



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en recursos Bióticos

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE CRÍAS DE LOBO
MARINO DE CALIFORNIA, ZALOPHUS CALIFORNIANUS.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Recursos Bióticos

Presenta:

Camila Adriana Vera Massieu

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Karina A. Acevedo Whitehouse

Presidente

Fausto Arellano Carbajal

Secretario

Juan Joel Mosqueda Gualito

Vocal

Patrick Michael Brock

Suplente

Marco Antonio Sánchez Ramos

Suplente

Dra. Teresa Margarita de Jesús García Gasca

Directora de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco

Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

19 · noviembre · 2013



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en recursos Bióticos

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE CRÍAS DE LOBO
MARINO DE CALIFORNIA, *ZALOPHUS CALIFORNIANUS*.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Recursos Bióticos

Presenta:

Camila Adriana Vera Massieu

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Karina A. Acevedo Whitehouse

Presidente

Fausto Arellano Carbajal

Secretario

Juan Joel Mosqueda Gualito

Vocal

Patrick Michael Brock

Suplente

Marco Antonio Sánchez Ramos

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. Teresa Margarita de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Diciembre, México · 2013

Resumen

Los procesos inmunes y sus variaciones pueden afectar caracteres ecológicamente importantes de los individuos. Se ha propuesto que las diferencias en la magnitud o eficiencia de respuestas inmunes entre individuos surgen debido a una distribución diferencial o canje de recursos energéticos limitados entre funciones fisiológicas costosas (“trade-offs”), como son la reproducción, el crecimiento y el desarrollo. Aún no está claro cuáles son los factores que determinan este canje, pero se sabe que las respuestas inmunes de los adultos son influenciadas por el ambiente patogénico durante su desarrollo. A la fecha se conoce poco sobre el desarrollo del sistema inmune en un contexto ecológico, y aún menos si el desarrollo del organismo afecta la manera en la que los recursos energéticos son distribuidos hacia los diferentes componentes inmunológicos. En este trabajo se usaron desafíos *in vivo* para investigar la respuesta inflamatoria y su relación con la condición corporal, como indicador de las reservas energéticas, durante el desarrollo temprano de crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Cada cría fue desafiada inmunológicamente con fitohemaglutinina (PHA) y se utilizó un análisis histológico de las biopsias tomadas en el sitio de inoculación para caracterizar los componentes celulares. Se observó que la PHA condujo a la infiltración de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos. La relación entre la condición corporal y la inflamación fue distinta entre las tres etapas del desarrollo evaluadas. La respuesta inflamatoria de crías de dos semanas de edad no fue explicada por su condición ni por su estado de salud. La magnitud de la respuesta inflamatoria generada por las crías de dos meses fue explicada significativamente por su condición corporal (GLM, $n = 12$, $F = 12.36$, $p = 0.006$). En las crías de seis meses, la inflamación fue explicada por la interacción de la condición corporal y su estado de salud (GLM, $n = 18$, porcentaje de neutrófilos: $p = 0.0122$, condición corporal y porcentaje de neutrófilos: $p = 0.0169$ condición corporal y porcentaje de linfocitos: $p = 0.0011$). Estos resultados resaltan la importancia de estudiar el desarrollo del sistema inmunitario dentro de un marco ecológico para identificar la existencia de canjes energéticos, y exhortan a una mejor comprensión de las dinámicas funcionales de la inmunidad en poblaciones silvestres. En un contexto más amplio, el presente estudio puede ayudar a identificar periodos de vulnerabilidad inmunológica asociados con el crecimiento y desarrollo que podrían llevar a un incremento en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas durante etapas críticas en el desarrollo de un mamífero carnívoro. Esta información puede ser útil para generar planes de manejo y conservación para el lobo marino y especies similares.

Palabras claves: canjes energéticos, ecoinmunología, fitohemaglutinina, inflamación, mamífero, PHA, *Zalophus californianus*

Abstract

Variations in immune function can affect ecologically important processes. It has been proposed that these variations arise due to trade-offs, that is, the allocation of limited energetic resources among competing, costly physiological functions. Nevertheless it is not entirely clear which factors determine the allocation of resources among physiological functions. It is well known that adult immune traits may be influenced by the pathogenic environment experienced during development. However, there is as yet little information regarding the ontogeny of the immune system from an ecological context, nor is it known whether development affects the way in which resources are allocated to different immune functions. Using ecoimmunological tools, I investigated the inflammatory response and its relation to body condition during the early development of California sea lion pups (*Zalophus californianus*). I examined immune activity and body condition of California sea lion pups from shortly after birth (2-3 weeks), at 2 months of age and at 5 months of age, using a linear model framework. Each pup was challenged with phytohemagglutinin (PHA) and I analyzed the cellular components of this test through histology. I found that PHA led to the infiltration of neutrophils, lymphocytes, macrophages and eosinophils. The magnitude of the inflammatory response elicited by the neonatal California sea lions was not correlated to the pup's body condition. At 2 months of age the inflammatory response was significantly correlated to the pup's body condition (GLM, $n=12$, $F=12.36$ $p=0.006$). In contrast, the inflammatory response elicited by older pups was correlated not only to their body condition but also to their overall health status, assessed by total and differential leukocyte counts (GLM, $n = 18$, neutrophils: $p = 0.0122$, body condition:neutrophils: $p = 0.0169$, body condition:lymphocytes: $p = 0.0011$). These results highlight the relevance of studying the development of the immune system within an ecological framework in order to identify the existence of true trade-offs, and call for a better understanding of the dynamics of immunity in wild populations. Perhaps more importantly, this study can help identify periods of immune vulnerability associated with growth and development which could lead to increased disease susceptibility during early and often critical life stages of a large mammal. This information may be useful for management and conservation plans of the California sea lion and closely related species.

Keywords: ecoimmunology, inflammation, mammal, PHA, phytohemagglutinin, trade-offs, *Zalophus californianus*

AgradecimientosÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de figuras	v
Índice de cuadros	vii
Capítulo 1. Introducción general	1
Sistema inmunitario	1
Sistema inmune innato	3
Componentes celulares del sistema inmune innato	3
Estrategias del sistema inmune innato en el reconocimiento de patógenos	5
PRRs y sus funciones	5
TLRs y sus cascadas de señalización	7
Inflamación	8
El sistema inmunitario de mamíferos	10
Desarrollo del sistema inmunitario en mamíferos	10
El sistema inmunitario de mamíferos marinos	11
Ecoimmunología	12
Canjes energéticos	13
Mecanismos fisiológicos que regulan canjes energéticos	14
Ecoimmunología y ontogenia del sistema inmunitario	16
El lobo marino de California	17
Capítulo 2. Metodología General	20
Trabajo de campo	20
Hematología	20
Capítulo 3. Caracterización histológica de la respuesta inmunitaria a	
Introducción	23
Metodología	24
Resultados	28
Discusión	33
Capítulo 4. Los costos de la inmunidad a lo largo de desarrollo temprano	
Introducción	36
Metodología	38
Resultados	40
Discusión	48
Capítulo 5. Discusión general	53
Capítulo 6. Conclusiones	57
Referencias	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

3.0 Mapa de la Región de la Grandes Islas mostrando la isla Granito lugar donde se realizó el trabajo de estudio.

3.1 Comparación de la inflamación de la membrana interdigital generada por la inyección de PHA (círculos negros) o solución salina (círculos abiertos) a cuatro, 24 y 48 horas pos-inyección en crías de lobo marino de California.	25
3.2 Secciones de tejido vistas a 40X a las cuatro horas post-inyección de PHA o solución salina. A) tejido inyectado con PHA mostrando la infiltración celular de n, neutrófilos; e, eosinófilos; l, linfocitos y m, macrófagos. B) tejido inyectado con solución salina en donde solo se observan f fibroblastos. C) tejido inyectado con PHA en donde no se observó la infiltración de células. D) tejido inyectado con solución salina en donde no se observó la infiltración de células.	29
3.3 Cambio en el grosor de la membrana interdigital en respuesta a PHA (círculos cerrados) y solución salina (círculos abiertos) de A) crías de lobo marino de California de dos semanas, B) dos meses y C) seis meses.	30
3.4 Conteo celular promedio de A) neutrófilos, B) linfocitos, C) macrófagos, D) eosinófilos y E) fibroblastos en crías de lobo marino de California de dos meses (*P < 0.05).	31
3.5 Conteo celular promedio de A) neutrófilos, B) linfocitos, C) macrófagos, D) eosinófilos y E) fibroblastos en crías de lobo marino de California de seis meses (*P < 0.05).	32
3.6 Promedio del número de células infiltradas al tejido en respuesta a la inyección de PHA o de solución salina de crías de ambos grupos de edad.	33
4.1 Análisis de distribución de los datos de la respuesta inflamatoria a PHA de acuerdo a Cullen y Frey (1999). En rojo se muestran los valores observados mientras que en azul se muestran los valores predichos por el método de bootstrap (1000). En el panel de la derecha se muestran las diferentes distribuciones teóricas, la franja gris corresponde a la distribución tipo beta.	40
4.2 Relación entre la respuesta inflamatoria a PHA de crías de lobo marino de California de dos semanas de edad con A) condición corporal; B) porcentaje de neutrófilos; y C) porcentaje de linfocitos. Las líneas punteadas representan intervalos de confianza del 95%.	43
4.3 Índice de condición corporal de crías de lobo marino de California de diferentes edades (P = 0.0016).	44
4.4 Relación entre la respuesta inflamatoria a PHA con la condición corporal de crías de lobo marino de California de dos meses de edad. Las líneas punteadas representan intervalos de confianza del 95%. R2ajustada = 0.53, P = 0.006.	44

- 4.5** Relación entre el porcentaje de leucocitos y la respuesta inflamatoria a PHA en crías de lobo marino de California de seis meses de edad. En A) se muestra el porcentaje de ambas poblaciones de leucocitos en relación a la respuesta inflamatoria a PHA, los círculos representan el porcentaje de neutrófilos y los rombos el porcentaje de linfocitos. En B) se muestra únicamente el porcentaje de neutrófilos y en C) únicamente el porcentaje de linfocitos en relación a la inflamación. 47
- 4.6** Relación entre la inflamación a PHA en crías de lobo marino de California de seis meses y la interacción con A) condición con el porcentaje de neutrófilos, y B) condición con el porcentaje de linfocitos. En A) se muestran los individuos con bajo porcentaje de neutrófilos y mayor índice de condición (a) y los individuos con alto porcentaje de neutrófilos y menor índice de condición (b). En B) se muestran los individuos con alto porcentaje de linfocitos y mayor índice de condición (c), y los individuos con bajo porcentaje de linfocitos y menor índice de condición (d). 48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

2.1 Valores hematológicos en lobo marino de California.	22
4.1 Modelo lineal generalizado con una función de distribución gaussiana para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de neutrófilos (PNEU), porcentaje de linfocitos (PLINF) concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike.	42
4.2. Modelo lineal generalizado con una función de distribución gaussiana para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA y el índice de condición (M_i). N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike.	45
4.3. Modelo lineal generalizado con una función de distribución binomial para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de neutrófilos (PNEU), porcentaje de linfocitos (PLINF) concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike, AIC (ajustado) = valor del modelo ajustado.	46

Capítulo 1

Introducción General

El sistema inmunitario confiere a los organismos la capacidad de hacer frente a agentes foráneos que amenazan su supervivencia. Las respuestas inmunes son importantes para la supervivencia en ambientes naturales, donde los individuos frecuentemente están expuestos a parásitos y patógenos. Sin embargo, existe gran variabilidad en la magnitud, especificidad y eficacia de las respuestas inmunitarias de organismos silvestres (Graham et al. 2010). Se ha propuesto que las diferencias interindividual en las respuestas inmunes surgen debido a una distribución diferencial o canje de recursos energéticos limitados entre funciones fisiológicas costosas (“trade-offs”); dentro de las cuales sobresalen la reproducción, el crecimiento y el desarrollo (Martin et al. 2006) . Sin embargo aún no está claro de qué manera y en qué tiempo son expresados los costos de la inmunidad en poblaciones silvestres, ni cómo contribuyen estos costos en mantener la heterogeneidad ecológica de las respuestas inmunitarias de los individuos que conforman a las poblaciones (Graham et al. 2010). Es sabido que las respuestas inmunes de los organismos adultos son influenciadas por el ambiente patogénico al cual están expuestos durante su desarrollo (McDade et al. 2010). Además se han documentado diferencias intraespecíficas en el desarrollo del sistema inmunitario, que no parecen deberse a diferencias genéticas (McDade 2003). No obstante, se conoce poco sobre el desarrollo del sistema inmune en un contexto ecológico, y se ha investigado aún menos acerca de la importancia de la ontogenia sobre la distribución de los recursos energéticos hacia diferentes componentes inmunes. En este sentido, una mayor comprensión del desarrollo del sistema inmunitario podría ayudar a reconciliar si las variaciones en el funcionamiento de sus efectores se deben a verdaderos canjes energéticos, a un efecto del desarrollo *per se*, o a ambos (Martin et al. 2006). El enfoque de ésta tesis es abordar preguntas sobre los costos de la implementación de respuestas inmunes durante el desarrollo temprano de un mamífero carnívoro utilizando al lobo marino de California como modelo de estudio. De manera específica, se busca analizar la relación que hay entre la respuesta inflamatoria y la condición corporal a diferentes tiempos del desarrollo temprano. La inflamación es la principal respuesta del sistema inmune innato y representa la primer línea de defensa contra cualquier agente infeccioso (Si-Tahar et al. 2009). Este proceso coordinado es activado por una infección microbiana o por daño tisular (Barton 2008). La activación de la respuesta inflamatoria resulta en el reclutamiento de efectores celulares como leucocitos y

células NK, y humorales, como componentes del complemento, factor de necrosis tumoral (FNT), e interferón (IFN) (Medzhitov 2008) por lo que representa la inversión de altos niveles de recursos metabólicos. En este trabajo se aborda la hipótesis de que los individuos con una mejor condición corporal podrán invertir más recursos energéticos en montar una respuesta inflamatoria, por lo que la magnitud de la respuesta inflamatoria debiera estar relacionada positivamente con la condición corporal. Asimismo debido a la importancia de esta respuesta inmune se espera que la relación entre inflamación y condición corporal se mantenga a lo largo del desarrollo temprano.

Sistema Inmunitario

El sistema inmunitario está compuesto por múltiples partes que forman redes de interacción complejas que confieren a los organismos la capacidad de hacer frente a agentes extraños que amenazan su supervivencia. En los vertebrados mandibulados existen dos tipos de defensas inmunes, la innata y la adaptativa, también conocida como adquirida (Medzhitov 2007). La principal diferencia entre ambas es el tipo de receptores utilizados en el reconocimiento de patógenos. El sistema inmune innato utiliza receptores que reconocen componentes conservados de las estructuras moleculares de los patógenos. Estos receptores están codificados en la línea germinal y son producidos constitutivamente (Janeway 1989). Además, la respuesta inmune innata se caracteriza por ser rápida y por jugar un papel central en la activación de la subsecuente respuesta inmune adaptativa (Turvey & Broid 2010). Por otro lado la inmunidad adaptativa es mediada por receptores que reconocen antígenos específicos. Los genes que codifican para estos receptores son ensamblados por segmentos genéticos codificados en la línea germinal y reorganizados por un proceso conocido como recombinación somática (Tonegawa 1983). Lo anterior permite la generación de un amplio repertorio de receptores altamente específicos, los cuales están distribuidos en los linfocitos T y B, es decir que cada linfocito expresa un receptor específico para un antígeno. Esto da lugar a la selección y expansión clonal de receptores patógeno-específicos, en donde solo ciertas poblaciones de linfocitos son seleccionadas para responder a determinado antígeno, lo cual forma la base de las respuestas específicas y a la generación de memoria inmunológica (Schatz et al. 1992).

Sistema inmune innato

El sistema inmune innato constituye la rama del sistema inmune que se encuentra mayormente distribuida y está presente en todos los organismos metazoarios (Hoffman et al. 1999). Este sistema se compone principalmente de efectores celulares y humorales. Los efectores celulares tienen un origen hematopoyético e incluyen células mieloides como los macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos; (Beutler 2004) y a las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) que son un tipo de linfocito (Lanier 2013). Los componentes humorales de sistema inmune innato comprenden una serie de proteínas cuya activación promueve principalmente tres actividades biológicas que incluyen la opsonización de patógenos, el reclutamiento y activación de leucocitos y la eliminación directa de patógenos (Fujita 2002). La opsonización es un proceso mediante el cual un microorganismo o una partícula ajena es cubierto de proteínas conocidas como opsoninas, con el objeto de hacerlo más visible a los fagocitos (Owens & Peppas 2006). Algunos ejemplos de estos componentes lo forman las proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos, la proteína de unión a LPS, y la proteína reactiva C, entre otros (Turvey & Broid 2010).

Componentes celulares del sistema inmune innato

En los vertebrados, la inmunidad innata depende principalmente de los fagocitos profesionales. Los macrófagos, también conocidos como fagocitos mononucleares, constituyen una población celular morfológica y fenotípicamente diversa (Beutler 2004, Ishii, et. al. 2009). Estos se distribuyen a lo largo del cuerpo del hospedero y en el parénquima de algunos órganos, como el hígado, cerebro, corazón y pulmón, y son las primeras células en detectar agentes foráneos. Los macrófagos poseen numerosas funciones dentro de las que se incluyen limpiar el espacio intersticial de desechos celulares, patrullar los tejidos en busca de agentes extraños, reclutar a otras células inmunes al sitio de infección, iniciar la respuesta inmune adaptativa a través de la presentación de antígenos y participar en la reparación de tejidos dañados (Mosser & Edwards 2008; Beutler 2004).

Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos son fagocitos polimorfonucleares especializados en la eliminación de patógenos. Los neutrófilos se caracterizan por la secreción de enzimas

líticas, especies reactivas de oxígeno y por su habilidad fagocítica (Nathan 2006). Así como los macrófagos, los neutrófilos también sintetizan mediadores tanto inflamatorios como anti-inflamatorios incluyendo quimoquinas y citocinas (Cassatella 1999). Además son capaces de secretar redes fibrilares compuestas de ADN conocidas como trampas extracelulares (NETs por sus siglas en inglés), las cuales poseen proteínas derivadas de sus gránulos que atrapan a los microorganismos (Brinkmann et al. 2004). Los eosinófilos se caracterizan por tener gránulos que contienen proteínas tóxicas como la peroxidasa de eosinófilos, la proteína mayor básica (MBP por sus siglas en inglés), la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN por sus siglas en inglés) y la ribonucleasa catiónica de eosinófilos (ECP por sus siglas en inglés) que les confieren su característica tinción rojiza (Rosenberg et al. 2013). Su principal función es liberar estos gránulos al espacio extracelular ante un desafío inmune. Además también son capaces de liberar citocinas, mediadores lipídicos y otras moléculas que promueven la respuesta inflamatoria (Rothenberg & Hogan 2006). Los basófilos se caracterizan por tener gránulos basófilos, es decir que tienen afinidad por los colorantes básicos y por la secreción de mediadores químicos como la histamina, prostaglandinas y citocinas antiinflamatorias del tipo Th2 (Karasuyama et al. 2009). Debido a la secreción de estos mediadores, los basófilos son un componente fundamental en las enfermedades alérgicas. (Schroeder et al. 2001).

Las células NK se especializan en la eliminación de patógenos intracelulares, principalmente virus (Medzhitov 2007). Estas células se caracterizan por la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN γ) y por inducir la apoptosis de células infectadas. Expresan dos tipos de receptores, los inhibidores y los activadores, que, a su vez, reconocen ligandos homólogos como el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) expresados en la superficie de todas las células nucleadas del cuerpo (Lanier 2005). El balance entre el número de ligandos activadores e inhibidores expresados en la célula blanco determina si ésta es eliminada o no por una célula NK. Los mecanismos que determinan la expresión de estos ligandos aún no se conocen totalmente pero se cree que involucra el reconocimiento viral por los sensores intracelulares y la producción de IFNs (Ma et al. 2006).

Estrategias del sistema inmune innato en el reconocimiento de patógenos

El reconocimiento de patógenos por el sistema inmune innato está basado en la detección de componentes conservados de las estructuras moleculares de los patógenos. Por esta razón, los receptores que conforman este sistema son conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) y sus ligandos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) (Janeway 1989). Los PAMPs se caracterizan por ser productos de vías de señalización específicas a los microorganismos, por variar poco entre microorganismos de la misma clase y por ser componentes esenciales dentro de la fisiología microbiana. Estas características los hacen indicadores ideales ya que permiten a los hospederos discriminar entre lo que es propio y lo que no y limitan la posibilidad de los microorganismos de evadir el reconocimiento por el sistema inmune a través de la evolución adaptativa de estas moléculas (Medzhitov 2007). Algunos ejemplos de PAMPs incluyen diversos componentes de la pared celular de los microorganismos como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas de la pared celular y ácido nucleicos (Beutler 2004).

Otra estrategia utilizada por el sistema inmune innato en el reconocimiento de patógenos es la detección de “peligro inmunitario” en la forma de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Bianchi 2007). Los DAMPs son moléculas que son liberadas y/o sobre-expresadas durante la lisis celular y el daño tisular que ocurren en una respuesta inflamatoria (Turvey & Broid 2010). Dentro de estas moléculas se incluyen la proteína de alta movilización de grupo 1 (HMGB1, por sus siglas en inglés) (Bonaldi et al. 2003), el ácido úrico (Shi et al. 2003), las proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés) (Schmitt et al. 2007), y las proteínas S100 o calgranulinas (Foell et al. 2007), entre otras. Por otro lado, el sistema inmune innato también es capaz de reconocer moléculas que identifican al hospedero como sí mismo. Es decir moléculas que son expresadas normalmente en células y tejidos sanos más no en células infectadas o en agentes extraños, por ejemplo las proteínas del MHC 1 (Joncker & Raulet 2008).

PRRs y sus funciones

Existen varias clases funcionales de PRRs, los mejor caracterizados son los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés). Los TLRs poseen múltiples funciones, y su papel inmune consiste principalmente en la inducción de la respuesta inflamatoria y de respuestas antimicrobianas (Medzhitov 2007). Estos receptores se expresan en varias células del sistema inmune innato y adaptativo incluyendo a los macrófagos, los fagocitos polimorfonucleares, células B, algunas poblaciones de células T, e incluso, en células no inmunes como los fibroblastos y las células epiteliales (Mansson & Cardell, 2009; Geissman et al. 2010, Akira et al. 2004, Mantovani et al. 2011). Debido a la diversidad estructural y funcional que existe dentro de la familia de los TLRs, estos son considerados dentro de los PRRs más importantes en las respuestas inmunitarias.

Otro receptor bien caracterizado es Dectina 1 que se une a los β -glucanos y está presente en las células dendríticas y en los macrófagos (Brown & Gordon 2001). Dectina 1 posee un motivo de activación basado en tirosinas de tipo inmunoreceptor atípico (ITAM, por sus siglas en inglés) que interactúa con la cinasa de tirosina SYK activando una vía de señalización que involucra a CARD-9, Bcl-10 y MALT1 (LeibundGut-Landman et al. 2007). Este receptor posee un papel importante en las defensas anti micóticas ya que está involucrado en la fagocitosis de hongos patogénicos, la inducción de respuestas antimicrobianas y la producción de citocinas (Brown 2006). Por otro lado existen receptores intracelulares que funcionan como PRRs. Dentro de estos se incluye a los receptores de unión a nucleótidos con dominio de oligomerización (NLRs, por sus siglas en inglés), los receptores tipo gen inducible de ácido retinoico (RIGs, por sus siglas en inglés), receptores tipo gen asociado a diferenciación de melanoma (MDA5 por sus siglas en inglés) y los receptores activadores de los factores reguladores de interferón dependientes de ADN (DAI, por sus siglas en inglés).

Los NLRs son una familia grande de proteínas que se caracteriza por tener un dominio de oligomerización común de unión a nucleótidos (Fritz et al. 2006). En el segmento amino terminal los NLRs poseen uno de tres dominios por lo que se subdividen en tres familias: un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, por sus siglas en inglés) presente en proteínas de la subfamilia conocida como receptores de dominio oligomérico de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés); un dominio de pirina presente en la subfamilia NALP o un dominio baculoviral inhibidor de apoptosis (BIR, por sus siglas en inglés) en la subfamilia NAIP (Inohara et al. 2005). Las fracciones N-terminal activan diferentes vías de señalización, lo que define funcionalmente a los miembros de estas familias (Medzhitov

2007). Las proteínas de la subfamilia NOD reconocen péptidoglicanos de bacteria, lo que genera la producción de mediadores inflamatorios incluyendo citocinas y quimoquinas; además participan en la activación de las respuestas adaptativas (Inohara et al. 2005, Fritz et al. 2007, Kobayashi et al. 2005). Algunos miembros de la familia NALP inducen la expresión de citocinas de la familia de la interleucina 1 (IL-1) que incluyen a la IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Meylan et al. 2006). Estas citocinas son sintetizadas como precursores inactivos que necesitan ser cortados por caspasas inflamatorias que conforman un complejo conocido como el inflamasoma (Martinon & Tschoop 2004).

TLRs y sus cascadas de señalización

Los TLRs son receptores transmembranales altamente conservados y presentes en una gran variedad de organismos, desde nematodos hasta mamíferos (Janeway & Medzhitov 2002). Se caracterizan por tener un dominio extracelular de motivos repetitivos ricos en leucina que regula el reconocimiento de los PAMPs y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 (TIR, por sus siglas en inglés), requerido para la señalización intracelular (Bowie & O'Neill 2000). Los TLRs pueden ser divididos en subfamilias con base en los PAMPs que reconocen, la subfamilia del TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lípidos, mientras que el TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. Sin embargo los TLRs pueden reconocer ligandos estructuralmente distintos. Por ejemplo el TLR4 puede reconocer lipopolisacáridos, proteínas virales y proteínas de choque térmico (Akira et al. 2004)

La expresión de los TLRs es dinámica ya que puede ser estimulada en respuesta a patógenos, citocinas y DAMPs (Hornung et al. 2002, Zarembek & Godowski 2002). Además estos receptores pueden ser extracelulares o intracelulares, por ejemplo algunos TLRs (TLR 3, 7, 8 y 9) solo se encuentran en compartimentos intracelulares como los endosomas (Akira et al. 2004). La activación de los TLRs genera a su vez la activación de moléculas señalizadoras que también participan en la señalización del receptor de interleucina 1 (Akira & Takeda 2004). Existen dos vías de señalización principales, una dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88, por sus siglas en inglés) y otra dependiente del factor inductor de IFN β con dominio TIR (TRIF, por sus siglas en inglés) (Akira & Takeda 2004). Todos los TLRs excepto TLR3 señalizan utilizando la vía de MyD88. Mientras que solo TLR4 y TLR3 señalizan mediante la vía de TRIF, ambas

vías inducen la expresión de mediadores inflamatorios incluyendo citocinas, quimoquinas, interferones entre otros (Kawai & Akira 2010).

La vía dependiente de MyD88 es la principal vía mediante la cual ocurre la señalización de los TLRs. La unión de los TLRs con sus ligandos genera el reclutamiento de MyD88 a los dominios citoplásmicos del receptor mediante una interacción homofílica entre sus dominios TIR (Dunne et al. 2003). Posteriormente MyD88 recluta cinasas asociadas al receptor de interleucina 1 (IRAK4, por sus siglas en inglés), lo que a su vez genera la asociación de IRAK1. Una vez formado este complejo, IRAK4 induce la fosforilación de IRAK1 (Li et al. 2002). Esto genera el reclutamiento y fosforilación del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6, por sus siglas en inglés) (Ye et al. 2002). Una vez fosforilados IRAK1 y TRAF6 se disocian y forman un complejo en la membrana plasmática con la cinasa activada del factor de transformación β (TAK1, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a TAK1 (TAB1, por sus siglas en inglés) y TAB2 (Shibuya et al. 1996). Lo anterior induce la fosforilación de TAK1 y TAB2 y la degradación de IRAK1. Posteriormente el complejo formado por TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2 se trasloca al citosol, en donde se asocia con la ubiquitina ligasa 3 (UBC13, por sus siglas en inglés) y con la enzima conjugada de ubiquitinación (UEV1A, por sus siglas en inglés). Esto lleva a la ubiquitinación de TRAF6, lo que induce la activación de TAK1 (Deng et al. 2000). Una vez activado TAK1 fosforila a cinasas activadas por mitógenos (MAP, por sus siglas en inglés) y al complejo inhibidor del factor nuclear $\kappa\beta$ (IKK por sus siglas en inglés) (Wang et al. 2000). Este complejo a su vez fosforila a $I\kappa\beta$ lo que lleva a su ubiquitinación y degradación, liberando de esta manera al factor de necrosis $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, por sus siglas en inglés) permitiendo su traslocación al núcleo en donde induce la expresión de múltiples genes blanco (Kerin & Ben-Neriah 2000).

Inflamación

La inflamación es un proceso biológico coordinado que es inducido por una infección microbiana o por daño tisular (Medzhitov 2008). La principal función de la respuesta inflamatoria consiste en restaurar la homeostasis perdida a través de la defensa del hospedero, reparación de tejidos y/o regulación del metabolismo (Medzhitov 2008; Hotamisligil 2006). La respuesta inflamatoria se caracteriza por ser rápida y específica; sin embargo, puede llegar a ser dañina si no es regulada adecuadamente. Por ejemplo,

existen diversos estados inflamatorios patológicos dentro de los que se incluyen la obesidad (Hotamisligil 2006), sepsis (Rittirsch et al. 2008), y gota (Dalbeth & Haskard 2005), entre otros.

La respuesta inflamatoria aguda involucra el tráfico de componentes sanguíneos como el plasma y los leucocitos al sitio de infección o daño tisular. El principal inductor de la respuesta inflamatoria es el reconocimiento de microorganismos por parte de receptores del sistema inmune innato por ejemplo, los receptores de tipo Toll y NLRs (Barton 2008). El reconocimiento inicial se lleva a cabo en el tejido por macrófagos o mastocitos residentes, lo que lleva a la producción de múltiples mediadores de la respuesta inflamatoria dentro de los que se incluyen quimoquinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas (Medzhitov 2008). Una de las principales funciones de estos mediadores es generar la extravasación de leucocitos y proteínas a los tejidos infectados, en donde se encargan de eliminar al agente infeccioso y posteriormente dan lugar a la fase de resolución de la respuesta inflamatoria que incluye la reparación de los tejidos.

Los macrófagos y mastocitos residentes al reconocer un agente extraño secretan citocinas. Dos de estas citocinas, el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y la interleucina-1 alfa ($\text{IL-1}\alpha$) actúan sobre las células endoteliales de vasos sanguíneos cercanos al sitio de infección. Estas citocinas estimulan a las células endoteliales a expresar moléculas de adhesión conocidas como selectinas (Mantovani et al. 1993). Los neutrófilos y monocitos circulantes expresan carbohidratos de membrana que se unen débilmente a las selectinas, uniéndose de esta manera al endotelio (Lawrence & Springer 1993). Sin embargo, el flujo sanguíneo interfiere con esta unión débil, la cual se vuelve a formar río abajo y así sucesivamente por lo que a este fenómeno se le conoce como el rodamiento de leucocitos (Diacovo et al. 1996). Al mismo tiempo los macrófagos residentes y las células endoteliales del tejido infectado en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ y a la $\text{IL-1}\alpha$ secretan quimoquinas que son citocinas quimioatrayentes. Estas quimoquinas se unen a glicoproteínas presentes en la superficie luminal de las células endoteliales por lo que son presentadas en grandes números a los leucocitos que se encuentran rodando en el epitelio (Baggiolini 1998). Estas quimoquinas estimulan la expresión de integrinas en los leucocitos a la vez que el $\text{TNF}\alpha$ y la $\text{IL-1}\alpha$ actúan sobre el endotelio para generar la expresión de ligandos para las integrinas. Debido a la gran afinidad que poseen las integrinas por sus ligandos se forma una unión firme que finaliza con el rodamiento de los

leucocitos sobre el endotelio. El citoesqueleto de los leucocitos se reorganiza y estos se extienden sobre las células endoteliales. Además las quimoquinas estimulan la movilidad de los leucocitos. Como resultado, los leucocitos comienzan a migrar entre las células endoteliales a través de la pared de los vasos sanguíneos conforme al gradiente de concentración de las quimoquinas hacia el sitio de infección o solución de continuidad en el tejido (Abbas et al. 2012).

Sistema inmunitario de mamíferos

Desarrollo del sistema inmunitario en mamíferos

El establecimiento del sistema inmunitario en los mamíferos requiere una serie de eventos del desarrollo cuidadosamente coordinados, comenzando desde la etapa embrionaria y a lo largo del periodo posnatal temprano (McDade 2003). El sistema inmunitario surge a partir de una población de células madre hematopoyéticas, que se generan temprano en la gestación a partir de progenitores mesenquimales ubicados en la esplanchnopleura intraembrionaria que rodea el corazón (Holsapple et al. 2003). Esta población de células madre hematopoyéticas da origen a todos los linajes celulares de la sangre (Weissman 2000). El establecimiento de los precursores linfoides-hematopoyéticos involucra la migración de estas células desde el mesénquima intraembrionario al hígado y vaso fetal, y finalmente la redistribución de éstas células a la médula espinal y al timo durante la gestación tardía (Cumano et al. 2001). La médula espinal y el timo constituyen los principales sitios de linfopoiesis y proveen un microambiente único con los factores necesarios para el desarrollo de células inmunocompetentes. Una vez en estos órganos las células madre se multiplican para formar un pool de células progenitoras altamente proliferativas que son capaces de generar continuamente células inmunocompetentes funcionales, que proveen la capacidad celular necesaria para montar respuestas inmunitarias efectivas (Good 1995).

El desarrollo del sistema inmunitario no culmina en el nacimiento. Los neonatos atraviesan periodos de inmadurez inmunitaria durante los cuales tanto componentes innatos como adaptativos necesitan de estímulos antigénicos para su completa maduración y funcionamiento (Day 2007). Uno de los principales estímulos está dado por la transición de un medio estéril dentro del útero de la madre a un medio lleno de

microorganismos, algunos de los cuales pasarán a formar parte de la microflora normal (Levy 2007). Asimismo, un estímulo importante está dado por la transferencia de antígenos a través de la leche materna (Newburg & Walker 2006). Los estímulos antigénicos generan una educación o “priming” del sistema inmunitario que afecta el tipo de respuesta desplegada por el neonato. Se ha reportado para varias especies de mamíferos incluyendo los de placentación endoteliochorial, como los cánidos, que durante los primeros días posteriores al nacimiento las respuestas inmunes de los neonatos son de tipo Th2 (Day, 2007; Levy, 2007). Esto significa que la mayoría de las moléculas liberadas en este tipo de respuesta tendrán un efecto antiinflamatorio. Por lo tanto el proceso de maduración inmunitaria involucra entre otras cosas el paso de una respuesta en su mayoría de tipo Th2 a una de tipo Th1 (Levy 2007). La respuesta de tipo Th1 se caracteriza por la liberación de citocinas proinflamatorias y por conferir protección contra microorganismos patógenos (Sun et al. 2005). Se ha propuesto que la transferencia de anticuerpos maternos proporciona protección durante este periodo de vulnerabilidad inmunitaria que además coincide con un período de alto riesgo y mortalidad elevada (McDade 2003). Los mamíferos que tienen placentación hemocorial y endoteliochorial reciben un solo tipo de inmunoglobulina (IgG) a través de la placenta (Day 2007). Sin embargo a través del calostro reciben inmunoglobulinas de las clases IgM e IgA además de IgG (Tizard 2009). El calostro también provee citocinas que estimulan la función inmunitaria e inhibidores de tripsina que evitan la digestión de las inmunoglobulinas maternas (Tizard 2009). En este sentido, el calostro también juega un papel en la maduración del sistema inmunitario de las crías. Por otro lado la leche materna también provee inmunoglobulinas (IgA e IgG) e inhibidores de tripsina, además de factores inmunoestimulatorios dentro de las que se incluyen la lactoferrina, lisozima y triglicéridos (Newburg & Walker 2006). Debido a que los anticuerpos provenientes del calostro o la leche probablemente se originan en la sangre de la madre, se ha propuesto que las crías son provistas de un repertorio de anticuerpos que concuerda con el ambiente antigénico experimentado por la madre (Boulinier & Staszewski 2008).

El sistema inmunitario de mamíferos marinos

Existe poca información sobre el sistema inmunitario de mamíferos marinos y mamíferos silvestres en general. Recientemente se han hecho avances en este tema en un contexto ecológico, utilizando sobre todo aves e invertebrados como modelos de estudio (Tella et

al. 2008, Martin et al. 2006, Lozano & Lank 2003, Schmid-Hempel 2003, Tizard 2009). Sin embargo los estudios en mamíferos se han enfocado en su mayoría a mamíferos pequeños y de vida corta (Martin et al. 2006b).

El sistema inmunitario de mamíferos marinos está formado y organizado de manera muy similar al sistema inmunitario de mamíferos terrestres. En este sentido el sistema inmunitario de mamíferos en general sirve como un modelo útil para el estudio de la inmunidad de mamíferos marinos (King et al. 2010) y el del perro para el estudio de la inmunidad del lobo marino (Day 2007, Mancía et al. 2011). El lobo marino de California pertenece al suborden Caniforma del orden Carnivora y se ha propuesto que entre sus parientes terrestres más cercanos se encuentra el perro (Tagle et al., 1996). Más aún se ha observado que existe hasta un 95% de homología entre las secuencias de algunos genes de ambas especies (Gill et al., 2010). Por ejemplo, se sabe que el sistema inmunitario de otáridos así como perros, roedores, gatos e incluso humanos requiere de un periodo de maduración en el desarrollo temprano para ser completamente funcional (Castinel et al. 2008, Keogh et al. 2010). Por otro lado es probable que los mamíferos marinos posean caracteres inmunes únicos que sean un reflejo del ambiente acuático que habitan. Estos caracteres podrían reflejar el espectro de patógenos que habitan los ecosistemas marinos, o bien podrían representar mecanismos homeostáticos que permitan mantener la función inmune a pesar de condiciones fisiológicas extremas como la hipoxia, presiones hiperbáricas y bajas temperaturas que han demostrado ser inmunosupresoras en otras especies (Shinomiya 1994, Shepard & Shek 1998, Brenner et al. 1999). Sin embargo aún son pocos los trabajos acerca del funcionamiento del sistema inmunitario de mamíferos marinos bajo un contexto ecológico. Por esto, es necesario ampliar este conocimiento para lograr un mejor entendimiento de la evolución de caracteres inmunes en los mamíferos marinos (King et al., 2010).

Ecoinmunología

En los últimos años se ha generado conocimiento que ha permitido un mejor entendimiento de los componentes y el funcionamiento del sistema inmunitario, a nivel molecular y celular. Sin embargo, aún falta descifrar los factores que determinan que organismos genéticamente similares respondan de manera distinta ante un mismo desafío inmune, e incrementar nuestra comprensión del funcionamiento del sistema inmunitario en

poblaciones silvestres. La ecoinmunología tiene como objetivo describir y explicar la variación que existe en las funciones inmunes, específicamente porqué y cómo contribuyen los factores bióticos y abióticos a esta variación en organismos silvestres (Sheldon & Verhulst 1996, Matrin et al. 2011). Esta disciplina se enfoca en estudiar las funciones inmunitarias bajo un contexto orgánico reconociendo que éstas son solo una parte de una respuesta integral, contexto-dependiente hacia el parasitismo (Demas et al. 2011, Ardía et al. 2011).

La ecoinmunología propone que las diferencias en la magnitud o eficiencia de respuestas inmunes entre individuos surgen debido a una distribución diferencial o canje de recursos energéticos limitados entre funciones fisiológicas costosas (“trade-offs”), como la reproducción, el crecimiento y el desarrollo (Sheldon & Verhulst, 1996).. Debido a que los recursos energéticos son limitados y varían a lo largo del tiempo, invertir en un proceso fisiológico en particular limita la disponibilidad de este recurso para otras funciones fisiológicas (French et al. 2009). Por ejemplo se ha observado una disminución de las funciones inmunitarias en aves, reptiles y mamíferos durante la época reproductiva (Zapta et al. 1992; Nelson & Demas 1996). También se ha observado lo contrario, en donde un aumento en los componentes humorales del sistema inmunitario disminuye el contenido proteico de ovarios de mosquito (Ahmed et al. 2002). En este sentido se asume que las funciones inmunitarias son energéticamente costosas y que los recursos destinados a éstas no pueden ser utilizados para otras funciones fisiológicas. Asimismo la distribución de recursos energéticos o el canje de estos entre diferentes funciones fisiológicas obedece a una regulación plástica que puede variar a lo largo del tiempo dependiendo de factores ambientales o a diferentes estrategias de comportamiento (Zera & Harshman, 2001).

Se ha propuesto que las defensas inmunitarias conllevan dos tipos de costos: el costo de mantener un sistema inmunitario y el costo de desplegar una respuesta inmune. Los costos de mantenimiento surgen como consecuencia de la inversión de energía y recursos en la infraestructura del sistema inmunitario, así como por mantener una vigilancia inmunitaria en ausencia de una infección. Estos costos pueden ser expresados a diferentes escalas temporales (Lee 2006). Por ejemplo, a largo plazo, pueden surgir costos evolutivos mediante pleiotropía o debido a una varianza genética negativa entre las funciones inmunes y otros caracteres (McKean et al. 2008). A corto plazo, los costos son fisiológicos en términos de la energía y los recursos que son requeridos para estos

procesos (Lochmiller & Deerenber 2000; Martin et al. 2003; Gasparini et al. 2009) o como consecuencia del daño colateral asociado con las respuestas inmunitarias (Graham et al. 2005). En apoyo al costo de las respuestas inmunes se ha visto que animales desnutridos presentan respuestas inmunitarias deficientes, como una menor actividad fagocítica, producción de citocinas, producción de anticuerpos y actividad del sistema del complemento (Gershwin et al. 1985; Chandra 1991). Asimismo, la inducción de la producción de anticuerpos eleva entre 20-30% el consumo de oxígeno y el calor metabólico en ratones (*Mus musculus*, Demas et al. 1997). Además en los modelos parásito-hospedero se ha visto que las poblaciones en general experimentan niveles de susceptibilidad más altos de los que se esperaría si las defensas inmunitarias no tuvieran un costo asociado (van Boven & Weissing 2004).

Canjes energéticos

La teoría de historia de vida provee un marco teórico para entender las diferentes estrategias reproductivas y del desarrollo dentro de una misma especie o en diferentes especies (Charnov, 1993). Esta teoría asume que los recursos son limitados y que la energía es distribuida hacia las principales funciones fisiológicas: el crecimiento, la reproducción y el mantenimiento (McDade, 2003). Además estas funciones son mutuamente excluyentes ya que los recursos invertidos en una función fisiológica ya no estarán disponibles para ser utilizados en otra (Hill & Hurtado 1996). Por ende, se genera una distribución diferencial o canje de recursos energéticos entre las diferentes funciones fisiológicas. En este sentido se define a los canjes energéticos con base a la asociación negativa que se forma entre caracteres. Los canjes energéticos pueden estar codificados a diferentes niveles: genéticamente como resultados de la selección natural; en el desarrollo, mientras el fenotipo responde a los ambientes experimentados durante las primeras etapas de vida y a corto plazo variando de acuerdo a las demandas ambientales (Lasker, 1969).

A raíz del surgimiento de la ecoinmunología se ha empezado a incluir a la inmunidad como un carácter de historia de vida que a su vez puede interactuar y afectar otros caracteres ecológicamente importantes (Sheldon & Verhulst, 1996). Por ejemplo se ha visto que un aumento artificial en el número de crías que integran la camada disminuye la actividad inmunitaria de la madre en múltiples especies de aves (Moreno et al. 1999; Ardía

2005). Asimismo, la actividad inmunitaria disminuye durante la lactancia en hámsters de Siberia (*Phodopus sungorus*; Drazen et al. 2003). Por otro lado la inducción de las funciones inmunitarias incrementa el gasto energético (Demas et al. 1997; Martin et al. 2003), suprime el comportamiento reproductivo (Aubert et al. 1997; Bonneaud et al. 2003; Weil et al. 2006) y disminuye el crecimiento (Prendergast et al. 2004; Martin 2005), tanto en roedores como en aves. Estos efectos también han sido observados en invertebrados. Por ejemplo la inducción del comportamiento reproductivo en arañas lobo (*Hygrolycosa rubrofasciata*) genera una disminución en la función inmunitaria (Ahtiainen et al. 2005). Un aumento en el esfuerzo de forrajeo disminuye la capacidad de encapsulación en abejorros (*Bombus terrestris*; König & Schmid-Hempel 1995) y en *Drosophila melanogaster* la respuesta inmune hacia parasitoides reduce en ausencia de alimento (Hoang 2002). Sin embargo debido a la complejidad de los sistemas fisiológicos que interactúan a lo largo de la historia de vida de los organismos, ha sido muy difícil descifrar la manera en la que son regulados los canjes energéticos. Se ha propuesto que la distribución de recursos energéticos hacia una u otra función es una consecuencia de la comunicación entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino.

Mecanismos fisiológicos que regulan canjes energéticos

Como se mencionó anteriormente, es conocido que una disminución en la energía de la cual disponen los organismos genera una disminución en la capacidad inmune de éstos (Chandra 1996). En mamíferos el tejido adiposo blanco representa una fuente importante de reservas energéticas por lo que es probable que éste tejido participe en el mantenimiento de procesos fisiológicos energéticamente costosos, incluyendo las funciones inmunitarias (Demas 2004). En apoyo a esta predicción, se ha visto que disminuciones en la grasa corporal total están correlacionadas con una menor función inmunitaria en diversas especies, incluyendo al humano (Norgan 1997; Spurlock et al. 1997; Klasing 1998). Por otro lado un aumento desproporcional en la cantidad de grasa acumulada como el que ocurre en la obesidad puede también tener efectos negativos sobre el funcionamiento del sistema inmunitario (Marti et al. 2001). Más aún algunos desórdenes inmunes desencadenan cambios importantes en el metabolismo de lípidos, enfatizando la importancia del tejido adiposo en la inmunidad (Pond 1996). Asimismo, fluctuaciones estacionales en el tejido adiposo están asociadas a cambios en las funciones inmunitarias. Por ejemplo, animales que aumentan su masa corporal en los

cortos días de invierno como el hámster de Syria muestran un incremento en sus funciones inmunitarias (Drazen et al. 2001), mientras que animales que pierden un porcentaje significativo de su grasa corporal durante el invierno como el hámster de Siberia (*Phodopus sungorus*) y el topo de las praderas (*Microtus ochrogaster*) muestran una disminución en sus respuestas inmunes (Nelson et al. 1996, Demas et al. 2002).

A pesar de la evidencia que sugiere que el tejido adiposo juega un papel importante en la regulación de las funciones inmunes, aún no se conoce el mecanismo neuroendocrino por el cual la disponibilidad de energía se traduce en una señal fisiológica que indique el balance energético del organismo. Un candidato endocrino que podría ligar las reservas energéticas con las funciones inmunes es la hormona leptina. Ésta es una citocina conocida por sus efectos reguladores de la ingesta de alimento (Zhang et al. 1994). Sin embargo, varias funciones inmunes son influenciadas por esta hormona. Por ejemplo, la leptina promueve la dominancia de una respuesta de tipo Th1 sobre una de tipo Th2 (la Cava & Matarese 2004). Además estimula la fagocitosis, secreción de leucotrienos, prostaglandinas, óxido nítrico y citocinas proinflamatorias en macrófagos (Zarkesh-Esfahani et al. 2001; Mancuso et al. 2002; Dixit et al. 2003). Más aún, la leptina es capaz de inducir la quimiotaxis y liberación de radicales libres de oxígeno en neutrófilos (Caldefie-Chezet et al. 2001; Caldefie-Chezet et al. 2003). Los efectos que tiene esta hormona sobre el sistema inmunitario parecen ser tanto indirectos como directos. En este sentido se ha encontrado la presencia del receptor de leptina en monocitos, células asesinas naturales y linfocitos (Lord et al. 1998; Zarkesh-Esfahani et al. 2001; Zao et al. 2003). Se ha propuesto que la leptina actúa como una señal neuroendocrina que comunica al sistema inmunitario la disponibilidad de energía. En apoyo a esto se ha visto que la extracción quirúrgica del tejido adiposo blanco de hámsters de Siberia genera una disminución en la producción de IgG en respuesta al antígeno KLH. El tratamiento de estos animales con leptina exógena disminuye el efecto y restaura las funciones inmunes, mientras que en los animales control el tratamiento con leptina no tiene efectos observables (Demas et al. 2005).

Por otro lado, se ha visto que la disponibilidad de diferentes nutrientes es un componente esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario. Por ejemplo, la disponibilidad de hierro, glucosa, ácidos grasos de cadena corta, arginina y triptófano afectan el tipo y magnitud de las respuestas inmunes (Bird et al. 1998; Mellor & Munn 2004; Fox et al. 2005; Bronte & Zanovello 2005; Michalek & Rathmell 2010). Existen

sensores asociados a células inmunitarias que acoplan información del ambiente nutricional o metabólico para coordinar las respuestas inmunes. Por ejemplo el TLR4 es capaz de unir ácidos grasos libres (Nguyen et al. 2007) mientras que el ATP es un fuerte activador del inflamasoma (Mariathasan et al. 2006). Otros ejemplos de sensores son el blanco de rapamicina de mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés), el receptor aryl de hidrocarburos (AHR, por sus siglas en inglés) y los receptores de proliferación de peroxisoma (PPAR- α , PPAR- β y PPAR- γ , por sus siglas en inglés) (Kau et al. 2011). La proteína mTOR es activada por la cinasa fosfatidilinositol-3 y por la cinasa serina/treonina AKT y es inhibida por la proteína activada por AMP que es un censor de los recursos energéticos de la célula (Thompson et al. 2009). La señalización por mTOR afecta la maduración y actividad de las células dendríticas y promueve la diferenciación hacia el fenotipo Th1 (Araki et al. 2010). El receptor AHR es activado por triptófano y modula la diferenciación de las células dendríticas y de las células T reguladoras (Quintana et al. 2008; Platzer et al. 2009).

Recapitulando, la cantidad de energía disponible es un componente fundamental que puede afectar la magnitud y la naturaleza de las respuestas inmunitarias y que por ende determina en parte la variación de las respuestas inmunitarias entre individuos. Los mecanismos que regulan la distribución de recursos energéticos no están del todo claros sin embargo, se ha propuesto que tanto el tejido adiposo como la hormona leptina participan activamente en este proceso. En este trabajo se pretende estudiar la relación que existe entre la disponibilidad energética y la respuesta inflamatoria utilizando como modelo un mamífero silvestre.

Ecoinmunología y ontogenia del sistema inmunitario

Debido a la complejidad del sistema inmunitario y a las limitaciones técnicas y logísticas que existen para estudiar organismos silvestres, no se ha logrado entender por completo los factores que determinan la variación de las respuestas inmunitarias. Como se mencionó previamente la distribución de recursos energéticos es una característica plástica. La cuál está determinada por reglas de prioridad que gobiernan la distribución relativa de recursos energéticos a determinados procesos fisiológicos. Sin embargo estas reglas no están claras y apenas empiezan a ser dilucidadas. Un área que ha recibido poca atención en el campo de la ecoinmunología ha sido el desarrollo del sistema inmune. No

obstante, a raíz de los pocos estudios que se han hecho acerca del tema se ha propuesto que existen diferencias interespecíficas en el desarrollo del sistema inmunitario y en la manera en la que éste responde a lo largo del tiempo (Martin et al. 2006). Por ejemplo, larvas de mosca (*Drosophila melanogaster*) expuestas a avispas parasitoides (*Asobara tabida*) mostraron una disminución en su alimentación y menor supervivencia en comparación con moscas adultas (Fellowes et al. 1999; Tien et al. 2001). Además se ha propuesto que tiempos más largos del desarrollo están asociados a una mayor inversión en las respuestas inmunitarias de organismos juveniles (Ricklefs, 1992; Tella et al. 1999; Martin et al. 2006). Más aún la activación de respuestas inmunitarias durante el desarrollo puede modificar otras funciones fisiológicas en la etapa adulta, como retrasar la reproducción (Prendergast et al. 2004). Lo anterior sugiere que las reglas que gobiernan la distribución de recursos energéticos son distintas dependiendo de la etapa de desarrollo en la que los organismos se encuentren.

Por otro lado se ha enfatizado que estudios de ésta índole son valiosos ya que ayudan a reconciliar si las funciones inmunitarias de crías varían debido a la existencia de canjes energéticos o a un efecto del desarrollo inmune *per se*. Se ha planteado que el enmascaramiento de los canjes energéticos en crías puede deberse a un sistema inmunitario inmaduro (Holsapple et al. 2003), a que los costos de las respuestas inmunes son mayores en determinados puntos de la ontogenia (Martin et al. 2006), a condiciones ambientales particulares que no requieren canjes energéticos (Sandland & Minchella 2003), o porque genuinamente no existan dichos canjes. También podrían ayudar a entender como experiencias en la ontogenia afectan caracteres inmunes durante la vida adulta (Martin et al. 2006).

El lobo marino de California

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) se distribuye a lo largo de la costa del Océano Pacífico Norte desde el sureste de la Columbia Británica en Canadá hasta el sur de Baja California en México incluyendo algunas islas del Golfo de Baja California (Lowry et al. 1992). Las áreas de reproducción del lobo marino de California se encuentran en islas localizadas al sur de California, el oeste de Baja California y en el Golfo de Baja California. Estas regiones geográficas son utilizadas para separar a la especie en tres stocks poblacionales. La población completa se estima en 238,000

individuos (Carreta et al. 2007). Además la tasa de crecimiento anual es del 5.6 % por lo que ésta especie está considerada de bajo riesgo (IUCN, 2008).

El lobo marino de California presenta un alto nivel de poliginia con establecimiento de territorios (Peterson & Bartolomew 1967). En esta especie existe un marcado dimorfismo entre sexos; los machos son de mayor tamaño, presentan una cresta sagital y un pelaje más oscuro que las hembras (Reijnders et al. 1994; Ono & Bones 1996). Las hembras alcanzan la madurez sexual entre los cuatro y cinco años (Lluch-Belda 1969) y los machos a los nueve años (Orr et al. 1970). Las hembras generalmente dan a luz a una cría al año (King 1983) y los nacimientos están concentrados en un tiempo corto que va desde mayo hasta mediados de julio (García-Aguilar & Auriolos-Gamboa 2003). La gestación dura alrededor de 11 meses con una diapausa embrionaria de alrededor de 90 días (Temte 1991). El período de lactancia dura aproximadamente seis meses cuando el proceso de destete comienza (Ramsdell & Zabka 2008); sin embargo, las crías pueden seguir consumiendo leche hasta los 10-12 meses aunque con menor frecuencia y no como su única fuente de alimento.

En términos de sus amenazas actuales, las enfermedades emergentes son un factor de riesgo importante para sus poblaciones. Entre las enfermedades de mayor relevancia están la leptospirosis (Gulland et al. 1996), la uncinariasis (Lyons et al. 2000) y más recientemente el cáncer genitourinario (Buckles et al. 2007). Estas enfermedades están bien estudiadas para las poblaciones del Pacífico estadounidense, pero se sabe menos de ellas para las poblaciones del Golfo de California y el Pacífico Mexicano. Actualmente todos los pinnípedos de México, incluyendo al lobo marino de California, están protegidos por la legislación mexicana (Norma oficial mexicana NOM.059-ECOL 1994, D.O.F. 16/05/1994). Sin embargo, a pesar de las iniciativas para la protección de los pinnípedos y a las investigaciones realizadas en materia de ecología poblacional e historia natural, se sabe muy poco acerca de cuestiones fisiológicas relevantes para el manejo y conservación de estos animales en nuestro país, incluyendo el riesgo que significan para sus poblaciones las enfermedades infecciosas. Por lo anterior, es esencial entender aspectos claves de la inmunidad así como su relación con otros factores de la historia de vida de estos animales.

El objetivo de este trabajo fue investigar la relación entre la disponibilidad de los recursos energéticos y la respuesta inflamatoria en tres etapas del desarrollo del lobo marino de California. Para esto se puso a prueba la hipótesis de que los individuos con una mejor

condición corporal podrán invertir más recursos energéticos en montar una respuesta inflamatoria, por lo que la magnitud de la respuesta inflamatoria debiera estar relacionada positivamente con la condición corporal. Asimismo se predijo que esta relación se mantendría a lo largo de las tres etapas del desarrollo evaluadas. Para lograr lo anterior se realizaron desafíos inmunes in vivo mediante la prueba de PHA y se analizó la relación entre la magnitud de la inflamación y la condición corporal de las crías como una medida de sus recursos energéticos disponibles; en tres etapas del desarrollo distintas. Además se caracterizaron los componentes celulares de la prueba de PHA con el objetivo de describir la naturaleza de esta prueba.

Capítulo 2.

Metodología general

Trabajo de campo

El trabajo de campo se realizó en la lobera Granito, localizada en la Isla Granito (29° 33' 43" N, 113° 32' 04" W, Fig. 3.0) la cual se ubica dentro del área de protección de flora y fauna "Islas del Golfo" (CONANP, SEMARNAT). Los lobos marinos fueron capturados mediante el uso de redes mariposeras e inmovilizados por contención manual. En la salida realizada en julio de 2012 se capturaron y obtuvieron muestras de 30 crías de seis a ocho semanas de edad. El manejo incluyó un marcaje temporal mediante el rasurado de un número de identificación único en el dorso, y la inyección subcutánea dorsal de un microchip (Avid) a la altura del cuello. Durante la salida de octubre del mismo año se muestrearon 18 crías de 18 a 24 meses de edad. Las crías se marcaron con el uso del microchip y ambas aletas frontales se marcaron con aretes (*flipper tags*) que tenían un número de identificación único. Durante la salida del mes de junio de 2013 se capturaron 23 crías de alrededor de 1-3 semanas de edad, éstas se marcaron en ambas aletas dorsales con aretes de identificación.

Cada cría fue pesada con una báscula colgante vertical de 60 Kg (precisión 0.1 Kg). Mediante el uso de una cinta métrica se registró la longitud total (LT), longitud curvilínea (LC), diámetro axilar (DA), diámetro umbilical (DM) y diámetro pélvico (DP). Además mediante el uso de un vernier (Mitutoyo U.S.A) con precisión de 0.01 mm se midió por triplicado el grosor de capa de grasa dorsal de cada cría (Luque & Aurióles-Gamboa 2001).

Hematología

Se tomaron tres muestras de sangre mediante la punción de la vena glútea caudal con equipo de vacío Vacutainer (BD Diagnostics, EE.UU.A). La primera muestra (5-7 ml) era colectada en un tubo con heparina sódica; la segunda muestra (3-5 ml) era colectada en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para la determinación de la

concentración total de leucocitos, hematocrito y frotis sanguíneos. La tercera muestra de sangre (7-10 ml) era colectada en un tubo sin anticoagulante.

La sangre con heparina era centrifugada inmediatamente a 4000 rpm durante 15 minutos para la separación *in situ* de la capa leucocitaria, misma que era almacenada en criotubos con solución amortiguante RNA $later$ (Ambion) a una proporción de 1:5 y se conservó a 8°C durante 6-8 horas aproximadamente. Al regresar al campamento se transfería a un criocontenedor (-120°C) donde permaneció durante el tiempo que duró la salida de campo.

La sangre sin anticoagulante se dejó coagular *in situ* antes de centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Este (1-2 ml) fue almacenado en criotubos a 8°C durante 6-8 horas aproximadamente, posteriormente en un criocontenedor con hielo seco durante el tiempo que duró la salida de campo.

El conteo total de leucocitos circulantes se realizó mediante el uso de un hemocitómetro modificado (Optic Labor, CA, EEUU). Previo al conteo se diluían 50 μ l de sangre en 950 μ l de solución de Turk (violeta de genciana y ácido acético glacial 6%). El hematocrito¹ se midió posterior a la centrifugación de las muestras de sangre con EDTA a 4000 rpm durante 15 minutos. De cada muestra sanguínea se realizaron 3 frotis de capa delgada que fueron fijados en metanol al 90% durante diez minutos, secados a temperatura ambiente, y almacenados en cajas protegidos de la luz. En el laboratorio fueron teñidos siguiendo el método de tinción amortiguada de Wright. La tinción de Wright pertenece al grupo de las tinciones de tipo Romanowsky que son una mezcla de un colorante catiónico como el azul de metileno y uno aniónico como la eosina. El componente catiónico tiñe el núcleo de las células mientras el aniónico tiñe el citoplasma. En el Cuadro 2.1 se muestran los valores hematológicos para el lobo marino de California.

¹ Porcentaje total de la sangre compuesta por eritrocitos.

Cuadro 2.1 Valores hematológicos en lobo marino de California

	Crías destetadas varadas ¹	Adultos en cautiverio ²
	n=73	n=23
Número total de leucocitos/ μ l	9780-22800	3400-11380
Porcentaje de neutrófilos	52-73 %	62-72 %
Porcentaje de linfocitos	12-36 %	10-28 %
Porcentaje de monocitos	1-7 %	0-7 %
Porcentaje de eosinófilos	0-6 %	0-5.5%
Porcentaje de basófilos	0 %	0-.3 %

¹Datos reportados en el Centro de Mamíferos Marinos (TMMC por sus siglas en inglés)

²Bossart et al. 2001



Figura 3.0. Mapa de la Región de las Grandes Islas en donde se muestra la isla Granito lugar dónde se llevó a cabo el trabajo de estudio (imagen obtenida de Godínez-Reyes et al. 2006).

Capítulo 3

Caracterización histológica de la respuesta inmunitaria a fitohemaglutinina del lobo marino de California, *Zalophus Californianus*.

Introducción

La fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) se deriva del frijol *Phaseolus vulgaris* y pertenece al grupo de proteínas de unión a carbohidratos mejor conocidas como lectinas. Estas proteínas se encuentran comúnmente en las semillas de algunas plantas en donde se piensa tienen un efecto contra la herbivoría (Sharon & Lis 2004). Los primeros estudios acerca de estas moléculas fueron realizados hace más de 100 años donde se observó por primera vez el efecto de aglutinación que tenían sobre las células animales (Acevedo-Moreira et al. 1991). Posteriormente se mostró que la PHA era un importante mitógeno de linfocitos (Nowell 1960). A partir de estos trabajos la PHA ha sido utilizada en numerosas ocasiones para análisis *in vitro* de la capacidad mitogénica de células inmunitarias, la producción de citocinas proinflamatorias y el estudio de agentes inmunomoduladores, entre otras cosas (Kennedy & Nager 2006).

La prueba de PHA es también utilizada comúnmente como una manera de medir la respuesta inmunitaria en el campo de la ecoinmunología (Demas et al. 2011). Ésta prueba se ha utilizado para evaluar respuestas de hipersensibilidad retardada (delayed-type hypersensitivity o DTH, por sus siglas en inglés) a través de la activación mitogénica de linfocitos (Stadecker et al. 1977) y más recientemente para estimular una respuesta inflamatoria *in vivo* (Martin et al. 2006; Turmelle et al. 2010). Mediante este ensayo se ha investigado la respuesta celular inmunitaria en relación a canjes energéticos con otras funciones fisiológicas en mamíferos (Allen et al. 2009; Lehmer et al. 2007, Brock et al. 2013a), aves (Martin et al. 2006); reptiles (Berger 2005; Khan et al 2007) y anfibios (Grevasi & Foufopolus 2008). El desafío con PHA ocasiona un aumento del 29 % en la tasa metabólica basal del gorrión común (*Passer domesticus*), por lo que se sugiere que montar una respuesta a este compuesto es energéticamente costoso (Martin et al. 2003).

Debido al uso tan frecuente de la técnica de PHA en estudios ecoinmunológicos se ha discutido ampliamente el cómo se deben interpretar los resultados obtenidos al aplicar ésta prueba. Durante mucho tiempo se asumió que el desafío con PHA generaba una

medida de la eficiencia de los linfocitos T (Bromer 2004; Cucco et al. 2006; Tella et al. 2008). Por otro lado se ha reportado que la inyección de PHA en la membrana del ala de aves y de murciélagos no solo conlleva la infiltración de linfocitos si no de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y basófilos (Martin et al. 2006; Turmelle et al. 2010). Más recientemente se mostró que la PHA activa una respuesta inflamatoria generada por la respuesta de diferentes tipos de leucocitos y no solamente debido a la mitosis de linfocitos T (Vinkler et al. 2010), lo que sugiere que la prueba de PHA es una medida de la inducibilidad de la señalización proinflamatoria que ocasiona la infiltración de leucocitos en el sitio del desafío (Vinkler et al. 2010). Recientemente se mostró que la PHA tiene la capacidad de unirse específicamente al TLR4 de manera similar a lipopolisacáridos de bacteria (LPS) y activar la producción de citocinas proinflamatorias a través de la activación del sistema inmune innato (Unitt & Hornigold 2011). A pesar de las evidencias anteriores se ha recalado que para tener una interpretación correcta de los resultados de la prueba de PHA, es necesario llevar a cabo la caracterización histológica para determinar los tipos celulares que generan la inflamación (Turmelle et al. 2010).

En este capítulo se presenta el análisis histológico de biopsias de tejido desafiado con PHA o y tejido desafiado con solución salina como un control negativo. El análisis se realizó durante diferentes etapas del desarrollo de crías de lobo marino de California provenientes de una misma lobera reproductiva.

Metodología

Desafío con fitohemaglutinina

Durante el muestreo de julio 2012 (ver capítulo dos) a cada cría se le midió por triplicado el grosor de la membrana interdigital entre la segunda y tercer falange de las aletas posteriores mediante el uso de un vernier (Mitutoyo EUA, precisión 0.01 mm). Posteriormente se administró una inyección intradérmica de 100 µl de una solución de 1mg/ml de PHA (L8754, Sigma-Aldrich, México) en la aleta derecha. El mismo volumen de solución salina estéril (solución CS, PiSA, México) se aplicó en la aleta izquierda como control negativo. Por motivos logísticos, las crías fueron recapturadas a diferentes tiempos de haberles aplicado el PHA (4, 24 y 48 horas). A la recaptura se midió por triplicado el grosor de la membrana interdigital en el punto de inyección utilizando el mismo vernier. La respuesta al desafío con PHA, considerado aquí como el índice de inflamación, se calculó

como la diferencia entre el cambio promedio del grosor de la membrana interdigital inducido por la inyección de solución salina del aleta izquierda y el cambio promedio del grosor de la membrana interdigital inducido por la inyección de PHA en la aleta derecha (Brock et al. 2013b).

A partir de los datos de la respuesta a PHA obtenidos en julio 2012 (Fig. 3.1) se determinó mediante una prueba de t student que no existe una diferencia ($t = -0.84$, $P = 0.41$, $GL = 10$) en el índice de inflamación a las cuatro y 24 horas. A partir de las 29 horas disminuye la respuesta inflamatoria ($t = 4.63$, $P = 0.0003$, $GL = 9$). Debido a lo anterior y a la dificultad de recapturar a las crías, en los muestreos de octubre 2012 y junio 2013 (ver Capítulo dos) se siguió el mismo protocolo de desafío pero el índice de inflamación se calculó entre las cuatro y cinco horas de haber realizado la inyección de PHA. Con esta variación en el protocolo los lobos marinos fueron mantenidos en una alberca desde su captura hasta la determinación del índice de inflamación por lo que no fue necesaria la recaptura, evitando así el estrés en los animales y la posibilidad de no poder recapturarlos.

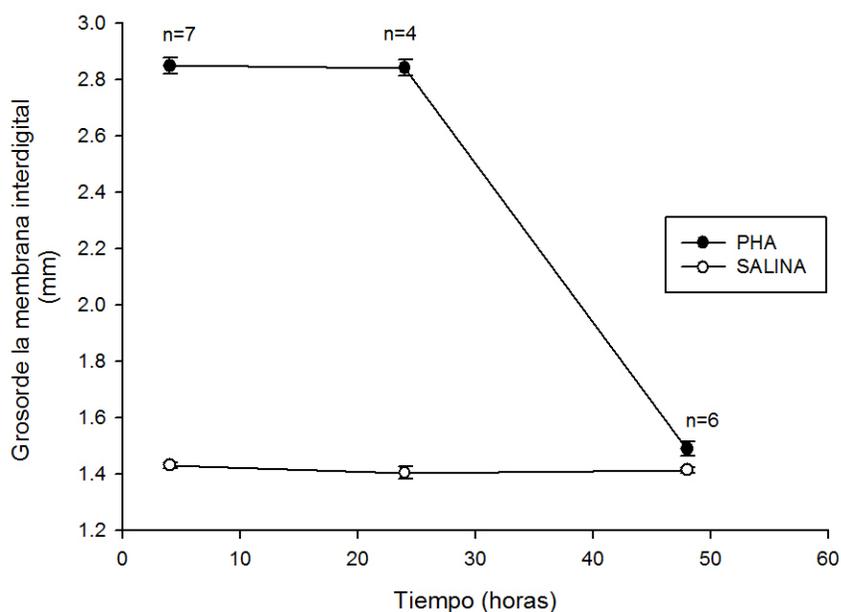


Figura. 3.1. Comparación de la inflamación de la membrana interdigital generada por la inyección de PHA (círculos negros) o solución salina (círculos abiertos) a cuatro, 24 y 48 horas pos-inyección en crías de lobo marino de California. Las barras representan el error estándar de las repeticiones.

Obtención y procesamiento de biopsias dérmicas

Se tomaron biopsias de la membrana interdigital de las aletas posteriores en los sitios de la inoculación con PHA y con solución salina mediante el uso de sacabocados estériles (Biopsy punch, Miltex, EEUUA) de 2 mm para las crías de dos meses y de 4 mm para las crías de seis semanas. Las muestras de tejido fueron fijadas inmediatamente en formalina amortiguada al 10 % y protegidas de la luz.

En el laboratorio las muestras fueron deshidratadas mediante el uso de un equipo histokinnette (Microm STP 120) de acuerdo al siguiente protocolo:

- Inmersión en alcohol etílico al 70 % durante 90 min (se repitió 2 veces);
- Inmersión en alcohol etílico al 90 % durante 90 min (2 veces);
- Inmersión en alcohol etílico al 100 % durante 90 min (2 veces);
- Inmersión en xylol durante 120 min (2 veces);
- Inmersión en parafina durante 120 min.

Los tejidos deshidratados fueron embebidos en bloques de parafina. Los tejidos fueron seccionados mediante el uso de un microtomo (RM2125RT, Leica, EEUUA). Se cortaron verticalmente secciones de 8 μ m; se montaron en laminillas y se fijaron con calor a 37°C durante 24 horas. Las muestras de tejido fueron teñidas con hematoxilina-eosina de acuerdo al siguiente protocolo:

- Xileno durante 5 min (se repitió 2 veces);
- Alcohol etílico absoluto durante 3 min (2 veces);
- Alcohol etílico al 96 % durante 3 min (2 veces);
- Alcohol etílico al 80 % durante 3 min;
- Enjuague con agua corriente durante 10 min;
- Hematoxilina durante 7 min;
- Enjuague con agua corriente durante 10 min;
- Alcohol etílico al 80 % durante 1 min;
- Eosina durante 20 segundos;
- Alcohol etílico al 96 % durante 3 min (2 veces);
- Alcohol etílico absoluto durante 3 min (2 veces),
- Xileno durante 3 min (2 veces);
- Montaje con entellan (107961, Merck Millipore, EEUUA).

Se eligieron dos secciones del corte tisular y en estos se determinó la infiltración de leucocitos en el tejido inoculado con PHA y en el tejido inoculado con solución salina. Para esto se escanearon ambas secciones a 40X de aumento utilizando el programa Aperio ScanScope CS (Aperio Vista, CA, EEUA) y se contó el número de células con el programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EEUA). La infiltración de células se caracterizó mediante la creación de un recuadro fijo de 120 micras en el que se contaron las células que estuvieran dentro o en contacto con el perímetro. Esto se realizó a lo largo del tejido en dirección vertical. Para elegir las zonas donde se realizaría el conteo la sección de tejido se dividió en una cuadrícula de 200 recuadros mediante la función cuadrícula del programa Aperio ScanScope, posteriormente mediante la función "aleatorio" en el programa de Excel se eligió un número entre el 0 y 200 y se ubicó este recuadro en la cuadrícula. Para cada individuo se contaron tres recuadros, tanto del tejido inoculado con PHA como el inoculado con solución salina, y el promedio de estas sub-muestras fue utilizado para los análisis estadísticos.

Se contaron células en seis categorías: linfocitos, neutrófilos eosinófilos, basófilos, macrófagos y fibroblastos. Los linfocitos se identificaron como células circulares pequeñas con un núcleo morado hiperpigmentado. Los neutrófilos se identificaban por su núcleo multilobulado, los eosinófilos por su núcleo bilobulado y la presencia de gránulos citoplasmáticos de tinción rojiza, los basófilos se caracterizaron por la presencia de gránulos basófilos. Los macrófagos se identificaron como células grandes o en forma de huso con núcleo en forma de riñón (Martin et al., 2006). Los fibroblastos se identificaron como células ramificadas con núcleo elíptico o alargado (Baglolle et al. 2006).

Análisis estadísticos

Utilizando la prueba de Shapiro-Wilk se analizó si las variables venían de una población de distribución normal. Para las crías de dos meses de edad el número de eosinófilos no cumplió con los criterios de normalidad y para las crías de seis meses de edad el número de macrófagos y eosinófilos infiltrados al tejido tampoco cumplían con normalidad, por lo que estos datos se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (Sokal & Rohlf 1979). Para el resto de los datos las diferencias en la infiltración de células y la inflamación generada por la inyección de solución salina y de PHA se investigaron mediante la prueba T de student o de muestras independientes. Además se evaluó la relación entre la inflamación macroscópica y los conteos de leucocitos en los tejidos

inyectados con PHA y la relación entre el porcentaje de células circulantes y los conteos de leucocitos en los tejidos inyectados con PHA mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Resultados

Infiltración celular en respuesta a PHA

La inyección de PHA en las crías de dos semanas s de edad generó un cambio significativo en el grosor de la membrana interdigital en comparación con la inyección de solución salina (T = 50, P = 0.0001, GL = 22, Fig. 3.3A). Lo mismo sucedió para las crías de dos meses de edad (T = 48.43, P = 0.0001, GL = 11, Fig. 3.3B). Sin embargo En las crías de 6 meses de edad la inyección con PHA no generó un cambio significativo en el grosor de la membrana interdigital de algunos individuos (W = 47.5, n = 9, P > 0.05, , Fig. 3.3C). Mientras que en el resto de animales muestreados la inyección de PHA generó un cambio significativo en el grosor de la membrana interdigital (W = 81, n = 9, P < 0.01, Fig.3.3C).

En las crías de dos meses la inyección de PHA generó un aumento significativo en el número de neutrófilos (T = 13.05, GL = 7 P = 3.14×10^{-9}), linfocitos (T= 6.57, GL = 7, P = 1.24×10^{-5}) y macrófagos (T = 2.59, GL = 7, P = 0.021) infiltrados al tejido en comparación con la inyección de solución salina (Fig. 3.4A B, C). Asimismo, se observó que el número de fibroblastos fue menor en el tejido inyectado con PHA (T = -5.32, GL= 7, P = 0.0001, Fig.3.4d). El número de eosinófilos infiltrados al tejido en respuesta a PHA no fue significativamente diferente del control (W = 40, n= 8, P > 0.05, Fig. 3.4E).

En las crías de seis meses de edad que no mostraron cambios en la inflamación tampoco se observó infiltración significativa de neutrófilos (T = -.74, GL = 6, P = 0.46), linfocitos (T = 1.05, GL = 6, P = 0.31), eosinófilos (W = 24, n = 7, P= 1) y macrófagos (W = 21, n = 7, P = 0.70). Tampoco se observaron diferencias en el número de fibroblastos fibroblastos en el tejido inyectado con PHA (T = -0.16, GL = 6, P = 0.87) ((Fig. 3.5 A, B,C, D y E). Por otro lado, en los individuos que mostraron una inflamación en respuesta a PHA se observó un aumento significativo en el número de neutrófilos (T = 25.07, GL = 8, P = 2.84×10^{-14}), linfocitos (T = 14.13, GL = 8, P = 1.84×10^{-10}) y eosinófilos (W=81, n = 9, P<.01) infiltrados al tejido en comparación con la inyección de solución salina (Fig. 3.5A, B, C). Asimismo, se observó que el número de fibroblastos fue menor en el tejido inyectado con PHA (T = -

5.32, GL = 8, $P = 1.07 \times 10^{-7}$, Fig. 3.5D). A diferencia de las crías de 2 meses de edad la PHA no genero diferencias significativas en el número de macrófagos infiltrados al tejido ($W = 56$, $n = 9$, $P > 0.05$, Fig. 3.5E).

Para los individuos de ambos grupos de edad que mostraron un cambio en la magnitud de la inflamación en respuesta a PHA las células más abundantes fueron neutrófilos (26.17 ± 1.08), seguidos de linfocitos (8.85 ± 0.64), macrófagos ($5.35 \pm .74$) y en menor medida eosinófilos ($1.38 \pm .28$). Por el contrario, las células más abundantes en los tejidos control, fueron fibroblastos (18.14 ± 0.80) mientras que en los tejido tratados con PHA disminuyo significativamente su número (10.40 ± 0.59) (Fig. 3.6). Finalmente, al analizar la relación entre el número de neutrófilos y el cambio en el grosor de la membrana interdigital en respuesta a PHA, no se observó una correlación significativa ($r = -0.19$, $P = 0.23$), tampoco entre el número de linfocitos ($r = -0.22$, $P = 0.13$), eosinófilos ($r = 0.15$, $P = 0.14$) y macrófagos ($r = -0.02$, $P = 0.93$). Al analizar si existía una relación entre el número de leucocitos infiltrados al tejido con el porcentaje de leucocitos circulantes tampoco se observaron correlaciones significativas para ninguno de los tipos celulares; neutrófilos ($r = 0.50$, $P = 0.06$), linfocitos ($r = -0.27$, $P = 0.33$), eosinófilos ($r = 0.21$, $P = 0.46$) y macrófagos ($r = -0.04$, $P = 0.87$).

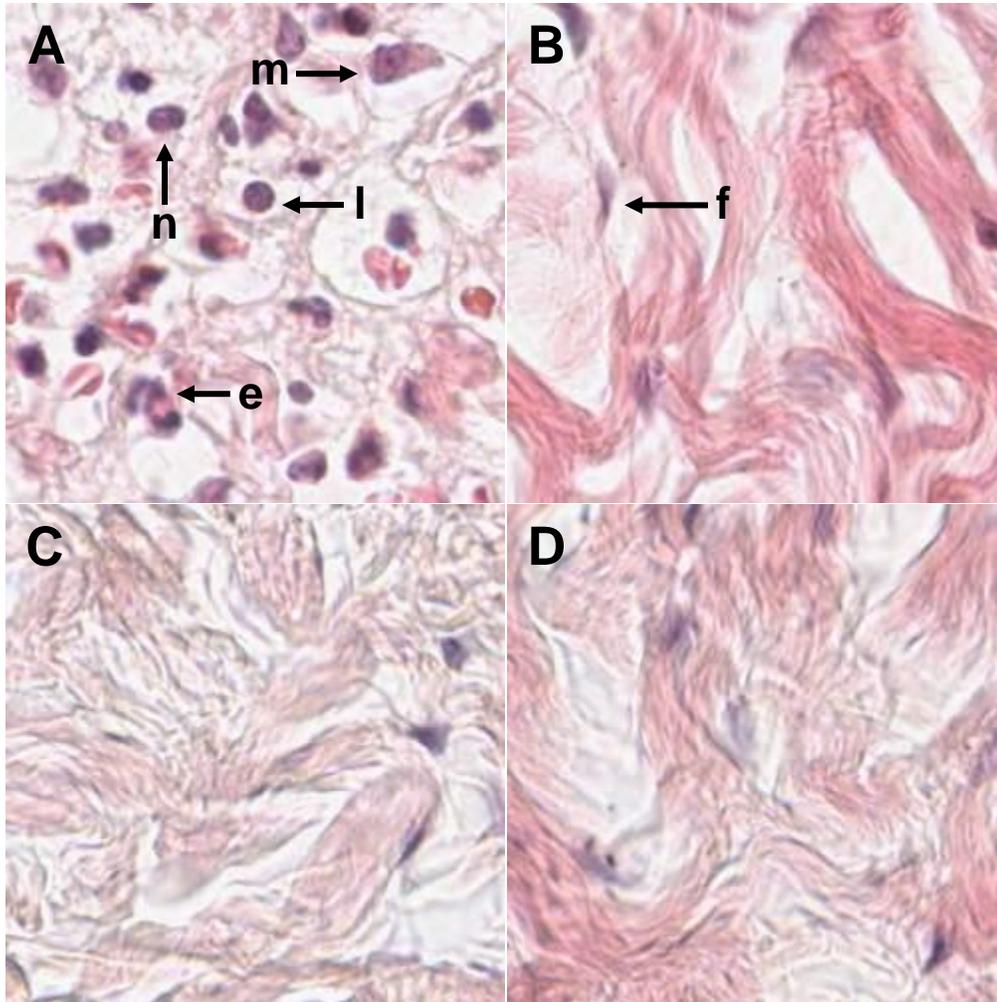


Fig. 3.2. Secciones de tejido vistas a 40X a las cuatro horas post-inyección de PHA o solución salina. A) tejido inyectado con PHA mostrando la infiltración celular de *n* neutrófilos, *e* eosinófilos, *l* linfocitos y *m* macrófagos. B) tejido inyectado con solución salina en donde solo se observan *f* fibroblastos. C) tejido inyectado con PHA en donde no se observó la infiltración de células. D) tejido inyectado con solución salina en donde no se observó la infiltración de células.

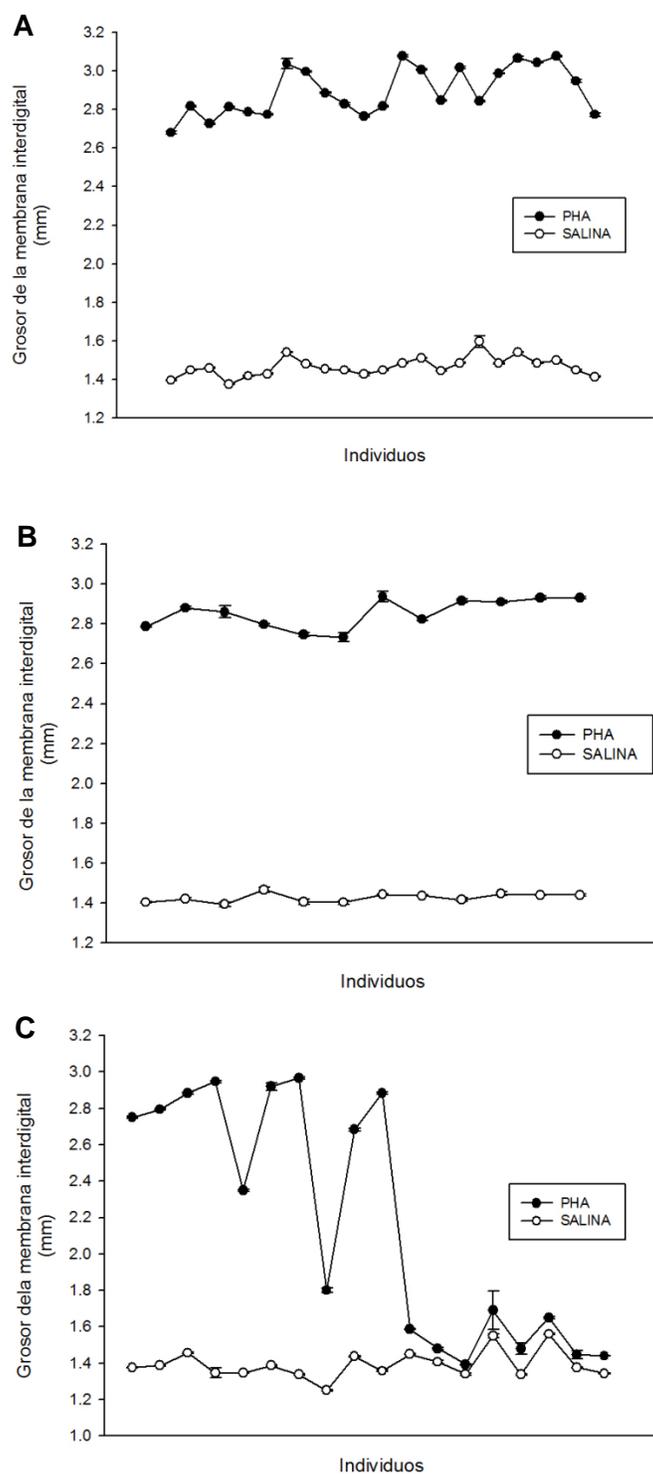


Fig. 3.3. Cambio en el grosor de la membrana interdigital en respuesta a PHA (círculos cerrados) y solución salina (círculos abiertos) de A) crías de lobo marino de California de dos semanas, B) dos meses y C) seis meses.

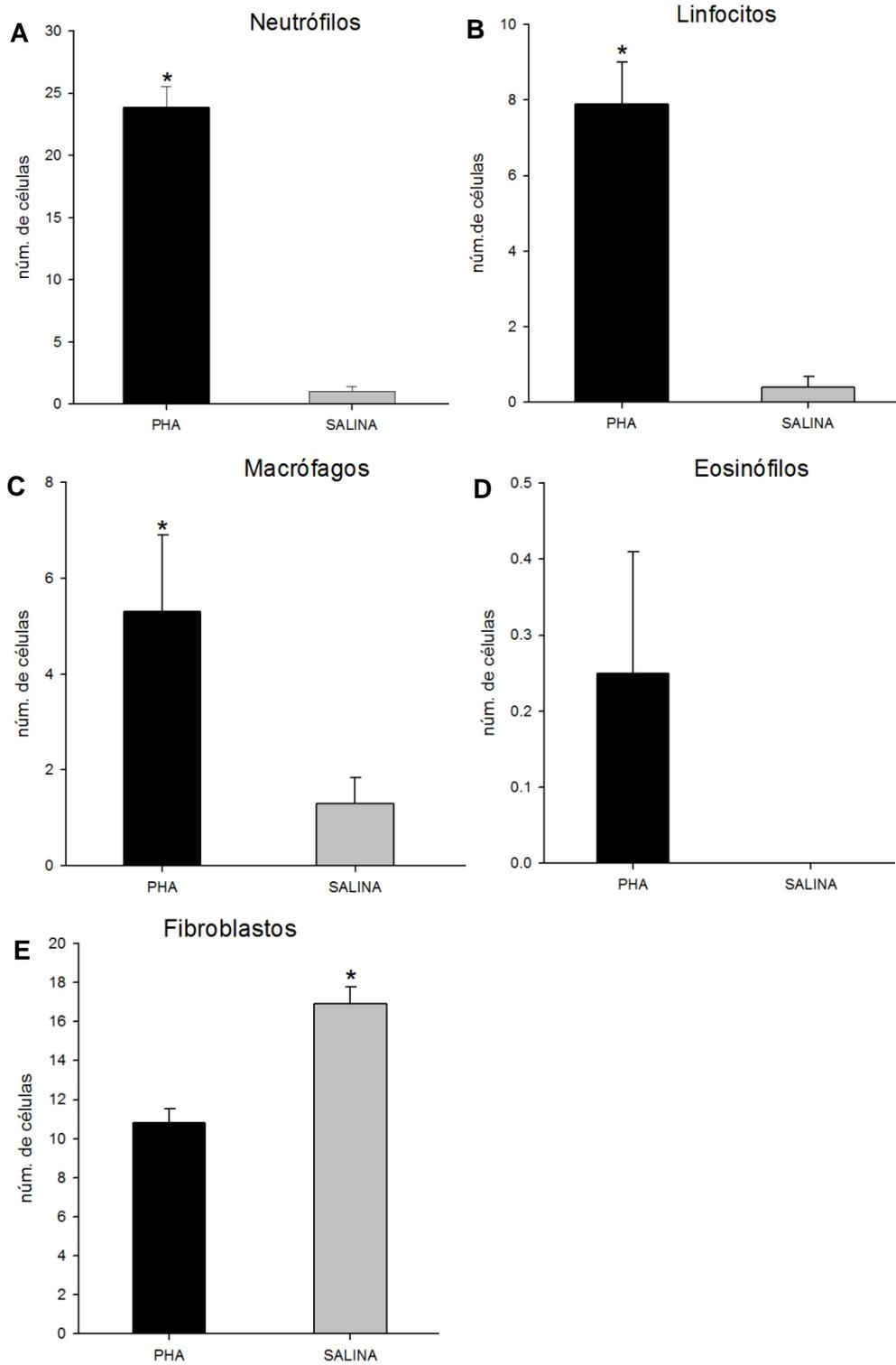


Fig. 3.4. Conteo celular promedio de A) neutrófilos, B) linfocitos, C) macrófagos, D) eosinófilos y E) fibroblastos en crías de lobo marino de California de dos meses (* $P < 0.05$).

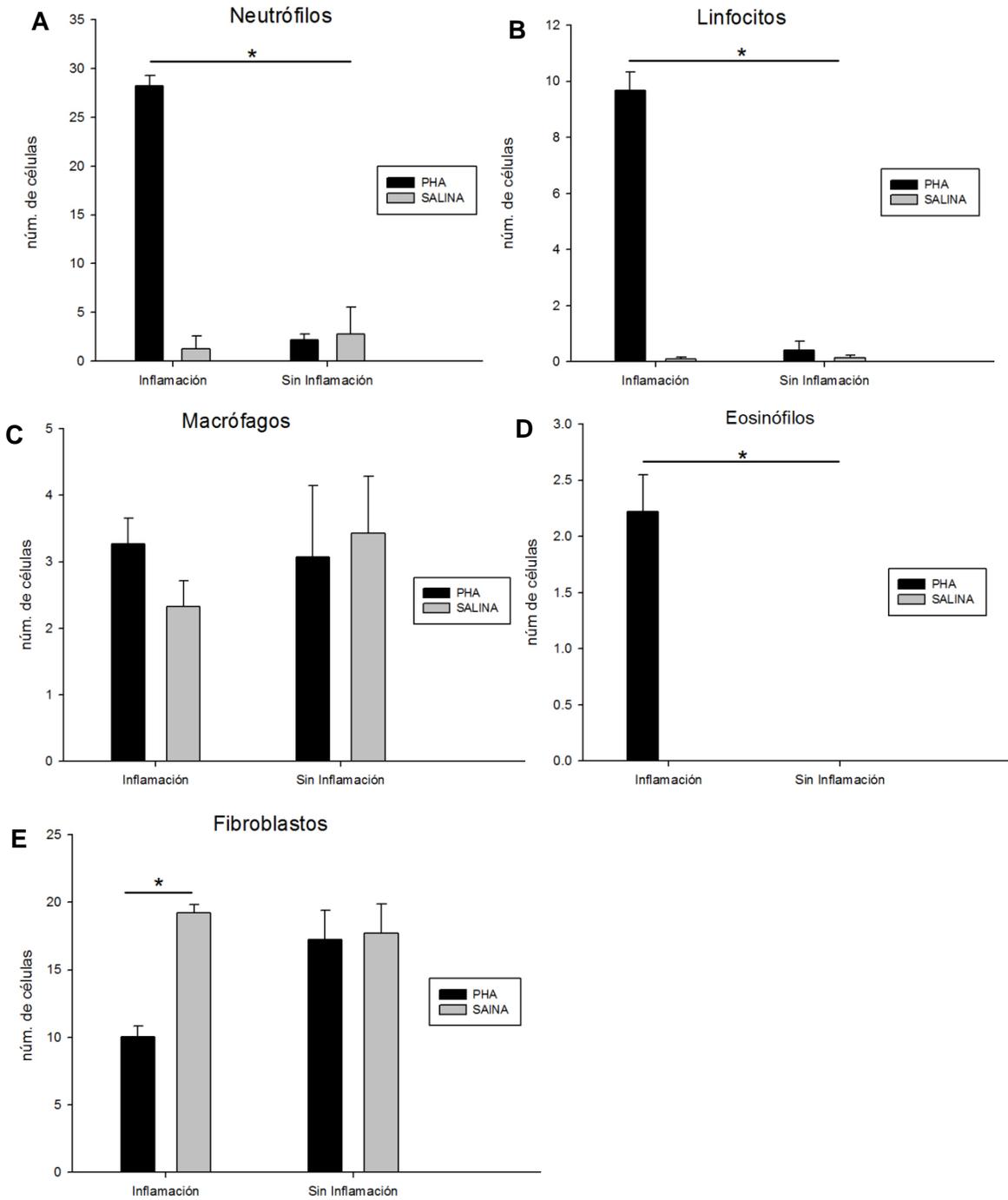


Fig. 3.5. Conteo celular promedio de A) neutrófilos, B) linfocitos, C) macrófagos, D) eosinófilos y E) fibroblastos en crías de lobo marino de California de seis meses (* $P < 0.05$).

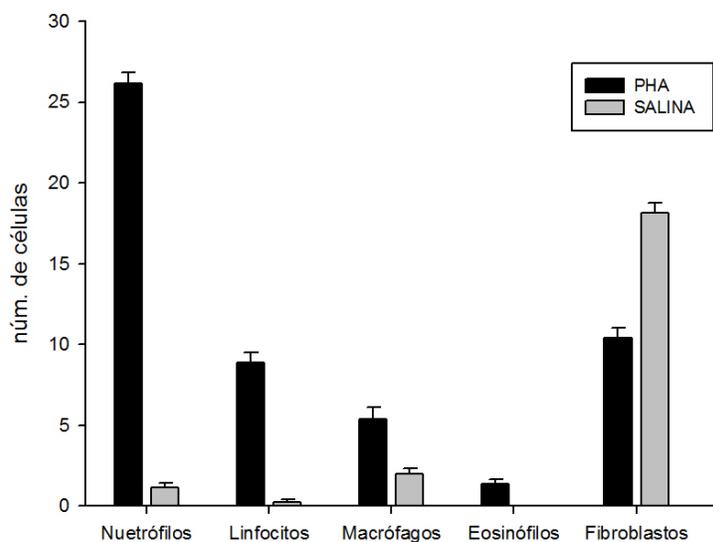


Fig. 3.6. Promedio del número de células infiltradas al tejido en respuesta a la inyección de PHA o de solución salina de crías de ambos grupos de edad.

Discusión

La técnica de PHA se ha utilizado numerosas veces como una manera de medir la respuesta inmunitaria de los organismos, principalmente aves, bajo un contexto ecológico. Es sabido que esta respuesta es costosa y puede ser canjeada con otras funciones fisiológicas (Tella et al. 2001; Fargallo et al. 2002; Navarro et al. 2003; Martin et al. 2006; Brock et al. 2013b). A pesar de la cantidad de información funcional que existe sobre la prueba de PHA, recientemente se ha enfatizado la importancia de caracterizar sus componentes celulares en la especie e incluso en la población con la cual se piensa trabajar (Turmelle et al. 2010).

En este capítulo se muestra que la respuesta inflamatoria hacia PHA en el lobo marino de California es determinada por procesos celulares complejos que involucran diferentes poblaciones de leucocitos. Lo anterior concuerda con lo que se ha visto para aves (Martin et al. 2006) y pequeños mamíferos (Turmelle et al. 2010). A las cuatro horas de haber realizado la inyección de PHA se observó un aumento significativo en el número de neutrófilos y linfocitos infiltrados al tejido. Sin embargo en el caso de los macrófagos y eosinófilos se encontraron diferencias entre las etapas de desarrollo de las crías de lobo marino de California incluidas en este análisis. En las crías de dos meses de edad se

observó un aumento de macrófagos infiltrados al tejido en respuesta a PHA mientras que para las crías de seis meses no encontramos diferencias. Por el contrario, para las crías de seis meses se observó un aumento significativo en el número de eosinófilos mientras que en las crías de dos meses se observaron muy pocos eosinófilos en general. Se ha reportado en humanos neonatos que las células polimorfonucleares, incluyendo a los eosinófilos, poseen deficiencias en su actividad microbicida, quimiotaxis y activación lo que puede generar una menor infiltración y una respuesta deficiente en tejidos infectados o una migración más lenta (Schuit & DeBlasio 1980; Hill, 1987). Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias en los números de otras poblaciones de células polimorfonucleares entre ambas etapas. No obstante es posible que a las cuatro horas de haber realizado el desafío no se hayan observado eosinófilos en el tejido debido a una migración más lenta. Por otro lado, se ha reportado que existen diferencias entre las poblaciones celulares que atraen determinadas citocinas (Ming et al. 1987). Por ejemplo, la interleucina 1-alpha (IL-1 α) induce la migración de neutrófilos (Bittleman et al. 1995) mientras que la interleucina cinco (IL5) induce la migración específica de eosinófilos (Takatsu & Nakajima 2008). En este sentido, es posible que citocinas secretadas localmente no hayan inducido una infiltración de eosinófilos en el tejido desafiado con PHA.

Se ha reportado que existe variación interpoblacional e interespecífica en la respuesta inflamatoria hacia PHA lo que sugiere que el funcionamiento del sistema inmunitario es afectado por la historia de vida de los organismos (Martin et al. 2006). En acorde con esto, en este estudio se observaron diferencias en la respuesta inflamatoria hacia PHA de crías de lobo marino de California. La respuesta generada por las crías de seis meses fue diferente a aquella observada en las crías de dos meses ya que todas las crías de dos meses montaron una respuesta inflamatoria mientras que la mitad de las crías de seis meses no mostró cambios en la inflamación en respuesta a PHA. Más aún, al realizar las biopsias de tejido de estos individuos no observamos una infiltración significativa de alguna población de leucocito, lo que confirma la falta de una respuesta celular hacia la inyección de PHA. Se ha reportado con anterioridad una disminución en la respuesta hacia PHA de varias especies de aves en relación a canjes energéticos con otras funciones fisiológicas costosas (Lifjeld et al, 2002; Navarro et al. 2003; Greenman et al. 2005; Martin 2005). Por ejemplo se ha observado que la respuesta a PHA disminuye significativamente en aves que se encuentran empollando sus huevos sobre todo cuando sufren una restricción de alimento (Bourgeon et al. 2013) y en aves que sufren de estrés

térmico (Reignier & Kelley 1981). Lo anterior sugiere que la inversión de recursos energéticos en funciones fisiológicas como la reproducción y la termorregulación limita aquellos recursos disponibles para generar una respuesta hacia la PHA. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la falta de respuesta hacia dicha molécula. El fenómeno anterior es de sumo interés ya que sugiere que montar una respuesta hacia PHA es energéticamente costoso en el lobo marino de California. En apoyo a esto, en un estudio reciente realizado en crías de lobo marino de Galápagos se observó una menor respuesta hacia PHA en animales bajo estrés antropogénico (Brock et al. 2013a). Además es probable que la variación que observamos en dicha respuesta se deba a canjes energéticos con otras funciones fisiológicas. Se ha propuesto que la tasa de crecimiento refleja el potencial de los tejidos de llevar a cabo proliferación y crecimiento celular (Ricklefs et al. 1998). Estos procesos requieren altos niveles de energía por lo que se considera que el crecimiento es un proceso energéticamente costoso. Particularmente en los mamíferos el crecimiento somático es acelerado durante el desarrollo embrionario y durante la etapa posnatal y disminuye significativamente con la edad (Lui et al. 2008). En este sentido las crías son distintas a los adultos ya que destinan una mayor cantidad de recursos energéticos al crecimiento. La mayoría de los estudios con PHA se han hecho utilizando adultos por ende es posible que la razón por la cual nunca antes se había reportado una falta de respuesta a la PHA se deba a los diferentes requerimientos energéticos entre crías y adultos. Finalmente, la inflamación macroscópica de las crías de lobo marino de California en respuesta a la inyección de PHA no estuvo correlacionada con la abundancia de ningún tipo celular en específico y podría reflejar más bien la acumulación total de leucocitos en el sitio de inyección. Asimismo, la falta de una correlación entre el número de linfocitos y la magnitud de la inflamación refuerza lo observado por Turmelle y colaboradores (2010), indicando que la respuesta a PHA no es una medida de la competencia celular de los linfocitos T sino más bien una medida de la capacidad de montar una respuesta inflamatoria.

Capítulo 4.

Los costos de la inmunidad a lo largo de desarrollo temprano.

Introducción

La inflamación representa la primera línea de defensa de un organismo contra cualquier agente que amenace su supervivencia. Existe evidencia de que montar una respuesta inflamatoria es energéticamente costoso (Ashley et al. 2012, Martin et al. 2003). Por ejemplo, la utilización de glucosa puede incrementar hasta en un 68 % en una respuesta de fase aguda (Klasing 1998) y si la respuesta inflamatoria se sale de control como sucede durante una septicemia, la tasa metabólica basal puede incrementar hasta un 60% (Lochmiller & Deerenberg 2000). Además, se ha observado variación en la activación de la respuesta inflamatoria en relación a otros caracteres de la historia de vida lo que sugiere que ésta respuesta es afectada por los canjes energéticos entre las diferentes funciones fisiológicas (Bilbo et al. 2002; Owen-Ashley & Wingfield 2006, Weil et al. 2006). No obstante, a pesar de las múltiples evidencias acerca del costo de las respuestas inmunitarias y de la inflamación, existe poca información acerca del desarrollo del sistema inmunitario en organismos silvestres y sobre las restricciones energéticas que la activación e implementación de sus efectores ejercen sobre diferentes funciones fisiológicas.

Una de las discusiones más importantes dentro del campo de la ecoinmunología ha sido sobre cómo medir la competencia inmunitaria de los organismos (Siva-Jothy 1995, Demas et al. 2011). En el capítulo tres de esta tesis se caracterizaron los componentes celulares de una de las pruebas más utilizadas en el campo de la ecoinmunología, la prueba de PHA, en el lobo marino de California. A partir de los resultados obtenidos se determinó que la prueba de PHA refleja la capacidad de montar una respuesta inflamatoria y que ésta es costosa ya que existen diferencias individuales en la magnitud de la respuesta generada hacia este compuesto. En este capítulo utilizamos la medida de inflamación macroscópica y analizamos su relación con otros parámetros inmunes incluyendo conteos totales y diferenciales de leucocitos en sangre. La medida de la concentración total de leucocitos circulantes se ha utilizado ampliamente como indicador del estado de salud (Ots et al. 1998), y se sabe que un número relativamente elevado de leucocitos suele estar asociado a procesos inflamatorios e infecciones agudas (Dei 1986), mientras que un

número relativamente bajo suele asociarse a infecciones crónicas (Sweetnam et al. 1997). Los conteos diferenciales de leucocitos, conocidos también como perfiles leucocitarios, proveen información importante sobre la concentración de tipos celulares específicos (Davis et al. 2008). Los perfiles leucocitarios han sido utilizados durante varios años como una forma indirecta de medir estrés en aves de corral (Gross & Siegel 1983; Davis et al. 2000; Nicol et al. 2006) y como indicadores del estado de salud (Davis et al. 2004) por ejemplo, una alta proporción de neutrófilos está típicamente relacionada con infecciones bacterianas agudas (Rodwell et al. 1998) y una baja proporción con infecciones virales (Bossart et al. 2001). Por otro lado, las proporciones altas de linfocitos suelen indicar infecciones bacterianas agudas, algunos tipos de enfermedades autoinmunes o infecciones virales no crónicas (Sherwood et al. 2004).

Recientemente, un estudio realizado en crías de lobo marino de Galápagos, *Zalophus wolfebaeki*, utilizó conteos totales y diferenciales de leucocitos como un proxy para medir la salud y el funcionamiento inmune (Brock et al. 2013b). El estudio mostró que la hematología clínica tradicional tenía alta sensibilidad para predecir diferencias en la capacidad de montar una respuesta inmune. En el contexto de la investigación con organismos silvestres, donde se requiere trabajar en condiciones ambientales difíciles y frecuentemente en sitios remotos, y para los que no se cuenta con una amplia gama de técnicas inmunes estandarizadas, la hematología clínica puede resultar una herramienta útil para inferir aspectos de la competencia inmune de organismos silvestres. Este capítulo se enfoca en evaluar y discutir los costos de la respuesta inflamatoria en diferentes etapas del desarrollo de crías de lobo marino de California, utilizando parámetros hematológicos clínicos como indicadores de salud, y evaluando su relación con la disponibilidad de recursos energéticos de los individuos.

Como medida de los recursos energéticos disponibles para cada individuo se obtuvo un índice de condición corporal basado en la relación entre la masa corporal y la longitud total (Peig & Green 2010). La relación entre masa y longitud como medida de los recursos energéticos disponibles se ha utilizado en mamíferos (Dobson et al. 1999; Hall et al. 2002, Brock et al. 2013a), aves (Weatherhead et al. 1999; Merila et al. 2001), anfibios (Judge & Brooks 2001) y reptiles (Shine et al. 2001). Se ha visto que los índices de condición están relacionados a otros caracteres de la historia de vida en diferentes vertebrados incluyendo pinnípedos (Dobson & Micheners 1995; Shine et al. 2001; Hall et al. 2002; Brock et al. 2013a). En el campo de la ecología el método más comúnmente

utilizado para generar índices de condición corporal es el índice residual. Éste es generado a partir de una regresión lineal de masa contra longitud estimada por mínimos cuadrados ordinarios (OLS, por sus siglas en inglés) (Millar & Hickling 2001; Schulte-Hostedde et al. 2005; Ardia 2005). Sin embargo, se ha cuestionado la validez de este método debido a que no toma en cuenta la alometría y no te permite comparar entre individuos de diferentes edades o diferente género (Peig & Green 2010). Recientemente se propuso un nuevo estimador de condición corporal conocido como índice de masa escalar (Peig & Green 2009), que establece un exponente escalar que describe la relación dimensional entre masa y longitud, tomando en cuenta el componente alométrico del crecimiento, lo que permite la comparación entre individuos de distintas edades y géneros (Peig & Green 2010). Además, se ha mostrado que los valores generados por el índice de masa escalar se correlacionan con la cantidad de grasa, proteína y agua en varias especies de vertebrados (Peig & Green 2009). Este índice se utilizó en este capítulo como medida de los recursos energéticos disponibles.

Dada la importancia de la respuesta inflamatoria como primera línea de defensa de los organismos y a las evidencias de costos fisiológicos asociados a esta respuesta, se ponen a prueba las siguientes hipótesis: 1) el cambio en la magnitud de la respuesta inflamatoria a PHA estará relacionado positivamente con la condición corporal 2) la condición corporal será el factor de mayor efecto para determinar la magnitud de la inflamación, y 3) ésta relación se mantendrá a lo largo de las tres etapas de desarrollo evaluadas.

En ecoinmunología la existencia de canjes energéticos se define en base a una asociación negativa entre caracteres debido a que los recursos son limitados y al ser utilizados para una función fisiológica particular dejan de estar disponibles para otras funciones (Zera & Harshman 2001). Como se mencionó previamente en este trabajo la condición corporal se utilizó como una medida de los recursos energéticos disponibles más que una medida de crecimiento. Debido a que la energía es el recurso limitante y a que el desafío con PHA es un desafío *in vivo* que refleja el costo de desplegar una respuesta inflamatoria en ese momento particular; en este estudio se esperó ver una asociación positiva entre ambas variables. Por lo que aquellos organismos con una mejor condición corporal es decir más recursos energéticos disponibles podrían destinar más de estos a montar una respuesta inflamatoria.

Metodología

Los detalles de la captura, la toma de medidas morfométricas y la hematología se describen en el capítulo 2 y la prueba de PHA se describe detalladamente en el capítulo 3. Como medida de los recursos energéticos disponibles para cada individuo se obtuvo el índice de masa escalar el cual se calculó de acuerdo a la ecuación 1:

Índice de masa escalar (\overline{M}_i):

$$\overline{M}_i = M_i \left[\frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{SMA}} \quad \text{eqn 1}$$

Donde M_i y L_i son la masa corporal y la longitud del individuo i . b_{SMA} es el exponente escalar estimado a partir de una regresión de eje mayor estándar (SMA, por sus siglas en inglés) de los valores de $\ln M$ en relación a $\ln L$; L_0 está dado por la media aritmética de L_i y \overline{M}_i es la predicción de la masa corporal del individuo i cuando los valores de longitud son estandarizados a L_0 (Peig & Green 2009).

Se construyeron modelos lineales generalizados (GLM, por sus siglas en inglés) para analizar los efectos de los recursos disponibles y los parámetros clínicos sobre la respuesta inflamatoria ante el desafío con PHA. Debido a la falta de datos para algunas variables en las crías de dos meses y a que la distribución de los datos de inflamación colectados en las crías de seis meses era diferente a la distribución de los datos de crías de otras edades, los datos de los tres períodos de muestreo fueron analizados de manera separada. Se ajustó un GLM con una función de distribución gaussiana para las crías de dos semanas de edad, donde el índice de inflamación (cambio en el grosor de la membrana interdigital, ver capítulo tres) se definió como variable respuesta y el índice de masa escalar y número de neutrófilos como variables explicativas. Se ajustó un GLM con una función de distribución gaussiana para el mismo cohorte, donde el índice de inflamación se definió como variable respuesta y el índice de masa escalar y número de linfocitos como variables explicativas

número de linfocitos y número total de leucocitos se definieron como variables explicativas. El modelo incluyó interacciones de tercer grado entre las variables.

Para los datos colectados de las crías de dos meses de edad, se ajustó un GLM con una función de distribución gaussiana. En este modelo, el índice de inflamación se definió como variable respuesta y el índice de masa escalar como variable explicativa. En este caso se omitieron las variables referentes a la hematología debido a que el tamaño de muestra era muy pequeño, por lo que el modelo no soportaba tantas variables (Sokal & Rohlf 1995).

Para los datos de las crías de seis meses se ajustó un GLM con una función de distribución binomial. En este modelo el índice de inflamación se definió como variable respuesta y el índice de masa escalar, número de neutrófilos, número de linfocitos, conteo total de leucocitos y sus interacciones de tercer grado se definieron como variables explicativas. Debido a que los datos para la variable respuesta no cumplían con el supuesto de normalidad (Shapiro Wilk, $w = 0.79$ $p < 0.05$), se realizó una prueba de Cullen Frey (Fig 4.1) para determinar el tipo de distribución. De acuerdo con la prueba de Cullen Frey se ajustó un GLM con una función de distribución binomial.

Todos los GLM fueron ajustados de acuerdo con el criterio de información de Akaike (AIC). Los modelos con una función de distribución gaussiana se analizaron para determinar su heteroscedasticidad, independencia, falta de normalidad en la distribución de los errores e influencia desproporcional de los valores extremos (Zur et al., 2009). Los análisis se llevaron a cabo en R 2.14.1.

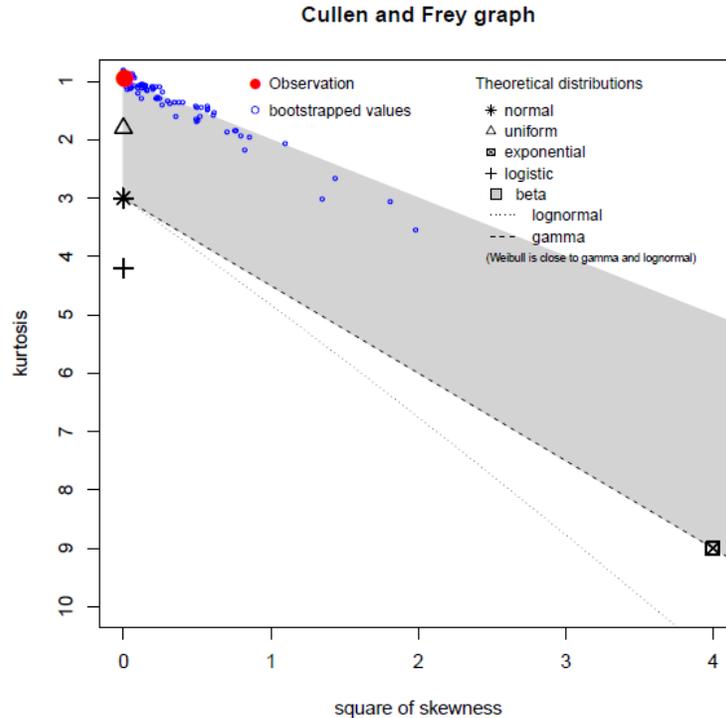


Fig. 4.1. Análisis de distribución de los datos de la respuesta inflamatoria a PHA de acuerdo a Cullen y Frey (1999). En rojo se muestran los valores observados mientras que en azul se muestran los valores predichos por el método de *bootstrap* (1000). En el panel de la derecha se muestran las diferentes distribuciones teóricas, la franja gris corresponde a la distribución tipo beta.

Resultados

En las crías de dos semanas de edad la condición corporal no explicó variaciones en la respuesta inflamatoria a PHA ($F = 0.49$, $P = 0.4980$). Tampoco se observó relación entre la inflamación y el porcentaje de neutrófilos ($F = 0.23$, $P = 0.63$), el porcentaje de linfocitos ($F = 0.00$, $P = 0.94$), el número total de leucocitos ($F = 0.45$, $P = 0.51$) y sus interacciones (Cuadro 4.1). Como se observa en la Figura 4.2, los datos de inflamación en relación a la condición, porcentaje de neutrófilos y porcentaje de linfocitos no siguen un patrón identificable. En las crías de dos meses, la magnitud de la respuesta inflamatoria fue predicha por la condición corporal ($F = 12.33$, $P = 0.006$, Cuadro 4.2). Es decir, que a mayor condición, la magnitud de la respuesta inflamatoria también fue mayor (Fig. 4.3). Por otro lado la condición de las crías fue distinta dependiendo de la edad ($F=3.71$, $P = 0.031$, Fig 4.4).

Como se mencionó previamente la respuesta inflamatoria hacia PHA en las crías de seis meses de edad no siguió una distribución normal. Se determinó que la variable inflamación en este cohorte seguía una distribución de tipo beta por lo que los valores continuos de la respuesta inflamatoria a PHA fueron transformados a datos de presencia (1) o ausencia (0) de inflamación. Para esto se estableció que por encima de un cambio en el grosor de la membrana interdigital de 0.7 mm existía una respuesta inflamatoria mientras que por debajo de este valor no existía respuesta inflamatoria. En el capítulo tres se mostró que en los individuos en donde el cambio en la magnitud de la inflamación era menor a 0.7 mm no hubo infiltración de leucocitos mientras que en aquellos por encima de 0.7 mm hubo infiltración de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eosinófilos. Por esta razón y con el mismo criterio, se ajustó un modelo GLM de tipo binomial con función de ligamiento logit.

En las crías de seis meses de edad, la condición corporal no predijo la presencia o ausencia de inflamación ($P = 0.56$), aunque ésta si era explicada por el porcentaje de neutrófilos ($P = 0.01$, Fig. 4.5A, B), por entre el porcentaje de neutrófilos en interacción con la condición corporal ($P = 0.01$, Fig. 4.6A) y por el número total de leucocitos en interacción con la condición corporal ($P = 0.00$). El porcentaje de linfocitos en interacción con la condición corporal influían negativamente sobre la presencia de inflamación ($P = 0.001$, Fig. 4.5c y Fig. 4.6B).

Cuadro 4.1 A) Modelo lineal generalizado con una función de distribución gaussiana para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de neutrófilos (PNEU,) concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. B) Modelo lineal generalizado con una función de distribución gaussiana para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de linfocitos (PLINF), concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike.

A Modelo: Inflamación ~ M_i * PNEU*WBC, family=gaussian

Variable	Pendiente	F	P(>F)
M_i	-	0.4911	0.4980
PNEU	-	0.2389	0.6346
WBC	+	0.4597	0.5118
M_i :PNEU	+	2.3264	0.1554
M_i :WBC	+	0.3309	0.5767
PNEU:WBC	-	0.7537	0.4039
SM:PNEU:WBC	+	0.0011	0.9739

N = 23, gl = 22, AIC = -24.94

B Modelo: Inflamación ~ M_i * PLINF*WBC, family=gaussian

Variable	Pendiente	F	P(>F)
M_i	+	0.4911	0.4980
PLINF	+	0.0044	0.9482
WBC	-	0.6153	0.4494
M_i :PLINF	+	1.1077	0.3151
M_i :WBC	+	0.5370	0.4790
PLINF:WBC	-	1.9739	0.1876
SM:PLINF:WBC	+	0.1094	0.7470

N = 23, gl = 22, AIC = -25.23

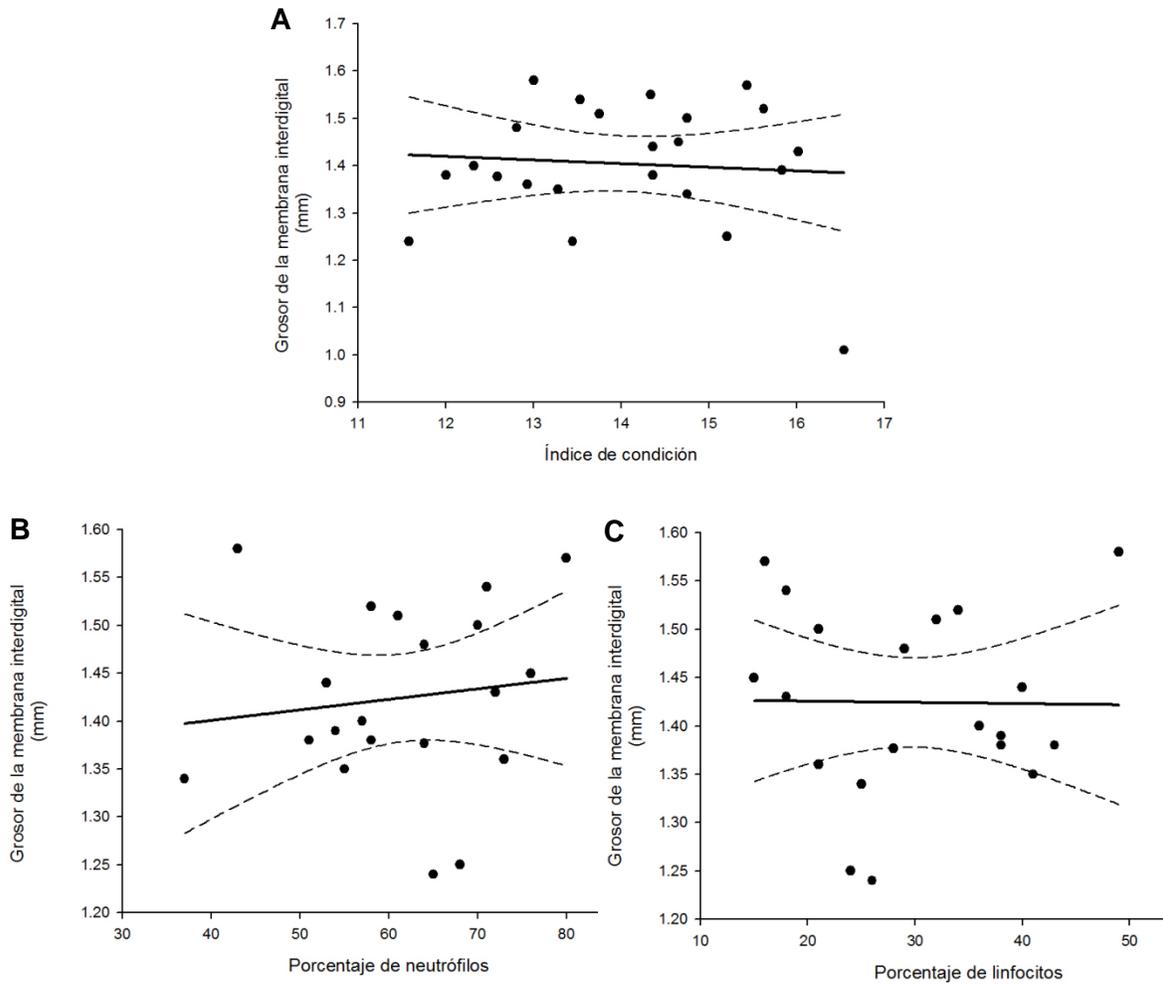


Fig. 4.2. Relación entre la respuesta inflamatoria a PHA de crías de lobo marino de California de dos semanas de edad con A) condición corporal; B) porcentaje de neutrófilos; y C) porcentaje de linfocitos. Las líneas punteadas representan intervalos de confianza del 95%.

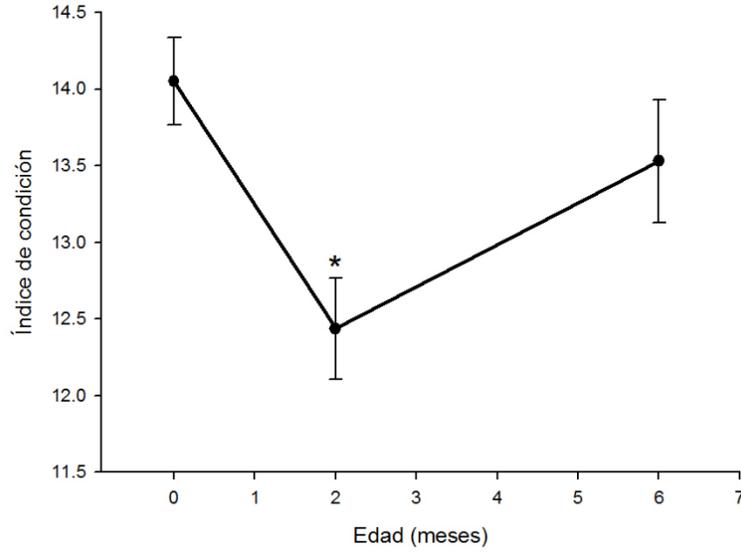


Fig 4.3. Índice de condición corporal de crías de lobo marino de California de diferentes edades ($P = 0.0016$).

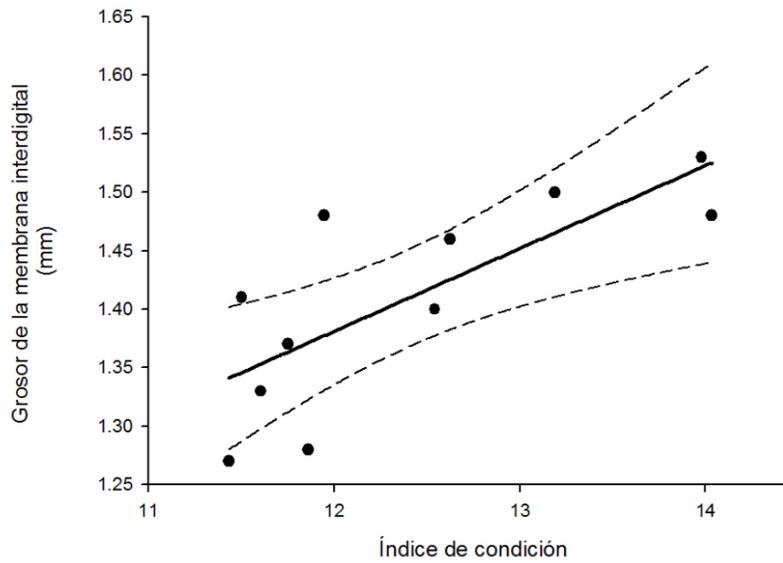


Fig. 4.4. Relación entre la respuesta inflamatoria a PHA con la condición corporal de crías de lobo marino de California de dos meses de edad. Las líneas punteadas representan intervalos de confianza del 95%. $R^2_{ajustada} = 0.53$, $P = 0.006$.

Cuadro 4.2. Modelo lineal generalizado con una función de distribución gaussiana para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA y el índice de condición (M_i). N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike.

Modelo: Inflamación $\sim M_i$, familia=gaussian

Variable	Pendiente	F	P(>F)
M_i	+	12.334	0.0065

N=11, gl = 10, AIC=-26.52

Cuadro 4.3. A) Modelo lineal generalizado con una función de distribución binomial para analizarla relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de neutrófilos (PNEU), concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. B) Modelo lineal generalizado con una función de distribución binomial para analizar la relación entre la inflamación generada en respuesta a PHA, el índice de condición (M_i), porcentaje de linfocitos (PLINF), concentración total de leucocitos (WBC) y sus interacciones. N = número de individuos, gl = grados de libertad, AIC = criterio de información de Akaike del modelo ajustado.

A Modelo: Inflamación ~ M_i * PNEU*WBC, familia=binomial

Variable	Pendiente	P(>Chi)
M_i	+	0.5647
PNEU	+	0.0122 *
WBC	+	0.5135
M_i :PNEU	+	0.0331 *
M_i :WBC	+	0.0055 *

N = 18, gl = 17, AIC (ajustado) = 12

Modelo: Inflamación ~ M_i * PLINF*WBC, familia=binomial

B

Variable	Pendiente	P(>Chi)
M_i	+	0.5647
PLINF	-	0.0182 *
WBC	+	0.2530
M_i :PLINF	-	0.0037 *
M_i :WBC	+	0.0055 *

N = 18, gl = 17, AIC (ajustado) = 12

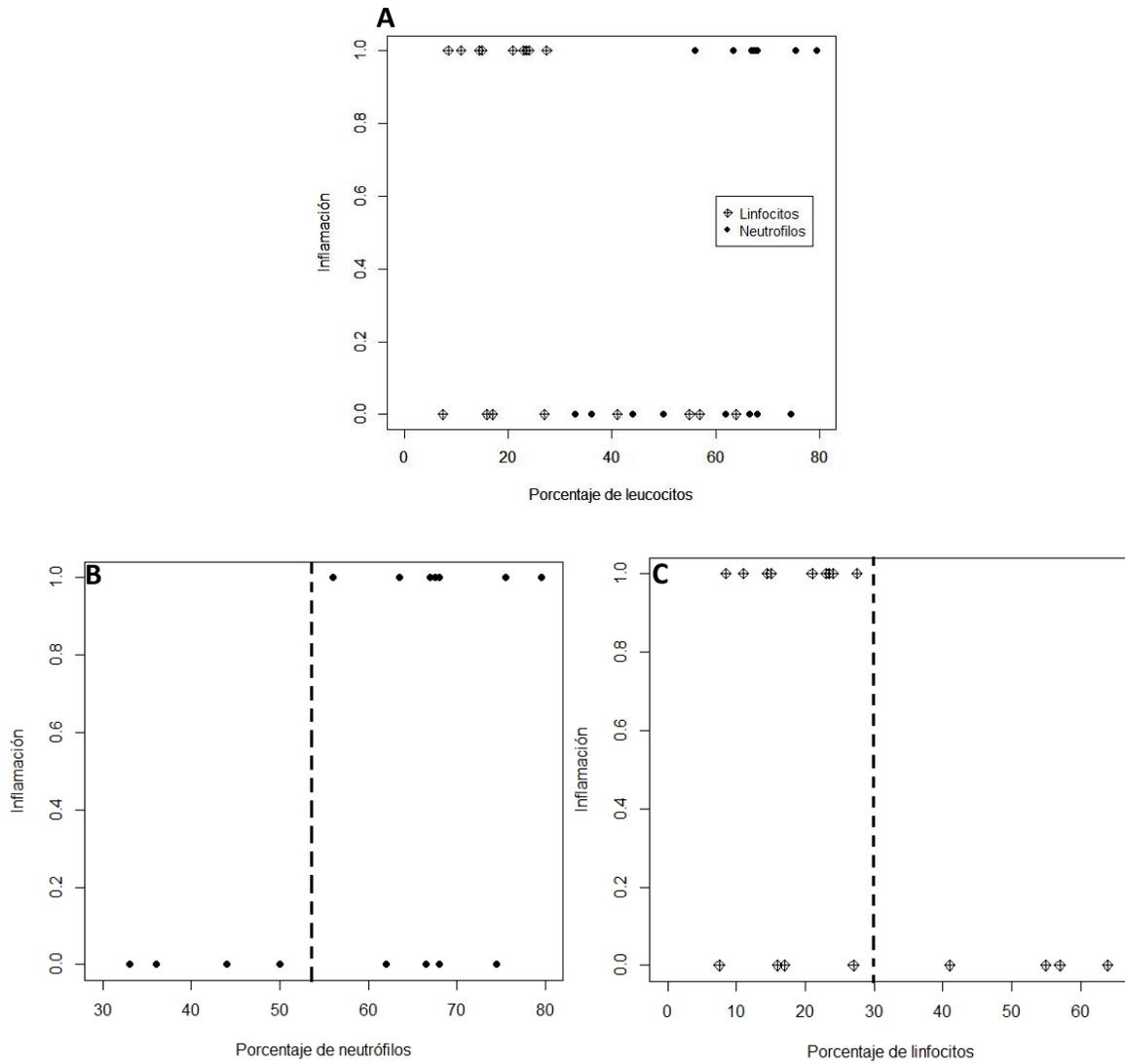


Fig. 4.5. Relación entre el porcentaje de leucocitos y la respuesta inflamatoria a PHA en crías de lobo marino de California de seis meses de edad. En A) se muestra el porcentaje de ambas poblaciones de leucocitos en relación a la respuesta inflamatoria a PHA, los círculos representan el porcentaje de neutrófilos y los rombos el porcentaje de linfocitos. En B) se muestra únicamente el porcentaje de neutrófilos y en C) únicamente el porcentaje de linfocitos en relación a la inflamación.

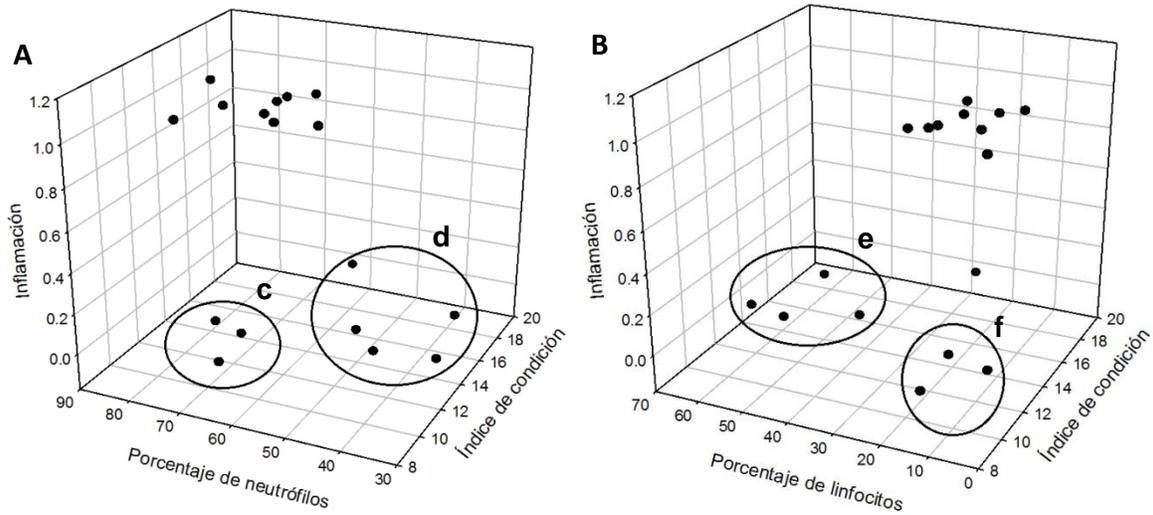


Fig 4.6. Relación entre la respuesta a PHA en crías de lobo marino de California de seis meses y la interacción de A) la condición con el porcentaje de neutrófilos, y B) la condición con el porcentaje de linfocitos. En la figura A) se muestran los individuos con bajo porcentaje de neutrófilos y mayor índice de condición (d) y los individuos con alto porcentaje de neutrófilos y menor índice de condición (c). En la figura B) se muestran los individuos con alto porcentaje de linfocitos y mayor índice de condición (e), y los individuos con bajo porcentaje de linfocitos y menor índice de condición (f).

Discusión

En este capítulo se buscó investigar la relevancia que tienen las reservas energéticas de las crías de lobo marino de California, durante distintos momentos de su desarrollo, sobre su capacidad inflamatoria, y a su vez, examinar la contribución de su estado de salud sobre la magnitud de dicha capacidad inflamatoria. Se predijo que el cambio en la magnitud de la respuesta inflamatoria se relacionaría directamente con la condición corporal de las crías, por lo que se observaría una asociación positiva entre ambas variables. Además debido a que la energía es el recurso limitante se esperó que la condición corporal como medida de las reservas energéticas tuviera más relevancia que la condición de salud para explicar la variación en la magnitud de la inflamación. También se esperó que la relación fuera semejante durante el desarrollo de las crías. Si bien la existencia de canjes energéticos inicialmente se definió en base a una asociación negativa entre caracteres, recientemente en numerosos estudios se han observado asociaciones positivas (de Jong 1993, van Noordwijk & de Jong 1986) incluyendo

interacciones positivas entre el tamaño corporal y otros caracteres (Allan 1984). Asimismo debido a la naturaleza de la respuesta inmunitaria analizada y el tiempo en que las variables fueron medidas era factible esperar que ambas variables estuvieran asociadas de manera positiva. Sin embargo, se encontró que la relación entre la respuesta inflamatoria y la condición corporal de las crías fue diferente entre etapas del desarrollo. Particularmente, y al contrario de lo que se esperaba, en las crías de dos semanas de edad la condición corporal no predijo ni la ocurrencia ni la magnitud de la respuesta inflamatoria, mientras que en las otras etapas esta relación si se observó.

Debido a la complejidad de los procesos inmunes se ha propuesto que los costos de la inmunidad pueden ser enmascarados bajo ciertas condiciones ambientales (Sandland 2003), y que solo cuando los recursos disponibles son abundantes los hospederos son capaces de compensar las altas demandas energéticas de ser desafiados inmunológicamente (Moret & Schmid-Hempel 2000). Como evidencia de esto, algunos estudios han observado que los costos de las respuestas inmunitarias son evidentes solo bajo condiciones de baja disponibilidad de recursos (Hoang 2001), falta de nutrientes (Lochmiller et al. 1993) o estrés antropogénico (Brock et al. 2013a). Es posible que a las dos semanas de vida, las crías de lobo marino de California no hayan experimentado desafíos inmunes que requieran una inversión energética considerable. Como apoyo a esta posibilidad, se observó que la condición corporal de las crías de dos semanas de edad fue mayor que la de crías de dos meses y similar a las crías de seis meses, lo que implica que entre las dos semanas y los dos meses ocurrieron eventos que impactaron negativamente sobre la condición, como podría ser una mayor inversión energética dedicada al crecimiento (McDade 2003). Se ha propuesto que la condición corporal de los neonatos provee una medida de la inversión maternal durante el período de gestación y que el crecimiento posnatal sirve como indicador de la disponibilidad de alimento durante la lactancia (Trillmich 1986; Boness et al. 1991; Bowen et al. 1991). Por ende es posible que la disminución de la condición corporal de las crías de dos meses se deba a una disminución temporal en la disponibilidad de alimento para la madre, condición que se vea revertida para las crías de seis meses. Otro factor que podría ayudar a explicar el resultado que se observó es la transferencia de leptina a las crías mediante la leche materna (Casabiell et al. 1997). Como se mencionó anteriormente la leptina es una hormona que tiene múltiples propiedades inmunoestimuladoras y se ha reportado que esta hormona está presente en mayor concentración en el calostro y que además pasa intacta a la sangre de la cría (Casabiell et al. 1997; Bonet et al. 2002). Por ende existe la

posibilidad que la respuesta inflamatoria de las crías sea determinada por factores extrínsecos que dependen de la madre. La alta concentración de leptina contenida en el calostro y que es transferida a las crías, explicaría la poca variabilidad en la respuesta a PHA entre las crías de dos semanas de edad a pesar de las diferencias en su condición corporal y en su estado de salud. Como se indicó arriba, y de acuerdo con lo hipotetizado, la condición corporal de las crías de dos meses de edad sí influyó sobre la magnitud de la respuesta inflamatoria. Un trabajo reciente realizado en una especie filogenéticamente cercana, el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wolfebaeki*), reportó el mismo efecto entre la condición de crías y diferentes variables inmunes (Brock et al. 2013a). En conjunto, los resultados ofrecen evidencia empírica de que la posibilidad de invertir recursos energéticos para implementar una respuesta inmune es dependiente de la condición de los individuos, ya que parece existir un fenómeno de correlación fenotípica en donde los lobos marinos de California destinan recursos energéticos tanto al crecimiento como a las respuestas inmunitarias en la medida que pueden (McDade 2003; Brock et al. 2013a). La respuesta inflamatoria es un proceso energéticamente costoso ya que implica la movilización de componentes celulares y humorales al sitio de infección así como síntesis de proteínas (Wolowczuk et al. 2008). Por ende, es posible que entre mayor sea la reserva de recursos energéticos, más podrán ser utilizados para montar una respuesta inmune. Aunque de manera indirecta, lo anterior también se ha observado para otras especies de pinnípedos. Por ejemplo, se ha visto que la condición corporal sirve para predecir la supervivencia de crías de foca gris (*Halichoerus grypus*) (Hall et al. 2002). Si bien la supervivencia no está determinada únicamente por las respuestas del sistema inmunitario, ambos caracteres parecen estar estrechamente ligados (Graham et al. 2010).

En las crías de seis meses de edad se observó un patrón interesante en la respuesta inflamatoria a PHA, ya que en algunos individuos no hubo inflamación ante el desafío. Este fenómeno no había sido reportado previamente y apoya la idea de que montar una respuesta inflamatoria ante un desafío con PHA es costoso (Martin et al. 2003), de manera que solamente individuos con recursos energéticos pueden destinarlos para dicha inflamación. Por otro lado, la habilidad de montar una respuesta inflamatoria en las crías de esta etapa del desarrollo se relacionó con su estado de salud, inferida por los indicadores inmunes medidos (Davis et al. 2004). En nuestro estudio se observó que las crías en las que los neutrófilos representaban menos del 55% de los leucocitos circulantes, no podían montar una respuesta inflamatoria a PHA. Eso es interesante, ya

que la literatura médica veterinaria indica que un porcentaje de neutrófilos menor de 50 está por debajo del rango de referencia considerado como normal para el lobo marino de California (Roletto 1993; Bossart et al. 2001), por lo que los resultados observados sugieren que la salud de los animales que no montaban una respuesta inflamatoria estaba comprometida. Asimismo, se observó una relación negativa entre el porcentaje de linfocitos circulantes y la ocurrencia de inflamación a PHA, aunque esta relación ocurrió en interacción con la condición corporal de las crías. El umbral permisivo en el caso de los linfocitos fue mayor a 30%, lo que también está en acorde con lo reportado para el lobo marino de California, ya que un porcentaje de linfocitos por encima de 30 está por encima del rango de referencia clínico de la especie (Roletto 1993; Bossart et al. 2001). Cuando esto ocurre, generalmente refleja estados patológicos asociados a infecciones bacterianas severas o a infecciones virales agudas (Bossart et al. 2001). En conjunto, los resultados encontrados para las crías de seis meses sugieren que el estado de salud de un organismo al momento de ser desafiado con un nuevo estímulo inmune determinará su capacidad de responder a este segundo desafío. Sin embargo, la condición corporal juega un papel relevante en esta interacción, ya que aquellos individuos con un porcentaje de neutrófilos o de linfocitos dentro de los parámetros normales para la especie, pero que tenían una condición corporal baja, no eran capaces de montar una respuesta inflamatoria, semejante a lo observado para las crías de dos meses.

Los resultados encontrados sugieren que existen canjes energéticos dentro del sistema inmune, posibilidad que ha sido poco abordada en estudios ecoinmunológicos. Uno de los pocos estudios relacionados, reportó que la ocurrencia de desafíos inmunes simultáneos afecta de manera negativa a uno de ellos (Martin et al. 2006b). Ese estudio especula que el efecto puede deberse al costo de las respuestas inmunitarias, o bien que indique estrategias para evitar una inflamación excesiva y disminuir el riesgo de anafilaxis o de montar un respuesta febril innecesaria y costosa (Martin et al. 2006b). La interacción entre la condición corporal y el estado de salud como determinante de la presencia o ausencia de inflamación de los lobos marinos de California, sugiere que para las crías de seis meses que presumiblemente tienen un sistema inmune activo, es demasiado costoso invertir recursos en tratar de resolver un segundo desafío inmune. Uno de las premisas más importantes dentro de la ecoinmunología es que el ambiente patogénico experimentado por un organismo afecta la magnitud y naturaleza de sus respuestas inmunes (Lochmiller & Deerenberg 2000). La frecuencia y la intensidad de la exposición a patógenos puede tener efectos en la organización del sistema inmunitario que van más

allá del proceso antígeno-específico de selección clonal (McDade 2003). Por ejemplo en humanos la ausencia de exposición a patógenos durante el primer año de vida está asociada con una mayor producción de IgE y un aumento en la producción de citocinas tipo TH2 durante la adolescencia (McDade et al. 2004). Asimismo es bien sabido que la exposición a patógenos tiene un efecto negativo en la tasa de crecimiento de gallinas (Klassing & Barnes 1988) y puercos (van Heugten et al. 1994). Recientemente se ha obtenido evidencia que sugiere que esto también ocurre en el lobo marino de Galápagos, en donde parece ser que un ambiente patogénico más rico genera un incremento de sus funciones inmunes teniendo un efecto negativo sobre su condición (Brock et al. 2013a). Es interesante que a los seis meses de edad las crías de lobo marino de California comienzan a suplementar su dieta con peces y comienza el destete (Orr et al. 2012). Este proceso genera un aumento en la diversidad patogénica a la que están expuestas las crías; además, el proceso de destete conlleva múltiples cambios en la fisiología del intestino que incluyen una marcada proliferación y diferenciación celular (Oka & Shi 2011). Debido a las altas demandas energéticas necesarias para soportar la proliferación y diferenciación celular y al incremento en la exposición a patógenos generada por la ingesta de nuevos alimentos es posible que algunas funciones inmunes se vean comprometidas ya que los recursos energéticos estén siendo utilizados en otras funciones fisiológicas. Otra posibilidad, no excluyente de la primera, que podría explicar el efecto observado es un cambio en el perfil de citosinas de las crías. La existencia de un proceso inmune activo podría generar que para evitar una inflamación excesiva y los efectos negativos de ésta, se pasara de una respuesta tipo TH1 proinflamatoria a una de tipo TH2 antiinflamatoria, lo que evitaría que se generase una respuesta ante un segundo desafío inmune debido a la inhibición de la señalización proinflamatoria (Rittirsch et al. 2008). Desafortunadamente, las restricciones temporales del presente estudio no permitieron la medición de citosinas de las crías, por lo que esta hipótesis no puede ser probada.

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la relación entre la condición corporal de los animales como determinantes para montar una respuesta inflamatoria inducida es compleja y dependiente del contexto de los animales. Si bien las reservas energéticas de los individuos juegan un papel importante en determinar las respuestas inmunitarias, estas parecen variar según la etapa del desarrollo, lo que reafirma la relevancia de considerar la ontogenia del sistema inmunitario en los estudios ecoinmunológicos.

Capítulo 5.

Discusión general

El enfoque de esta tesis ha sido contribuir al conocimiento que se tiene sobre las dinámicas del sistema inmune en organismos silvestres con especial atención sobre el efecto que tiene el desarrollo sobre estas dinámicas. En los capítulos anteriores se buscó caracterizar los componentes celulares de una de las principales técnicas utilizadas en el campo de la ecoinmunología, el desafío con PHA. También se buscó investigar los costos fisiológicos de las respuestas inmunes en diferentes etapas del desarrollo de un mamífero carnívoro.

En el capítulo tres se mostró que la respuesta inflamatoria hacia la PHA en el lobo marino de California es determinada por procesos celulares complejos que involucran diferentes poblaciones de leucocitos. La inyección de PHA generó la infiltración de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eosinófilos al tejido. Además la inflamación macroscópica a PHA no estuvo correlacionada con la abundancia de ningún tipo celular específico lo que sugiere que esta prueba sirve como una medida de la capacidad inflamatoria del lobo marino de California. En el capítulo cuatro se mostró que las reservas energéticas y el estado de salud tienen un efecto sobre la capacidad inflamatoria de las crías del lobo marino de California. Sin embargo, estos efectos fueron dependientes del contexto de los animales ya que se observaron diferencias entre las etapas del desarrollo.

A partir de esta tesis se generaron tres hallazgos principales de relevancia para el campo de la ecoinmunología. En primer lugar se generó evidencia sobre la naturaleza de la prueba de PHA. A pesar del largo debate que ha existido en torno al significado y relevancia de esta prueba como medida de la competencia inmune de los organismos (Kennedy & Nager 2006; Demas et al. 2011). Cada vez ha surgido más evidencia incluyendo los resultados presentados en este estudio de que la prueba de PHA refleja la capacidad inflamatoria de los organismos y no la competencia celular de linfocitos T (Martin et al 2006a; Vinkler et al. 2010; Turmelle et al. 2010). Además la asociación positiva que se observó entre la respuesta a PHA y el índice de condición, así como el hecho de que individuos con una salud comprometida y mala condición no fueran capaces de responder a la PHA; sugiere que la respuesta a PHA es energéticamente costosa por lo que es una metodología válida para investigar los costos fisiológicos de las respuestas inflamatorias en vertebrados silvestres (Fargallo et al. 2002; Martin et al. 2003; Navarro et

al. 2003; Brock et al. 2013). No obstante, debido a que existen diferencias interespecíficas en el funcionamiento de ésta prueba es necesario caracterizar tanto los componentes celulares como la temporalidad de la inflamación macroscópica en la especie bajo investigación con el objeto de realizar una interpretación correcta de los resultados.

El segundo hallazgo fue la existencia de canjes energéticos entre componentes del sistema inmunitario. En este trabajo se mostró que la existencia de un proceso inmune activo puede tener un efecto antagónico sobre la capacidad de responder ante un segundo desafío inmune y que esto a su vez depende de los recursos energéticos disponibles. Este fenómeno ha sido poco abordado en el campo de la ecoinmunología. Sin embargo su consideración es fundamental ya que en muchos estudios ecoinmunológicos no se toma en cuenta el estado de salud de los organismos estudiados, lo que podría afectar la observación y el sentido de los canjes energéticos. Asimismo, es importante investigar la interacción entre los diferentes componentes inmunes y establecer si el antagonismo o el sinergismo dentro del sistema inmunitario son fenómenos que ocurren comúnmente (Martin et al. 2003).

El tercer hallazgo fue que el desarrollo puede afectar la manera en la que son distribuidos los recursos energéticos hacia las diferentes funciones fisiológicas y por ende como son expresados los costos de las respuestas inmunes. En el contexto de la ecoinmunología, este es el resultado más relevante de al presente tesis. Se mostró que la disponibilidad de los recursos energéticos, medido aquí como la condición corporal de las crías, influía sobre la presencia y magnitud de la respuesta inflamatoria de distinta manera entre las tres etapas del desarrollo. Debido a que las respuestas inmunes de un organismo dependen del contexto, el patrón que se observó podría deberse a cambios en el ambiente como por ejemplo cambios en la disponibilidad de alimento de las madres (Trillmich 1986). Sin embargo, en el caso de las crías de seis meses su condición no fue distinta a las crías de dos semanas. Lo anterior sugiere que, al menos en caso de las crías de seis meses, los patrones observados se deben a un efecto del desarrollo. En apoyo a esta idea, se sabe que la etapa de los seis meses de edad representa una transición importante en donde ocurren cambios fisiológicos que requieren una inversión de recursos energéticos considerable (Newberg & Walker 2007). En otras especies de mamíferos, como el cerdo y el humano, se ha reportado que el destete tiene efectos negativos sobre el crecimiento de los organismos (Girard et al. 1992; Pluske et al. 1997). Incluso, el destete se ha equiparado a la metamorfosis que sufren los anfibios al pasar de

un estadio larvario a una fase juvenil en donde se observa una disminución significativa en su supervivencia (Oka & Shi 2011). En conjunto, los resultados presentados en esta tesis reafirman la relevancia de tomar en consideración la ontogenia del sistema inmunológico dentro de los estudios ecoinmunológicos.

En comparación con otras etapas de vida, las demandas energéticas durante el desarrollo posnatal se ven incrementadas ya que el crecimiento es maximizado debido a la competencia entre distintos caracteres de historia de vida, por lo que se puede esperar que los canjes energéticos durante esta etapa sean severos, especialmente cuando hay recursos energéticos limitados (McDade 2003). Uno de los resultados más llamativos en nuestro estudio fue la ausencia de una respuesta inflamatoria en algunas crías de seis meses. Esto es importante, ya que la ausencia de una respuesta inflamatoria en el tejido infectado o dañado promueve infecciones bacterianas (Marucha et al. 2000; Rojas et al. 2002). Esto podría significar que las crías de lobo marino de California a los seis meses de edad tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones debido a los procesos fisiológicos que atraviesan como una marcada proliferación y diferenciación celular durante el destete o debido a que están expuestas a mayor número de patógenos, y por ende tienen más desafíos inmunitarios que resolver. De la misma manera se observó que las crías de dos meses tuvieron una condición menor que las crías de dos semanas y las crías de seis meses. Además para las crías de dos meses la disponibilidad de recursos energéticos fue fundamental en determinar la magnitud de la respuesta hacia PHA. Si bien ha sido difícil definir la magnitud óptima de las respuestas inmunes (Sheldon & Verhulst 1996; Raber et al. 1998). Es sabido que una respuesta inflamatoria disminuida está asociada con una menor supervivencia (Gershwin et al. 2000). En este sentido las crías de lobo marino de California a los dos meses también podrían ser más susceptibles a las infecciones sobre todo si disminuyen los recursos energéticos de los cuales disponen. No obstante es importante mencionar que las crías de dos semanas pertenecen a un cohorte distinto ya que nacieron en el año 2013 mientras que las crías de dos y seis meses nacieron en el año 2012. Este hecho podría estar determinando las diferencias que se observaron en relación a la condición de las crías. Por ejemplo se ha reportado una disminución en la condición corporal y en la supervivencia de crías cuyas madres estuvieron expuestas a una disminución en la disponibilidad de alimento (Ono et al. 1987). Con base en lo anterior será necesario en un futuro comparar los patrones climáticos y de productividad entre ambos años, para poder inferir si la aparente disminución en la condición de las crías de dos meses se debe a un efecto indirecto del año.

Como se mencionó en el primer capítulo el lobo marino de California está considerado como una especie de bajo riesgo, esto se debe a que las poblaciones del norte de California han ido en aumento desde hace 20 años. Sin embargo las poblaciones del Golfo de California en general han estado disminuyendo desde 1994 (Aurióles-Gamboa & Zavala-Gonzalez 1994). Particularmente la lopera reproductiva de Granito, donde se realizó el presente estudio está considerada una de las loperas con mayor peligro de extinción debido que sus poblaciones han disminuido en un 45% desde 1994 (Szteren et al. 2006). Debido a esto es necesaria la implementación de planes de manejo para las colonias reproductivas que se encuentran en peligro. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que a los dos y a los seis meses las crías de lobo marino de California experimentan una mayor susceptibilidad a contraer infecciones. En este sentido se propone que durante estas etapas se lleve a cabo un esfuerzo para reducir el contacto que existe entre el humano y los lobos marinos. Las colonias reproductivas en el golfo de California en donde se han visto más afectadas las poblaciones de lobo marino se encuentran geográficamente cercanas y se propone que una de las razones de este declive es una disminución de su alimento (Szteren et al. 2006). De acuerdo a lo que se observó, los recursos energéticos disponibles para las crías de lobo marino son un factor fundamental que determina la manera en la que éstas responden a desafíos patogénicos. Por ende es necesario generar estrategias para tratar de aminorar el efecto que tiene la pesca sobre la disponibilidad de alimento particularmente en estas colonias reproductivas.

Capítulo 6.

Conclusiones

El desarrollo es, sin lugar a duda, uno de los procesos más importantes que moldean la historia de vida de los organismos. Es fundamental para los estudios ecológicos tomar en consideración que el desarrollo de múltiples sistemas fisiológicos no culmina con el desarrollo embrionario. En este proyecto se demostró que el desarrollo posnatal de un modelo mamífero carnívoro afecta la manera en la que son distribuidos sus recursos energéticos para implementar una respuesta inflamatoria. Las conclusiones más relevantes de este estudio son:

- 1) La prueba de PHA refleja la capacidad inflamatoria de los organismos y es una respuesta costosa que puede ser intercambiada con otras funciones fisiológicas. Por ende es una metodología válida para investigar los costos de la respuesta inflamatoria.
- 2) La disponibilidad de recursos energéticos regula la magnitud de la respuesta inflamatoria sobre todo cuando éstos son limitados. Las respuestas inmunes dependen del contexto y sus costos pueden ser enmascarados en condiciones de sobreabundancia de recursos energéticos.
- 3) La trayectoria ontogénica de un organismo determina la presencia y la dirección de canjes energéticos entre diferentes funciones fisiológicas.
- 4) El sistema inmune es una red compleja de mecanismos interactuantes, que durante mucho tiempo se han estudiado como efectores aislados. Existen aún pocos estudios acerca del antagonismo o sinergismo que puede existir entre diferentes efectores que actúan ante desafíos inmunes diferentes. En esta tesis se demostró que cuando existe actividad inmune en un individuo, esta puede afectar la manera en la que su sistema responde a un segundo desafío.

En conclusión, es fundamental en los estudios ecoinmunológicos evaluar la salud de los organismos al momento de estudiar las respuestas inmunes y su relación con otras funciones fisiológicas. Los estudios de carácter ecológico conllevan casi siempre limitaciones técnicas sobre todo al trabajar con fauna silvestre. Sin embargo en este trabajo se demostró que a pesar de estas limitantes, es posible generar información relevante no solo para una especie silvestre, sino para abordar preguntas de relevancia ecológica.

Referencias

- Ahtiainen, J. J., Alatalo, R. V., Kortet, R., & Rantala, M. J. (2005). A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(4), 985–991.
- Akira, S., y Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *4*(7), 499–511.
- Ardia D. R. (2005). Tree swallows trade off immune function and reproductive effort differently across their range. *Ecology*, *86*(8), 2040–6.
- Ardia, D. R., Parmentier, H. K., y Vogel, L. A. (2011). The role of constraints and limitation in driving individual variation in immune response. *Functional Ecology*, *25*, 61–73.
- Aubert, A., Goodall, G., Dantzer, R. y Gheusi, G. (1997) Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. *Brain Behavior. Immunology*, *11*, 107–118.
- Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, *392*, 565–568
- Barton, G. M. (2008). Review series A calculated response : control of inflammation by the innate immune system, *The Journal of Clinical* *118*(2).
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, *40*(12), 845–859.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, *81*(1), 1–5.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *The EMBO journal*, *22*(20), 5551–60.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., & Sorci, G. (2003). Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist*, *161*(3), 367–79.
- Bowie, A. y O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology*, *67*(4), 508–14.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1532–5.

- Bronte V., Zanovello P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5:641–654.
- Brown, G. D. y Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature* 413, 36–37.
- Brown, G. D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews of Immunology* 6, 33–43.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B., y Vasson, M. P. (2001). Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *Journal of leukocyte biology*, 69(3), 414–8.
- Caldefie-Chezet, F. Poulin, A., Vasson, M.P. (2003) Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radicals Research*, 37, 809–814.
- Carretta, J. V, Forney, K. A., Lowry, M. S., Barlow, J., Baker, J., Hanson, B., Muto, M. M., et al. (2007). NOAA Technical Memorandum NMFS MAY 2007 DRAFT U . S . PACIFIC MARINE MAMMAL STOCK ASSESSMENTS : 2007 with contributions from, (May).
- Cassatella, M. A., (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Advanced Immunology*, 73, 369–509.
- Castinel, A., Kittelberger, R., Pomroy, W. E., Duignan, P. J., Chilvers, B. L., & Wilkinson, I. S. (2008). Humoral immune response to *Klebsiella* spp. in New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*) and the passive transfer of immunity to pups. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(1), 8–15.
- Chandra R. K. (1981). Immune response in overnutrition. *Cancer Research*, 41, 3795–3796.
- Chandra, R. K. (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93(14) 302–307.
- Charnov, E. L. (1993). Life history invariants. Oxford: Oxford University Press.
- Dalbeth, N., y Haskard, D. O. (2005). Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology, Oxford, England*, 44(9), 1090–6.
- Day, M. J. (2007). Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 137, S10–S15.

- Demas, G. E., Chefer, V., Talan, M. C. & Nelson, R. J. (1997) Metabolic costs of an antigen-stimulated immune-response on adult and caged C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology* 273, R1631–R1637.
- Demas, G. E. (2002). Splenic denervation blocks leptin- induced enhancement of humoral immunity in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neuroendocrinology* 76, 178–184.
- Demas, G. E. (2004). The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Hormones and Behavior*, 45(3), 173–80.
- Demas, G. E., Zysling, D. A., Beechler, B. R., Muehlenbein, M. P., & French, S. S. (2011). Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *The Journal of Animal Ecology*, 80(4), 710–730.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., et al. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 103(2), 351–61.
- Drazen, D. L., Demas, G. E., y Nelson, R. J. (2001). Leptin effects on immune function and energy balance are photoperiod dependent in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 142, 2768–2775.
- Drazen, D.L., Trasy, A., y Nelson, R.J. (2003). Photoperiod differentially affects energetics of immunity in pregnant and lactating Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Canadian Journal of Zoology*, 81, 1406–1413.
- Dunne, A., y O'Neill, L. A. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll- like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE* [online], 2003, re3 (2003).
- Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., y Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 28–37.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., y Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*, 7, 1250–1257
- Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 2(5), 346–53.
- García-Aguilar, M.C., y D. Auriolles-Gamboa. 2003. Breeding seasons of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, México. *Aquatic Mammals* 29(1):67-76.

- Gasparini, J., Piault, R., Bize, P., y Roulin, A. (2009). Synergistic and antagonistic interaction between different branches of the immune system is related to melanin-based coloration in nestling tawny owls. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(11), 2348–53.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. a, Mowat, A. M., y Randolph, G. J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), 453–60.
- Gershwin, M. E., Beach, R. S., y Hurley, L. S. (1985). Nutrition and immunity. Orlando, FL: Academic Press.
- Graham, A. L., Allen, J. E., & Read, A. F. (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1), 373–397.
- Graham, A. L., Hayward, A. D., Watt, K. A., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., y Nussey, D. H. (2010). Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. *Science*, 330(6004), 662–5.
- Hill K., y Hurtado A. M. (1996). Aché life history: the ecology and demography of a foraging people. New York: Aldine de Gruyter.
- Hoang, A. (2001) Immune response to parasitism reduces resistance of *Drosophila melanogaster* to desiccation and starvation. *Evolution* 55, 2353–2358
- Hoffmann, J. A. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, 284(5418), 1313–1318.
- Holsapple, M. P., West, L. J., y Landreth, K. S. (2003). Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 68(4), 321–34.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., et al. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(9), 4531–7.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867.
- Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C., y Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual Reviews of Biochemistry*, 74:355–383.
- Ishii, M., Wen, H., Corsa, C. A. S., Liu, T., Coelho, A. L., Allen, R. M., Carson, W. F., et al. (2009). Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood*, 114(15), 3244–54.

- Janeway C. A. J. (1989). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54, 1.
- Janeway, C.A. J., y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Reviews of Immunology*, 20, 197–216.
- Joncker, N. T., y Raulet, D. H. (2008). Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunology Reviews*; 224:85-97.
- Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y., y Obata, K. (2009). Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews Immunology*, 9, 9-13.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., y Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351), 327–36.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373–84.
- Keogh, M. J., Maniscalco, J. M., y 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. *Veterinary immunology and immunopathology*, 137(3-4), 298–304.
- Klasing, K. C. (1998). Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science*, 77, 1119–1125.
- Konig, C., y P. Schmid-Hempel. 1995. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 260:225-227.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 307:731–734.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual Reviews of Immunology* 23, 225–274.
- Lanier, L. L. (2013). Shades of grey: the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 73–74.
- Lasker G. W. 1969. Human biological adaptability: the ecological approach in physical anthropology. *Science* 166:1480–1486.
- Lee, K. A. (2006). Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species, 46(6), 1000–1015.

- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., et al. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology*, 8(6), 630–8.
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews. Immunology*, 7(5), 379–90.
- Lluch-Belda, D. (1969). Crecimiento y mortalidad del lobo marino de California. *Anales del Instituto Nacional de Ciencias Biológicas*, 18:167–189.
- Lochmiller, R. L., y Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88, 87–98.
- Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R. y Lechler, R. I. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.
- Lowry, M.S., P. Boveng, R.J. DeLong, C.W. Oliver, B.S., Stewart, H. DeAnda, and J. Barlow. (1992). Status of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) population in 1992. NOAA NMFS SWFSC Admin. Rep. LJ-92-32. La Jolla, California.
- Lozano, G. A., y Lank, D. B. (2003). Seasonal trade-offs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). *Proceedings. of The Royal Society, Biological sciences*, 270(1520), 1203–8.
- Lyons, E. T., DeLong, R. L., Gulland, F. M., Melin, S. R., Tolliver, S. C., y Spraker, T. R. (2000). Comparative biology of *Uncinaria* spp. in the California sea lion (*Zalophus californianus*) and the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) in California. *Journal of Parasitology*, 86(6), 1348–1352.
- Mancia, A., Ryan, J. C., Chapman, R. W., Wu, Q., Warr, G. W., Gulland, F. M. D., y Van Dolah, F. M. (2011). Health status, infection and disease in California sea lions (*Zalophus californianus*) studied using a canine microarray platform and machine-learning approaches. *Developmental and comparative immunology*, 36(4), 629–37.
- Mancuso, P.,Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden,M., Lukacs,N. W., Huffnagle, G.B. (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *Journal of Immunology*, 168, 4018–4024.
- Mansson, A., y Cardell, L. O. (2009). Role of atopic status in Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated activation of human eosinophils. *Journal of leukocyte biology*, 85(4), 719–27.

- Mantovani, A., Cassatella, M. a, Costantini, C., y Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 11(8), 519–31.
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke K., Roose-Girma M., Lee W. P., Weinrauch, Y., Monack D. M., Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232
- Martin, L. B., Scheuerlein, A., y Wikelski, M. (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270(1511), 153–8.
- Martin, L. B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K., y Wikelski, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology*, 140(2), 126–35.
- Martin, L. B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J. R., Klasing, K. C., y Wikelski, M. (2006a). Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology*, 20(2), 290–299.
- Martin, L. B., Weil, Z. M., Kuhlman, J. R., y Nelson, R. J. (2006b). Trade-offs within the immune systems of female White-footed Mice, *Peromyscus leucopus*. *Functional Ecology*, 20(4), 630–636.
- Martin, L. B., Weil, Z. M., y Nelson, R. J. (2006c). Refining approaches and diversifying directions in ecoimmunology. *Integrative and comparative biology*, 46(6), 1030–9.
- Martin, T. E., Møller, A. P., Merino, S. y Clobert, J. (2001) Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98, 2071–2076.
- Martinon, F. y Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561–574.
- McDade, T. W. (2003). Life history theory and the immune system: steps toward a human ecological immunology. *American journal of physical anthropology, Suppl* 37, 100–25.
- McDade, T. W., Rutherford, J., Adair, L., y Kuzawa, C. W. (2010). Early origins of inflammation: microbial exposures in infancy predict lower levels of C-reactive protein in adulthood. *Proceedings of The Royal Society, Biological sciences*, 277(1684), 1129–37.
- McKean, K. a, Yourth, C. P., Lazzaro, B. P., y Clark, A. G. (2008). The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. *BMC evolutionary biology*, 8, 76.

- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–26.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–35.
- Mellor, A. L., y D. H. Munn. (2000). Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annual Review of Immunology* 18:367– 391.
- Meylan E, Tschopp J, Karin M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*;442:39–44.
- Michalek, R. D. y Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunology Reviews*, 236, 190–202.
- Moreno, J., Sanz, J.J., y Arriero, E. (1999). Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 266, 1105–1109.
- Mosser, D. M., y Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–69.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews. Immunology*, 6(3), 173–82.
- Nelson, R.J., Asfaw, B., DeVries, A.C., Demas, G.E. (1996). Reproductive response to photoperiod affects corticosterone and immunoglobulin G levels in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Canadian Journal of Zoology*, 74, 576–581
- Newburg, D. S., y Walker, W. A. (2006). Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric research*, 61(1), 2–8.
- Norgan, N.G. (1997). The beneficial effects of body fat and adipose tissue in humans. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 21, 738–746.
- Nguyen, M. T., Favelyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D, Scott, P. A., Jenn A., Liu-Bryan R., Glass C.K., Neels J.G., Olefsky J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 35279–35292.
- Ono, K. O., y Boness D.J. (1996). Sexual dimorphism in sea lion pups: Differential maternal investment, or sex specific differences in energy allocation? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 38:31-41.

- Orr, R. T., Schonewald, J., y Kenyon, K. W. (1970). The California sea lion: skull growth and a comparison of two populations. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 37:381-394.
- Owens, D. E., y Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 307(1), 93–10
- Platzer, B., Richter, S., Kneidinger, D., Waltenberger, D., Woisetschläger, M., Strobl, H. (2009). Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *Journal Immunology*, 183, 66–74.
- Pond, C. (1996). Interactions between adipose tissue and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55, 111–126.
- Prendergast, B. J., Hotchkiss, A. K., Bilbo, S. D., y Nelson, R. J. (2004). Peripubertal immune challenges attenuate reproductive development in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biology of reproduction*, 70(3), 813–20.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., et al. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453(7191), 65–71.
- Reijnders, P. J. H. (1994). Toxicokinetics of chlorobiphenyls and associated physiological response in marine mammals, with particular reference to their potential for ecotoxicological assessment. *Science of the Total Environment*, 154, 229-236.
- Ricklefs R. E. (1992). Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89:4722–5.
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., y Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, 8(10), 776–787.
- Rosenberg, H. F., Dyer, K. D., y Foster, P. S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 13(1), 9–22.
- Rothenberg, M. E., y Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Annual review of immunology*, 24, 147–74.
- Sandland, G., y Minchella, D. (2003). Effects of diet and *Echinostoma revolutum* infection on energy allocation patterns in juvenile *Lymnaea elodes* snails. *Oecologia* 134, 479–486
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., y Schlissel, M. S. (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annual Reviews of Immunology*, 10, 359–383.
- Schmid-Hempel, P. (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270(1513), 357–66.

- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., y Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 15–27.
- Schroeder, J. T., MacGlashan, D. W., y Lichtenstein, L. M. (2001). Human basophils: mediator release and cytokine production. *Advances in immunology*, 77, 93–122.
- Sheldon, B. C., y Verhulst S. (1996). Ecological Immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *TREE*, 11(8), 317-321.
- Shi, Y., Evans, J. E., Rock, K. L. (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516–521.
- Si-Tahar, M., Touqui, L., y Chignard, M. (2009). Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction. *Clinical and experimental immunology*, 156(2), 194–8.
- Tella, J. L., Blanco, G., Forero, M. G., Gajón, A., Donázar, J. A., y Hiraldo, F. (1999). Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1785–9.
- Tella, J. L., Lemus, J. a, Carrete, M., y Blanco, G. (2008). The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. *PLoS one*, 3(9), e3295.
- Tien, N., Boyle D., Kraaijeveld A. R., y Godfray, H. C. J. (2001). Competitive ability of parasitized *Drosophila* larvae. *Evolutionary Ecological Research* 3, 747–757.
- Tizard, I. R. (2009) *Veterinary Immunology*. Philadelphia PA: Saunders Elsevier.
- Turvey, S. E., y Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S24–32.
- Van Boven, M., y Weissing, F. J. (2004). The evolutionary economics of immunity. *The American naturalist*, 163(2), 277–94.
- Wang, Y.X., Jiang, C.L., Lu, C.L., Song, L.X., You, Z.D., Shao, X.Y., Cui, R.Y., Liu, X.Y., (2000). Distinct domains of IFN[alpha] mediate immune and analgesic effects respectively. *Journal of Neuroimmunology*, 108, 64–67.
- Weissman I. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 100:157–168.
- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson S., et al. (2002). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense.

- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., y Friedman, J. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 519–527.
- Zarembek, K. A., Godowski, P. J., y Alerts, E. (2013). Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *The journal of immunology*, 168:554-5561.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockly, A. G., Wu, Z., Hellewell, P.G., Weetman, A. P., Ross, R.J. (2004). Leptin indirectly activates human neutrophil via induction of TNF-alpha. *J Immunology*, 172:1809–1814.