de grasa (a nivel umbilical lateral y a nivel caudal dorsal; todas se tomaron por triplicado). También se tomaron fotografías laterales de cada individuo a una distancia conocida, con el fin de poder obtener la masa corporal de cada cría con el uso de fotogrametría (ver sección g).

La condición corporal se determinó con base en la relación escalar entre la masa corporal y la longitud total de las crías de acuerdo con Peig y Green (2009), el índice de masa escalada de la condición corporal ( $M_i^*$ ) se puede calcular con la siguiente expresión:

$$M_i^* = M_i \left[ \frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{SMA}} \quad (1)$$

donde  $M_i$  y  $L_i$  son la masa corporal y la longitud medida en cada individuo  $i$  respectivamente,  $b_{SMA}$  es el exponente escalado estimado con la regresión de la estandarización del eje mayor (SMA por sus siglas en inglés) de  $M$  en  $L$ ;  $L_0$  es un valor arbitrario de  $L$  (p.e. se puede tomar la media aritmética de la

población estudiada); y  $M_i^*$  es la masa corporal predicha del individuo  $i$  cuando la longitud medida es estandarizada a  $L_0$ .

El exponente escalado  $b_{SMA}$  puede calcularse indirectamente si se divide la pendiente obtenida de la regresión ordinada de mínimos cuadrados (OLS por sus siglas en inglés) entre el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) (LaBarbera, 1989), o de manera directa si se usa el software propuesto por Bohonak y Van der Linde (2004).

### ***c) Colecta de muestras biológicas***

Con base en protocolos establecidos (Bossart et al., 2001) de cada cría se tomaron tres muestras de sangre de la vena intervertebral extradural con un equipo de vacío Vacutainer. La primera muestra de sangre (7 ml), se colectó en un tubo con heparina sódica y fue centrifugada de inmediato en una centrífuga clínica a 3,200 rpm durante 15 minutos para separar a los leucocitos mismos que fueron transferidos a un criotubo con solución amortiguadora de ARN, RNAlater (Sigma-Aldrich, Mexico), con una proporción de 1:5.

La segunda muestra de sangre (7-10 ml) se colectó en tubos sin anticoagulante y se dejó coagular en posición vertical, por al menos 30 minutos, en una hielera a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 3,200 rpm durante 15 minutos para la separación del suero, que fue almacenado en criotubos y colocado en un criocontenedor con nitrógeno líquido.

La tercera muestra se colectó en tubos que contenían ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) para determinar el número de leucocitos totales, el hematocrito y realizar frotis sanguíneos.

De cada cría se colectó una vibrisa con unas pinzas de hierro en ambas etapas del muestreo y se guardaron en sobres de papel Kraft, para su posterior análisis. En colaboración con el Dr. Fernando Elorriaga Verplancken (CICIMAR-IPN, Departamento de Pesquerías y Biología Marina), se contó con información sobre los niveles isotópicos de  $\delta^{15}N$  de las crías. Para esto, se analizó el segmento más próximo al folículo, correspondiente a las dos etapas del muestreo (recién destetadas y post-destetadas).

#### ***d) Observaciones conductuales***

Todos los días, entre las 9:00 y las 18:00 horas se visitaron los territorios reproductivos y se realizaron observaciones de las hembras adultas, machos adultos y las crías. Se llevaron registros sobre la presencia de crías y ubicaciones en cada territorio. Además, se realizaron observaciones focales de las 40 crías durante 21 días, y se contó el total de machos adultos, hembras adultas, hembras con cría, crías y crías muertas de cada territorio. Para fines de la tesis, se consideró como indicador de estrés la densidad poblacional de cada territorio (Le Boeuf et al., 2000). Originalmente se pensaba incluir datos sobre la agresión entre crías, así como las mordeduras que pudieron recibir las crías por parte de las hembras adultas cercanas, ya que se ha reportado que estos factores también influyen en el estrés, la supervivencia y el descenso de las crías (Le Boeuf et al., 2000). Sin embargo, debido a que no se observó ninguna interacción agresiva, estos datos ya no se incluyeron como indicadores de estrés.

#### ***e) Respuestas inmunes innatas***

##### ***Desafío in vivo con fitohemaglutinina (PHA)***

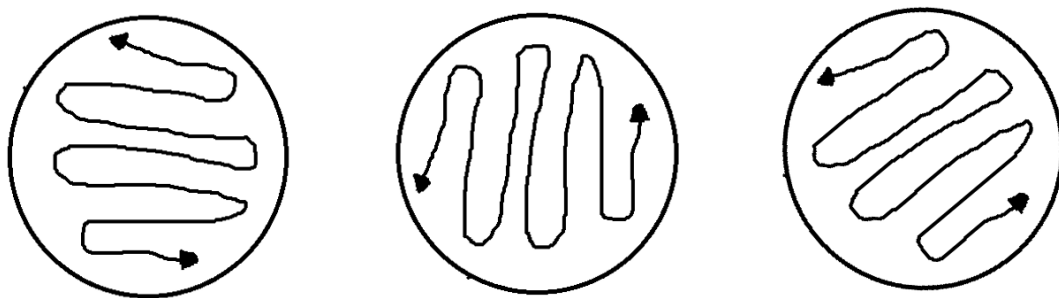
Con el fin de medir la respuesta inflamatoria inespecífica, en dos ocasiones (al momento del destete y 34 días post-destete) las crías fueron desafiadas con fitohemaglutinina (PHA), conforme a protocolos previamente descritos para pinnípedos (Brock et al., 2013; Vera-Massieu et al., 2015). Este proceso consistió en medir por triplicado el grosor de la membrana interdigital entre el segundo y tercer dedo, mediante el uso de un vernier (Mitutoyo EUA, precisión 0.01 mm), antes de administrar por medio de una inyección intradérmica 50 µl de PHA (1mg/ml), en la aleta derecha. Como control negativo, fue administrado el mismo volumen de solución salina estéril en la misma zona de la aleta izquierda. De 18 a 24 horas después del desafío se volvieron a capturar las crías y se determinó la respuesta al PHA como el grosor de la aleta derecha restándole el grosor de la aleta izquierda, como se puede ver en la siguiente fórmula:

$$CMI = (ALD_{post} - ALD_{pre}) - (ALI_{post} - ALI_{pre}) \quad (2)$$

donde  $ALD_{post}$  es la aleta derecha a las 24 horas de la inoculación con PHA;  $ALD_{pre}$  es la aleta derecha a las 0 horas de la inoculación con PHA;  $ALI_{post}$  es la aleta izquierda a las 24 horas de la inoculación con solución salina y  $ALI_{pre}$  es la aleta izquierda a las 0 horas de la inoculación con solución salina.

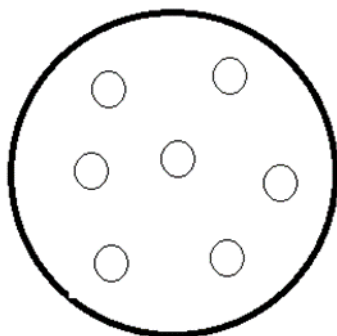
### ***Inhibición ex vivo del crecimiento bacteriano por acción del complemento***

A partir de un cultivo puro de las cepas de *Escherichia coli* (Topo 10, Invitrogen) *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) y *Candida albicans*, se tomó una colonia de bacterias con un asa bacteriológica y se re-suspendió en un tubo Falcon con 10 ml de medio LB. El asa bacteriológica se giró en ambos sentidos para ayudar al desprendimiento de las bacterias en el medio. Los tubos se incubaron a 37°C en agitación constante (250 rpm) durante un periodo de 24 horas. Posteriormente se midió 1 ml del cultivo en el espectrofotómetro para verificar que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 1. Con una micropipeta de 1000 µl se tomaron 200 µl del cultivo previo y se vertió en una placa Petri, se pasó el hisopo en la superficie de la placa como se muestra en la Fig. 10. Al final se pasó el hisopo por el borde de la caja para que hubiera un recubrimiento total de la bacteria.



**Figura 10.** Inoculación bacteriana en la caja de Petri con LB sólido.

Se colocaron los discos del papel filtro estéril sobre la superficie del agar por medio del uso de unas pinzas estériles. Se oprimió ligeramente el disco sobre la superficie del agar, y se agregó 10 µl de suero de cinco diferentes crías, en el sexto papel filtro como control negativo se agregaron 10 µl de solución salina estéril, todo esto por duplicado. Los discos no se colocaron a menos de 15 mm de los bordes de las placas (Fig. 11) y se colocaron seis discos como máximo por caja.



**Figura 11.** Forma correcta de colocar los discos en la caja Petri.

Las placas se incubaron en posición invertida a 37°C por 24 horas. Se tomaron fotografías de los halos de inhibición y se midieron en el programa ImageJ. Este protocolo es una modificación del método de Kirby Bauer (Bauer et al., 1966).

#### ***f) Análisis de indicadores de salud e inflamación de las crías***

En el campo se determinó el total de leucocitos circulantes a partir de las muestras de sangre colectadas con EDTA. Se diluyeron 50 µl de sangre en 950 µl de solución Turk, y después de una incubación por 10 minutos se utilizó una cámara de Neubauer para determinar el número total de leucocitos. Por cada muestra de sangre se realizarán tres frotis sanguíneos, que fueron fijados con etanol al 90% durante 10 minutos, secados a temperatura ambiente y almacenados en cajas para protegerlos de la luz. Una vez en el laboratorio se tiñeron los frotis sanguíneos con un hemocolorante rápido (HYCEL N° 548) para distinguir las diferentes células blancas y realizar el conteo de cada tipo. Se determinaron los conteos totales y diferenciales de los leucocitos de acuerdo a protocolos establecidos (Dierauf y Gulland, 2001; Vera-Massieu et al., 2015).

A partir de estos datos se determinó el perfil de salud de cada cría, se identificaron tres condiciones: Las crías sanas, que no se encontraron fuera de los rangos establecidos en los conteos de células blancas (Yochem et al., 2008), las crías con infecciones agudas o abscesos (IAA), que presentaron niveles de neutrófilos elevados (neutrófilia); y crías con infecciones por microparásitos como bacterias o virus (IPM), quienes presentaban niveles altos de leucocitos, linfocitos, monocitos (leucofilia, linfocitosis, monocitosis) (ver Anexo IV).

En el laboratorio se utilizaron alícuotas del suero para determinar niveles de hierro. Esto se realizó en colaboración con la Dra. Olga Patricia García Obregón del Laboratorio de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, mediante el kit comercial Iron Ferrozine (FEFR-0600; ELITech Clinical Systems, EEUUA). Se consideró el hierro sérico como un indicador indirecto de la inflamación, debido a que existe evidencia de una estrecha relación entre alteraciones en los niveles de hierro y la respuesta inflamatoria (Cherayil, 2015).

#### ***f) Análisis de indicadores de reservas energéticas de las crías***

Se determinaron varios indicadores de reservas energéticas. Cuatro de ellos fueron la masa, la condición corporal (masa escalar), grosor de la capa de grasa y la señal isotópica  $\delta^{15}\text{N}$ . Además, se determinaron otros dos indicadores de las reservas energéticas: la gravedad específica del plasma, que refleja la cantidad de proteínas presentes en la misma (Addis, 1948), y la concentración sérica de glucosa (Champagne, 2005) .

En el campo los tubos de sangre colectados con EDTA fueron centrifugado a 3,200 rpm durante 15 minutos y se utilizó un refractómetro clínico para medir la gravedad específica en una gota de plasma. Los niveles de glucosa se determinaron en el laboratorio de Nutrición humana, en colaboración con la Dra. Olga García Obregón. Para su cálculo se utilizó un kit de Glucosa (1001190; Spinreact, EEUUA).

### **g) Estimación de la masa mediante variables morfométricas y fotogramétricas**

En los estudios de campo, obtener las medidas directas de la longitud del cuerpo y zonas en específico, así como la masa, es una tarea difícil de lograr debido al tamaño y fuerza de los animales de vida silvestre que se están estudiando. Por otra parte, el uso de anestesia no siempre es una técnica viable, ya que puede causar estrés, lesiones e incluso provocar la muerte de los animales (McDonell, 1972). Además, el uso de la anestesia se vuelve complicado cuando se trabaja con un gran número de animales, o cuando el tiempo de manejo es largo (Meise et al., 2014), lo cual puede provocar efectos negativos tanto para los animales como para la toma de muestra. De acuerdo con estudios recientes, la fotogrametría es considerada como una nueva herramienta para obtener estimaciones de tamaño y masa de manera indirecta. Por ejemplo, Bell et al., (1997) obtuvieron la masa corporal del elefante marino del Sur a partir de técnicas fotogramétricas y algunas medidas morfométricas, McFadden et al., (2006) estimaron el tamaño y la masa de la foca monje de Hawái, *Neomonachus schauinslandi*, con una técnica fotogramétrica; Webster et al., (2010) estudiaron las medidas del delfín de Héctor, *Cephalorhynchus hectori* con una técnica fotogramétrica laser; y Meise et al., (2014) trabajaron con una técnica fotogramétrica para obtener las dimensiones corporales del lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, entre muchos otros ejemplos que se pueden mencionar. En general, las técnicas fotogramétricas tienen dos enfoques: aquellas donde se utiliza una cámara estereoscópica y aquellas en donde se usa una cámara simple. En la primera es necesario tomar varias fotos para crear el modelo en tres dimensiones (3D) del animal (Bruyn et al., 2009), mientras que en la segunda sólo es necesario una fotografía, ya que el animal se escala de manera proporcional a un objeto de longitud conocida o una medida propia del modelo de estudio (Willisch et al., 2013). No obstante, que se ha avanzado en estas técnicas fotogramétricas, la eficiencia está en función del cuidado que se tiene al tomar la fotografía: el ángulo de disparo, la distancia, así como si el animal a analizar está colocado en la posición correcta (Willisch et al., 2013).

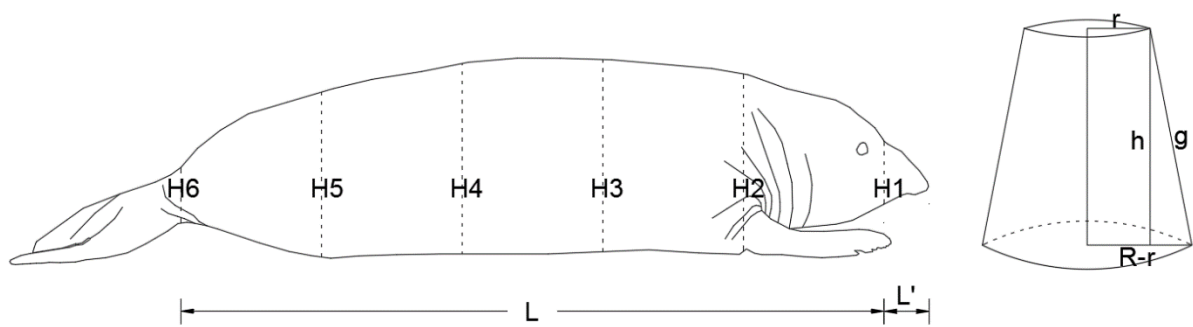


Se tomaron una serie de fotografías laterales (Ver ejemplo en Fig. 12) de cada una de las crías del elefante marino del Norte con una cámara Nikon Coolpix P900, la cual tiene un zoom óptico de 83x (equivalente a 2000 mm) y una resolución de 16 MP.



**Figura 12.** Ejemplo de fotografía útil para el análisis fotogramétrico de una cría de elefante marino del Norte.

Para obtener el volumen de la cría, ésta se dividió en seis zonas (Fig. 13), de la cual se utilizó la medida obtenida en campo de la longitud total de las crías (L). Las medidas de los diámetros H1 a H6 se obtuvieron de manera digital, importando las imágenes a un programa comercial de diseño asistido por computadora, CAD por sus siglas en inglés (AutoCAD 2018). Las líneas del contorno de la imagen, así como las medidas H1 a H6, fueron trazadas de manera manual con un digitalizador y usando la medida conocida de L, se obtuvieron los valores de escala, que, al multiplicarlas por los valores obtenidos en la digitalización, se calcularon los valores reales de las crías. Todas las variables, morfométricas y fotogramétricas, fueron medidas en el Sistema Internacional de Unidades.



**Figura 13.** Representación gráfica de las medidas obtenidas con fotogrametría en una cría de elefante marino del Norte.

Para obtener el volumen de los elefantes marinos se utilizó el método de Gales y Burton (1987) modificado, el cual asume que los individuos son circulares en cada corte de sección que se realiza. De esta manera, el diámetro de cualquier sección es equivalente a la altura lateral en cada punto. Siguiendo la metodología de Bell et al., (1997), la cabeza y la sección trasera de la aleta se descartaron en el cálculo, ya que éstas son mínimas en términos de volumen y que además son difíciles de estimar con este método.

El volumen se calculó por secciones tomando como base la fórmula para sacar el volumen de un cono truncado cuando conocemos la generatriz (g):

$$V = \frac{1}{3} \pi h (R^2 + r^2 + Rr) \quad (3)$$

donde R y r son los radios mayor y menor del cono truncado.

El valor de h (altura del cono truncado) se obtiene a partir del teorema de Pitágoras de un triángulo rectángulo,  $h^2 = g^2 - (R - r)^2$ , es decir:

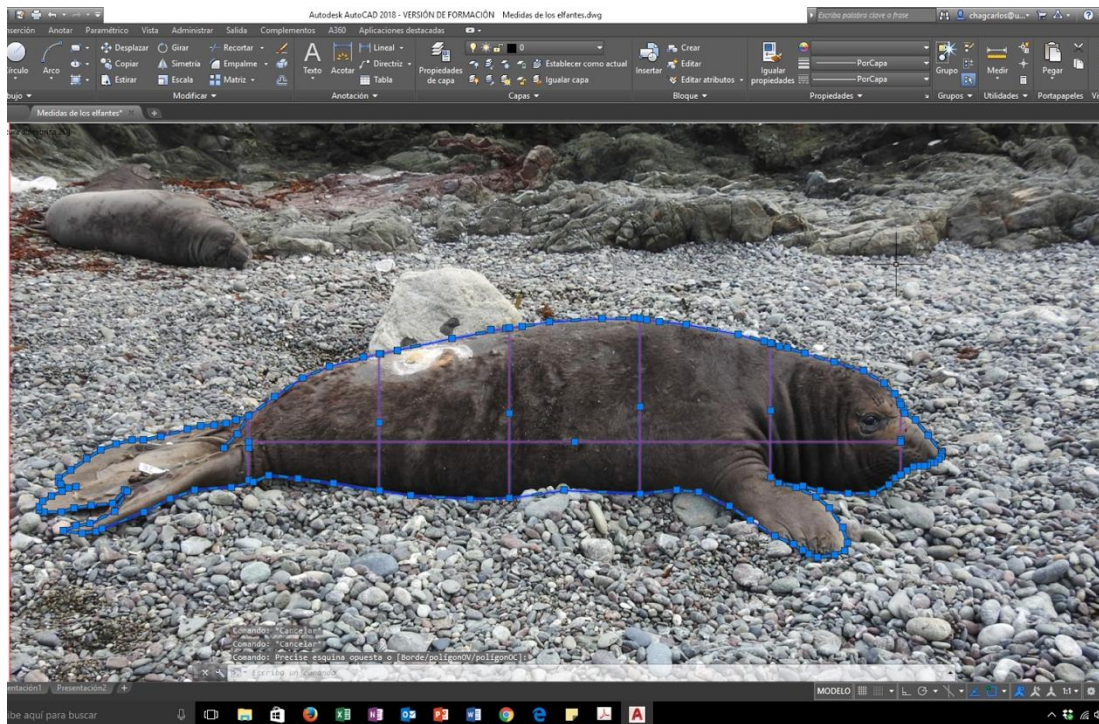
$$h = \sqrt{g^2 - (R - r)^2} \quad (4)$$

Para el cálculo del volumen de cada una de las secciones, el extremo con la mayor altura fue tomado como la base del cono, y el otro extremo se tomó como una sección paralela a la base. La medida de H1 se realizó a una distancia L' del hocico: que es, de acuerdo a las medidas realizadas en las fotografías, de 0.15 m en promedio. Finalmente, la longitud restante fue dividida en 5 intervalos iguales de acuerdo con la figura 13.

Para obtener la masa de las crías se hizo uso de dos modelos de tipo potencial que involucran medidas morfométricas y fotogramétricas (Cuadro 1), donde  $L_T$  es la longitud medida en campo de la nariz hasta la cola [m], V es el volumen [ $m^3$ ] y P el perímetro [m] de la circunferencia en la posición H3. Estas dos últimas variables fueron obtenidas a partir de las fotografías. Un ejemplo de las mediciones que se realizaron en la fotografía se muestra en la Fig 14.

**Cuadro 1.** Modelos para la estimación de la masa

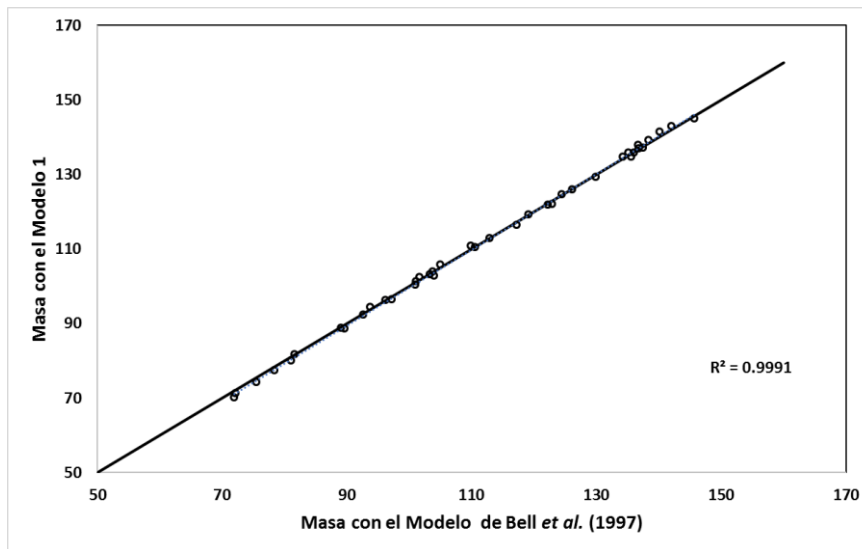
<b>MODELO</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
$M = 54.7954(L_T^{1.1337})(P^{1.5145})$	0.9991
$M = 84.208(VOL^{0.1545})(L_T^{0.8626})(P^{1.2893})$	0.9963



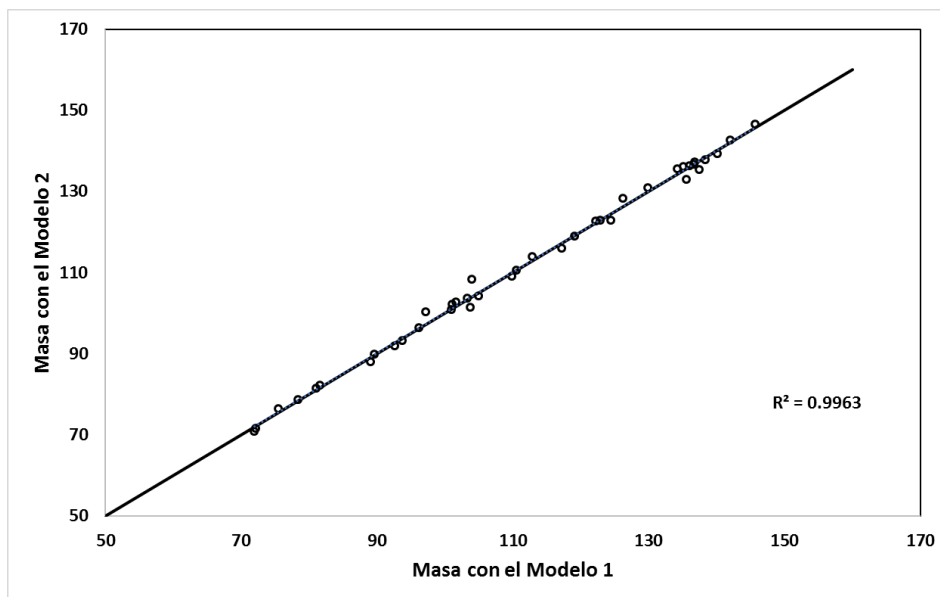
**Figura 14.** Ejemplo de digitalización de la fotografía de una cría de elefante marino del Norte (identificación de cría: 26).

Como se indicó arriba, este tipo de modelos fotogramétricos fueron propuestos originalmente para obtener la masa de crías de elefante marino del Sur (Bell et al., 1997). Sin embargo, para calcular la masa del elefante marino del Norte, se hizo uso del mismo modelo pero se tomó en cuenta la información generada por (Le Boeuf, 1994), en la cual se estima que la masa promedio de las crías del elefante del Norte es 10 Kg más que el de las crías del elefante marino del Sur. Así, al resultado obtenido con el modelo se le sumaron 10 Kg, y el valor de las constantes del modelo fueron estimados mediante mínimos cuadrados, utilizando un algoritmo de optimización no lineal (Marquardt, 1963).

En la Fig. 15 se muestra la masa obtenida con el factor de corrección al modelo de Bell, misma que se compara con el modelo que se utilizó. Se comparó la masa obtenida con la de los dos modelos propuestos, y el coeficiente de determinación fue cercano a 1 (Fig. 16).



**Figura 15.** Masa obtenida con el modelo 1 en comparación con el modelo propuesto por Bell et al. (1997).



**Figura 16.** Comparación de la masa obtenida con los modelos propuestos para crías del elefante marino del Norte.

## **h) Análisis estadísticos**

Con el fin de poner a prueba las hipótesis planteadas, como variables respuesta se tomaron en cuenta las dos respuestas inmunes medidas *in vivo* y *ex vivo* (la respuesta a PHA y la inhibición bacteriana del suero) en cada una de las dos etapas, así como el cambio entre las etapas para cada cría. Como variables explicativas se consideraron seis indicadores de recursos energéticos (masa, masa escalar, grosor de la capa de grasa, señal isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$ , glucosa y gravedad específica), el estado de salud y nivel sérico de hierro, y la densidad territorial como estimador de estrés. Antes de iniciar los análisis, se realizaron correlaciones de Spearman entre las variables explicativas (Anexo I). Se construyeron histogramas de frecuencia para observar la distribución de las variables respuesta, y se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para ver si tenían una distribución normal y una prueba de Bartlett para analizar desviaciones de homoscedasticidad. También se analizaron diferencias en las variables explicativas entre etapas (Anexo II) y entre sexos (Anexo III) con el fin de determinar si se incluirían las interacciones en los modelos (ver abajo).

Para abordar las hipótesis planteadas, se realizaron pruebas de T de dos colas para determinar diferencias en las variables en los dos periodos de muestreo y entre sexos. Aquellas variables que se desviaron de las expectativas de normalidad fueron analizadas con la técnica no paramétrica de Mann-Whitney y Kruskal- Wallis. Se construyeron modelos generalizados lineales para analizar si la capacidad de respuesta a PHA y a la inhibición bacteriana está determinada por los recursos que adquieren las crías durante la lactancia, así como determinar si el sexo, el estado de salud, la densidad poblacional y el territorio están relacionado con la respuesta de las crías a estos desafíos inmunes (Zuur et al., 2009). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el uso del software R Project versión 3.2.4 (R Core Team 2017).

## RESULTADOS

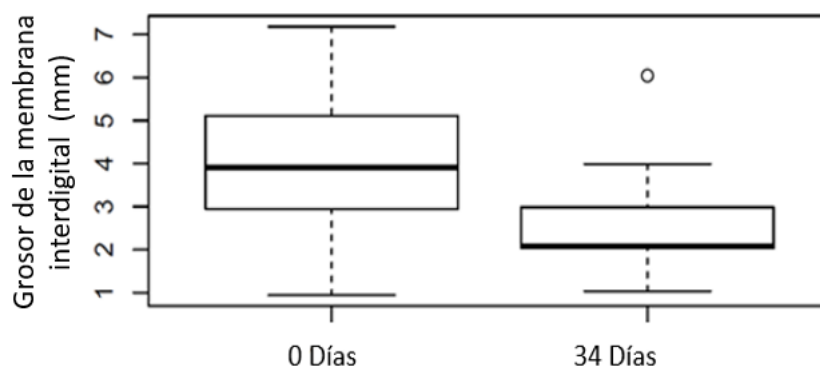
### Hipótesis 1

El destete de las crías repercute en su respuesta inmune.

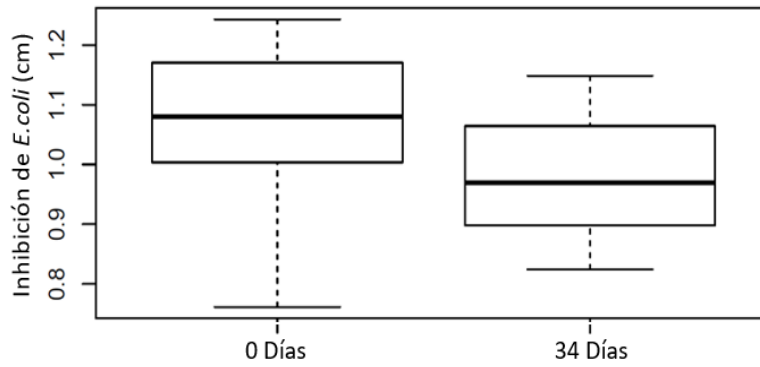
#### Predicción

Las crías recién destetadas tendrán mejor respuesta inmune que las crías en etapa de destete tardío.

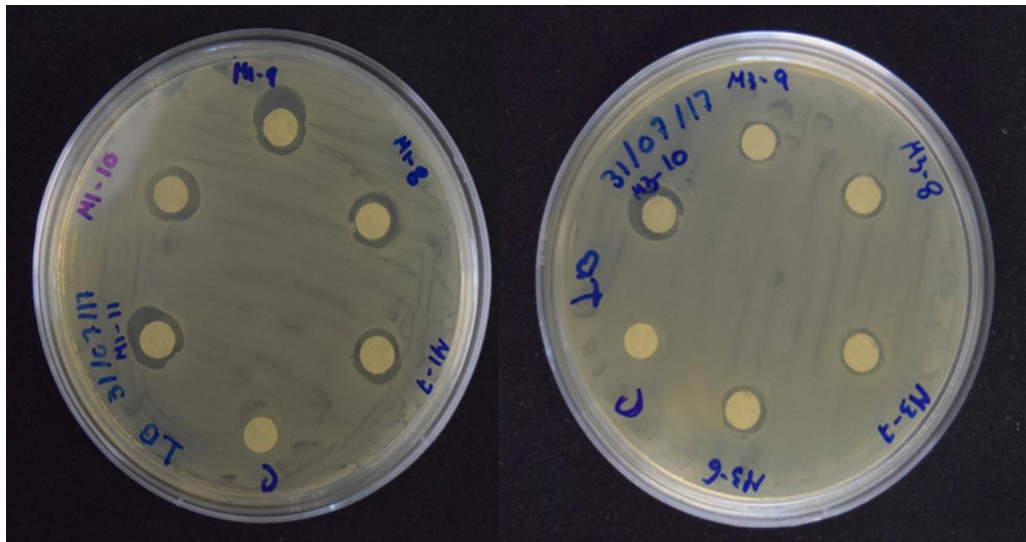
La respuesta a la inoculación con PHA de las crías varió entre las etapas del destete (Rango Wilcoxon,  $W=1024$ ,  $p=0.0001$ ), siendo menor al final del destete (Fig. 17). En términos de la inhibición del crecimiento bacteriano del suero, se vio el mismo patrón, ya que el suero de las crías recién destetadas tuvo mayor capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* en comparación con la etapa de destete tardío (Rango Wilcoxon,  $W=938$ ,  $p=0.0003$ ; Figs. 18 y 19). En el caso de la bacteria *Staphylococcus aureus* y el hongo *Candida albicans* no se observó inhibición microbiana en ninguno de los muestreos.



**Figura 17.** Respuesta a la inoculación con PHA en la membrana interdigital de crías de elefante marino del Norte con respecto al periodo de destete.



**Figura 18.** Inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli*, (0 días recién destetados y 34 días post-destete).



**Figura 19.** Ejemplo de la inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli*, de cuatro muestras y un control (M1 = 0 días recién destetados, M3 = 34 días post-destete).



## Hipótesis 2

La disponibilidad de recursos energéticos afecta la respuesta inmune innata de las crías.

### Predicción

La respuesta inmune innata de las crías será mayor en las crías que tengan más recursos energéticos.

Para abordar la hipótesis, primero se evaluaron los indicadores de recursos energéticos de las crías (Anexo I y II). Ya que el grosor de la capa de grasa lateral y dorsal estaba altamente correlacionado, entre estos dos, se decidió utilizar únicamente la capa de grasa lateral.

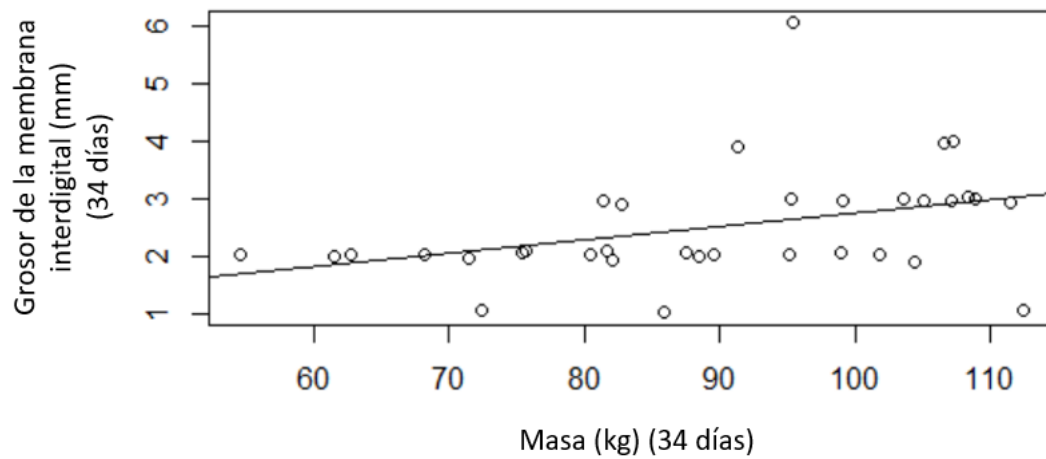
Se construyeron modelos lineales generalizados para determinar si los indicadores de las reservas energéticas por separado determinaban el cambio en las respuestas entre los 0 y los 34 días post-destete al desafío con PHA. Ninguno de los indicadores de los recursos energéticos de las crías presentó alguna relación con el cambio en la respuesta inflamatoria en la etapa de recién destetado (Cuadro 2). Sin embargo, la masa y la capa de grasa lateral predijeron linealmente la respuesta a la inflamación en la etapa de destete tardío (Cuadro 3). Específicamente, la masa de las crías no predijo linealmente la respuesta a PHA a los 0 días de haber sido destetados (GLM,  $F_{1,38}=0.927$ ,  $R^2=0.023$ ,  $p=0.341$ ; Fig. 20), no obstante, en la etapa de destete tardío se observó esta relación (GLM,  $F_{1,32}=4.668$ ,  $R^2=0.127$ ,  $p=0.038$ ; Fig. 21). Asimismo, la capa de grasa lateral no predijo esta relación lineal en la etapa de recién destetados (GLM,  $F_{1,38}=0.445$ ,  $R^2=0.0124$ ,  $p=0.508$ ; Fig. 22), sin embargo, a los 34 días post-destete la capa de grasa lateral predijo en un 12% la capacidad de respuesta a PHA (GLM,  $F_{1,32}=4.539$ ,  $R^2=0.124$ ,  $p=0.0409$ ; Fig. 23).

**Cuadro 2.** Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de recién destetados.

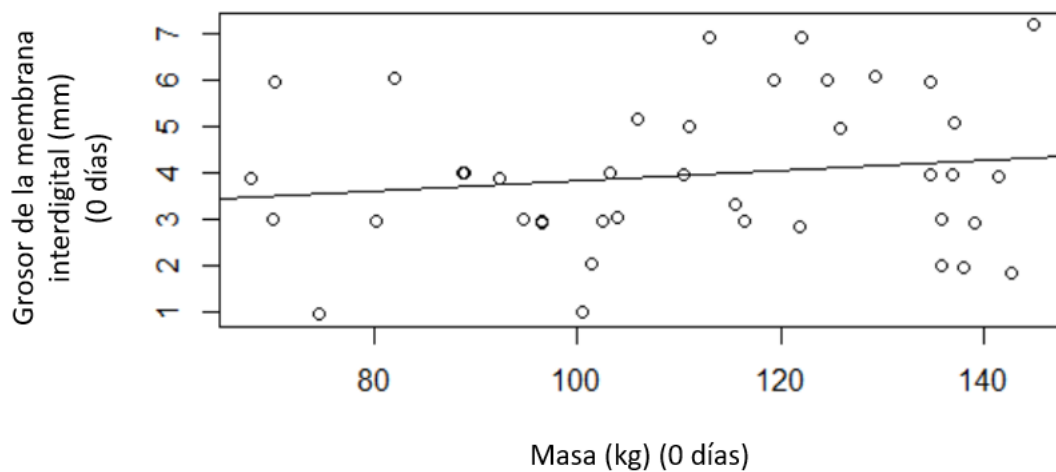
<b>Respuesta a PHA (0 días)</b>	<b>Residuales de la desviación</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Masa	1.630	1,38	0.927	0.341
Capa de grasa lateral	1.640	1,38	0.445	0.508
Capa de grasa dorsal	1.644	1,38	0.225	0.637
Condición corporal	1.596	1,38	2.587	0.116
Masa esalar	1.598	1,38	2.465	0.125
Gravedad específica	1.636	1,37	1.236	0.273
Glucosa g/dL	1.663	1,37	0.001	0.972
$\delta^{15}\text{N}$	1.595	1,32	2.298	0.139

**Cuadro 3.** Indicadores de recursos energéticos correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de destete tardío (34 días post-destete). El asterisco indica significancia estadística.

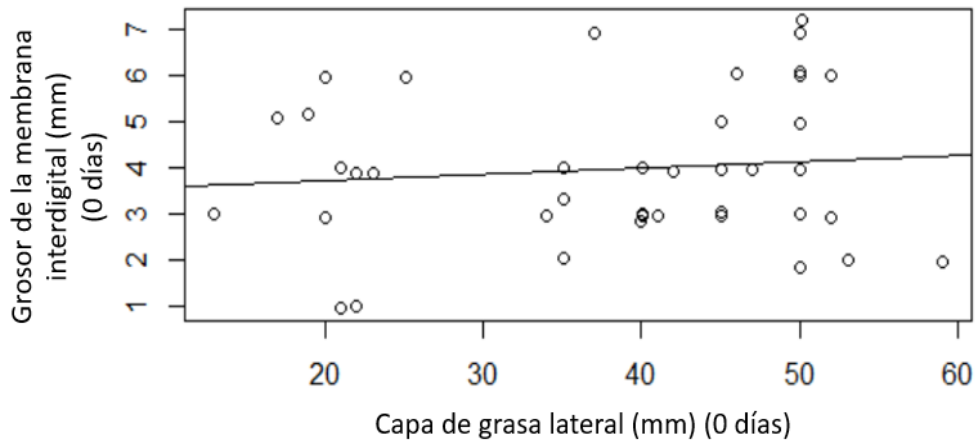
<b>Respuesta a PHA (34 días)</b>	<b>Residuales de la desviación</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Masa	0.351	1,32	4.668	0.038*
Capa de grasa lateral	0.351	1,32	4.539	0.040*
Capa de grasa dorsal	0.360	1,32	2.792	0.104
Condición corporal	0.035	1,32	3.127	0.086
Masa esalar	0.371	1,32	0.807	0.375
Gravedad específica	0.373	1,30	1.800	0.189
Glucosa g/dL	0.375	1,32	0.139	0.711
$\delta^{15}\text{N}$	0.037	1,32	0.302	0.585



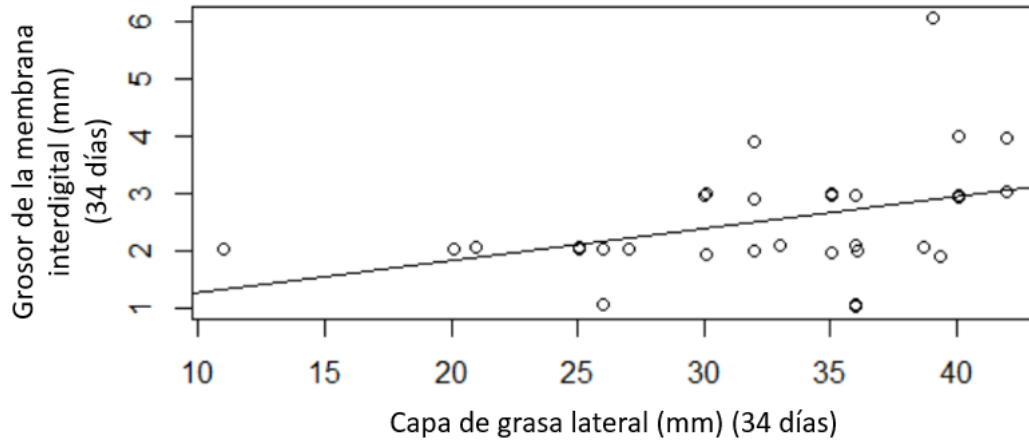
**Figura 20.** Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la masa en crías de elefante marino del Norte durante el destete tardío (34 días post-destete).



**Figura 21.** Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la masa en crías de elefante marino del Norte recién destetadas.



**Figura 22.** Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la capa de grasa lateral en la etapa de recién destetados (0 días) de las crías del elefante marino del Norte.



**Figura 23.** Correlación entre el grosor de la membrana interdigital y la capa de grasa lateral en la etapa de destete tardío (34 días) de las crías del elefante marino del Norte.

Se construyeron modelos lineales generalizados para determinar si los cambios en los indicadores de las reservas energéticas determinaban el cambio en la respuesta al desafío con PHA. Ninguno de los indicadores de los recursos energéticos presentó alguna relación con el cambio en la respuesta inflamatoria (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Cambio en los Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la respuesta a PHA en las crías del elefante marino del Norte en la etapa de recién destetados.

$\Delta$ Respuesta a PHA	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
$\Delta$ Masa	1.962	1,32	0.175	0.677
$\Delta$ Capa de grasa lateral	1.957	1,32	0.335	0.566
$\Delta$ Capa de grasa dorsal	1.967	1,32	0.015	0.901
$\Delta$ Condición corporal	1.897	1,32	2.421	0.129
$\Delta$ Masa escalar	1.921	1,32	1.566	0.219
$\Delta$ Gravedad específica	1.921	1,30	0.561	0.459
$\Delta$ Glucosa g/dL	1.953	1,31	0.629	0.434
$\Delta \delta^{15}\text{N}$	1.954	1,32	0.442	0.510

Se construyeron modelos lineales generalizados para determinar si los indicadores de las reservas energéticas determinaban la respuesta a la inhibición bacteriana en ambas etapas del muestreo. Ninguno de los indicadores de los recursos energéticos determinó el cambio en la respuesta en la inhibición de *E.coli* (Cuadros 5 y 6).

**Cuadro 5.** Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de *E. coli* por el suero de las crías del elefante marino del Norte, en la etapa de recién destetados.

Inhibición de <i>E.coli</i> (0 días)	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
Masa	0.097	1,35	0.648	0.426
Capa de grasa lateral	0.097	1,35	0.503	0.482
Capa de grasa dorsal	0.094	1,35	2.318	0.136
Condición corporal	0.097	1,35	0.242	0.625
Masa escalar	0.096	1,35	0.900	0.349
Gravedad específica	0.097	1,35	0.034	0.852
Glucosa g/dL	0.096	1,35	0.904	0.348
$\delta^{15}\text{N}$	0.089	1,30	3.633	0.662

**Cuadro 6.** Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de *E. coli* por el suero de las crías del elefante marino del Norte, en la etapa de destete tardío (34 días post-destete).

Inhibición de <i>E.coli</i> (34 días)	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
Masa	0.099	1,32	0.128	0.722
Capa de grasa lateral	0.098	1,32	0.504	0.482
Capa de grasa dorsal	0.098	1,32	0.762	0.389
Condición corporal	0.099	1,32	0.144	0.706
Masa escalar	0.099	1,32	0.962	0.758
Gravedad específica	0.106	1,30	0.051	0.822
Glucosa g/dL	0.098	1,32	0.642	0.428
$\delta^{15}\text{N}$	0.097	1,32	1.309	0.261

Se construyeron modelos lineales generalizados para determinar si los cambios en los indicadores de las reservas energéticas determinaban el cambio en la respuesta a la inhibición bacteriana. Ninguno de los indicadores de los recursos energéticos presentó alguna relación con el cambio en la respuesta en la inhibición bacteriana (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Cambio en los Indicadores de recursos energéticos que no están correlacionados con la inhibición de *E. coli* por el suero de las crías del elefante marino del Norte.

$\Delta$ Inhibición de <i>E.coli</i>	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
$\Delta$ Masa	0.011	1,30	1.807	0.189
$\Delta$ Capa de grasa lateral	0.108	1,30	3.340	0.077
$\Delta$ Capa de grasa dorsal	0.108	1,30	3.269	0.080
$\Delta$ Condición corporal	0.113	1,30	0.478	0.494
$\Delta$ Masa escalar	0.114	1,30	0.051	0.821
$\Delta$ Gravedad específica	0.113	1,29	0.173	0.679
$\Delta$ Glucosa g/dL	0.114	1,30	0.0001	0.989
$\Delta \delta^{15}\text{N}$	0.113	1,30	0.287	0.595

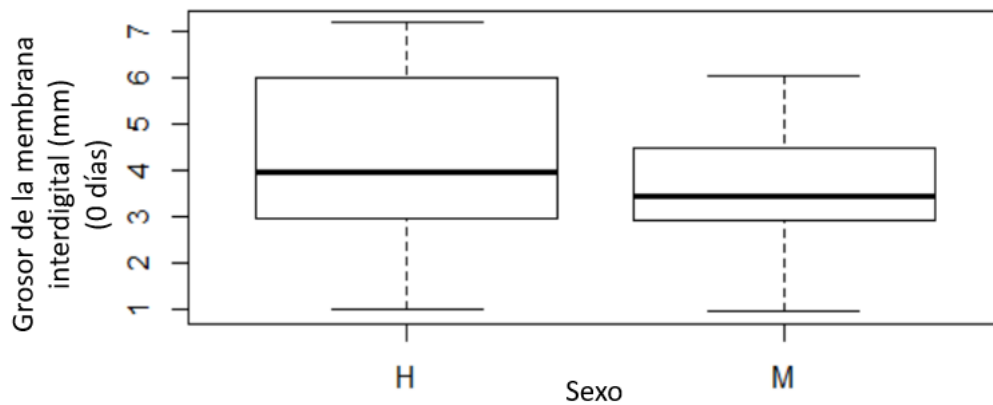
### Hipótesis 3

La respuesta inmune innata de las crías es diferente entre sexos.

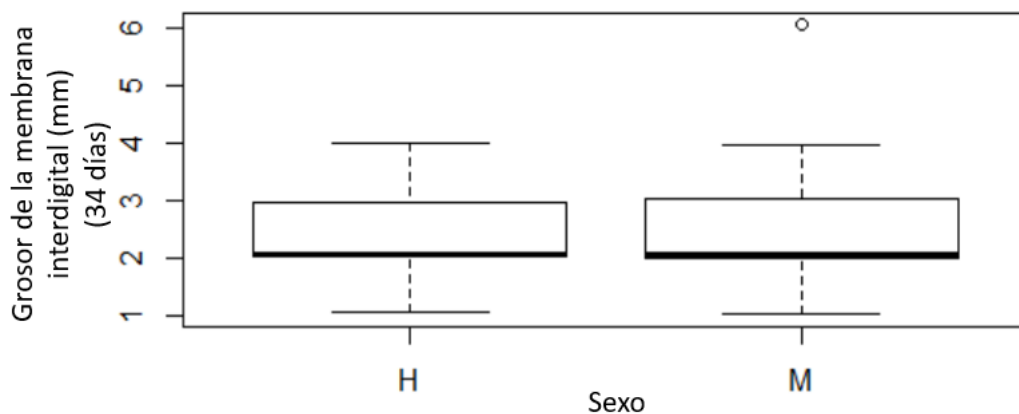
#### Predicción

Los machos tendrán mejor respuesta inmune innata que las hembras

La respuesta a PHA no varió entre sexos en crías recién destetadas (Prueba de t de dos colas,  $t= 1.121$ ,  $gl=35.58$ ,  $p=0.270$ ; Fig. 24), ni en la etapa de destete tardío (Rango Wilcoxon,  $W=142$ ,  $p=0.959$ ; Fig. 25).



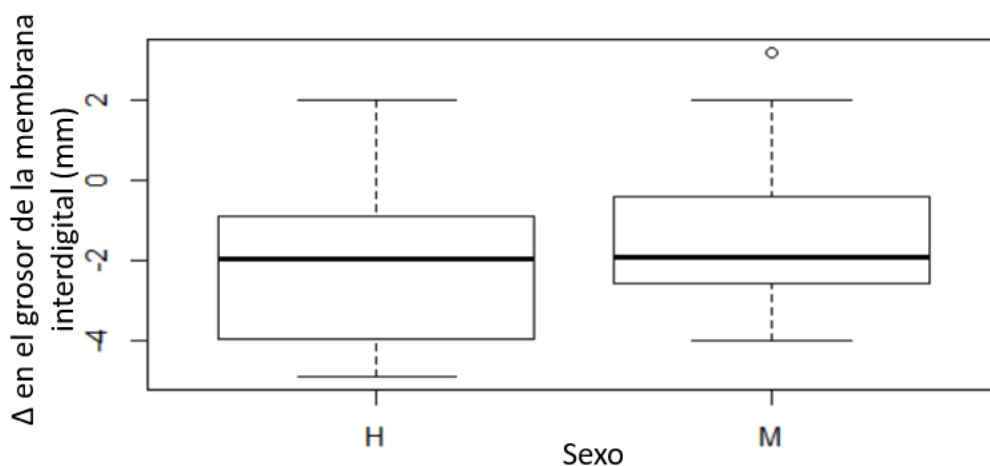
**Figura 24.** Respuesta da la inoculación con PHA en hembras (H) y machos (M) de crías de elefante marino del Norte recién destetadas.



**Figura 25.** Respuesta da la inoculación con PHA en hembras (H) y machos (M) de crías de elefante marino del Norte a los 34 días post destete.

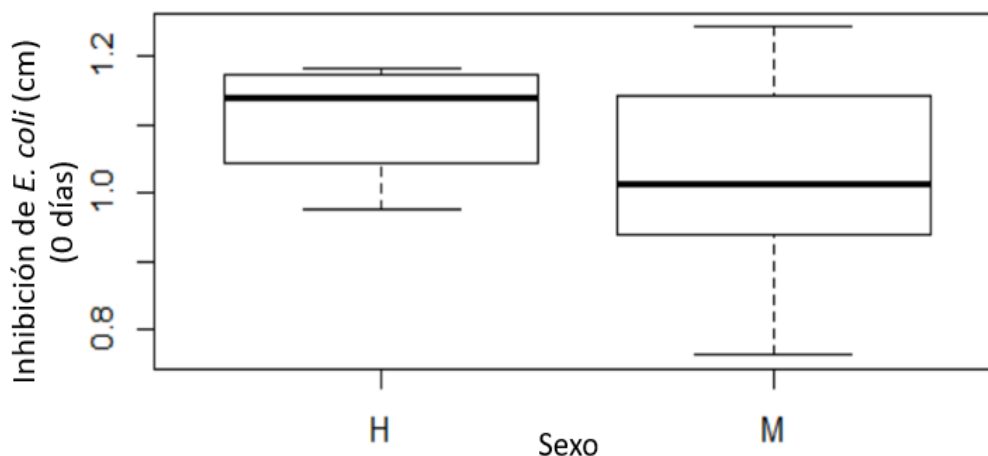


El cambio en la respuesta a PHA entre ambas etapas de muestreo no mostró diferencias entre sexos (Prueba de t de dos colas,  $t= 1.087$ ,  $gl=31.78$ ,  $p=0.284$ ; Fig. 26).



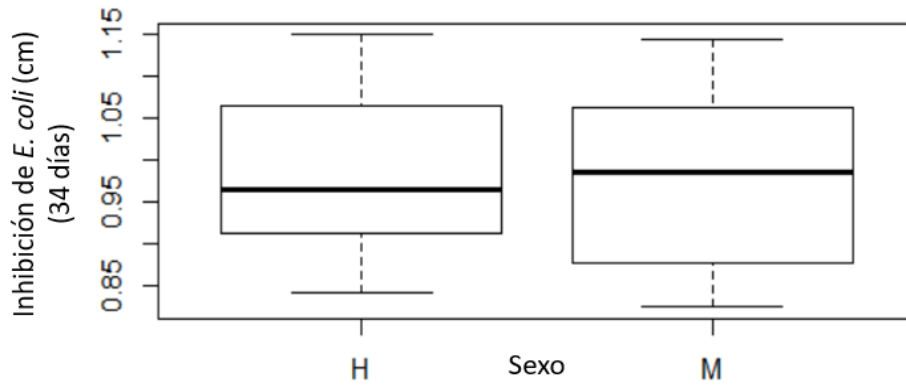
**Figura 26.** Cambio en el grosor de la membrana interdigital en respuesta a PHA en crías hembras (H) y machos (M).

Se encontraron diferencias significativas en la inhibición sérica del crecimiento bacteriano en la etapa de recién destetados entre machos y hembras (Rango Wilcoxon,  $W=238$ ,  $p=0.042$ ; Fig. 27). Las hembras mostraron mayor capacidad de inhibir a la bacteria *E. coli* que los machos.



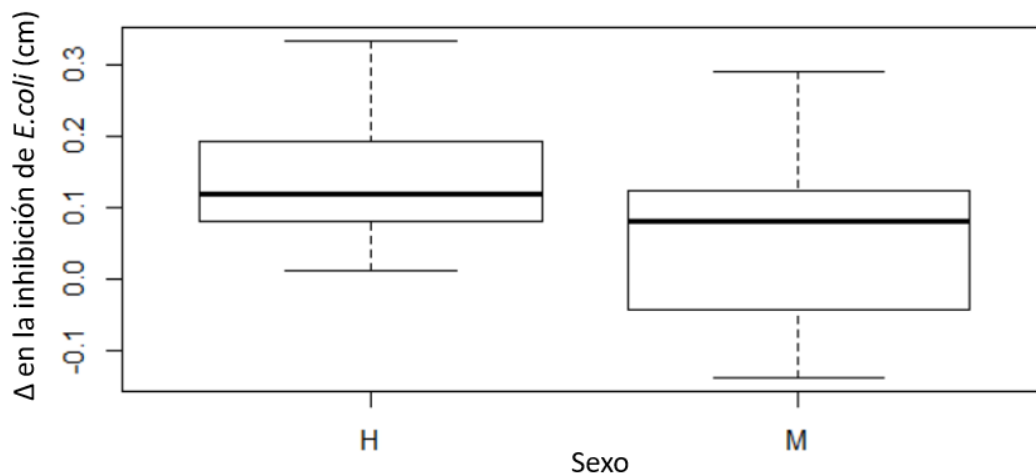
**Figura 27.** Inhibición sérica del crecimiento bacteriano de *E. coli* en crías macho (M) y hembra (H) en la etapa de recién destetados.

No se encontraron diferencias entre sexos en la inhibición del crecimiento de *E. coli* en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.1375$ ,  $gl=31.003$ ,  $p=0.891$ ; Fig. 28). Las hembras no mostraron la misma capacidad de inhibición bacteriana que la que se observó para la etapa de recién destetados.



**Figura 28.** Inhibición sérica del crecimiento bacteriano de *E. coli* en machos (M) y hembras (H) durante la etapa post-destete.

El cambio en la inhibición sérica de *E. coli* entre etapas varió entre sexos (Prueba de t de dos colas,  $t= 2.088$ ,  $gl=23.91$ ,  $p=0.047$ ), siendo más grande en hembras que en machos (Fig. 29).



**Figura 29.** Cambio en la inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* en crías del elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M).

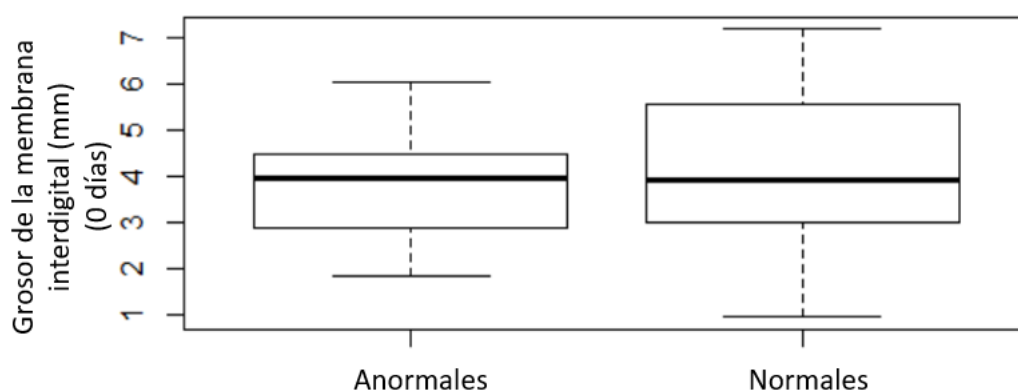
#### Hipótesis 4

El estado de salud de las crías afecta la respuesta inmune innata inducida.

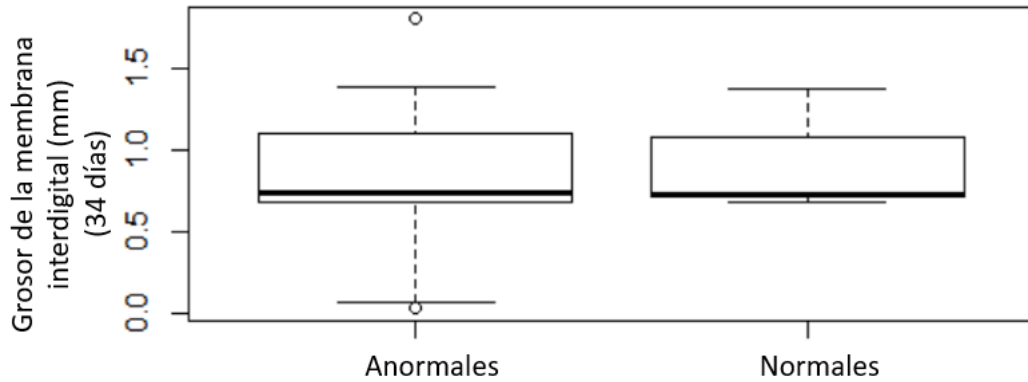
##### Predicción

La respuesta inmune innata de las crías enfermas, con heridas o con inflamación será menor que la de las crías sanas.

Las crías cuyos valores hematológicos se encontraban fuera de los parámetros clínicos normales no presentaron diferencias significativas en la respuesta a PHA en comparación con aquellas crías que estaban dentro de los parámetros clínicos normales en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas ( $t=0.844$ ,  $gl=36.075$ ,  $p=0.403$ ; Fig. 30), esto también se observó para la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t=0.618$ ,  $gl=29.51$ ,  $p=0.951$ ; Fig. 31).

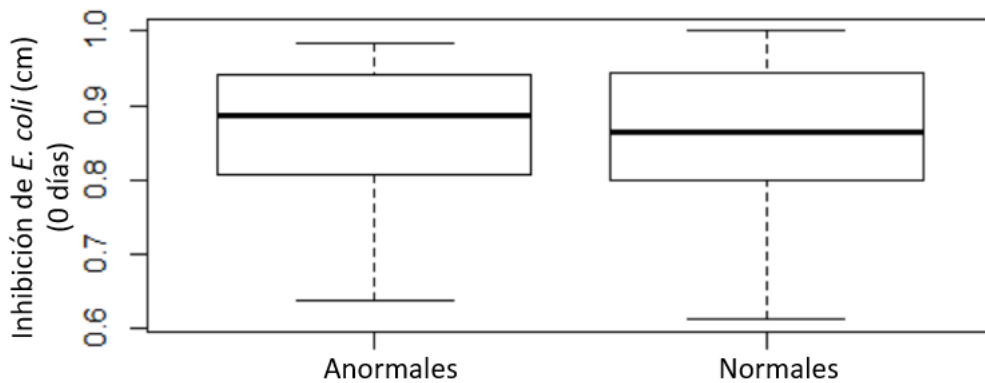


**Figura 30.** Respuesta PHA de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanas y clínicamente anormales recién destetados.

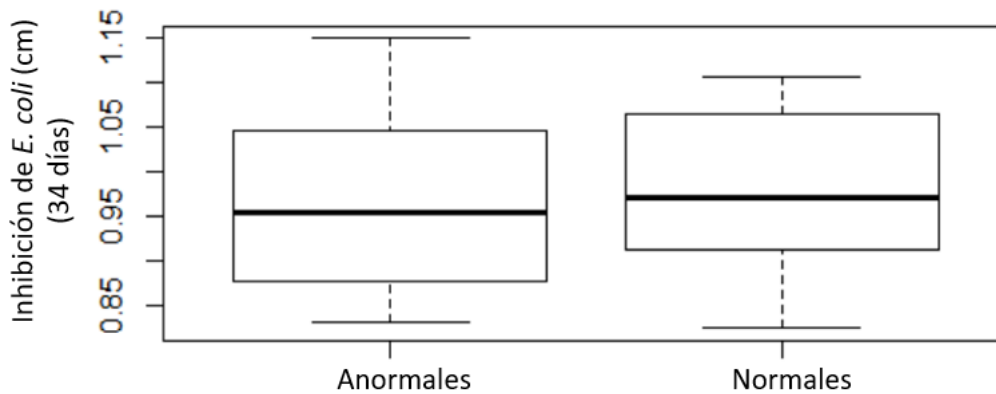


**Figura 31.** Respuesta a PHA de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanas y clínicamente anormales a los 34 días post-destete.

En el caso de la respuesta a la inhibición bacteriana, no se observaron diferencias entre las crías que se encontraban dentro y fuera de los parámetros clínicos normales, en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t = 0.214$ ,  $gl = 34.93$ ,  $p = 0.831$ ; Fig. 32), ni en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.200$ ,  $gl = 28.06$ ,  $p = 0.842$ ; Fig. 33).

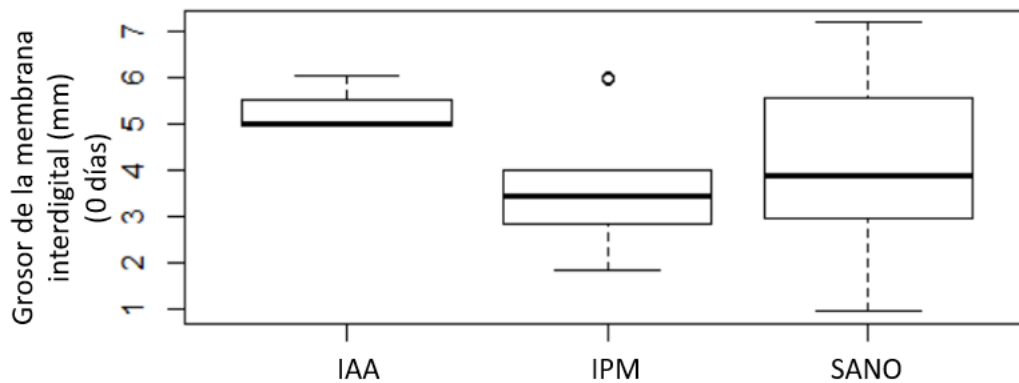


**Figura 32.** Respuesta a la inhibición sérica del crecimiento bacteriano de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanos y clínicamente anormales recién destetados.

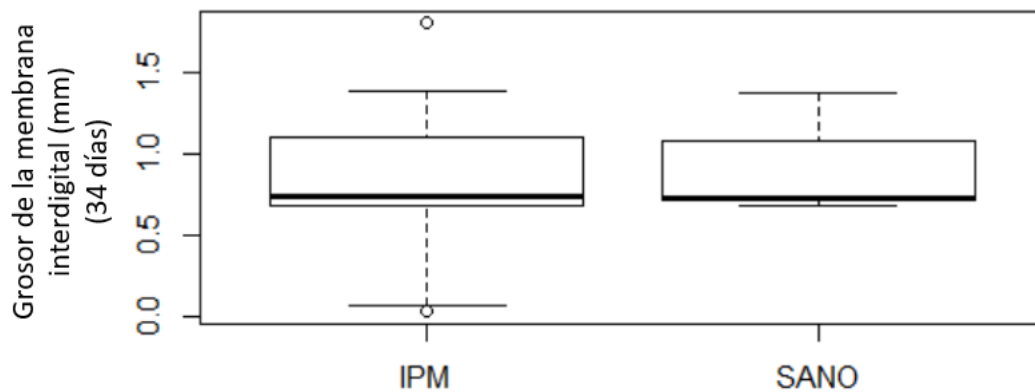


**Figura 33.** Respuesta a la inhibición sérica del crecimiento bacteriano de crías de elefante marino del Norte clínicamente sanos y clínicamente anormales 34 días post destete.

Las crías no presentaron diferencias significativas en la respuesta a PHA entre los diferentes diagnósticos que se obtuvieron en la etapa de recién destetados (ANOVA,  $F_{2,37}= 1.711$ ,  $p=0.195$ ; Fig. 34). Esto también se observó para la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.0529$ ,  $gl=27.126$ ,  $p=0.958$ ; Fig. 35).

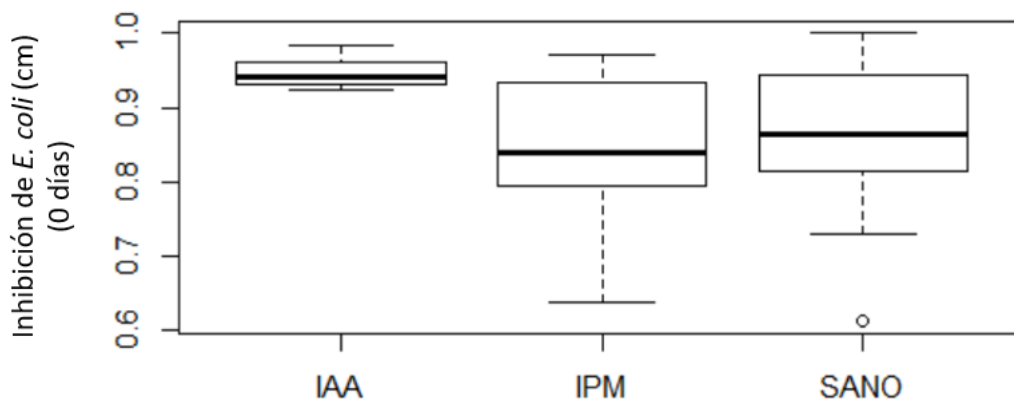


**Figura 34.** Respuesta a PHA en la etapa de recién destetados (0 días) de las crías de acuerdo a los diagnósticos clínicos. IAA=Infección aguda/probable absceso, IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales.

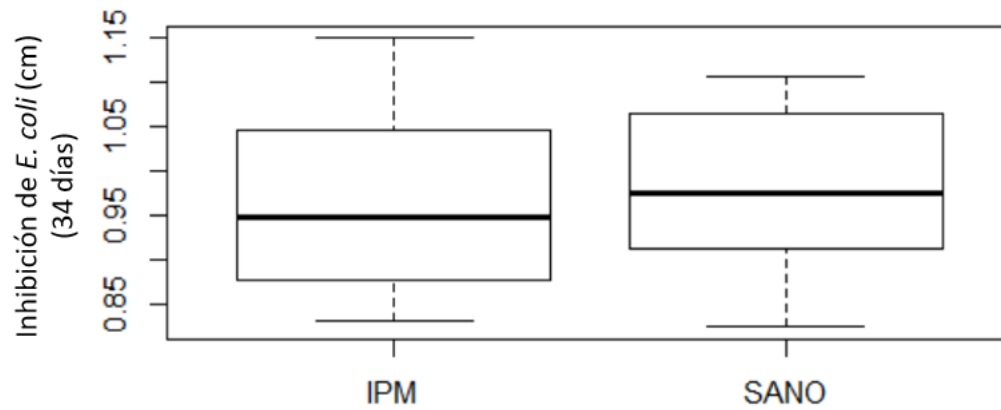


**Figura 35.** Respuesta a PHA a los 34 días post-destete de las crías de acuerdo a diagnósticos clínicos. IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales.

Las crías no presentaron diferencias en la respuesta a la inhibición sérica del crecimiento de *E. coli* de acuerdo a los diagnósticos clínicos durante la etapa de recién destetados (ANOVA,  $F_{1,34} = 1.552$ ,  $p=0.226$ ; Fig. 36), ni en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.220$ ,  $gl=30.54$ ,  $p=0.827$ ; Fig. 37).

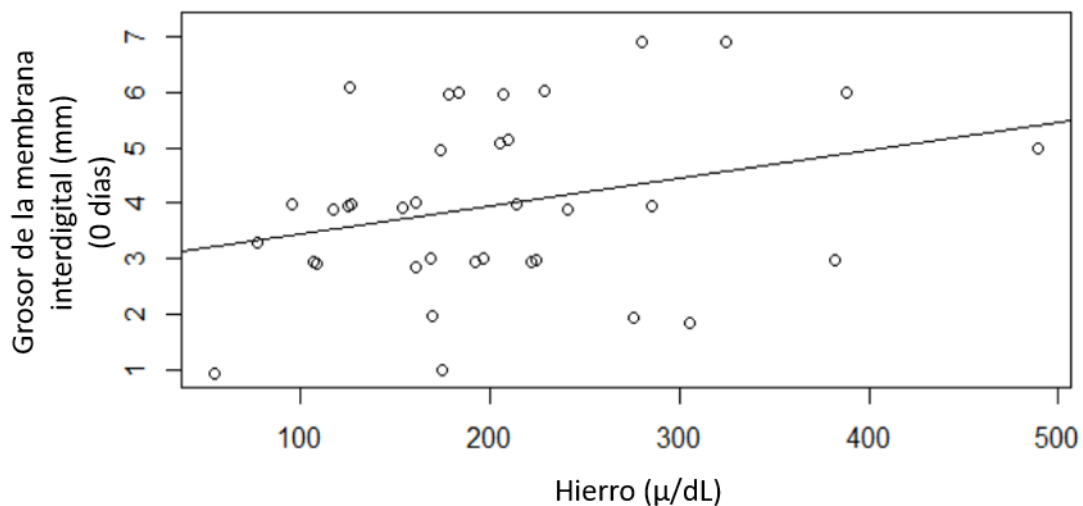


**Figura 36.** Respuesta a la inhibición sérica de *E. coli* en crías de elefante marino del Norte recién destetados de acuerdo a diagnósticos clínicos. IAA=Infección aguda/absceso probable, IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales.

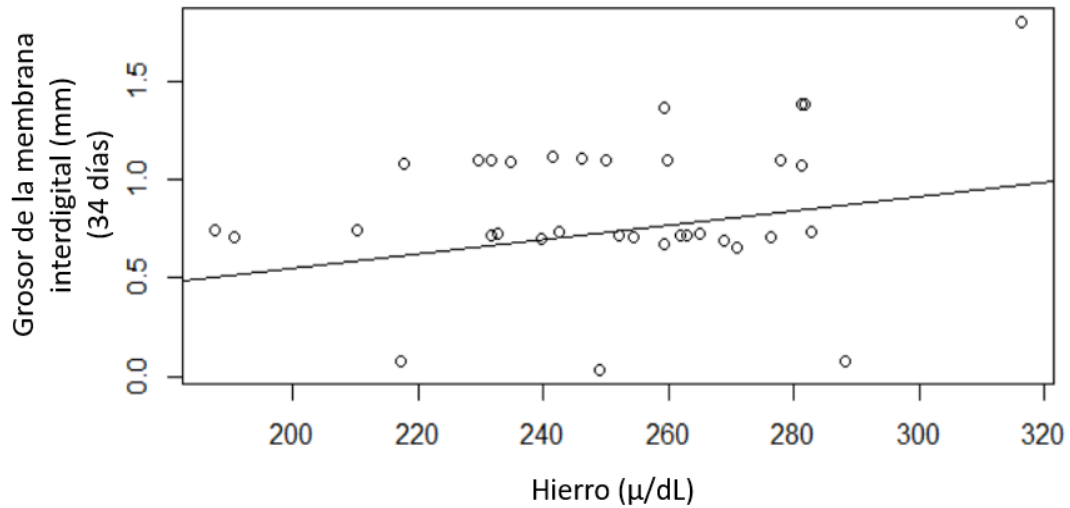


**Figura 37.** Respuesta a la inhibición sérica de *E. coli* a los 34 días post-destete de acuerdo al diagnóstico clínico de las crías. IPM= Infección por microparásitos, SANO= crías que se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales.

Los niveles de hierro no se relacionaron significativamente a la magnitud de la respuesta a PHA de las crías recién destetadas (GLM,  $F_{1,35}=3.337$ ,  $R^2= 0.087$ ,  $p=0.763$ ; Fig. 38), ni en la etapa de destete tardío (GLM,  $F_{1,32}=2.613$ ,  $R^2= 0.075$ ,  $p=0.116$ ; Fig. 39).

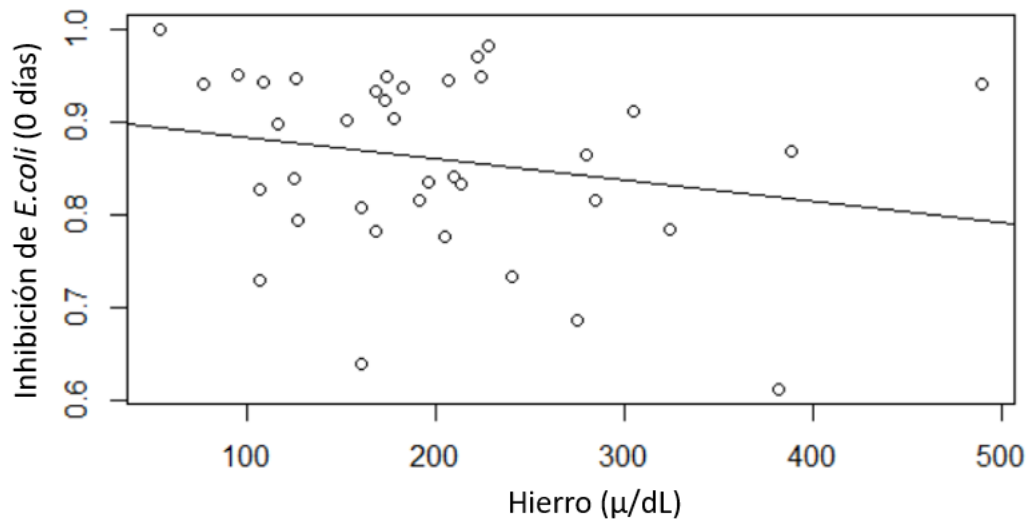


**Figura 38.** Relación entre los niveles de hierro en suero y la respuesta a PHA en crías recién destetadas.



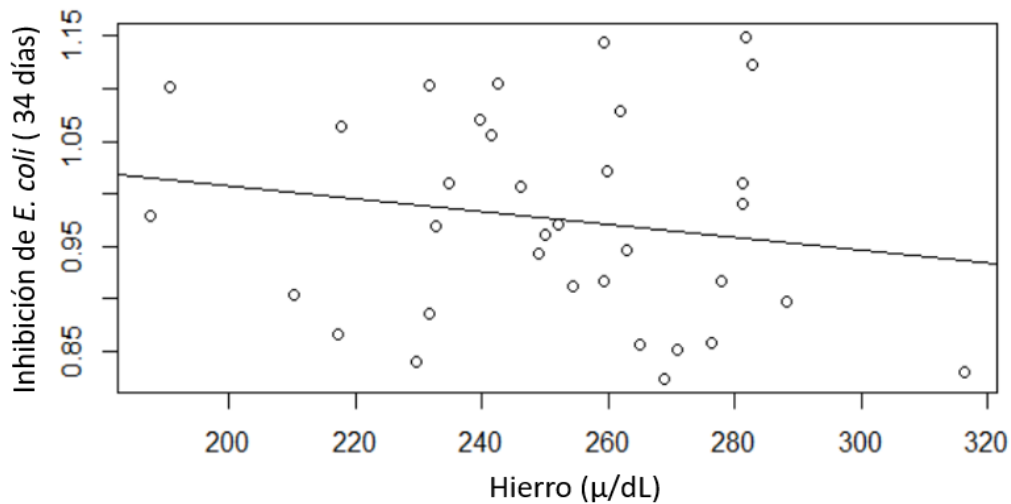
**Figura 39.** Correlación entre los niveles de hierro en suero y la respuesta a PHA en crías a los 34 días del destete.

Los niveles de hierro no se relacionaron de manera lineal con la inhibición sérica de *E. coli* de crías recién destetadas (GLM,  $F_{1,35}=1.756$ ,  $R^2= 0.047$ ,  $p=0.194$ ; Fig. 40) ni a los 34 días post-destete (GLM,  $F_{1,32}=1.756$ ,  $R^2= 0.030$ ,  $p=0.323$ ; Fig. 41).



**Figura 40.** Correlación entre los niveles de hierro en suero y la inhibición de la bacteria *E. coli* a los 0 días del destete.





**Figura 41.** Correlación entre los niveles de hierro en suero y la inhibición de la bacteria *E. coli* a los 34 días del destete.

## Hipótesis 5

La densidad poblacional y tipo de territorio afecta la respuesta inmune innata de las crías.

### Predicción

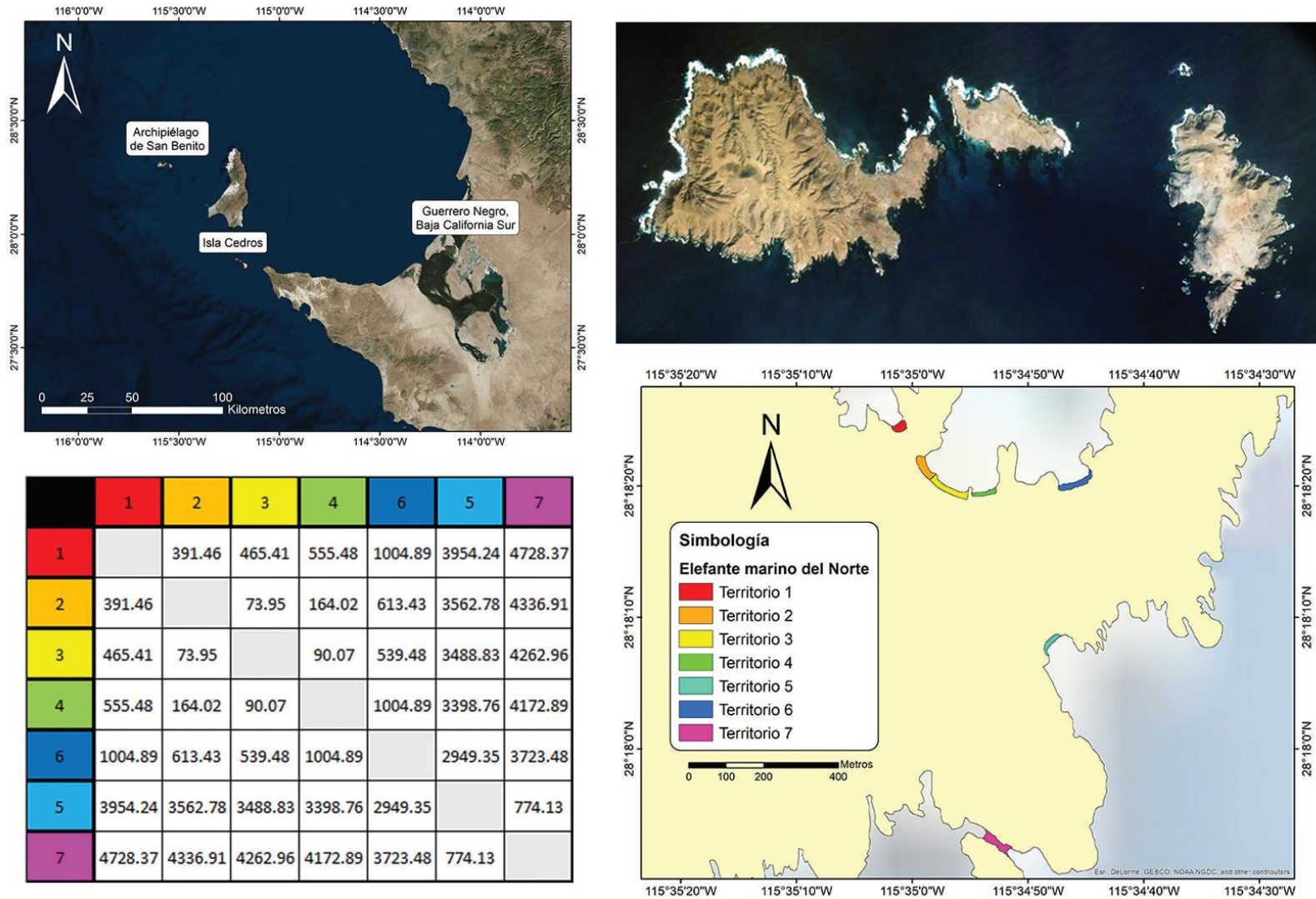
La respuesta inmune innata de las crías que nacen en territorios con densidad poblacional alta es menor que la observada en territorios de baja densidad poblacional, si una mayor densidad poblacional ocasiona estrés en las crías.

El tipo de territorio influye en la respuesta inmune de las crías.

Las crías incluidas en el presente estudio se encontraron en siete territorios pertenecientes a dos zonas (Cuadro 8), esta diferenciación se realizó con base en la distancia entre el primer territorio y el séptimo territorio que era de 4,728.37 km (Fig. 42). Se realizaron conteos del número de hembras adultas, con cría y sin cría, el número de machos adultos y el número de crías totales por cada territorio (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Características de las zonas y territorios de muestreo. T=número de territorio (1-7), Z=número de zona (1 y 2).

<b>Territorio/ Zona</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Hembras adultas</b>	<b>Machos adultos</b>	<b>Hembras con crías</b>	<b>Crías</b>
<b>T1/Z1</b>	N 28° 18.409´ W 115° 35.014´	Canto rodado	3	1	3	59
<b>T2/Z1</b>	N 28° 18.374´ W 115° 34.998´	Arena	14	5	11	60
<b>T3/Z1</b>	N 28° 18.319´ W 115° 34.927´	Canto rodado	12	1	12	52
<b>T4/Z1</b>	N 28° 118.307´ W 115° 34.903´	Arena	9	1	7	53
<b>T6/Z1</b>	N 28° 18.306´ W 115° 34.783´	Mixto	10	2	9	34
<b>T7/Z2</b>		Mixto	10	5	9	44



**Figura 42.** Mapa del Archipiélago de San Benito en la cual se puede observar los diferentes territorios del muestreo, así como la distancia en metros (m) entre ellos. Mapa elaborado con ArcMap 10.1 por el M. en C. Luis Alberto Soto García.

Se identificaron tres sustratos en los territorios: arena, canto rodado y sustrato mixto. El sustrato mixto se conformaba por rocas de diferentes tamaños y de arena. Se pueden observar en las figuras 43 y 44 algunos ejemplos de los diferentes sustratos que se encontraron, y en el cuadro 10 se muestra el tipo de sustrato de cada territorio y zona.



**Figura 43.** Territorio 4, se puede observar que el sustrato de arena.



**Figura 44.** Territorio 3 que tiene sustrato de canto rodado.

**Cuadro 9.** Tipo de sustrato en zona y territorio

<b>Territorio</b>	<b>Zona</b>	<b>Sustrato</b>
1	1	Canto rodado
2	1	Arena
3	1	Canto Rodado
4	1	Arena
5	1	Canto rodado
6	1	Mixto
7	2	Mixto

Se estimó la densidad poblacional para cada territorio en ambas temporadas del muestreo (Cuadros 10 y 11). Esta fue baja, ya que las crías podían desplazarse fácilmente sin ser molestadas por hembras adultas o por otras crías.

**Cuadro 10.** Densidad poblacional para cada territorio de muestreo a los 0 días del destete.

<b>Territorio</b>	<b>Área m<sup>2</sup></b>	<b>Población</b>	<b>Densidad poblacional</b>
1	1014	63	0.062
2	2120	82	0.038
3	2837	65	0.022
4	786	65	0.082
5	98.5	7	0.071
6	1213	46	0.037
7	893	60	0.067

**Cuadro 11.** Densidad poblacional para cada territorio de muestreo a los 34 días post-destete.

<b>Territorio</b>	<b>Área m<sup>2</sup></b>	<b>Población</b>	<b>Densidad poblacional</b>
1	1014	30	0.029
2	2120	155	0.073
3	2837	0	0
4	786	44	0.055
5	98.5	6	0.060
6	1213	54	0.044
7	893	24	0.026

## Observaciones conductuales

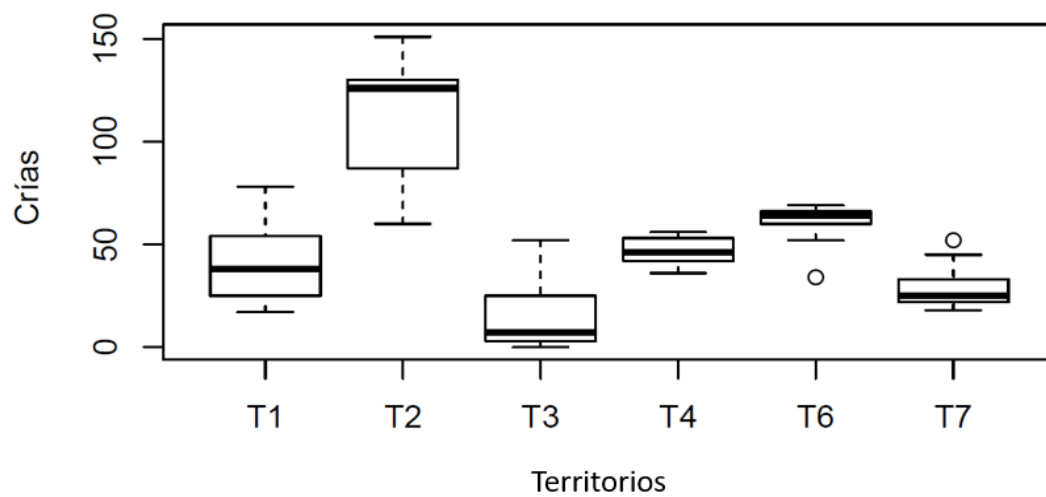
No se encontró actividad marcada de ningún tipo de agresión por parte de las hembras y ni entre las crías, quienes la mayor parte del tiempo descansaban o practicaban sus primeros nados (Figs. 45 y 46). No obstante, se observaron cambios de territorios de las crías, sobre todo de las crías que habían nacido en el sustrato de canto rodado se cambiaron a territorios aledaños que tenían sustrato arena. El número de las crías que nacieron en territorios con sustrato de arena se mantuvo constante a lo largo del muestreo a excepción del territorio "T2/Z1" que se caracterizó por ser el preferente por las crías que estaban en los territorios aledaños de canto rodado o sustrato mixto (Fig. 47).



**Figura 45.** Crías de elefante marino del Norte practicando sus primeros nados en charcas cercanas al harén en el cual nacieron.



**Figura 46.** Crías de elefante marino del Norte descansando sobre la playa.



**Figura 47.** Conteo de crías en los diferentes territorios (T= número de territorio).



Se construyeron modelos lineales generalizados para determinar si la densidad poblacional y el territorio en el cual habían nacido las crías tenían algún efecto sobre la respuesta al desafío por PHA o sobre la inhibición sérica al crecimiento bacteriano. La densidad poblacional no presentó ninguna relación lineal en ambas respuestas (Cuadro 12), sin embargo, el territorio sí mostró un efecto sobre la inhibición bacteriana en ambas etapas del muestreo (Cuadro 13). En la etapa de recién destetados las crías que nacieron en el territorio 6 presentaron mayor capacidad de inhibición, mientras que en la etapa de destete tardío fueron las crías del territorio 7 las que mostraron mayor respuesta.

**Cuadro 12.** Efecto de la densidad poblacional sobre la respuesta a PHA y la inhibición sérica del crecimiento bacteriano a los 0 y 34 días post-destete.

Densidad poblacional (0 y 34 días)	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
Respuesta a PHA (0 días)	1.648	1,38	0.044	0.834
Inhibición <i>E.coli</i> (0 días)	0.097	1,35	0.406	0.528
Respuesta a PHA (34 días)	0.307	1,32	1.016	0.321
Inhibición <i>E. coli</i> (34 días)	0.099	1,32	0.220	0.642

**Cuadro 13.** Efecto de los territorios sobre la respuesta a PHA y la inhibición sérica del crecimiento bacteriano a los 0 y 34 días post-destete. El asterisco denota significancia estadística.

Territorio (0 y 34 días)	Residuales de la desviación	gl	F	Valor de p
CMI (0 días)	1.665	4,35	0.571	0.685
Inhibición <i>E.coli</i> (0 días)	0.088	4,32	2.715	0.047*
CMI (34 días)	0.370	4,29	0.985	0.431
Inhibición <i>E. coli</i> (34 días)	0.088	4,29	2.949	0.036*

## DISCUSIÓN

En esta tesis se investigaron dos respuestas inmunes innatas – la inflamación y la actividad antibacteriana del complemento – en el marco de la historia de vida temprana del elefante marino del Norte. Se pusieron a prueba cinco hipótesis relacionadas con el tiempo post-destete, los recursos energéticos, el sexo, la salud y el territorio de las crías. No fue posible descartar todas las hipótesis nulas; sin embargo, algunas sí fueron descartadas, y se encontraron relaciones interesantes que se discutirán a continuación.

Se predijo que las respuestas inmunes innatas serían menos eficientes al final del destete que al inicio del mismo. En concordancia con la predicción, se encontró que las crías recién destetadas tienen una respuesta más marcada a ambos desafíos inmunes en comparación con la que despliegan durante el destete tardío. Este patrón se esperaría si disminuyen los recursos disponibles de las crías entre estos dos periodos. La etapa posterior a la inversión materna se cataloga como un momento importante para el desarrollo temprano de los mamíferos, sobre todo en aquellas especies precoces, que son independientes al poco tiempo del nacimiento y que se caracterizan por tener un cuidado parental extremadamente corto (Boness y Bowen, 1996; Reiter et al., 1978; Trillmich, 1996). Este tipo de historia de vida temprana se caracteriza por una alta vulnerabilidad de las crías, debido a que tienen que madurar y desarrollarse en ambientes nuevos sin el soporte que brinda el cuidado parental, por lo que las etapas posteriores al destete están sujetas a una fuerte presión de selección (Reiter et al., 1978). Las crías del elefante marino del Norte experimentan un periodo largo de ayuno después del destete, por lo que los recursos que obtienen durante la lactancia se convierten en su única fuente de energía para sustentar diversas funciones fisiológicas (Champagne et al., 2012). Durante el periodo de ayuno, las crías aprenden a nadar, bucear y experimentan un desarrollo físico marcado que se puede ver reflejado en el crecimiento dental y en la primera muda antes de aventurarse al mar (Reiter et al., 1978). Todas estas funciones son costosas por lo que la disponibilidad de los recursos tiende a disminuir en la etapa posterior al destete. En el contexto teórico de la ecoinmunología, que plantea que las respuestas inmunes compiten con otros procesos fisiológicos (French et al., 2009), un periodo sin alimento reduciría los recursos disponibles

de las crías, por lo que activar respuestas inmunes sería más difícil al final del destete que al inicio. La interpretación de los resultados se sustenta en el haber encontrado que la mayoría de los indicadores de disponibilidad de recursos de las crías variaron significativamente entre el primer y el tercer muestreo.

Además de haber encontrado evidencia de que las respuestas inmunes son más difíciles de implementar al final de un periodo de ayuno, la observación de que tanto la masa corporal como la capa de grasa predecían la magnitud de la respuesta a PHA y la inhibición sérica del crecimiento de *E. coli* durante el destete tardío – cuando se tienen pocos recursos – y no al inicio del destete, cuando aún tienen reservas, sirve como evidencia de que las respuestas inmunes son costosas, y que su implementación depende de los recursos energéticos disponibles (Demas y Nelson, 2011; Downs et al., 2014; Trillmich, 1996; Verhulst et al., 1999) , además del contexto (Vera-Massieu et al., 2015). Se sabe que la leche de las hembras adultas de elefante marino del Norte es una de las leches más ricas en energía puesto que a la mitad de la lactancia la composición de la leche rebasa el 50% en lípidos y esto tiende a incrementar hasta la etapa final en el destete; en contraste, el contenido proteico es de aproximadamente 10% y se mantiene constante hasta finalizar la lactancia, y el contenido de carbohidratos es mínimo (Crocker et al., 2001; Reiter et al., 1978; Riedman y Ortiz, 1979). Con base en los resultados aquí observados, se sugiere que la alta cantidad de lípidos de la leche materna otorga a las crías recién destetadas recursos suficientes para responder a los desafíos inmunes en comparación con las crías en la etapa de destete tardío, ya que las crías aún no tienen la necesidad de invertir estos recursos en desarrollarse, madurar, aprender a nadar e interactuar con el ambiente, como comienza a suceder durante la etapa de destete tardío (Crocker et al., 2001; Le Boeuf, 1994; Reiter et al., 1978; Riedman y Ortiz, 1979). Durante la etapa del destete tardío los pocos recursos energéticos disponibles comienzan a distribuirse entre las diferentes funciones fisiológicas, lo que restringe las respuestas inmunes innatas en aquellas crías con menos reservas energéticas.

Las crías nacen con una masa aproximada de 20 a 40 kg y llegan a aumentar a cerca de 140 kg, con más de un 55 % de lípidos como composición corporal (Crocker et al., 2001). Las crías del elefante marino tienen una fuerte dependencia de esta reserva de lípidos durante el periodo de ayuno post destete

ya que es la única fuente de energía disponible para poder sobrevivir al ayuno prolongado (Louis et al., 2015; Strandberg et al., 2008). El uso de estos recursos es evidente, ya que pierden cerca del 30% de su masa antes de entrar al mar y comenzar a alimentarse por sí mismos (Noren et al., 2003). Las reservas de grasa les ayudan al aislamiento térmico y a la flotabilidad, además de proporcionar productos metabólicos importantes para el desarrollo neurológico y el buceo (Louis et al., 2015; Strandberg et al., 2008).

No se encontró evidencia de que los otros indicadores de recursos energéticos, como la concentración de glucosa sanguínea, explicaran la variación en las respuestas inmunes. Un estudio reciente reportó que el recurso limitante para la activación de una respuesta inmune innata en crías de lobo marino de California era la glucosa (Banuet-Martínez et al., 2017). A diferencia del elefante marino del Norte, el lobo marino de California cuenta con un periodo de lactancia largo, con presencia materna constante y una transición sutil a la alimentación independiente (García-Aguilar, 2003; Trillmich, 1996). Es probable que al tener una lactancia corta e intensa y un periodo de ayuno prolongado, las crías de elefante marino del Norte deriven energía directamente de los lípidos de la leche materna y de su propia grasa más que de carbohidratos, lo que podría resultar en una menor importancia de la glucosa sanguínea como fuente energética. Estudios fisiológicos han demostrado que los requerimientos metabólicos de las crías durante la temporada de ayuno se basan principalmente en la oxidación de los ácidos grasos (Ortiz et al., 1978), y que la glucosa contribuye solamente entre el 1 y el 5 % de la tasa metabólica promedio durante el ayuno. Además, se ha reportado que este porcentaje no cambia a lo largo de este periodo y los niveles de glucosa sanguínea permanecen altos y constantes (Champagne, 2005; Ortiz, 2003), lo que concuerda con lo que se encontró en esta tesis.

Los niveles del isótopo  $\delta^{15}\text{N}$  de las vibrisas también fueron considerados aquí como otro indicador de reservas dado a que se esperaría que estos incrementaran conforme las crías comenzaran a consumir sus propias proteínas musculares lábiles durante las etapas tardías del destete. Efectivamente, estos niveles fueron más altos a los 34 días de que en crías recién destetadas, reflejo del estrés fisiológico cercano a lo que se da durante los procesos de inanición (Hobson et al., 1993; Kurle y Worthy, 2001). Sin embargo, no se encontró

evidencia de que las respuestas inmunes variaran conforme al autoconsumo de proteínas musculares lábiles. Es probable que esto se deba a que las crías no experimentan un grado severo de catabolismo protéico a pesar de que sus reservas lipídicas han empezado a disminuir. Probablemente se hubiera visto una relación si se hubieran obtenido muestras de las crías más adelante en el destete, justo antes de que entraran al mar, pero por motivos logísticos, esto no pudo ser realizado. Tomando en cuenta los resultados observados, se propone que la masa y la capa de grasa son buenos estimadores de recursos energéticos disponibles para crías de esta especie, pero no así la glucosa, condición corporal, masa escalar ni niveles séricos del isótopo  $\delta^{15}\text{N}$ .

Otra predicción de esta tesis fue que las respuestas inmunes de las crías serían diferentes entre machos y hembras. Existe evidencia de diferencias en la activación y el mantenimiento de las respuestas inmunes, tanto innatas como adaptativas, entre sexos. Estas diferencias se han explicado en términos genéticos, hormonales, ambientales y del microbioma, entre muchos otros factores (Klein y Flanagan, 2016). En esta tesis no se pudieron detectar diferencias significativas entre sexos con respecto a la capacidad de inflamación provocada por el desafío con el PHA, pero sí se observaron para la inhibición sérica de *E. coli*. La respuesta a PHA se caracteriza por ser costosa, al requerir la activación, reclutamiento y destrucción de efectores celulares (Martin et al., 2003; Vera-Massieu et al., 2015). La respuesta inflamatoria inespecífica se considera una respuesta de acción inmediata, lo que conlleva a una vasodilatación para aumentar el suministro de sangre y con ello promover la infiltración celular en la zona afectada (Kennedy y Nager, 2006). Este desafío ha sido estudiado para diversas especies tales como aves (Moreno et al., 1998; Martin et al., 2006), anfibios (Brown et al., 2011; Zhang et al., 2017) y mamíferos (Brock, 2012; Turmelle et al., 2010; Vera-Massieu et al., 2015), entre muchos otros, y no todos han observado diferencias entre sexos. Un estudio realizado en tres anuros, los sapos asiáticos, *Bufo gargarizans*, las ranas de manchas oscuras, *Pelophylax nigromaculatus* y los sapos mongoles, *Pseudepidalea raddei*, reportó que las respuestas al PHA fueron indistintas entre sexos (Zhang et al., 2017). Esto concuerda con lo reportado para los pingüinos de barbijo, *Pygoscelis antarctica* (Moreno et al., 1998), el roedor tuco-tuco de las talas *Ctenomys talarum* (Merlo et al., 2014). En cambio, Brock y colaboradores (2013)

demonstraron que la respuesta a PHA en crías del lobo marino de Galápagos era mayor en machos que en hembras. El único estudio publicado a la fecha sobre este tema en dos especies de fócido, el elefante marino del sur y la foca gris, no encontró diferencias en la respuesta entre sexos (Hall et al., 2003). Para estas especies, al igual que para el elefante marino del Norte, la disponibilidad de recursos energéticos es de gran importancia durante el periodo de ayuno post-destete, ya que de estos recursos depende cualquier función fisiológica que sea requerida, incluyendo la respuesta inmune. Incluso en la etapa de crías de muchos pinnípedos, los machos son en promedio más grandes y pesados que las hembras, debido a una inversión diferencial por parte de las hembras adultas hacia las crías machos, ya que esto les otorga una ventaja para crecer más rápido e incrementar su probabilidad de supervivencia y reproducción a futuro (Kretzmann et al., 1993; Le Boeuf et al., 1989; Reiter et al., 1978).

Se sabe que las hembras de elefante marino del Norte son capaces de aportar más recursos a su cría cuando es esta es del sexo macho, con lo que logran incrementar su masa, lo que favorece la probabilidad de que de adulto pueda tener mayor éxito reproductivo. Sin embargo, este incremento en la masa está determinado por el éxito en la búsqueda de alimento de las hembras adultas; si ésta es exitosa, la hembra puede contar con recursos extras para transmitirle a las crías machos, caso contrario la inversión se da por igual entre machos y hembras (Noren et al., 2003). En un estudio se determinó la masa de crías del elefante marino del Norte en la reserva de Año Nuevo en California durante 1999 y 2000, y no se encontraron diferencias significativas entre sexos para el año de 1999, sin embargo, sí hubo diferencias en el año 2000 (Noren et al. 2003). Los autores argumentan que esta diferencia podría deberse a variaciones en la inversión de recursos maternos, a su vez influenciadas por el éxito en la obtención de alimento que las madres tengan a lo largo del año de embarazo. Se propuso lo anterior debido a que entre 1997 y 1998 se presentó el fenómeno de “El Niño Oscilación del Sur” (ENSO, por sus siglas en inglés), por lo que es probable que las madres no tuvieran acceso al alimento como en el año 2000, considerado un año normal. De acuerdo a la Administración Atmosférica y Oceánica de los Estados Unidos de Norte América, durante el 2015 ocurrió otro fenómeno ENSO con efectos que duraron hasta el 2016 en el Pacífico Norte Mexicano, cuando las madres de las crías aquí incluidas en el

estudio estaban preñadas, por lo que el hecho de no haber encontrado diferencias en la masa de los machos y las hembras podría explicarse en el mismo contexto que lo reportado por Noren et al. (2003). Sin embargo, en este estudio la masa escalar y la condición corporal de las crías sí variaron entre sexos, siendo al contrario de lo que se esperaría (Crocker et al., 2001; Dailey et al., 2016; Kretzmann et al., 1993; Louis et al., 2015; Noren et al., 2003), mayor en hembras que en machos. Ambos parámetros han sido propuestos como estimadores de los recursos que tienen las crías de pinnípedos otáridos (e.g. Brock et al., 2013; Peig y Green, 2009) ya que se basan en la relación entre la longitud total y la masa corporal. En estudios previos no se han utilizado estos estimadores en crías de elefante marino, sino masa y composición corporal bioquímica (Crocker et al., 2001; Dailey et al., 2016; Kretzmann et al., 1993; Louis et al., 2015; Noren et al., 2003), y es probable que no sean buenos indicadores de la disponibilidad de los recursos para esta especie en particular, debido a que el cuerpo de las crías del elefante marino se caracteriza por ser fusiforme y su crecimiento es lento, con pérdida de masa, en vez de ganancia como ocurre en otras especies de pinnípedo. Por ello, es complicado determinar la condición corporal con base en estas medidas. En este sentido, resulta difícil determinar si realmente hubo diferencias en la inversión de recursos de las madres hacia las crías de acuerdo a su sexo, o si estas diferencias observadas se deban a variaciones sutiles en la tasa de crecimiento y pérdida de masa durante el ayuno post destete y si esto pudiera explicar la diferencia en la inhibición sérica del crecimiento bacteriano entre sexos. Si no hay inversión diferencial de recursos maternos entre sexos en las crías de fócidos (Hall et al., 2003), el que aquí no se hayan observado diferencias en la respuesta al PHA entre machos y hembras, y que la masa de ambos haya sido semejante, podría deberse a que ambos cuentan con recursos suficientes sin que un solo sexo tenga un “bono extra” provisto por sus madres que les permitan utilizar mejor esta respuesta inmune costosa (Martin et al., 2003; Vera-Massieu et al., 2015). Otra posibilidad es que ambos sexos tengan la misma capacidad para responder a este desafío, independientemente de la cantidad de recursos con los que cuenten en ese momento como ha sucedido para otras especies, aunque es difícil aseverar esto debido a la escases de información sobre respuestas a PHA en mamíferos marinos.

En contraste a lo observado para el PHA, el suero de las crías hembras recién nacidas tuvo mayor capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* que el suero de los machos. Esta ventaja se perdió en el destete tardío. Las crías de elefante marino del Norte presentan diferencias inter-sexo en términos de su desarrollo temprano. Al nacer las crías tienen un pelaje grueso y de color negro, y al ser destetadas comienzan su primera muda por lo que el pelaje se reemplaza por un pelaje liso de color plata brillante, lo que puede tomar de 1 a 3 semanas. Sin embargo se ha reportado que existe una gran variabilidad entre sexos (Reiter et al., 1978); las hembras suelen comenzar la muda antes que los machos, y lo mismo ocurre para el desarrollo dental, específicamente para los caninos, que aparecen antes del destete para las hembras mientras que en los machos suelen salir hasta cuatro semanas post-destete (Briggs, 1974). La madurez precoz de las hembras tiene una explicación relacionada con las historias de vida diferentes entre sexos: en la vida adulta las hembras tienen que desarrollarse más rápido en comparación con los machos, ya que las hembras llegan a la maduración sexual entre los 3 a los seis años de edad, mientras que los machos suelen madurar hasta los 8 años de edad (Le Boeuf y Law, 1994). Es posible que la madurez diferencial de las crías también abarque la síntesis de los componentes del complemento (Tamaro et al., 1993) que participan en las respuestas de inhibición del crecimiento bacteriano, o que las madres transfieran más factores de complemento a través de la placenta o el calostro a crías hembras que a crías machos (Swain y Nayak, 2009). En cualquiera de las dos opciones, para cuando las crías están en la etapa del destete tardío, ya se hubieran igualado ambos sexos en su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Por otro lado, a diferencia de la respuesta del PHA, la inhibición bacteriana por parte del complemento no requiere del montaje de una respuesta inmune *per se*, ni de una contribución energética extra, sino que depende de la disponibilidad de los factores del complemento que las crías tengan en ese momento en el suero.

Cabe mencionar que el suero de las crías sólo fue capaz de inhibir a la bacteria *E. coli*, y no a los otros dos patógenos. Esto se debe a que a diferencia de las bacterias Gram negativas, las bacterias Gram positivas como, *S. aureus*, son pioneras en evadir al complemento, y los hongos, como *C. albicans*, activan mecanismos inmunes celulares, además de activar la vía de la manosa del complemento (Owen et al., 2013). Es posible que haya diferencias entre machos



y hembras en términos de la respuesta y la intensidad de activación, y que esto dependerá del desafío al cual se enfrenten, debido a que ambos sexos siguen estrategias de vida diferentes a lo largo de su vida, por lo que su exposición a agentes patógenos es muy probable que difiera.

Se hipotetizó también que el estado de salud de las crías determina la magnitud de las respuestas inmunes, como se esperaría si el uso de recursos energéticos debido a la resolución de procesos infecciosos limitara el uso de recursos para otro desafío inmune (Vera-Massieu et al., 2015). Los conteos diferenciales de células blancas de las crías de este estudio fueron semejantes a los valores de referencia ya establecidas para crías de esta especie (Yochem et al., 2008). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre las etapas de los muestreos, donde las crías presentaron una disminución en la mayoría de los tipos celulares en la etapa de destete tardío, con la excepción de los eosinófilos, que aumentaron significativamente. Diversos estudios realizados en otras especies de pinnípedos han demostrado que los conteos de leucocitos varían en los primeros meses de vida. Un ejemplo de esto se observó en crías del lobo marino de Galápagos, en los que los conteos de leucocitos totales, eosinófilos y neutrófilos son más bajos en los primeros tres meses de vida, y comienzan a incrementar a los 6 meses del nacimiento (Brock et al., 2013). En el lobo de dos pelos, *Arctocephalus australis*, se demostró que las crías al nacer tienen niveles bajos de los leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos, y estos incrementan durante las primeras dos semanas de vida (Seguel et al., 2016). Las crías del lobo marino de Steller, *Eumetopias jubatus*, presentan altos conteos de leucocitos totales, y estos disminuyen en los primeros días posteriores al nacimiento al igual que los neutrófilos y los linfocitos T, aunque el número de linfocitos, eosinófilos y monocitos se mantiene constante durante el desarrollo temprano (Keogh et al., 2010).

Estudios realizados en fócidos, como el elefante marino del Sur y la foca gris, demostraron que los niveles de leucocitos totales, los neutrófilos y los linfocitos aumentan durante los primeros 15 días después del nacimiento, posteriormente algunos de estos tipos celulares disminuyen mientras que otros se mantuvieron constantes (Hall et al., 2003). No obstante, también reportaron un aumento marcado en los conteos de eosinófilos en etapas posteriores, similar al que se encontró en este estudio. Los autores relacionan este fenómeno con la

presencia de ectoparásitos, como el piojo de foca (*Lepidophthirus macrorhini*) que afecta a ambas especies (Hall et al., 2003). En esta tesis no se determinó la presencia de ectoparásitos, por lo que no es posible determinar si el aumento en los eosinófilos se debe a ectoparásitos; sin embargo, también es posible que el incremento se deba a la exposición a otros ambientes, y por lo tanto, a nuevos patógenos y antígenos (Brock et al., 2013), ya que las crías en la etapa de destete tardío comienzan a interactuar con el agua y expanden su ámbito territorial al desplazarse a zonas aledañas al lugar de nacimiento. Esto quedó demostrado para el lobo marino de Galápagos, ya que se reportó que las crías que nacen en colonias con impacto antrópico tienen un incremento marcado en los conteos de eosinófilos entre los 6 y 12 meses de edad, en comparación con crías nacidas en colonias que no tienen impacto antrópico, y se especuló que en las zonas pobladas la exposición a antígenos es mayor (Brock et al., 2013). No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos respuestas a los desafíos inmunes de acuerdo a los parámetros clínicos de salud. Es probable las diferencias en los conteos diferenciales de células blancas que se utilizaron para determinar estos parámetros, sean causados por los altos niveles en la producción y distribución de los leucocitos que son comunes en etapas del desarrollo temprano del sistema inmune en mamíferos (Day, 2007).

En cuanto a los niveles de hierro, usados como indicadores de procesos de infección (Cassat y Skaar, 2013), no se encontró evidencia de una relación con ninguno de los dos desafíos inmunes que realizamos en este estudio. Se cree que el hierro se produce en lo que comienza la síntesis de mioglobina que se requiere para el buceo en etapas tempranas y se produce por la movilización del hierro de la ferritina en el hígado y de la hemoglobina degradada (Somo et al., 2015).

La última predicción de esta tesis fue que el tipo de territorio, en términos de su densidad poblacional y sustrato, influirían en la respuesta inmune. No se encontró evidencia de que la densidad poblacional afectara a las respuestas inmunes innatas. Es posible que esto se deba a que en todos los territorios aquí estudiados, la densidad poblacional era extremadamente baja, ya que la población del elefante marino del Norte en el Archipiélago de San Benitos está en declive (Elorriaga-Verplancken, 2015). Sin embargo, la magnitud de la inhibición sérica del crecimiento bacteriano varió de acuerdo al territorio en el

cual nacieron las crías, tanto en el destete temprano como en el destete tardío. La importancia de la elección del territorio por parte de los machos y las hembras adultas radica en que los animales con más experiencia seleccionan la mejor zona geográfica que generalmente cuenta con superficies planas y se caracterizan por tener arena como sustrato, debido a que pueden usar la arena para regular la temperatura en tierra y ahuyentar a los insectos que los molestan (Le Boeuf y Law, 1994). Estos territorios suelen ser controlados por los machos más dominantes, que ganaron en peleas brutales al comienzo de la temporada reproductiva (Le Boeuf y Law, 1994). También, las hembras adultas con mayor experiencia reproductiva suelen desplazar a las hembras jóvenes o primíparas a zonas aledañas, ya que tener acceso a los mejores territorios no solo incrementa la probabilidad de supervivencia de sus crías sino que las hembras tendrán acceso a los mejores machos y así podrán favorecer su adecuación biológica, al aparearse con machos de buena calidad, portadores de buenos genes que podrán transmitir a la descendencia (Møller y Alatalo, 1999; Neff y Pitcher, 2005). Se encontró que las crías que nacieron en territorios con sustrato mixto presentaron una mayor respuesta de inhibición del crecimiento bacteriano que las crías nacidas en otros territorios, y esto se mantuvo tanto para las crías recién destetadas como para la etapa de destete tardío. Interesantemente, no se observó esta relación para la respuesta a PHA. Más allá de plantear que la diferencia en la inhibición del crecimiento bacteriano se debe a que los territorios con sustrato mixto sean los que concentran a los mejores machos y a las hembras con mayor experiencia, ya que los territorios con sustrato arena no presentaron esta relación como se espera, debido a que el sustrato arena suele ser el más solicitado (Le Boeuf y Law, 1994), y se esperaba que los territorios con este sustrato presentaran alguna relación con las respuestas inmunes que se midieron, no obstante, no se pueden discutir estos resultados a cabalidad, y se requerirían de más estudios para comprender los patrones observados. Además, las crías que nacieron en territorio con sustrato arena no se cambiaron a lugares aledaños, mientras que los territorios que tenían canto rodado o sustrato mixto fueron los lugares que más recambio de crías tuvieron.

En términos de las observaciones conductuales que se realizaron a lo largo del muestro para calcular comportamientos que podrían estar asociados con niveles altos estrés, no se registraron agresiones entre crías, ni agresiones

de las hembras adultas a las crías, esto quizá se debe a que la densidad poblacional no fue alta por lo que la probabilidad de molestarse entre sí es menor. Tampoco se observó el robo de leche, comportamiento que se ha reportado para esta especie (Le Boeuf y Law, 1994; Reiter et al., 1978). Es probable que este comportamiento no se haya observado debido a que no se realizó un muestreo con seguimiento focal durante el periodo de lactancia, que es cuando se suelen dar este tipo de interacciones, y la mayor parte del tiempo las crías de este estudio permanecieron con poca actividad o practicando el nado en pozas de marea cercanas y poco profundas, donde era poco probable la interacción entre animales. Estudios futuros podrían medir niveles de cortisol y ACTH en suero para contar con un marcador biológico de niveles subclínicos de estrés.

## CONCLUSIONES

Los recursos que las crías adquieren durante la lactancia son esenciales para responder a desafíos inmunes inespecíficos durante la etapa post-destete.

Existen diferencias entre sexos en la inhibición sérica del crecimiento bacteriano, pero no en la respuesta a PHA, lo que podría deberse a diferencias en el costo de ambas respuestas y en la posible diferenciación en la asignación de los recursos entre hembras y machos durante su desarrollo temprano.

El territorio en el cual nacen las crías tiene relevancia para las respuestas inmunes inespecíficas, lo que posiblemente impacte su probabilidad de supervivencia.

Esta tesis generó conocimiento que ayudará a entender la importancia de algunas características de la historia de vida de las crías de los elefantes marinos del Norte, como el ayuno prolongado que experimentan en tierra después del nacimiento y la importancia de los diversos factores que están interactuando para alterar la supervivencia en etapas del desarrollo temprano.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkhaleq, L.A., Assi, M.A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y.H., Hezmee, M.N.M., 2018. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet. World* 11, 627–635.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Acevedo-Whitehouse, K., Duffus, A.L.J., 2009. Effects of environmental change on wildlife health. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 3429–3438.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0128>
- Addis, T., 1948. Food protein effect on plasma specific gravity, plasma protein, and hematocrit value. *J. Exp. Med.* 87, 353–368.  
<https://doi.org/10.1084/jem.87.4.353>
- Alberts, B., Johnston, A., Lewis, J., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, USA.
- Anderson, S.S., Burton, R.W., Summers, C.F., 1975. Behaviour of grey seals (*Halichoerus grypus*) during a breeding season at North Rona. *J. Zool.* 177, 179–195.
- Archipiélago San Benito [WWW Document], n.d. URL  
<http://www.islas.org.mx/esp/islasanbenito.htm> (accessed 12.8.17).
- Arumugam, T.V., Magnus, T., Woodruff, T.M., Proctor, L.M., Shiels, I.A., Taylor, S.M., 2006. Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. *Clin. Chim. Acta* 374, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.010>
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Banuet-Martínez, M., Espinosa-de Aquino, W., Elorriaga-Verplancken, F.R., Flores-Morán, A., García, O.P., Camacho, M., Acevedo-Whitehouse, K., 2017. Climatic anomaly affects the immune competence of California sea lions. *PLoS ONE* 12, e0179359.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179359>
- Bartholomew, G.A., Hubbs, C.L., 1960. Population growth and seasonal movements of the northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *Mammalia* 24: 313–324.

- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496. [https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4\\_ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493)
- Bell, C.M., Hindell, M.A., Burton, H.R., 1997. Estimation of body mass in the Southern elephant seal, *Mirounga leonina*, by photogrammetry and morphometrics. *Mar. Mammal Sci.* 13, 669–682. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1997.tb00090.x>
- Black, P.H., 2002. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* 16, 622–653. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00021-1)
- Bohonak, A., Van der Linde, K., 2004. Reduced Major Axis Regression @ [www.kimvdlinde.com](http://www.kimvdlinde.com) [WWW Document]. URL <http://www.kimvdlinde.com/professional/rma.html> (accessed 10.6.18).
- Boness, D.J., Bowen, W.D., 1996. The evolution of maternal care in pinnipeds. *BioScience* 46, 645–654. <https://doi.org/10.2307/1312894>
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161, 367–379. <https://doi.org/10.1086/346134>
- Bostik, P., Takahashi, Y., Mayne, A.E., Ansari, A.A., 2010. Innate immune natural killer cells and their role in HIV and SIV infection. *HIV Ther.* 4, 483–504. <https://doi.org/10.2217/HIV.10.28>
- Briggs, K.T., 1974. Dentition of the Northern elephant seal. *J. Mammal.* 55, 158–171. <https://doi.org/10.2307/1379264>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science* 303, 1532–1535.
- Brock, P.M., 2012. Immunity, life history and conservation in the Galapagos sea lion. University of Leeds.
- Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M., Acevedo-Whitehouse, K., 2013. Applying the tools of ecological immunology to conservation: a test case in the Galapagos sea lion: Ecological immunology in the Galapagos sea lion. *Anim. Conserv.* 16, 19–31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2012.00567.x>

- Brock, P.M., Murdock, C.C., Martin, L.B., 2014. The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integr. Comp. Biol.* 54, 353–362. <https://doi.org/10.1093/icb/icu046>
- Brown, G.P., Shilton, C.M., Shine, R., 2011. Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*: Measuring immunocompetence in anurans. *Methods Ecol. Evol.* 2, 341–348. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00090.x>
- Carr, R., 2000. Neutrophil Production and Function in Newborn Infants. *Br. J. Haematol.* 110, 18–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01992.x>
- Cassat, J.E., Skaar, E.P., 2013. Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe* 13, 509–519. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010>
- Champagne, C.D., 2005. Glucose production and substrate cycle activity in a fasting adapted animal, the Northern elephant seal. *J. Exp. Biol.* 208, 859–868. <https://doi.org/10.1242/jeb.01476>
- Champagne, C.D., Crocker, D.E., Fowler, M.A. Houser, D.S., 2012. Fasting physiology of the pinnipeds: the challenges of fasting while maintaining high energy expenditure and nutrient delivery for lactation. En: M.D. McCue (Ed.), *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer, Berlin.
- Cherayil, B.J., 2015. Pathophysiology of iron homeostasis during inflammatory states. *J. Pediatr.* 167, S15–S19. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.07.015>
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Sboarina, A., Vella, A., 2017. The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 815-831. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1417711>
- Crocker, D.E., Williams, J.D., Costa, D.P., Le Boeuf, B.J., 2001. Maternal traits and reproductive effort in Northern elephant seals. *Ecology* 82, 3541–3555. <https://doi.org/10.1890/0012-9658>
- Dailey, R.E., Fontaine, C.M., Avery, J.P., 2016. Endocrine response to realimentation in young northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*): Indications for development of fasting adaptation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 235, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.009>



- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402. <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- Day, M.J., 2007. Immune system development in the dog and cat. *J. Comp. Pathol.* 137, S10–S15. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.04.005>
- de Bruyn, P., Bester, M., Carlini, A., Oosthuizen, W., 2009. How to weigh an elephant seal with one finger: a simple three-dimensional photogrammetric application. *Aquat. Biol.* 5, 31–39. <https://doi.org/10.3354/ab00135>
- Demas, G.E., Chefer, V., Talan, M.I., Nelson, R.J., 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* 273, R1631–R1637. <https://doi.org/10.1152/ajpregu>.
- Demas, G.E., Nelson, R.J. 2011. *Ecoimmunology*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., Cheng, G., 2003. The art of war: innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2604–2621. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3180-y>
- Dierauf, L., Gulland, F.M.D., 2001. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*, 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press.
- Dowling, D.J., Levy, O., 2014. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol.* 35, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.007>
- Downs, C.J., Adelman, J.S., Demas, G.E., 2014. Mechanisms and methods in ecoimmunology: Integrating within-organism and between-organism processes. *Integr. Comp. Biol.* 54, 340–352. <https://doi.org/10.1093/icb/icu082>
- Elorriaga-Verplancken, F., 2015. Current status of the California sea lion (*Zalophus californianus*) and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) at the San Benito Archipelago, Mexico. *Cienc. Mar.* 41, 269–281. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2545>
- Emlen, S., Oring, L., 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197, 215–223. <https://doi.org/10.1126/science.327542>
- Fabian, D., Flatt, T., 2012. Life History Evolution. *Nature Education* 3 (10):24.

- Flatt, T., Heyland, A., 2011. Mechanisms of life history evolution. Oxford, New York.
- Folstad, I., Karter, A.J., 1992. Parasites, bright males, and the Immunocompetence handicap. *Am. Nat.* 139, 603–622.
- Freire, M.O., Van Dyke, T.E., 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontol.* 2000 63, 149–164. <https://doi.org/10.1111/prd.12034>
- French, S.S., Moore, M.C., 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.04.007>
- French, S.S., Moore, M.C., Demas, G.E., 2009. Ecological immunology: The organism in context. *Integr. Comp. Biol.* 49, 246–253. <https://doi.org/10.1093/icb/icp032>
- Gales, N., Burton, H., 1987. Ultrasonic measurement of blubber thickness of the Southern elephant seal, *Mirounga leonina* (Linn). *Aust. J. Zool.* 35, 207. <https://doi.org/10.1071/ZO9870207>
- Gao, S., Tang, Y., Wei, K., Wang, X., Yang, Z., Zhang, Y., 2016. Relationships between body size and parasitic fitness and offspring performance of *Sclerodermus pupariae* Yang et Yao (Hymenoptera: Bethyilidae). *PLoS ONE* 11, e0156831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156831>
- García-Aguilar, M.C., 2003. Maternal care in the California sea lion at Los Islotes, Gulf of California, Mexico. *Cienc. Mar.* 29, 573–583. <https://doi.org/10.7773/cm.v29i42.199>
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Graham, J.E., Christian, L.M., Kiecolt-Glaser, J.K., 2006. Stress, age, and immune function: Toward a Lifespan Approach. *J. Behav. Med.* 29, 389–400. <https://doi.org/10.1007/s10865-006-9057-4>
- Gregory D. Bossart, Thomas H. Reidarson, Leslie A. Dierauf, Deborah A. Duffield, 2001. Pathology of Marine Mammals, in: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine Health, Disease, and Rehabilitation*. United States of America, pp. 383–436.

- Guilmot, A., Hermann, E., Braud, V.M., Carlier, Y., Truyens, C., 2011. Natural Killer cell responses to infections in early life. *J. Innate Immun.* 3, 280–288. <https://doi.org/10.1159/000323934>
- Hall, A.J., Engelhard, G.H., Brasseur, S.M.J., Vecchione, A., Burton, H.R., Reijnders, P.J., 2003. The immunocompetence handicap hypothesis in two sexually dimorphic pinniped species—is there a sex difference in immunity during early development? *Dev. Comp. Immunol.* 27, 629–637. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00029-6)
- Hamilton, W.D., Zuk, M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218, 384–387. <https://doi.org/10.1126/science.7123238>
- Hobson, K.A., Alisauskas, R.T., Clark, R.G., 1993. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: Implications for isotopic analyses of diet. *The Condor* 95, 388. <https://doi.org/10.2307/1369361>
- Holt, P.G., 1998. Programming for responsiveness to environmental antigens that trigger allergic respiratory disease in adulthood is initiated during the perinatal period. *Environ. Health Perspect.* 106, 795.
- Houston, A.I., McNamara, J.M., Barta, Z., Klasing, K.C., 2007. The effect of energy reserves and food availability on optimal immune defence. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 2835–2842. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0934>
- Huber, H.R., 1987. Natality and weaning success in relation to age of first reproduction in northern elephant seals. *Can. J. Zool.* 65, 1311–1316.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295.
- Janeway, C., Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M., 2009. *Inmunobiología de Janeway*. McGraw-Hill, México.
- Janeway, C.A., 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13, 11–16.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

- Kennedy, M., Nager, R., 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 653–655. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.017>
- Keogh, M.J., Maniscalco, J.M., Atkinson, S., 2010. Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) pups undergo a decrease in circulating white blood cells and the ability of T cells to proliferate during early postnatal development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.05.008>
- Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kretzmann, M.B., Costa, D.P., Le Boeuf, B.J., 1993. Maternal Energy Investment in Elephant Seal Pups: Evidence for Sexual Equality? *Am. Nat.* 141, 466–480. <https://doi.org/10.1086/285484>
- Kurle, C.M., Worthy, G.A.J., 2001. Stable isotope assessment of temporal and geographic differences in feeding ecology of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their prey. *Oecologia* 126, 254–265. <https://doi.org/10.1007/s004420000518>
- Kutzer, M.A.M., Armitage, S.A.O., 2016. Maximising fitness in the face of parasites: a review of host tolerance. *Zoology.* <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.05.011>
- LaBarbera, M., 1989. Analyzing body size as a factor in ecology and evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, 97–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.000525>
- Laws, R.M., 1956. The elephant seal (*Mirounga leonina* Linn.). II. General social and reproductive behavior. Falkland Islands Dependencies Survey, London.
- Le Boeuf, B.J., 1972. Sexual behavior in the northern elephant seal *Mirounga angustirostris*. *Behaviour* 41, 1–26.
- Le Boeuf, B.J., Crocker, D.E., Costa, D.P., Blackwell, S.B., Webb, P.M., Houser, D.S., 2000. Foraging ecology of northern elephant seals. *Ecol. Monogr.* 70, 353–382.

- Le Boeuf, B.J., Richard Condit, Joanne Reiter, 1989. Parental investment and the secondary sex ratio in Northern elephant seals. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 25, 109–117.
- Le Boeuf, B.J.L., Law, R.M., 1994. *Elephant Seals: Population ecology, behavior, and physiology*. University of California Press.
- Lindenfors, P., Tullberg, B., Biuw, M., 2002. Phylogenetic analyses of sexual selection and sexual size dimorphism in pinnipeds. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 52, 188–193. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0507-x>
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87–98.
- Louis, C., Perdaens, L., Suci, S., Tavoni, S.K., Crocker, D.E., Debier, C., 2015. Mobilisation of blubber fatty acids of northern elephant seal pups (*Mirounga angustirostris*) during the post-weaning fast. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 183, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.008>
- Lowry, M., 2014. Abundance, Distribution, and population growth of the Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) in the United States from 1991 to 2010. *Aquat. Mamm.* 40, 20–31. <https://doi.org/10.1578/AM.40.1.2014.20>
- Marquardt, D.W., 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–441.
- Marshall, G.D., Agarwal, S.K., Lloyd, C., Cohen, L., Henninger, E.M., Morris, G.J., 1998. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain. Behav. Immun.* 12, 297–307. <https://doi.org/10.1006/brbi.1998.0537>
- Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, K.C., Wikelski, M., 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct. Ecol.* 20, 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x>
- Martin, L.B., Scheuerlein, A., Wikelski, M., 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 153–158. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2185>

- Mauget, C., Mauget, R., Sempéré, A., 1997. Metabolic rate in female European roe deer (*Capreolus capreolus*): incidence of reproduction. *Can. J. Zool.* 75, 731–739. <https://doi.org/10.1139/z97-094>
- McDONELL, W., 1972. Anesthesia of the harp seal. *J. Wildl. Dis.* 8, 287–295. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-8.3.287>
- McFadden, K.W., Worthy, G.A.J., Lacher, T.E., 2006. Photogrammetric Estimates of Size and Mass in Hawaiian Monk Seals (*Monachus schauinslandi*). *Aquat. Mamm.* 32, 31–40. <https://doi.org/10.1578/AM.32.1.2006.31>
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Meise, K., Mueller, B., Zein, B., Trillmich, F., 2014. Applicability of single-camera photogrammetry to determine body dimensions of pinnipeds: Galapagos sea lions as an example. *PLoS ONE* 9, e101197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101197>
- Merlo, M.J.L., Cutrera, D.A.P., Zenuto, D.R.R., 2014. Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the tuco-tuco *Ctenomys talarum*: implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents. *Can. J Zool.* 92, 689–697.
- Michael, E., Bundy, D.A.P., 1992. Protein content of CBA/Ca mouse diet: relationship with host antibody responses and the population dynamics of *Trichuris muris* (Nematoda) in repeated infection. *Parasitol.* 105, 139–150.
- Møller, A.P., Alatalo, R.V., 1999. Good-genes effects in sexual selection. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266, 85–91.
- Moreno, J., de León, A., Fargallo, J., Moreno, E., 1998. Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. *Oecologia* 115, 312–319.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290, 1166–1168.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852.

- National Oceanic and Atmospheric Administration [WWW Document], n.d. URL [http://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/enso\\_disc\\_apr2016/](http://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/enso_disc_apr2016/) (accessed 9.9.18).
- Neff, B.D., Pitcher, T.E., 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol. Ecol.* 14, 19–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02395.x>
- Nesargikar, P., Spiller, B., Chavez, R., 2012. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2, 103–111. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.2.2>
- Newsome, S.D., Koch, P.L., Etnier, M.A., Aurióles-Gamboa, D., 2006. Using carbon and nitrogen isotope values to investigate maternal strategies in northeast pacific otariids. *Mar. Mammal Sci.* 22, 556–572. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2006.00043.x>
- Noren, D.P., Crocker, D.E., Williams, T.M., Costa, D.P., 2003. Energy reserve utilization in northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) pups during the postweaning fast: size does matter. *J. Comp. Physiol. B* 173, 443–454. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0353-9>
- Nowak, J., Pawłowski, B., Borkowska, B., Augustyniak, D., Drulis-Kawa, Z., 2018. No evidence for the immunocompetence handicap hypothesis in male humans. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25694-0>
- Ortiz, C.L., Costa, D., Le Boeuf, B.J., 1978. Water and energy flux in elephant seal pups fasting under natural conditions. *Physiol. Zool.* 51, 166–178. <https://doi.org/10.1086/physzool.51.2.30157864>
- Ortiz, R., 2003. GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Endocrinol.* 178, 533–539. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780533>
- Ortiz, R.M., Noren, D.P., Ortiz, C.L., Talamantes, F., 2003. GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Endocrinol.* 178, 533–539.
- Owen, J., Punt, J., Jones, P., 2013. *Inmunología de Kuby*, 7<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill.
- Patel, H., Patel, V.H., 2015. Inflammation and metabolic syndrome: An overview. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.* 3, 263–268. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.3.10>

- Peig, J., Green, A.J., 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- PrabhuDas, M., Adkins, B., Gans, H., King, C., Levy, O., Ramilo, O., Siegrist, C.-A., 2011. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat. Immunol.* 12, 189–194. <https://doi.org/10.1038/ni0311-189>
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. <https://www.R-project.org>
- Rauw, W.M., 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00267>
- Rea, L.D., Costa, D.P., 1992. Changes in standard metabolism during long-term fasting in Northern elephant seal pups (*Mirounga angustirostris*). *Physiol. Zool.* 65, 97–111.
- Reiter, J., Panken, K.J., Le Boeuf, B.J., 1981. Female competition and reproductive success in northern elephant seals. *Anim. Behav.* 29, 670–687.
- Reiter, J., Stinson, N.L., Le Boeuf, B.J., 1978. Northern elephant seal development: the transition from weaning to nutritional independence. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 3, 337–367.
- Richards, D.M., Hettinger, J., Feuerer, M., 2012. Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions. *Cancer Microenviron.* 6, 179–191. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0123-x>
- Riedman, M., Ortiz, C.L., 1979. Changes in milk composition during lactation in the Northern elephant seal. *Physiol. Zool.* 52, 240–249. <https://doi.org/10.1086/physzool.52.2.30152567>
- Riedman, M.L., Le Boeuf, B.J., 1982. Mother-pup separation and adoption in northern elephant seals. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11, 203–215.
- Roberts, M.L., Buchanan, K.L., Evans, M.R., 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim. Behav.* 68, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.001>



- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S., 2012. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 9–22. <https://doi.org/10.1038/nri3341>
- Ross, P.S., Pohajdak, B., Bowen, W.D., Addison, R.F., 1993. Immune function in free-ranging harbor seal (*Phoca vitulina*) mothers and their pups during lactation. *J. Wildl. Dis.* 29, 21–29. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-29.1.21>
- Saino, N., Møller, A.P., 1996. Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behav. Ecol.* 7, 227–232.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* 182.
- Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2, 947–950.
- Segerstrom, S.C., Miller, G.E., 2004. Psychological stress and the human immune system: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychol. Bull.* 130, 601–630. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Seguel, M., Muñoz, F., Keenan, A., Perez-Venegas, D.J., DeRango, E., Paves, H., Gottdenker, N., Müller, A., 2016. Hematology, serum chemistry, and early hematologic changes in free-ranging South American fur seals (*Arctocephalus australis*) at Guafo Island, Chilean Patagonia. *J. Wildl. Dis.* 52, 663–668. <https://doi.org/10.7589/2015-11-293>
- Somo, D.A., Ensminger, D.C., Sharick, J.T., Kanatous, S.B., Crocker, D.E., 2015. Development of dive capacity in Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*): Reduced body reserves at weaning are associated with elevated body oxygen stores during the postweaning fast. *Physiol. Biochem. Zool.* 88, 471–482. <https://doi.org/10.1086/682386>
- Sorrells, S.F., Sapolsky, R.M., 2007. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain. Behav. Immun.* 21, 259–272. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.00>

- Spraker, T.R., Lyons, E.T., Kuzmina, T.A., Tift, M.S., Raverty, S., Jaggi, N., Crocker, D.E., 2014. Causes of death in preweaned Northern elephant seal pups (*Mirounga angustirostris*, Gill, 1866), Año Nuevo State Reserve, California, 2012. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1040638714523427.
- Stearns, S.C., 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Funct. Ecol.* 3, 259. <https://doi.org/10.2307/2389364>
- Stockwin, L.H., McGonagle, D., Martin, I.G., Blair, G.E., 2000. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 78, 91–102.
- Strandberg, U., Käkälä, A., Lydersen, C., Kovacs, K.M., Grahl-Nielsen, O., Hyvärinen, H., Käkälä, R., 2008. Stratification, composition, and function of marine mammal blubber: The ecology of fatty acids in marine mammals. *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 473–485. <https://doi.org/10.1086/589108>
- Strunk, T., Doherty, D., Richmond, P., Simmer, K., Charles, A., Levy, O., Liyanage, K., Smith, T., Currie, A., Burgner, D., 2008. Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 94, F230–F231. <https://doi.org/10.1136/adc.2008.143438>
- Suárez, R., Buevas, N., 2015. El inflamasoma: mecanismos de activación. *Invest. Clín.* 56.
- Swain, P., Nayak, S.K., 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.04.008>
- Tamaro, G., Morena, C., Uxa, F., Candusso, M., Trappan, A., de Vonderweid, U., 1993. Serum immunoglobulin and complement levels in prematures with parenteral feeding--preliminary results. *Allerg. Immunol. (Leipz.)* 25, 19–21.
- Tegla, C.A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V., Niculescu, F., Rus, H., 2011. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol. Res.* 51, 45–60. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8239-5>
- Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J., Smith, A., 2010. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. *Int. J. Parasitol.* 40, 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.009>

- Tieleman, I., Williams, J.B., Ricklefs, R.E., Klasing, K.C., 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272, 1715–1720.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3155>
- Trillmich, F., 1996. Parental Investment in Pinnipeds, in: *Advances in the study of behavior*. Elsevier, pp. 533–577. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60342-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60342-3)
- Turmelle, A.S., Ellison, J.A., Mendonça, M.T., McCracken, G.F., 2010. Histological assessment of cellular immune response to the phytohemagglutinin skin test in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *J. Comp. Physiol. B* 180, 1155–1164.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-010-0486-6>
- Vera-Massieu, C., Brock, P.M., Godinez-Reyes, C., Acevedo-Whitehouse, K., 2015. Activation of an inflammatory response is context-dependent during early development of the California sea lion. *R. Soc. Open Sci.* 2, 150108–150108. <https://doi.org/10.1098/rsos.150108>
- Vergnolle, N., 2003. The inflammatory response. *Drug Dev. Res.* 59, 375–381.  
<https://doi.org/10.1002/ddr.10306>
- Verhulst, S., Dieleman, S.J., Parmentier, H.K., 1999. A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4478–4481.
- Viswanathan, K., Dhabhar, F.S., 2005. Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5808–5813. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501650102>
- Vitlic, A., Lord, J.M., Phillips, A.C., 2014. Stress, ageing and their influence on functional, cellular and molecular aspects of the immune system. *Age* 36. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9631-6>
- Ward, A.E., Rosenthal, B.M., 2014. Evolutionary responses of innate immunity to adaptive immunity. *Infect. Genet. Evol.* 21, 492–496.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.021>
- Webster, T., Dawson, S., Slooten, E., 2010. A simple laser photogrammetry technique for measuring Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*) in the field. *Mar. Mammal Sci.* 26, 296–308. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00326.x>

- Weller, P.F., Spencer, L.A., 2017. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 746–760. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>
- Willisch, C.S., Marreros, N., Neuhaus, P., 2013. Long-distance photogrammetric trait estimation in free-ranging animals: A new approach. *Mamm. Biol. - Z. Für Säugetierkd.* 78, 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.02.004>
- Winkelstein, A., Sacher, R., Kaplan, S., Roberts, G., 1998. *White Cell Manual*, 5th ed. F.A Davis, Philadelphia, USA.
- Yochem, P.K., Stewart, B.S., Mazet, J.A.K., Boyce, W.M., 2008. Hematologic and serum biochemical profile of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*): variation with age, sex, and season. *J. Wildl. Dis.* 44, 911–921. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.4.911>
- Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., Lennon-Duménil, A.-M., 2013. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 475–486. <https://doi.org/10.1038/nri3469>
- Zhang, Z., Jin, C., Qu, K., Caviedes-Vidal, E., 2017. Immune responsiveness to phytohemagglutinin displays species but not sex differences in three anuran species. *PeerJ* 5, e3181. <https://doi.org/10.7717/peerj.3181>
- Zuur, A., Ieno, E., Walker, E., Saveliev, N., Smith, G., 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. New York: Springer Press.

## ANEXO I

Se realizaron correlaciones de Spearman entre las variables explicativas como se puede observar en los cuadros 14 y15.

**Cuadro 14.** Correlaciones de Pearson entre los indicadores de recursos de crías recién destetadas (0 días post-destete).

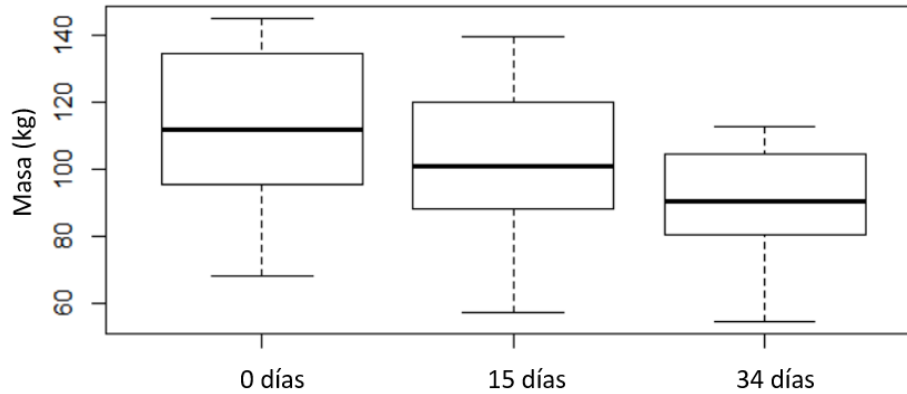
0 días post-destete	Masa	Masa escalar	Condición corporal	Capa grasa lateral	Capa grasa dorsal	Glucosa	Gravedad específica	δN15
Masa	-	<b>0.33</b>	<b>0.65</b>	<b>0.56</b>	<b>0.54</b>	-0.28	<b>0.47</b>	0.32
Masa escalar	0.036	-	<b>-0.03</b>	0.06	-0.07	-0.27	0.096	-0.03
Condición corporal	3.7x10 <sup>-6</sup>	0.032	-	0.26	0.14	-0.30	0.20	0.08
Capa grasa lateral	1.0x 10 <sup>-3</sup>	0.669	0.098	-	<b>0.68</b>	<b>-0.43</b>	0.22	0.12
Capa grasa dorsal	2.0x10 <sup>-3</sup>	0.659	0.362	1.3x10 <sup>-6</sup>	-	<b>-0.35</b>	<b>0.47</b>	0.29
Glucosa	0.075	0.086	0.054	0.005	0.024	-	-0.17	0.059
Gravedad específica	0.002	0.560	0.199	0.161	0.002	0.289	-	0.21
N15	0.057	0.854	0.618	0.465	0.086	0.744	0.22	-

**Cuadro 15.** Correlaciones de Pearson entre los indicadores de recursos de crías durante el destete tardío (34 días post-destete).

34 días post-destete	Masa	Masa escalar	Condición corporal	Capa grasa lateral	Capa grasa dorsal	Glucosa	Gravedad específica	δN15
Masa	-	<b>0.41</b>	<b>0.80</b>	<b>0.59</b>	<b>0.56</b>	<b>0.35</b>	-0.02	0.19
Masa escalar	0.014	-	<b>0.87</b>	-0.11	-0.23	0.21	0.01	0.13
Condición corporal	1.1x10 <sup>-08</sup>	2.2e-11	-	0.26	0.14	<b>-0.30</b>	0.20	0.08
Capa grasa lateral	2.0x10 <sup>-03</sup>	0.524	0.182	-	<b>0.90</b>	0.18	-0.10	0.32
Capa grasa dorsal	5.0x10 <sup>-03</sup>	0.182	0.383	2.6x10 <sup>-13</sup>	-	0.18	-0.05	0.22
Glucosa	0.038	0.229	0.049	0.286	0.300	-	-0.12	0.16
Gravedad específica	0.902	0.919	0.898	0.580	0.775	0.479	-	-0.23
δN15	0.269	0.453	0.286	0.064	0.198	0.361	0.200	-

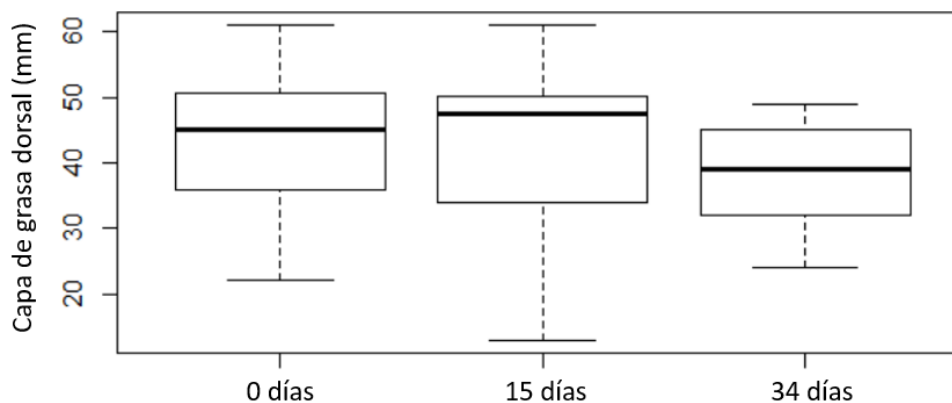
## ANEXO II

La masa de las crías varió entre las etapas de muestreo. Las crías perdieron cerca del 20% de su peso entre el primer y el último muestreo (ANOVA,  $F_{2,109}=10.18$ ,  $p=8.88 \times 10^{-5}$ ; Fig. 48).



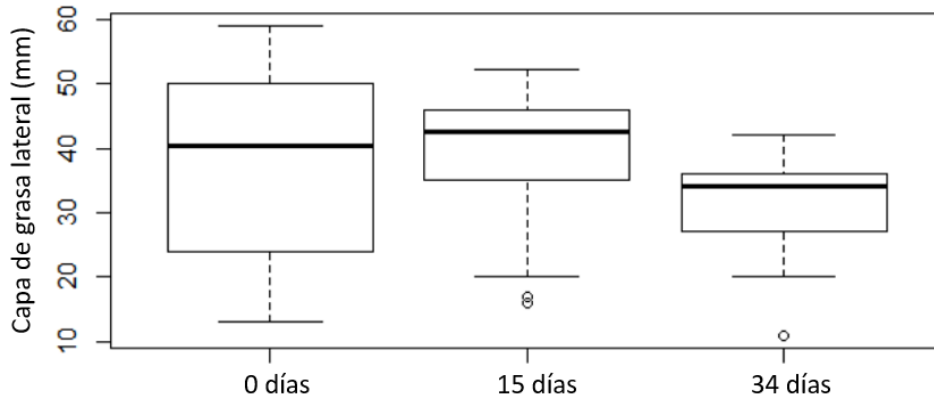
**Figura 48.** Masa de las crías de elefante marino del Norte en las etapas del muestreo.

El grosor de la capa de grasa dorsal cambió significativamente en las tres etapas del muestreo (ANOVA,  $F_{2,109}=4.226$ ,  $p=0.0171$ ; Fig. 49), con una disminución marcada en la etapa del destete tardío, consistente con los resultados de la masa obtenida mediante el modelo.



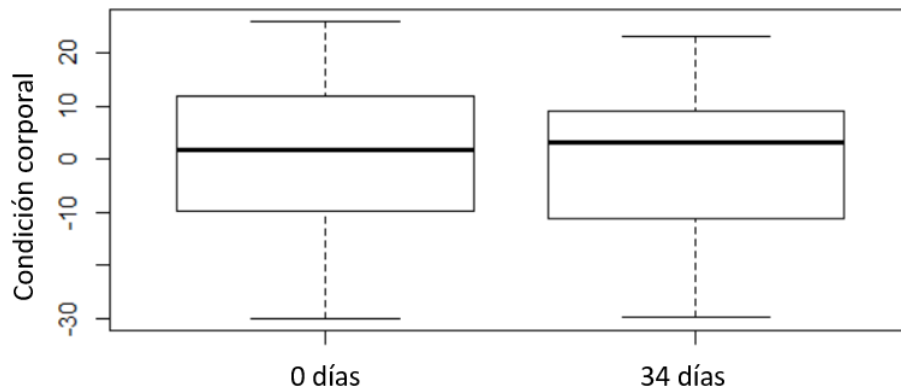
**Figura 49.** Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino del Norte en las etapas del muestreo.

Se observó un patrón similar en las medidas de la capa de grasa lateral de los tres muestreos (Kruskal-Wallis,  $X^2= 12.785$ ,  $gl=2$ ,  $p= 0.001$ ; Fig. 50) entre las tres etapas, con una disminución en la etapa de destete tardío parecida a la observada para la masa y al grosor de la capa de grasa dorsal.



**Figura 50.** Capa de grasa lateral de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

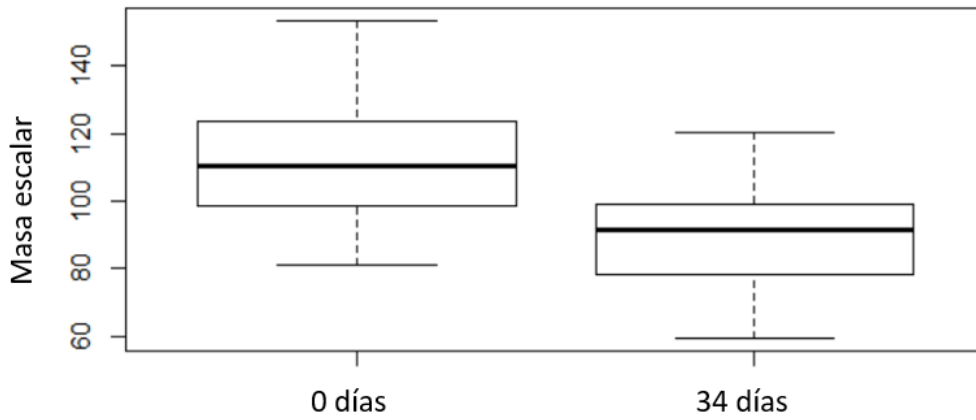
La condición corporal no varió entre ambas etapas del muestreo (Prueba de t de dos colas,  $t= -2.512 \times 10^{-18}$ ,  $gl=72$   $p=1$ ; Fig. 51).



**Figura 51.** Capa de grasa lateral de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

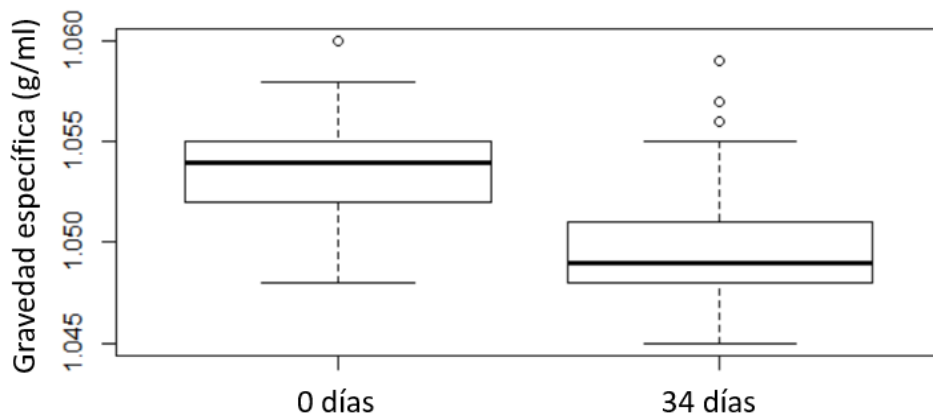


La masa escalar de las crías varió entre etapas (Prueba de t de dos colas,  $t=5.622$ ,  $gl=71.88$ ,  $p=3.374 \times 10^{-7}$ ; Fig.52).



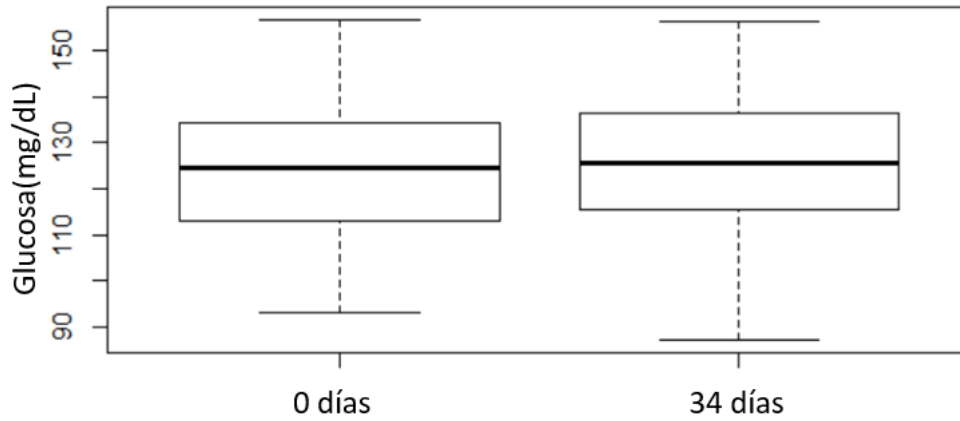
**Figura 52.** Masa escalar de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

La gravedad específica del plasma varió en ambas etapas del muestreo, siendo menor en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t=0.485$ ,  $gl=62.64$ ,  $p=8.717 \times 10^{-6}$ ; Fig. 53).



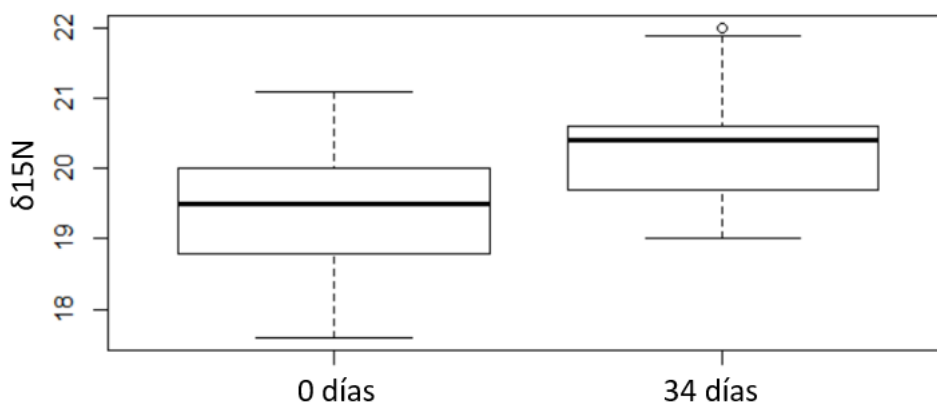
**Figura 53.** Gravedad específica del plasma de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

Los niveles de glucosa no variaron entre crías recién destetadas (0 días) y crías durante el destete tardío (34 días) (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.330$ ,  $gl=70.13$ ,  $p=0.742$ ; Fig. 54).



**Figura 54.** Cuantificación de glucosa en sangre de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

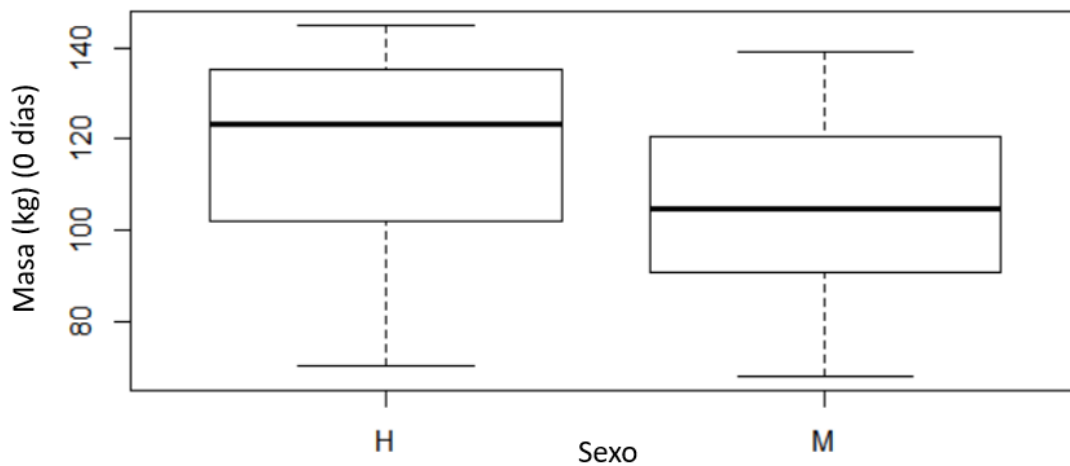
La señal isotópica  $\delta^{15}N$  de las vibrisas fue mayor a los 34 días post-destete (Prueba de t de dos colas,  $t= -4.156$ ,  $gl=64.601$ ,  $p=9.69 \times 10^{-5}$ ; Fig. 55).



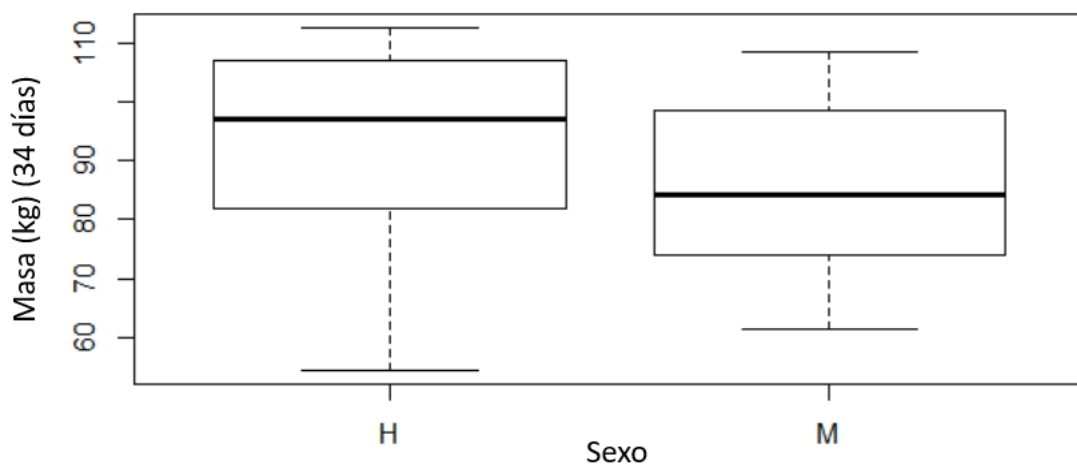
**Figura 55.** Señal isotópica  $\delta^{15}N$  de las vibrisas de crías del elefante marino del Norte en las etapas de muestreo.

### ANEXO III

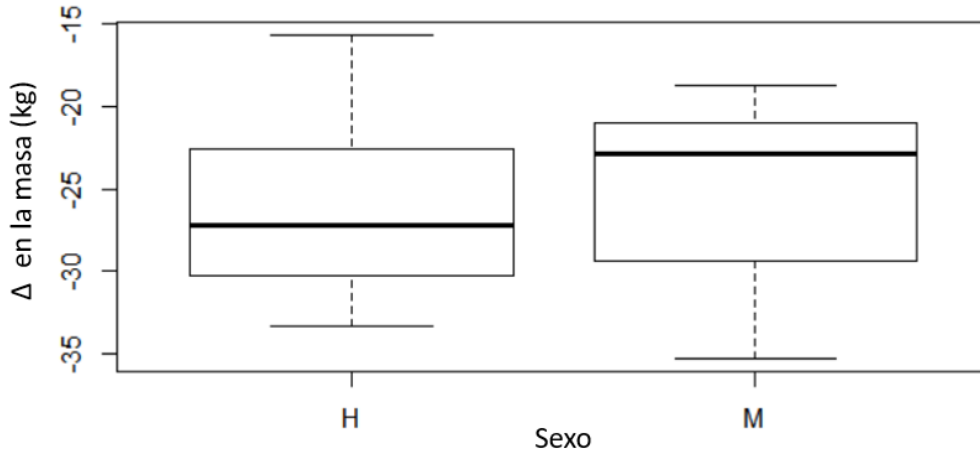
La masa de las crías de los elefantes marinos fue igual entre machos y hembras, tanto en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t= 1.609$ ,  $gl=37.93$ ,  $p=0.115$ ; Fig. 56) como en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t= 1.611$ ,  $gl=31.85$ ,  $p=0.116$ ; Fig. 57). Además, las crías macho y hembras presentaron el mismo cambio en la masa entre los dos muestreos (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.929$ ,  $gl=31.19$ ,  $p=0.359$ ; Fig. 58).



**Figura 56.** Masa de crías de elefante marino macho (M) y hembras (H) recién destetadas.

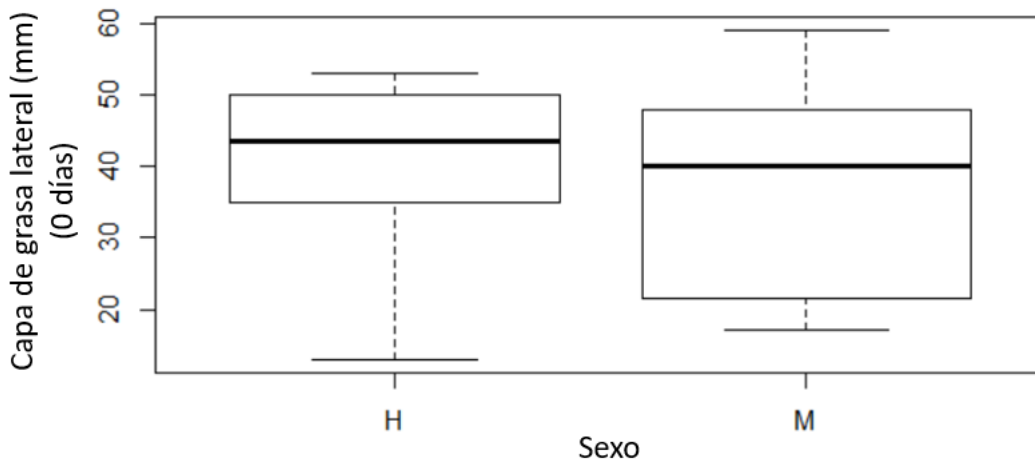


**Figura 57.** Masa de crías de elefante marino recién macho (M) y hembras (H) durante el destete tardío.

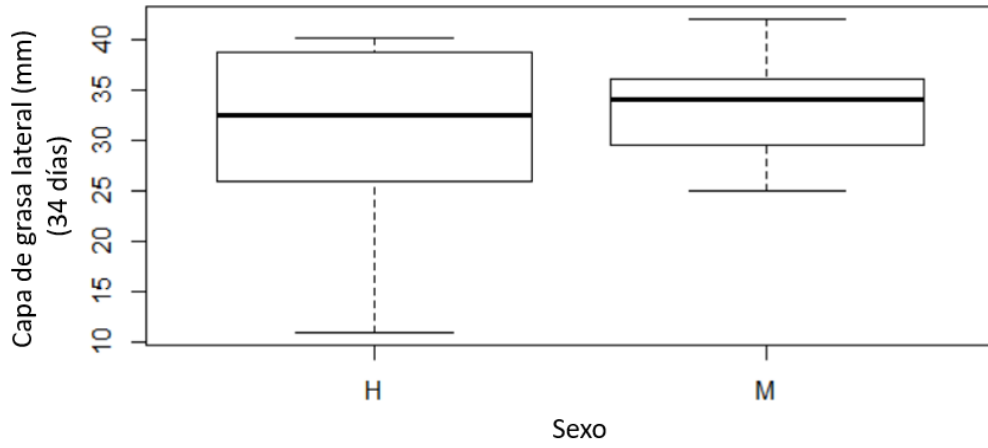


**Figura 58.** Cambio en la masa de las crías entre el primer y segundo muestreo. H= hembras, M= machos.

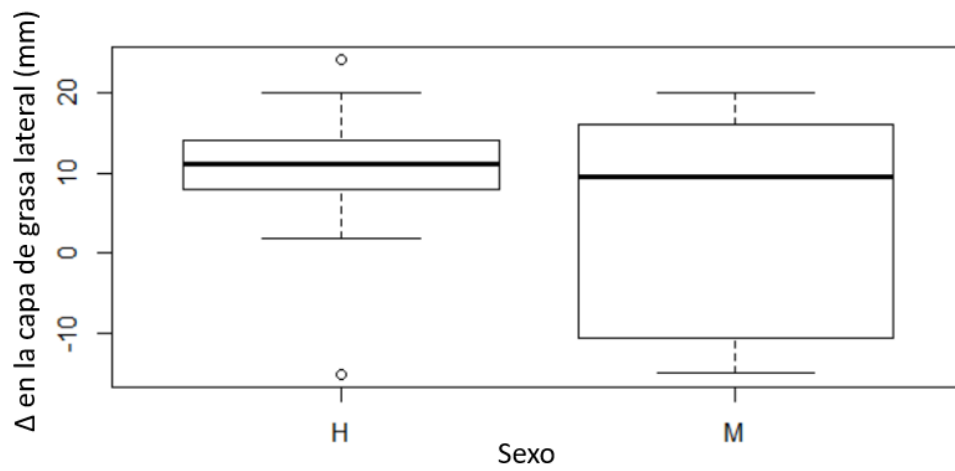
La capa de grasa lateral no varió entre sexos en la etapa de recién destetados (Rango Wilcoxon,  $W=226$ ,  $p=0.049$ ; Fig. 59) ni en la etapa post- destete (Rango Wilcoxon,  $W=125.5$ ,  $p=0.534$ ; Fig. 60). Tampoco varió el cambio entre etapas de la capa de grasa lateral entre sexos (Rango Wilcoxon,  $W=124$ ,  $p=0.506$ ; Fig. 61).



**Figura 59.** Capa de grasa lateral de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas.

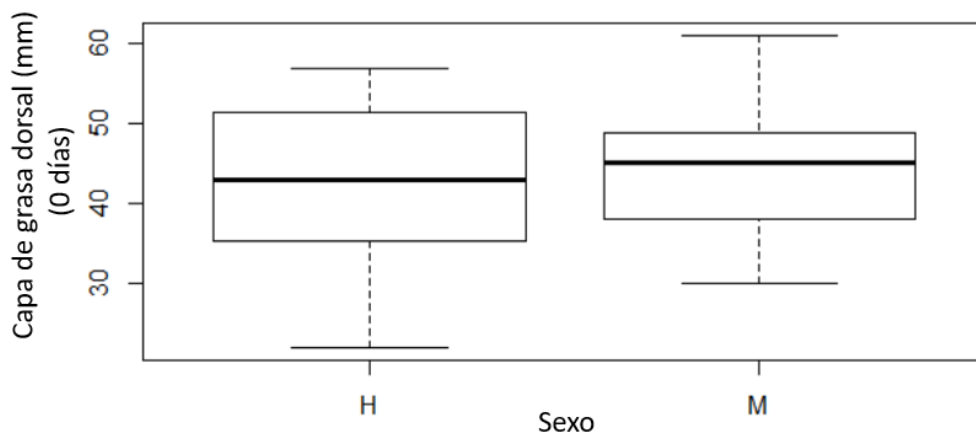


**Figura 60.** Capa de grasa lateral de crías de elefante marino del norte machos (M) y hembras (H) en el destete tardío (34 días).

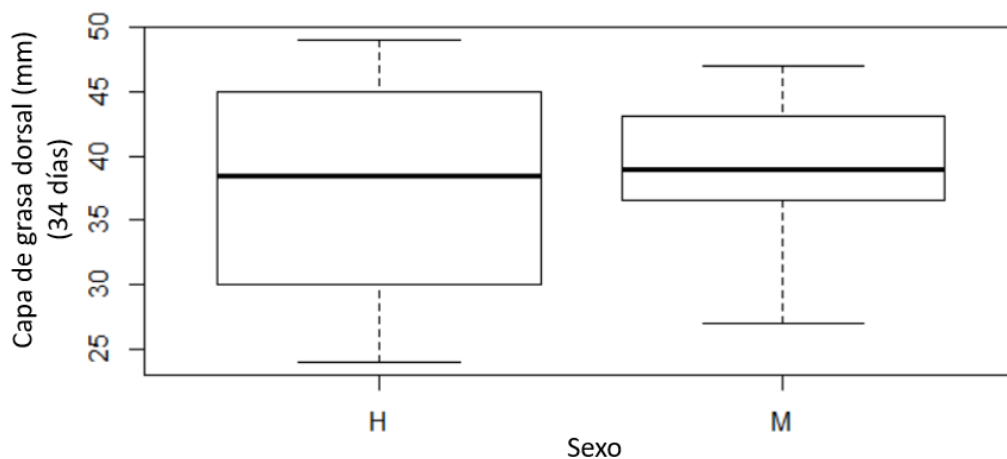


**Figura 61.** Cambio en la capa de grasa lateral de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo.

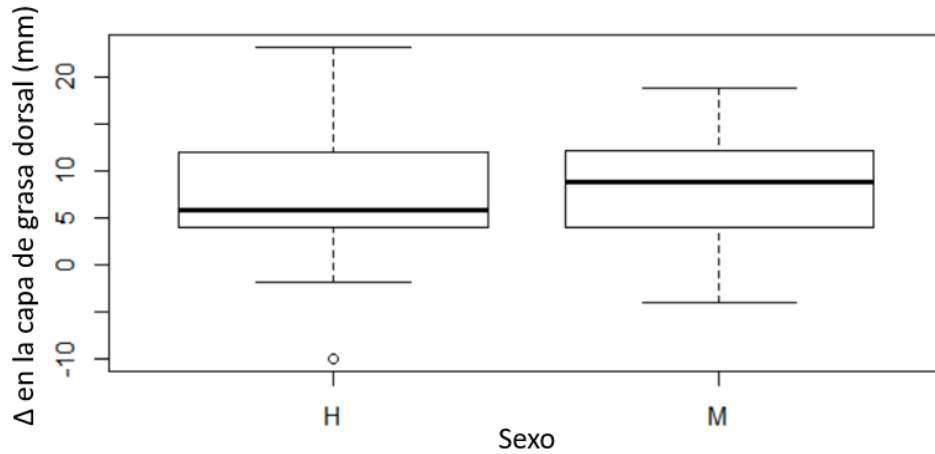
La capa de grasa dorsal no mostró diferencias significativas entre sexos en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.732$ ,  $gl=35.97$ ,  $p=0.468$ ; Fig. 62) y a los 34 días post-destete (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.651$ ,  $gl=30.23$ ,  $p=0.519$ ; Fig. 63). No se encontraron diferencias significativas en el cambio de la capa de grasa dorsal entre sexos (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.325$ ,  $gl=31.97$ ,  $p=0.747$ ; Fig. 64).



**Figura 62.** Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas.

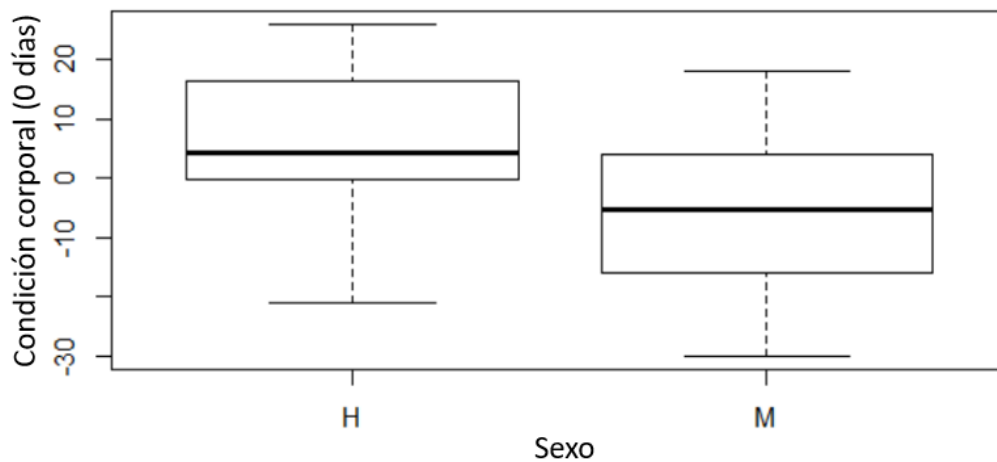


**Figura 63.** Capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), en el destete tardío.

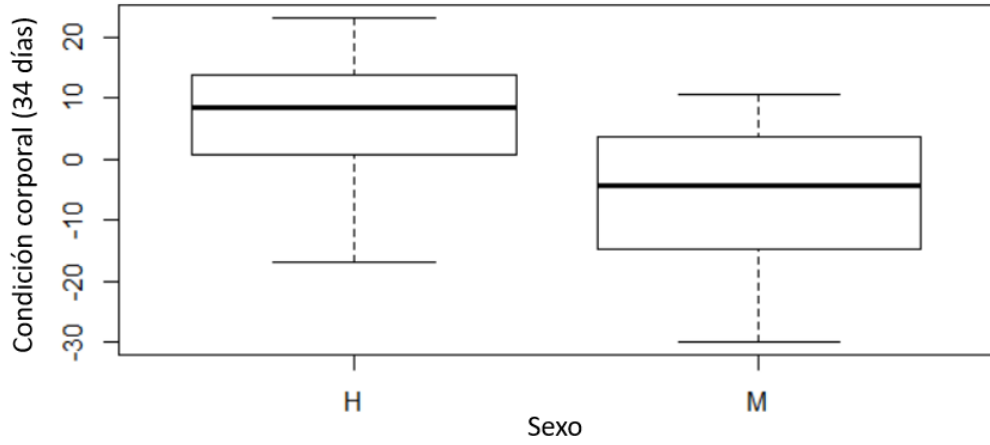


**Figura 64.** Cambio en la capa de grasa dorsal de las crías de elefante marino de acuerdo al sexo. H= hembras, M= machos.

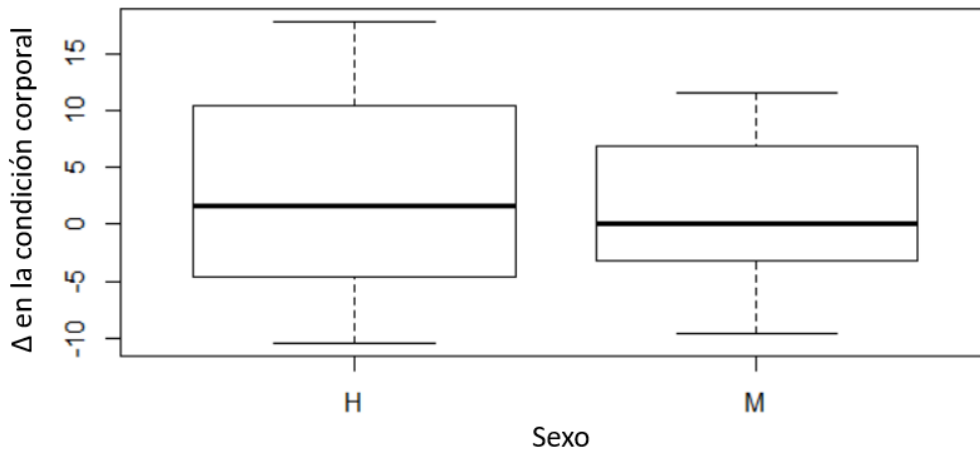
La condición corporal de las crías varió entre sexos en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t= 2.405$ ,  $gl=37.89$ ,  $p=0.021$ ; Fig. 65) y en a los 34 días post-destete (Prueba de t de dos colas,  $t= 2.792$ ,  $gl=30.55$ ,  $p=0.008$ ; Fig. 66). No varió entre sexos el cambio en la condición corporal (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.483$ ,  $gl=31.45$ ,  $p=0.632$ ; Fig. 67).



**Figura 65.** Condición corporal de las crías de elefante marino, machos (M) y hembras (H) recién destetadas.



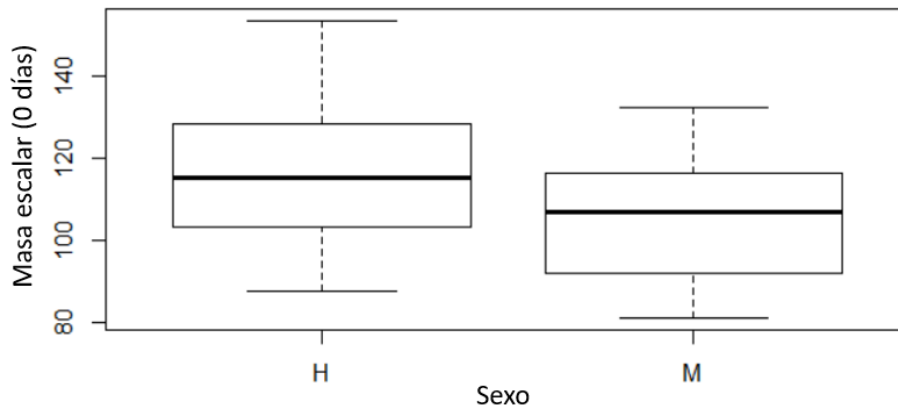
**Figura 66.** Condición corporal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), durante el destete tardío.



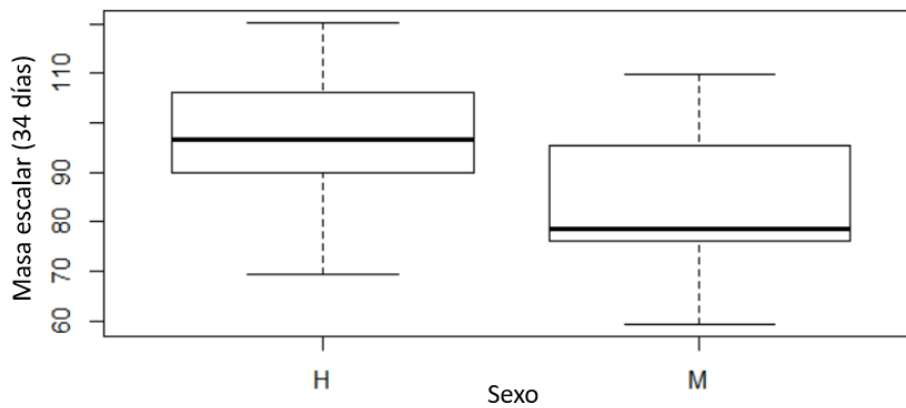
**Figura 67.** Cambio en la condición corporal de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H), entre las etapas de muestreo.



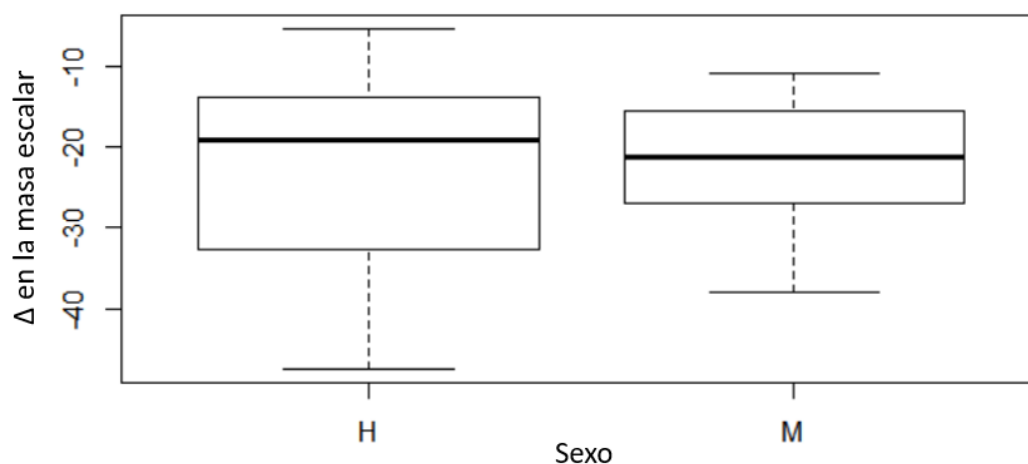
La masa escalar de las crías varió entre sexos en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t= 2.087$ ,  $gl=37.58$ ,  $p=0.043$ ; Fig. 68) y a los 34 días post-destete (Prueba de t de dos colas,  $t= 2.791$ ,  $gl=31.47$ ,  $p=0.008$ ; Fig. 69). No se encontraron diferencias en el cambio de la masa escalar entre sexos (Prueba de t de dos colas,  $t= 0.0425$ ,  $gl=29.44$ ,  $p=0.966$ ; Fig. 70).



**Figura 68.** Masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetadas.

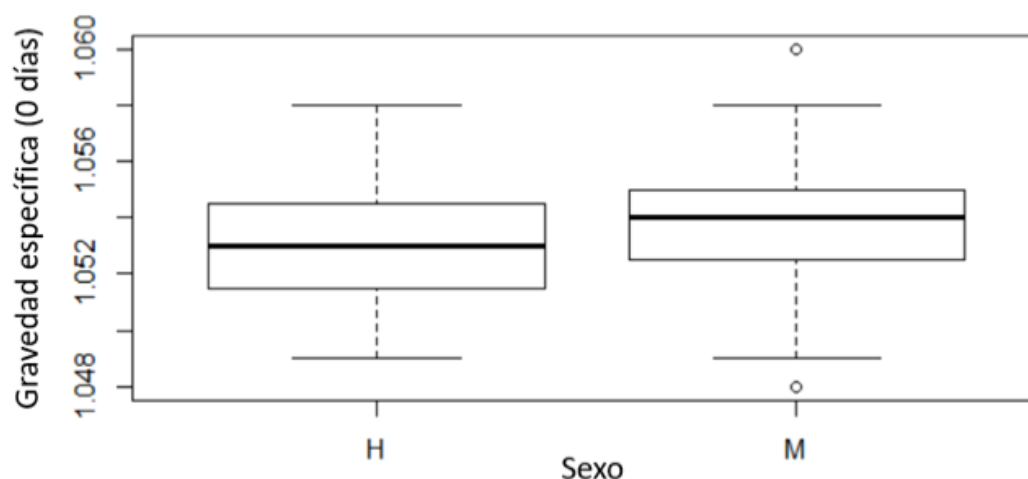


**Figura 69.** Masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) durante el destete tardío.

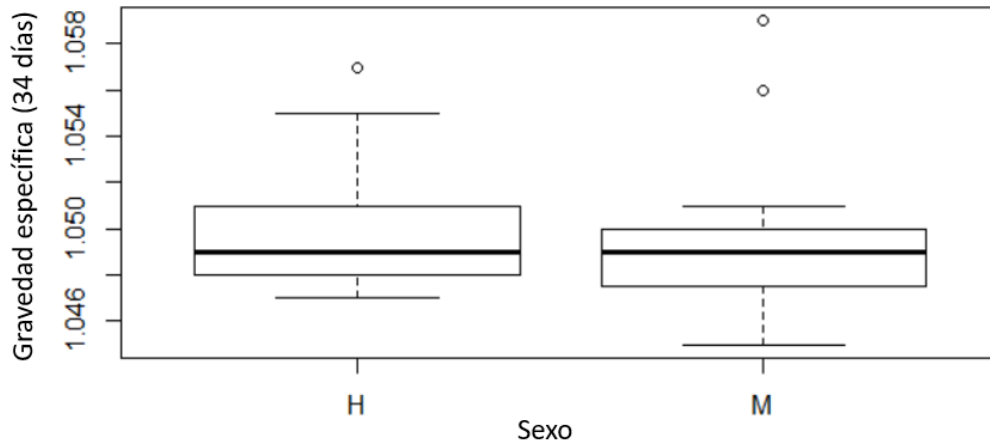


**Figura 70.** Cambio en la masa escalar de las crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo.

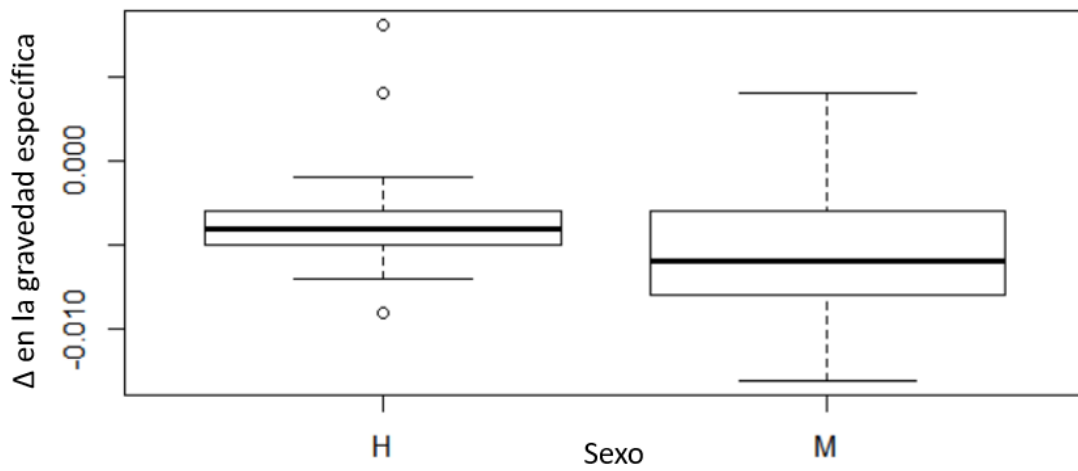
La gravedad específica no varió entre sexos en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t = -0.826$ ,  $gl=34.17$ ,  $p=0.414$ ; Fig. 71) y en a los 34 días post-destete (Rango Wilcoxon,  $W=156.5$ ,  $p=0.276$ ; Fig. 72). Además, el cambio en la gravedad específica no varió entre sexos (Rango Wilcoxon,  $W=163.5$ ,  $p=0.176$ ; Fig. 73).



**Figura 71.** Gravedad específica del plasma de crías de elefante marino hembra (H) y macho (M) al inicio del destete.

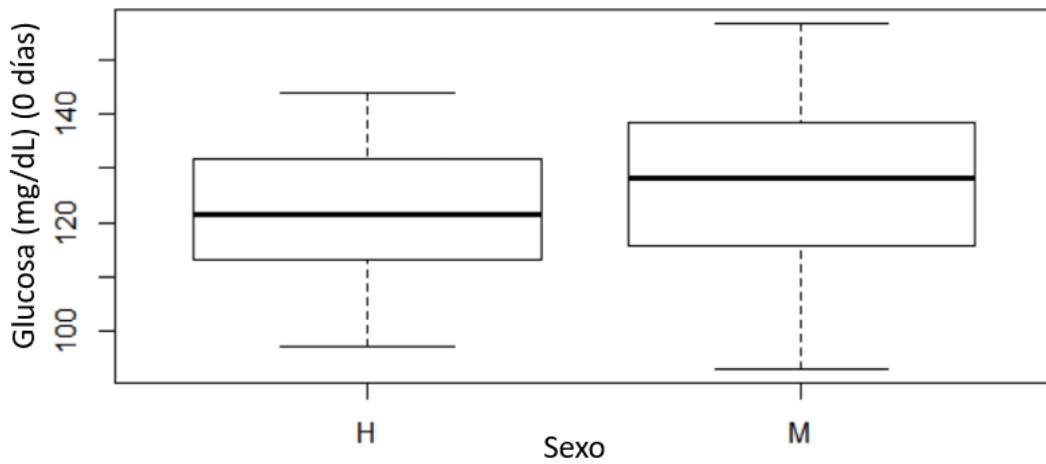


**Figura 72.** Gravedad específica del plasma de crías de elefante marino hembra (H) y macho (M) en el destete tardío

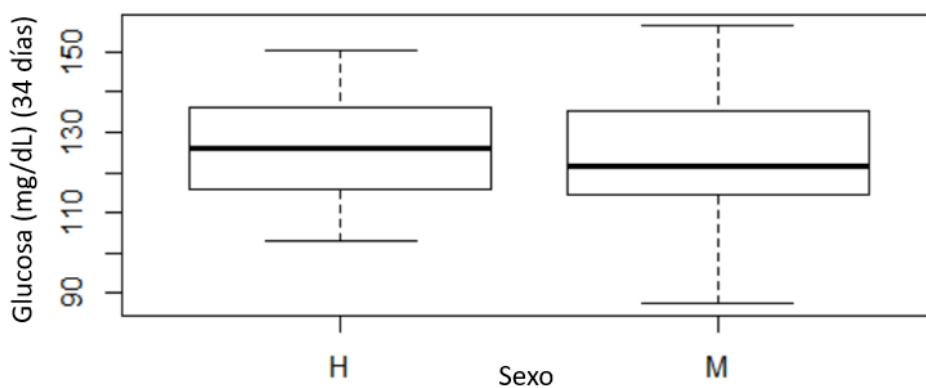


**Figura 73.** Cambio en la gravedad específica del plasma de crías de elefante marino hembra (H) y macho (M) entre las etapas de muestreo.

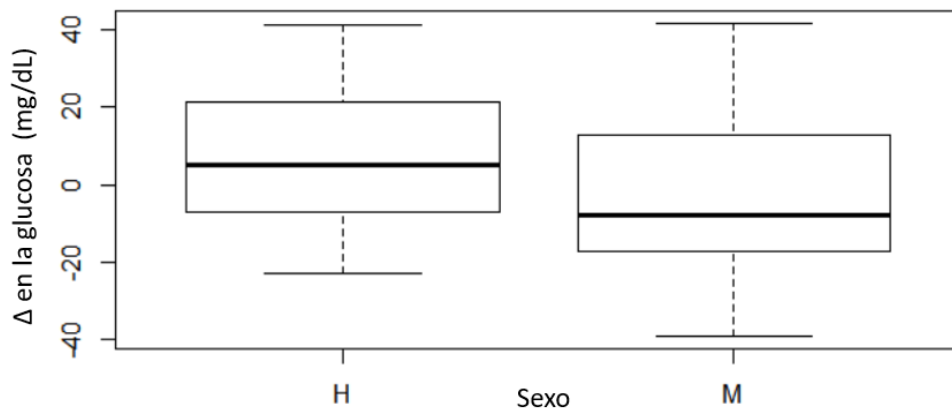
La concentración sérica de glucosa en la etapa de recién destetados no varió entre hembras y machos (Prueba de t de dos colas,  $t = -1.179$ ,  $gl=32.05$ ,  $p=0.247$ ; Fig. 74). El mismo patrón se observó para la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t = 0.411$ ,  $gl=30.30$ ,  $p=0.683$ ; Fig. 75). Tampoco se se encontraron diferencias en el cambio de la concentración de glucosa entre hembras y machos (Prueba de t de dos colas,  $t = -1.257$ ,  $gl=28.78$ ,  $p=0.218$ ; Fig.76).



**Figura 74.** Concentración de glucosa en suero de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) recién destetados.

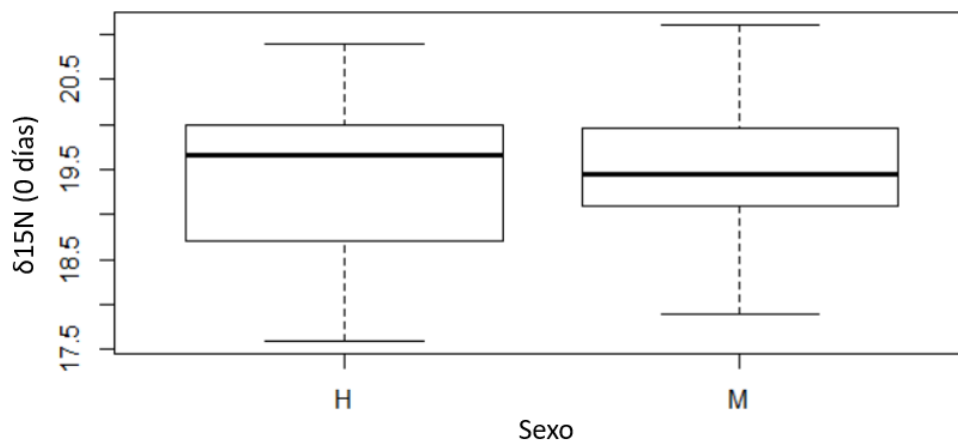


**Figura 75.** Concentración de glucosa en suero de crías de elefante marino machos (M) y hembras (H) en el destete tardío.

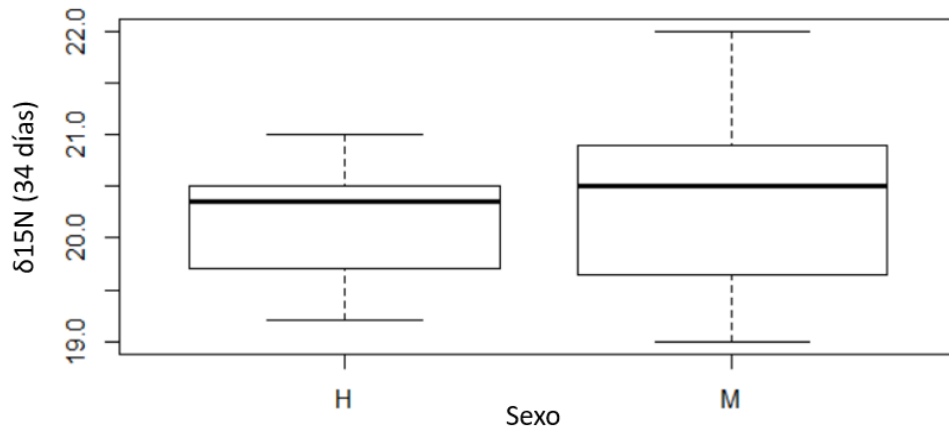


**Figura 76.** Cambio en la concentración de glucosa sérica de crías de elefante marino en machos (M) y hembras (H) entre las etapas de muestreo.

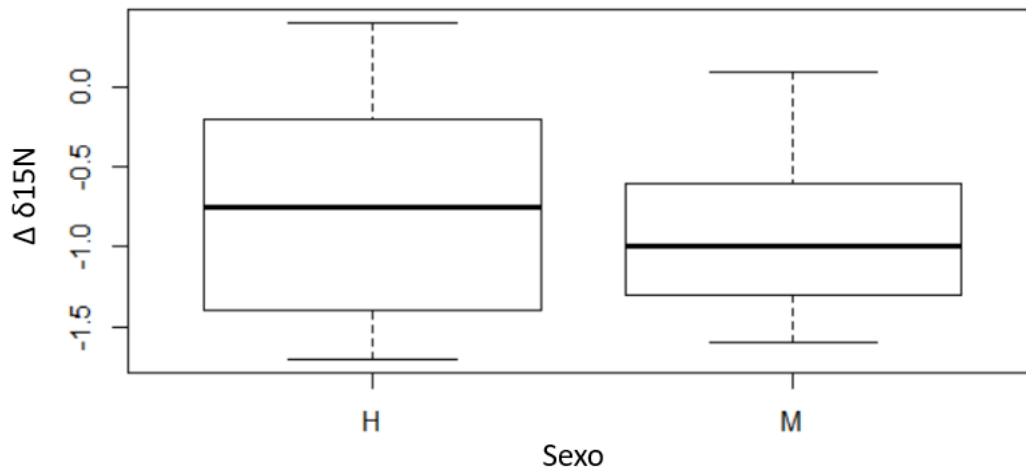
El isotopo  $\delta^{15}\text{N}$  no varió entre sexos en la etapa de recién destetados (Prueba de t de dos colas,  $t=-0.324$ ,  $gl=31.39$ ,  $p=0.747$ ; Fig. 77) ni en la etapa de destete tardío (Prueba de t de dos colas,  $t= -1.025$ ,  $gl=24.38$ ,  $p=0.315$ ; Fig.78). El cambio de los valores del isotopo  $\delta^{15}\text{N}$  no varió entre sexos (Prueba de t de dos colas,  $t=-0.828$ ,  $gl=30.19$ ,  $p=0.413$ ; Fig. 79).



**Figura 77.** Señal isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) al inicio del destete (0 días).



**Figura 78.** Señal isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) en el destete tardío.



**Figura 79.** Cambio en la señal isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  de las vibrisas de crías de elefante marino del Norte hembras (H) y machos (M) entre etapas de muestreo.

## ANEXO IV

Los niveles de hierro incrementaron en 25% en la etapa del destete tardío con respecto a la etapa inmediata al destete. En el caso del conteo total de células blancas, no se detectaron diferencias entre ambos periodos; sin embargo, las crías recién destetadas tenían conteos más altos de neutrófilos en banda y monocitos, mientras que los números de eosinófilos eran mayores en crías durante el destete tardío (Cuadro 16).

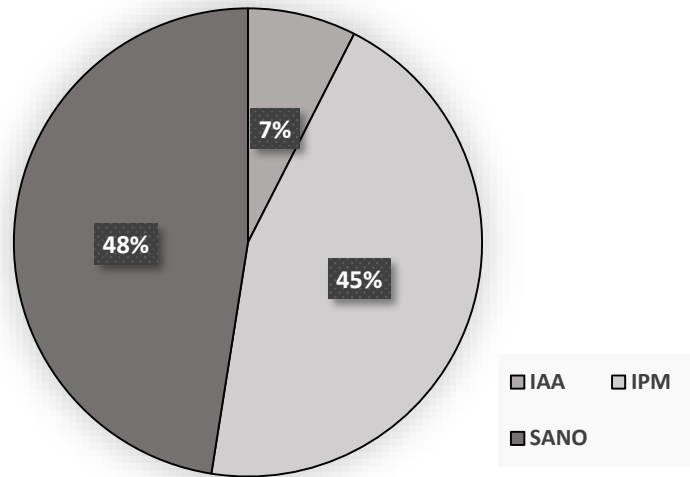
**Cuadro 16.** Resultados de los análisis sanguíneos de las crías del elefante marino del Norte. El asterisco denota significancia estadística

Variable	Valores de referencia (Yochem <i>et al.</i> , 2008)	Destete (0 días)	Post-destete (34 días)	Valor de p
Hematocrito(%)	45–66	63	69	0.1807
Células blancas	7,000 - 20,700	15,374	12,909	0.2754
Neutrófilos band.	0-1,035	405*	144*	0.0026
Neutrófilos seg.	4,141-11,592	6,812	5,174	0.0848
Linfocitos	1,260-5,983	4,790	4,814	0.6310
Monocitos	228-3,312	2,606*	1,540*	0.0077
Eosinófilos	207-2,123	665*	1160*	0.0003
Basófilos	0-114	0	0	0
Hierro (µg/dL)	96–505	200*	251*	0.0001

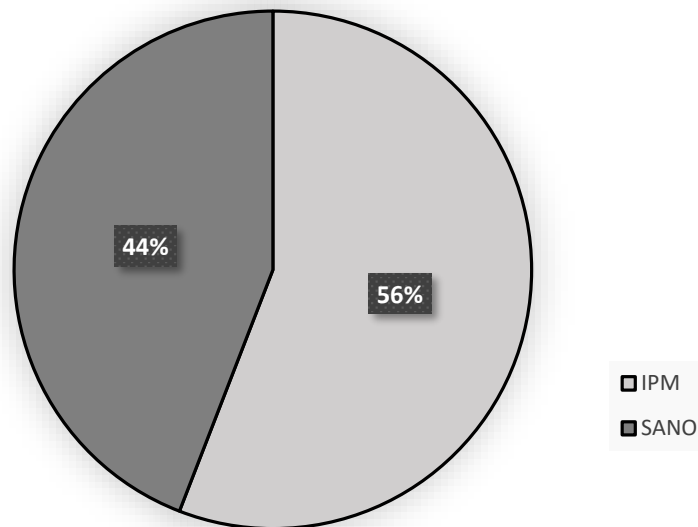
  

Variable	Valores de referencia (Castellini <i>et al.</i> , 1990)	Destete (0 días)	Post-destete (34 días)	Valor de p
Gravedad esp. (g/ml)	1.071	1.053	1.049	0.608

De acuerdo a los parámetros hematológicos, se identificaron tres condiciones clínicas en las crías incluidas en este estudio: crías clínicamente sanas, crías con infecciones agudas o abscesos (IAA), y crías con infecciones por microparásitos como bacterias o virus (IPM) como se puede observar en las figuras 80 y 81.



**Figura 80.** Condición clínica de las crías del elefante marino del Norte recién destetadas.



**Figura 81.** Condición clínica de enfermos de las crías del elefante marino del Norte durante el destete tardío.