



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

**“Ecología del repertorio antigénico de los linfocitos T del lobo marino de California en el Golfo de California y Pacífico Mexicano”.**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Marina Banuet Martínez

**Dirigido por:**

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

**SINODALES**

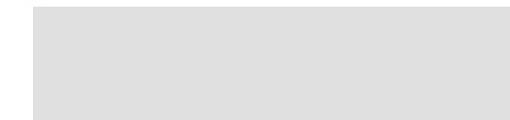
Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse  
Directora

Dr. Roberto Álvarez Martínez  
Sinodal

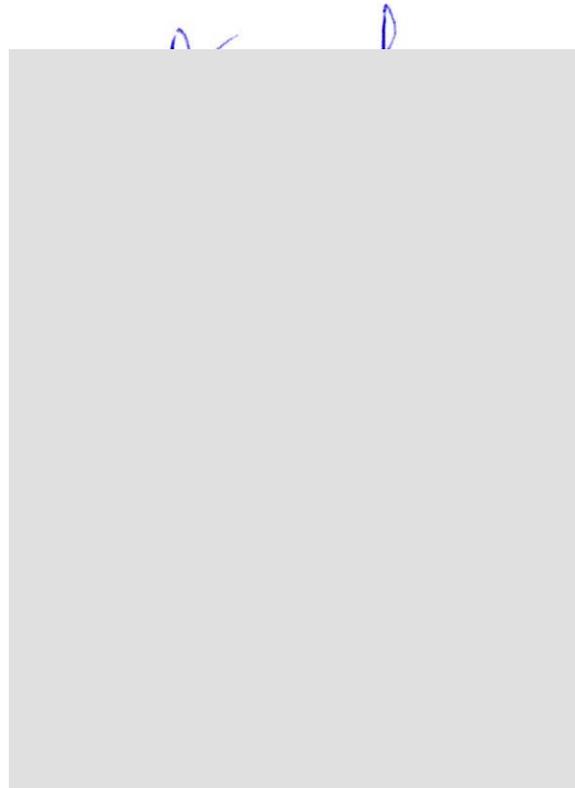
Dr. Fernando R. Elorriaga Verplancken  
Sinodal

Dr. Luis G. Hernández Sandoval  
Sinodal

Dr. Rubén Pineda López  
Sinodal



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



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



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Ecología del repertorio antigénico de los linfocitos T  
del lobo marino de California en el Golfo de California y  
Pacífico Mexicano.

**por**

Marina Banuet Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNMAC-222378

## **Declaratoria de autoría**

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

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

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



## Resumen

La supervivencia y adecuación de los organismos son influenciadas permanentemente por el ambiente. En un contexto evolutivo, los organismos responden a cambios en las condiciones ambientales y se adaptan a estos por medio de la plasticidad y selección de variantes genéticas exitosas. La variación en las condiciones ambientales como las anomalías climáticas y oceanográficas, así como variaciones en la distribución de los organismos, tienen un impacto en la fisiología y salud de los individuos. Las herramientas de secuenciación masiva facilitan el estudio genético de modelos de estudio no tradicionales, y proporcionan información detallada de los procesos moleculares y celulares que ocurren en los individuos. La distribución reproductiva del lobo marino de California lo convierte en un modelo de estudio eco-inmunológico ideal para estudiar el efecto de las condiciones bio-geográficas y ecológicas sobre el sistema inmunitario. Asimismo, el lobo marino de California es una especie centinela de vida libre que está expuesto a condiciones ambientales naturales, por lo que brinda información real del efecto que anomalías climáticas tienen sobre las respuestas celulares. El objetivo primordial de esta tesis fue analizar el efecto del impacto ambiental sobre respuestas inmunitarias. Se abordó a través de dos aproximaciones ecológicas y dos métodos de HTS. En el primer capítulo se describe el protocolo de amplificación de la cadena beta del receptor de los linfocitos T. Se demostró la posibilidad de su amplificación a partir de muestras de sangre total y con un solo par de oligos. La amplificación se llevó a cabo para muestras de 14 islas, cubriendo así, las regiones ecológicas caracterizadas para la especie. En el segundo capítulo se analizó el efecto de una anomalía climática intensa y repentina, denominada “La Mancha”, sobre el perfil transcriptómico leucocitario de hembras adultas y crías. Se observó un patrón de sobre-

expresión genética en las hembras adultas, mientras que en las crías se observó únicamente genes sub-regulados. Para las hembras se encontraron genes relacionados con las respuestas de estrés celular, pro-inflamación y regulación positiva del ciclo celular. En las crías se obtuvieron genes involucrados en las vías de respuesta defensa del sistema inmune innato. Estas observaciones sugieren que los individuos muestreados durante la anomalía estaban pasando por procesos de estrés celular y respuestas inmunitarias alteradas. Estos resultados añaden evidencia a la noción de que cambios abruptos ambientales, como la anomalía oceanográfica de “La Mancha”, impactan la fisiología de los organismos.

## Abstract

The survival and fitness of organisms is permanently influenced by the environment. The organisms respond to changes in environmental conditions and adapt to them by means of plasticity and selection of successful genetic variants. Climatic and oceanographic anomalies, as well as ecological variations in the distribution of organisms, have an impact on the physiology and health of individuals. High-throughput sequencing tools facilitate the genetic study of non-traditional biological models, and provide detailed information on the molecular and cellular processes that occur within individuals. The reproductive distribution of the California sea lion makes it an ideal ecoimmunological model to study the effect of biogeographic and ecological conditions on the immune system responses. Also, the California sea lion is considered as a sentinel wildlife species that is exposed to natural environmental conditions, so it provides real information of the effect that climatic anomalies have on cellular responses. The aim of this thesis was to analyze the effect of environmental impact on immune responses. It was addressed through two ecological approaches and two methods of HTS. The first chapter describes the amplification protocol of the beta chain of the TCR. We demonstrated the possibility of its amplification from whole blood samples and with a single pair of primers. The amplification was carried out for samples from 14 islands, thus covering the ecological regions characterized for the species. The main purpose of this amplification is to be able to analyze and compare later, the antigenic repertoire between biogeographic regions. In the second chapter we analyzed the effect of the climatic anomaly "The Blob" on the leukocyte transcriptomic profile of female adults and pups. A pattern of genetic over-expression was observed in the adult females, whereas in the offspring, only sub-regulated genes were

observed. Mainly, genes associated with regulation responses to stimulus and stress and inflammatory responses, were significantly upregulated in female adults. On the other hand, downregulation of genes involved in innate immune responses were observed in pups. These observations suggest that the individuals sampled during the anomaly were undergoing marked cellular stress processes and altered immune responses. These results add further evidence to the notion that abrupt environmental changes can impact the physiology of organisms.

## **Dedicatorias**

A mi familia Corina, Tamara, Gloria, Raúl, Carlos y Said...

## **Agradecimientos**

A todas las personas que hicieron posible la realización del proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir y al CONACYT por apoyar el desarrollo científico del país, al brindarme una beca ( ) para realizar la maestría como estudiante de tiempo completo. Asimismo a Fronteras de la Ciencia (CONACYT) por financiar el proyecto (número 446).

Al Museo de la Ballena y a la tripulación del Narval, por el apoyo logístico durante la toma de muestras en el Golfo de California. A la Cooperativa de Pescadores Nacionales de Abulón (PNA), por el apoyo brindado durante el trabajo en campo en el Archipiélago San Benito.

A Karina por brindarme la oportunidad de realizar la investigación, y por ser siempre mi mayor ejemplo.

A mis sinodales por el apoyo y confianza que me dedicaron hasta el final.

# Índice

Índice de figuras.....	13
Índice de Cuadros .....	14
Introducción general.....	15
CAPÍTULO 1. Ecología del repertorio antigénico de los linfocitos T del lobo marino de California en el Golfo de California y Pacífico Mexicano. ....	18
1.1 Introducción .....	18
1.2 Antecedentes .....	21
El Sistema Inmunitario .....	21
Los Linfocitos.....	25
Memoria Inmunitaria: generación del repertorio antigénico .....	29
Herramientas biotecnológicas: Rep-Seq.....	32
El lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> ) en el Golfo de California.....	37
Descripción de la especie.....	37
Biogeografía de <i>Z. californianus</i> en el Golfo de California.....	39
1.3 Hipótesis.....	44
1.4 Objetivo.....	44
Objetivos específicos: .....	44
1.5 Métodos.....	44
Colecta de muestras .....	44
Extracción de ARN y amplificación del TRB- $\beta$ .....	46
1.5 Resultados.....	49
Amplificación y caracterización preliminar del ZACA_TRB.....	50
1.6 Discusión .....	56

1.7 Conclusión.....	57
CAPÍTULO 2. Modificación en la regulación de genes inmunes y metabólicos en el lobo marino de California: consecuencias de las anomalías climáticas.....	
2.1 Introducción.....	59
2.2 Antecedentes.....	61
La anomalía climática “La Mancha”.....	61
Respuestas de estrés celular.....	63
Herramientas para medir la expresión genética: RNA-Seq.....	69
Aplicaciones del RNASeq.....	75
La teoría de los canjes bio-energéticos.....	83
2.3 Hipótesis.....	86
2.4 Objetivos.....	86
Objetivos específicos.....	86
2.5 Métodos.....	87
Toma de muestras.....	87
Extracción de ARN.....	87
Construcción de las bibliotecas de RNASeq y secuenciación.....	88
Análisis bioinformático.....	88
2.6 Resultados.....	89
Alineamiento de las secuencias de ARN.....	89
Análisis de ontología genética e identificación de DEG.....	94
Identificación de funciones relacionadas con el sistema inmunitario.....	105
2.7 Discusión.....	115
2.7 Conclusión.....	121

3.1 Conclusión general.....	122
Referencias.....	124

# Índice de figuras

## Capítulo 1

<b>Figura 1.1</b> Mapa de las cuatro regiones ecológicas del Golfo de California, propuesta por Lluch-Cota y Arias-Aréchiga (2000) .....	42
<b>Figura 1.2</b> Mapa de las 14 colonias reproductivas muestreadas, 13 dentro del Golfo de California y una en el Pacífico Norte. ....	45
<b>Figura 1.3</b> Esquema del método LA-PCR utilizado para amplificar el TRB del lobo marino de California (ZACA_TRB).....	49
<b>Figura 1.4</b> Gel de agarosa de la amplificación del TRB de ADNc de <i>Z. californianus</i> , con los oligos Antilink y ZACA_TRB5, amplificado por LA-PCR.....	51
<b>Figura 1.5</b> Análisis en el IMGT/V-QUEST de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos correspondientes a la región de unión CDR3 del TRB amplificado. ....	52
<b>Figura 1.6</b> Representación 2D obtenido del IMGT/Collier de Perles del TRB V-D-J de la secuencia amplificada y secuenciada a partir de los oligos ANTILINK y ZACA-TRB5. ....	55

## Capítulo 2

<b>Figura 2. 1</b> Uso del RNASeq en el tiempo.....	76
<b>Figura 2. 2</b> Representación de la cantidad de publicaciones realizadas en las últimas décadas que han utilizado las NGS para observar los cambios en la expresión genética en respuesta a distintos cambios ambientales. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 2. 3</b> Fracción de lecturas mapeadas durante el pseudo-alineamientos. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 2. 4</b> : Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados (DEG .....	92
<b>Figura 2. 5:</b> Análisis de expresión diferencial genética de individuos.....	93
<b>Figura 2. 6</b> Gráfico de calor que muestra la divergencia Jensen-Shannon .....	94
<b>Figura 2. 7</b> Gráficos de volcán con los nombres de los DEG's.....	95
<b>Figura 2. 8</b> Categorías GO de los procesos biológicos. ....	97
<b>Figura 2. 9</b> Mapa de árbol de los procesos biológicos diferencialmente expresados.....	98
<b>Figura 2. 10</b> Redes de interacción genética de los DEG's.....	104

# Índice de Cuadros

## Capítulo 1

**Cuadro 1.1** Oligos utilizados para la amplificación del TRB de *Z. californianus*. .. **¡Error! Marcador no definido.**

**Cuadro 1. 2** Nombre de la colonia reproductiva de *Z. californinaus* de la que se obtuvieron las muestras (n), la región ecológica a la que pertenece, y el año en el que se tomaron las muestras. .... 51

**Cuadro 1. 3** Datos arrojados por IMG/TA de la secuencia de TRB amplificada ..... 53

## Capítulo 2

**Cuadro 2. 1** Proteoma mínimo de las respuestas de estrés celular..... 69

**Cuadro 2. 2** Resumen del pseudo-alineamiento de las 12 muestras procesadas de *Z. californianus*, al utilizar las secuencias de ARN disponibles de *C. familiaris*... **¡Error! Marcador no definido.**

**Cuadro 2. 3** DEG's sobre y sub-regulados en adultos y crías de *Z. californianus* ..... 106

# Introducción general

*“If there were no trade-offs, then selection would drive all traits correlated with fitness to limits imposed by history and design”.*

S. C. Stearns

Todos los organismos optimizan su supervivencia y reproducción de acuerdo con las condiciones ambientales (Stearns, 1989). La teoría de la historia de vida determina que los recursos en el ambiente son limitados, y que la energía disponible actúa como una limitante de diversos procesos fisiológicos, tales como el funcionamiento inmunitario y la reproducción, así como la supervivencia (McDade, 2003). El sistema inmunitario es el encargado de reconocer agentes foráneos y propios, además de diferenciar entre los que son inocuos de los que son dañinos (McDade, 2003). Este proceso se da principalmente en etapas tempranas del desarrollo cuando se dan procesos de “educación” del sistema inmunitario (MacGillivray y Kollmann, 2014), además de la implementación de respuestas de defensa si estas proceden. El mantenimiento y uso del sistema inmunitario es energéticamente costoso, y debe competir por recursos con otros procesos importantes como la reproducción y el crecimiento (Sheldon y Verhulst, 1996a; Klasing, 2004). Por lo tanto, en un ambiente donde los recursos son variables, la energía alocada al sistema inmunitario varía dependiendo de diversos factores de la historia de vida de cada especie e incluso de cada individuo (Sheldon y Verhulst, 1996a; Schulenburg *et al.*, 2009).

Las condiciones ambientales a las que están expuestos los organismos cambian constantemente, y se reconoce que las anomalías climáticas y oceanográficas como El Niño y La Niña, así como el impacto de las actividades humanas en diversos ecosistemas causan efectos

negativos en las poblaciones de vida libre (Trillmich y Limberger, 1985; Acevedo-Whitehouse y Duffus, 2009; Doney *et al.*, 2012; Maxwell *et al.*, 2013). Particularmente, en el ecosistema marino, las especies más afectadas son aquellas que ocupan niveles tróficos altos, entre ellos los pinnípedos, que suelen presentar tasas más altas de mortalidad neonatal y juvenil debido a sus hábitos alimenticios que son afectados por las variaciones en la temperatura (Trillmich y Ono, 1991). Al ser especies longevas y topes frecuentes de la cadena trófica, los pinnípedos son considerados centinelas marinos, entre ellos el lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Bossart, 2011). Así, su estudio permite la generación de información que refleja el estado del ecosistema en el que viven (Gulland y Hall, 2007; Bossart, 2011).

El lobo marino de California es un modelo no tradicional emergente para el estudio ecoinmunológico y biogeográfico (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2002; Brock *et al.*, 2013; Vera-Massieu *et al.*, 2015; Banuet-Martínez *et al.*, 2017). Primeramente, al ser una especie oceánica y costera, en vida libre está expuesta a cambios abruptos climáticos y antropogénicos, por lo que potencialmente refleja las condiciones reales del ecosistema marino. Además, la especie tiene una distribución geográfica relativamente amplia, ya que se encuentra a lo largo del Océano Pacífico noreste, desde la Columbia Británica en Canadá hasta las costas de Baja California en México y el Golfo de California (Lowry y Maravilla-Chavez, 2003; Szteren, Auriolles y Gerber, 2006). Esta amplia distribución y el aprovechamiento de recursos mayoritariamente regional que se presentan alrededor de las colonias (García-Rodríguez y Auriolles-Gamboa, 2004), permite analizar el efecto de las condiciones biogeográficas sobre el estado de salud y respuestas fisiológicas de la población.

El objetivo general de la presente tesis fue comprender los efectos del ambiente, particularmente la presencia de contaminantes y actividades humanas, así como el incremento en la temperatura superficial oceánica y la consecuente falta de alimento, sobre el sistema inmunitario del lobo marino de California en México. En el primer capítulo se investigó la variación del repertorio antigénico en función de su regionalización ecológica. Se desarrolló el protocolo para poder amplificar la región variable del receptor de los linfocitos T de esta especie, y poder secuenciar el repertorio antigénico. Esto, como una aproximación para observar la variación en la diversidad antigénica de acuerdo con la biogeografía de la especie. En el segundo capítulo se examinó el efecto de “La Mancha” sobre las respuestas inmunitarias y metabólicas del lobo marino de California a través de la secuenciación de ARN extraído de leucocitos. En conjunto, esta tesis busca destacar la importancia del sistema inmunitario en la salud y supervivencia del lobo marino de California en un ambiente cambiante.



detectar la alta diversidad de agentes infecciosos a los que puede enfrentarse, el sistema inmunitario adaptativo (SIA).

El sistema inmunitario es considerado el principal sistema de defensa de cualquier organismo. Su tarea principal es identificar lo propio de lo extraño, reconocer patógenos y otros materiales extraños, así como desencadenar las reacciones para eliminarlos. Señalado por Kipnis (2018) como el “séptimo sentido”, el sistema inmune es capaz de reconocer a una gran variedad de agentes extraños. Sin embargo, a diferencia del sistema inmune innato, el SIA reconoce y distingue de manera específica a millones de antígenos, y generar memoria inmunitaria. Este sistema utiliza la información de una primera exposición ante el sistema inmune innato, para generar una respuesta anticipatoria eficiente en contra del mismo antígeno durante una segunda exposición. De esta forma, un individuo es capaz de almacenar la información antigénica en una “biblioteca” casi infinita de receptores linfocitarios.

El SIA en vertebrados mandibulados se da a través de los receptores de los linfocitos B (BCRs) y los T (TCRs). La cantidad de información generada en el estudio del repertorio es gigantesca. Tan solo el mecanismo combinatorio para la generación de los receptores da origen a más de  $10^{18}$  TCRs distintos en humanos y  $10^{15}$  en ratón; y es todavía más alta la diversidad de los BCRs (Davis y Bjorkman, 1988; Venturi *et al.*, 2008; Benichou *et al.*, 2012; Elhanati *et al.*, 2015), por lo que estudiar dicha diversidad representa un problema logístico. Sin embargo, el rápido avance de las tecnologías de genómica y de secuenciación han hecho posible la obtención de datos genéticos a gran escala (Hill, 2001; Henry *et al.*, 2014). Asimismo, el mejoramiento de estas herramientas, el incremento en la capacidad de lecturas y la

disminución del tiempo y el costo del proceso de secuenciación, han popularizado las herramientas existentes (Thomas, Heather, Pollara, *et al.*, 2013).

El mapeo del repertorio antigénico, conocido como Rep-seq, permite profundizar en el entendimiento de las dinámicas inmunitarias con diversas aplicaciones ecológicas y biomédicas (Bashford-Rogers *et al.*, 2014; Galson *et al.*, 2015). Actualmente, esta tecnología se ha convertido en la herramienta preferente para el estudio de enfermedades autoinmunes, infecciosas, cáncer y envejecimiento (Boyd *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014, 2015, 2016; Galson *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, a la fecha, el Rep-seq no se ha utilizado en modelos no tradicionales, ni en poblaciones silvestres (da Fonseca *et al.*, 2016).

En este capítulo se presenta el primer paso para la determinación de la diversidad del repertorio antigénico de la cadena beta de los linfocitos T de una especie silvestre y modelo emergente, el lobo marino de California. Esto se realizó con el objetivo de comparar posteriormente la diversidad a lo largo de su distribución reproductiva en el Golfo de California y el Pacífico nororiental.

## 1.2 Antecedentes

*“There are many aspects of life which, when viewed retrospectively, fall into a pattern, although in their developing they seemed but a random play of accident and circumstance”*

*(Sir Macfarlane-Burnet)*

### El Sistema Inmunitario

El sistema inmunitario es el principal sistema de defensa del organismo. Este sistema posee un armamento extraordinario, conformado por un repertorio de constituyentes y un conjunto de procesos complejos de interacciones celulares y moleculares. El sistema inmunitario se ha clasificado de forma general en el sistema innato (SII) y el sistema adaptativo o adquirido (SIA) (Clark y Kupper, 2005).

La primera línea de defensa del sistema inmune se da a través de barreras físicas y químicas. La barrera más grande del organismo son las membranas mucosas que cubren tractos y sistemas, y que se extiende, al menos en el humano, por cerca de 400 m<sup>2</sup> (Sompayrac, 2016). Por otro lado, la piel, el órgano más grande del cuerpo, es la primera barrera con la que tienen contacto los patógenos (Mann, 2014). Además de actuar como barrera física, extensos componentes celulares y microbianos de la piel regulan respuestas inmunes y mantienen la homeostasis (Pasparakis, Haase y Nestle, 2014). El conjunto de células y moléculas inmunes forman una red de protección denominada “el sistema inmunitario de la piel” (Bos y Kapsenberg, 1986). También posee inhibidores microbianos en el sudor y en secreciones subcutáneas, como ácido láctico y ácidos grasos capaces de producir moléculas pro-inflamatorias (Richmond y Harris, 2014). Estos inhibidores disminuyen el pH de la piel y generan un ambiente que no es apto para muchos microorganismos patógenos (Roitt y Delves, 2001). Asimismo, los cilios, lágrimas, saliva, orina y mecanismos como la tos o el estornudo, remueven

y bloquean la adherencia del agente extraño a las células (Roitt y Delves, 2001; Janeway *et al.*, 2009).

La segunda barrera del sistema inmune la conforman los efectores del SII. Las respuestas del SII son rápidas e inespecíficas, y está compuesto principalmente por células circulantes (leucocitos de origen mieloide y células NK), proteínas antimicrobianas, y moléculas señalizadoras como las quimiocinas y citocinas (Beutler, 2004). Los efectores celulares del SII poseen receptores de reconocimiento de estructuras conservadas, conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) (Medzhitov, 2002; Borghesi y Milcarek, 2007). Este sistema es altamente conservado, con muchos efectores comunes desde insectos hasta mamíferos (Deng *et al.*, 2013).

Las principales respuestas de este sistema son la inflamación y la fagocitosis, donde las células fagocíticas como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas reconocen moléculas conservadas entre los microorganismos a través de los PRRs (Janeway *et al.*, 2009). Estas moléculas son peptidoglicanos, lipopolisacáridos y oligosacáridos presentes en las superficies de los microorganismos y pertenecientes a células dañadas (Matzinger, 2002), y se les conoce genéricamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Matzinger, 2002; Medzhitov, 2002; Seong y Matzinger, 2004). En estos procesos basales del SII, las células secretan proteínas señalizadoras denominadas citocinas y quimiocinas que permiten el reclutamiento celular del SII y SIA (Dembic, 2015b). También, estas moléculas inducen la extravasación, proceso por el cual las células endoteliales sufren un cambio en su conformación

y adhesión para permitir el paso de los leucocitos circulantes hacia el tejido (Mosser y Edwards, 2008; Elgert, 2009; Dembic, 2015a).

Finalmente, el SIA se conforma por efectores que son activados por el SII. Las respuestas son más lentas pero son específicas, ya que utilizan receptores de reconocimiento específico de antígenos (Deng *et al.*, 2013). El SIIA también es conocido como el sistema inmunitario de memoria, ya que tiene la capacidad de guardar la información de una previa exposición para una respuesta más rápida y efectiva durante exposición posterior (Roitt y Delves, 2001; Janeway *et al.*, 2009).

Se estima que el SIA surgió hace aproximadamente 500 ma en los vertebrados (Pancer y Cooper, 2006). Sin embargo, fue solamente a partir del surgimiento de los vertebrados mandibulados (*Gnatostomados*), hace aproximadamente 420 ma (Zhu *et al.*, 2009; Brazeau y Friedman, 2015), que se desarrolló un SIA basado en receptores antigénicos altamente variados (TCR y BCR) en los linfocitos (Litman, Rast y Fugmann, 2010). Mientras que los vertebrados no mandibulados (*Agnatha*), como las lampreas y los mixinos, son capaces de montar respuestas específicas contra microorganismos patógenos y células exógenas a través de receptores variables linfocitarios (VLRs) (Linthicum y Hildemann, 1970; Fujii, Nakagawa y Murakawa, 1979). Los VLRs consisten en módulos repetidos ricos en leucina (LRR por sus siglas en inglés) (Boehm *et al.*, 2012), encontrados también en receptores del SII como los TLRs y NLRs (Pålsson-McDermott y O'Neill, 2007).

A pesar de que el SIA se observa únicamente a vertebrados, diversos estudios han encontrado moléculas relacionadas con dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) en algunos invertebrados. Por ejemplo la molécula Dscam (*Down síndrome cell adhesión*

*molecule*) presente en la hemolinfa de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Watson *et al.*, 2005) y en el mosquito, *Anopheles gambiae*, tiene un empalme alternativo de los genes que la codifican, con lo que son capaces de producir más de 31,000 isoformas Dscam para el reconocimiento específico de bacterias y parásitos (Dong, Taylor y Dimopoulos, 2006). Ambos procesos moleculares, el re-arreglo somático en vertebrados y el empalme alternativo en invertebrados, tienen el objetivo de generar receptores altamente diversos para distinguir diferentes antígenos (Kurtz y Armitage, 2006). Sin embargo, aún es tema de discusión el considerar el empalme alternativo de los receptores de los insectos como análogo al SIA de los vertebrados. Además, falta mucha información para demostrar una posible capacidad de memoria inmunitaria en los invertebrados (Arala-Chaves y Sequeira, 2000; Hauton y Smith, 2007).

Todas las células del sistema inmune descienden de las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés), y se originan, mantienen y renuevan en la médula ósea (Sompayrac, 2016). Las HSC dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas o progenitores comunes, que son dos linajes principales, la línea linfoide y la línea mieloide (Granick, Simon y Borjesson, 2012). A partir de estos linajes, se originan los progenitores especializados; el progenitor mieloide y el linfoide. El progenitor mieloide da lugar a los reticulocitos y megacariocitos, que generan a los eritrocitos y plaquetas respectivamente; los promocitos, que generan a las células dendríticas y monocitos; y los granulocitos, que dan lugar a los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células cebadas (Roitt y Delves, 2001). Por otro lado, el progenitor linfoide da lugar a las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) y a los linfocitos T y B (Janeway *et al.*, 2009).

## Los Linfocitos

Los linfocitos son las células que juegan el papel principal en el SIA. Son células pequeñas, de 7 a 10  $\mu\text{m}$ , de núcleos grandes que tienen la capacidad de reconocer de forma específica a distintos antígenos a través de receptores altamente variables (Deng *et al.*, 2013). Existen dos subpoblaciones mayores de linfocitos, conocidos como linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), cada uno caracterizada por sus receptores de membrana TCR o BCR, respectivamente (Borst, Jacobs y Brouns, 1996).

La generación de los linfocitos T y B, denominada linfopoyesis, se da en la médula de los huesos largos, y su maduración en tejidos linfoides (Hirose *et al.*, 2002). Ambos linfocitos se originan a partir de un progenitor linfoide común (CLP) en la médula ósea, del cual se diferencian en LT, LB y células NK. La maduración de los LB se lleva a cabo en la médula ósea y en la bolsa de Fabricio, en el caso de las aves, mientras que la maduración de los LT finaliza en el timo (Guy-Grand *et al.*, 2003). La célula progenitora del timo, TSP por sus siglas en inglés (*thymus-seeding progenitor*), da origen a dos grandes linajes de LT,  $\alpha\beta$  y en menor porcentaje  $\delta\gamma$ , a través del desarrollo y reordenamiento de los genes del TCR, discutido más adelante (Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2007).

Posterior a la maduración, los linfocitos entran a circulación y migran a tejidos linfoides periféricos, donde pueden ser activados por la presencia y presentación de antígenos (Katz, 1977b). En el caso de los LB, la maduración se genera por la generación de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Los LB maduros poseen los isotipos IgM e IgD en la superficie, y al entrar a los tejidos linfoides periféricos se lleva a cabo una proliferación dependiente de antígeno

(Wickramasinghe, Porwit y Erber, 2011). Durante la maduración y desarrollo de los linfocitos, se da una exigente selección, donde los LB o LT que reconocen antígenos propios sufren apoptosis (Rathmell y Thompson, 2002). De hecho, más del 99% de los LT generados son destruidos mediante apoptosis en el timo (Wickramasinghe, Porwit y Erber, 2011).

Los linfocitos B son las células encargadas de producir a los anticuerpos específicos a un antígeno. Las Ig's pueden encontrarse ancladas a la membrana o libres en la sangre, donde capturan a los antígenos para que sean presentados a las células T CD4+ o llevadas al sistema retículo endotelial para su destrucción (Katz y Benacerraf, 1972). La unión del anticuerpo al antígeno inactiva al patógeno y bloquea la unión de este a los receptores celulares (Katz, 1977a). Además, la unión funciona como un aumentador de la respuesta, denominado "opsonización", para su identificación por células fagocíticas y su posterior destrucción (Alberts *et al.*, 2008). Los LB se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en células de memoria, las cuales se activan durante la siguiente exposición al mismo antígeno (Yuseff *et al.*, 2013). Los anticuerpos que producen son Ig's formadas por dos cadenas idénticas "pesadas" y dos "ligeras", unidas por enlaces disulfuro (Alberts *et al.*, 2002). La estructura del anticuerpo se conforma de dos partes, una variable y una conservada. La región variable está formada por las cadenas ligeras y una sección de las cadenas pesadas (Klein y Hořejší, 1997). Esta región se une a los antígenos y se conoce como fragmento de unión al antígeno (Fab, por sus siglas en inglés) (Bouvet, 1994). La región conservada, conocida como fragmento cristizable (Fc, por sus siglas en inglés), no posee afinidad a los antígenos, y la conforman únicamente las cadenas pesadas (Roitt y Delves, 2001).

Los LT se pueden clasificar en células citotóxicas (CTLs), células auxiliares (ThC) y células reguladoras (Treg) (Groscurth y Filgueira, 1998; Mellanby, Thomas y Lamb, 2009; Josefowicz, Lu y Rudensky, 2012). Las CTLs también denominadas células  $CD8^+$ , por la expresión de la proteína CD8 en su superficie, son células encargadas de reconocer y matar células infectadas (Groscurth y Filgueira, 1998; Zhang y Bevan, 2011; Halle *et al.*, 2016). Por otro lado las células ThC o  $CD4^+$ , que expresan a la proteína CD4 en su superficie, son las encargadas de secretar moléculas como citoquinas y presentar proteínas co-estimuladoras que activan a los LB, células dendríticas, macrófagos y CTLs (Behrens *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2008). Una vez activadas, las ThC pueden diferenciarse en Th1 y Th2 (Berger, 2000). Las citoquinas del tipo Th1 son producidas durante respuestas pro-inflamatorias contra parásitos intracelulares o respuestas autoinmunes (Biedermann, R\_cken y Carballido, 2004). Por otro lado, las citoquinas tipo Th2 están relacionadas con las respuestas contra parásitos extracelulares, respuestas inflamatorias alérgicas, y respuestas anti-inflamatorias (Paul y Zhu, 2010). Finalmente, las células Treg  $CD4^+$   $CD25^+$ , son células reguladoras encargadas de la auto-tolerancia, las cuales evitan la sobre-reacción del sistema inmune (Mathis y Benoist, 2004; Mellanby, Thomas y Lamb, 2009; Josefowicz, Lu y Rudensky, 2012).

Los LT juegan un papel muy importante contra agentes patógenos dentro de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Gasteiger y Rudensky, 2014). El reconocimiento antigénico por parte de estas células se da a través de la asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) (Klein y Hořejší, 1997). El MHC es una familia multigénica, que codifica proteínas de reconocimiento de antígenos para presentarlos a los linfocitos T (Doherty y Zinkernagel, 1975). El MHC se puede clasificar de acuerdo a su estructura

y función en clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II). El MHC-I se encuentra en todas las células nucleadas y reconoce péptidos derivados de proteínas degradadas en el citosol, lo que permite la identificación de patógenos intracelulares o células cancerígenas (Rock, Reits y Neefjes, 2016). Los péptidos intracelulares son procesados a través del proteosoma y transportadas al retículo endoplásmico para su unión con el MHC-I (Cruse y Lewis, 2000). El MHC-II se encuentra únicamente en células presentadoras de antígenos (CPA), como macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y LB, que tienen la capacidad de presentar péptidos derivados de antígenos exógenos (Villadangos, 2001). En este caso, las CPA incorporan proteínas extracelulares, y las procesan en endosomas a través de vesículas enzimáticas (Cruse y Lewis, 2000). El MHC-I es reconocido por los LT-CD<sup>8+</sup>, lo cual genera una respuesta citotóxica que elimina la célula que presenta el antígeno (Bjorkman, 1997). Por otro lado, el MHC-II es reconocido por los LT-CD<sup>4+</sup>, los cuales producen linfoquinas (como IL-2), activan a los LB para producir anticuerpos, e incrementan la actividad microbicida de los fagocitos mononucleares (Blum, Wearsch y Cresswell, 2013).

La activación de los LT y el reconocimiento antigénico se da únicamente a través de la interacción de las moléculas de MHC de las CPA, y el receptor de los LT, el TCR. Cada LT puede tener más de 30,000 receptores idénticos sobre su superficie (Janeway *et al.*, 2009). El TCR es un complejo heterodimérico transmembranal, compuesto por dos cadenas,  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) y  $\beta$  (TCR $\beta$ ), o  $\delta$  (TCR $\delta$ ) y  $\gamma$  (TCR  $\gamma$ ) (Clevers *et al.*, 1988). Ambos receptores unidos por enlaces disulfuro, están formados por un dominio variable de unión al antígeno y uno constante (Allison y Lanier, 1987). La región variable de las cadenas TCR $\beta$  y TCR $\delta$  son ensambladas por la recombinación somática (detallada más adelante) de los genes V(D)J (*variable, diversity &*

*joining*), mientras que las cadenas TCR $\alpha$  y TCR  $\gamma$ , están formadas únicamente por los genes V y J (Clevers *et al.*, 1988). De forma similar en los BCRs, el proceso de recombinación de las cadenas pesadas (IGH) se da a través de los tres genes, mientras que el de la cadena ligera (IGL/IGK), es únicamente con los genes V y J (Hoehn *et al.*, 2016). La región variable de los TCRs se encuentra dentro de los dominios de las Ig's, las cuales se parecen mucho a los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de los anticuerpos (Rudolph, Stanfield y Wilson, 2006).

### Memoria Inmunitaria: generación del repertorio antigénico

Una respuesta inmunitaria eficiente debe tener la capacidad de reconocer a los agentes extraños, contenerlos o eliminarlos, y regularse a sí mismo para evitar respuestas autoinmunes. Además “debe” generar la memoria inmune para proteger al organismo de una segunda exposición al mismo antígeno (Janeway *et al.*, 2009). La característica más relevante del SIA es la capacidad de responder a millones de antígenos distintos, muy similares entre estos (Klein, 1998). De esta forma, el SIA es capaz de reconocer a detalle una sola molécula. La diversidad combinatoria puede llegar a más de  $10^{18}$  receptores únicos (Venturi *et al.*, 2008).

La capacidad de producción de tan alta diversidad de receptores linfocitarios, se genera a través de un proceso de recombinación somática de los genes V(D)J (Oettinger, 1996; Spicuglia, Franchini y Ferrier, 2006; Fugmann, 2010). Este mecanismo se da a través de las proteínas activadoras de la recombinación de genes, Rag1 y Rag2, las cuales cortan y unen de forma precisa segmentos de DNA (Sadofsky, 2001). Las uniones de DNA son guiadas por secuencias conservadas no codificantes conocidas como secuencias de señal de recombinación

(RSS, por sus siglas en inglés) (Schatz y Swanson, 2011). Las RSS están formadas por un heptámero de nucleótidos conservados, ubicado junto a la secuencia codificadora, seguido de una región no conservada de 12-23 pares de bases, denominado espaciador, y de otro bloque conservado de nueve nucleótidos (Schatz y Swanson, 2011).

Durante el proceso de recombinación somática, dentro de las uniones de los genes V(D)J, se generan deleciones e inserciones de nucleótidos aleatorias a la secuencia (Hoehn *et al.*, 2016). Además, en los BCRs se genera un proceso de hipermutación somática, que consiste en un cambio aleatorio de secuencia, que implica un aumento en las tasas de mutación de aproximadamente  $10^{-3}$  cambios por nucleótido por división celular (Rajewsky, Forster y Cumano, 1987). Este proceso es generado por la enzima de inducción de la activación citidina deaminasa, la cual genera el cambio de citosina a uracilo durante la transcripción (Teng y Papavasiliou, 2007).

Como se mencionó en la sección anterior, de acuerdo con la estructura de la isoforma del heterodímero, los TCRs se pueden dividir en dos categorías, TCR $\alpha\beta$  y TCR $\gamma\delta$ . Los TCR $\alpha\beta$  son los encargados de asistir la producción de las Ig's y las respuestas citotóxicas de los LT, y se unen a los antígenos presentados por el MHC (Chien y Jores, 1995). Por otro lado, los TCR $\gamma\delta$  son capaces de reconocer antígenos presentados por el MHC, así como antígenos libres no procesados (similar a las Ig's) (Chien y Jores, 1995). Más aún, estudios filogenéticos han demostrado que los TCR $\gamma\delta$  son más antiguos que los TCR $\alpha\beta$ , lo que sugiere que el reconocimiento indirecto de los antígenos evolucionó más tarde (Richards y Nelson, 2000). La frecuencia y distribución fisiológica de cada isoforma es distinta, y también difiere entre especies. Los TCR $\gamma\delta$  representan menos del 5% de los LT en órganos linfoides en el humano y

en el ratón (Haas, Pereira y Tonegawa, 1993); aunque en individuos con infecciones bacterianas y virales o enfermedades autoinmunes puede incrementar en 50% y 30%, respectivamente (Konigshofer y Chien, 2006). Por otro lado, en artiodáctilos, aves y lagomorfos, los TCR $\gamma\delta$  representan más del 20% (Sowder *et al.*, 1988; Hein y Mackay, 1991; Yang *et al.*, 2017). Asimismo, en otros tejidos como el intestino y el epitelio reproductivo, o en ungulados pueden representar casi el 50% (Haas, Pereira y Tonegawa, 1993).

La región variable de los receptores está compuesta por tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de complementariedad: CDR1, CDR2 y CDR3. Las primeras dos se encuentran en el segmento del gen V y son las encargadas de la interacción con la molécula de MHC (Jung y Alt, 2004). Por lo que la variabilidad de estas regiones está restringida a lo que está presente en la línea germinal. En cambio, la región CDR3 es más variable, y está formada por la unión de los segmentos VJ en la cadena  $\alpha$ , y los segmentos V(D)J en la cadena  $\beta$ , así como los nucleótidos añadidos durante la maduración (*V-N-D-N-J*) (Robins *et al.*, 2010). Es a través de la región CDR3 que se da la unión e interacción con los antígenos presentados; y es la diversidad de esta región, la que permite el reconocimiento de los posibles antígenos a los que un individuo puede enfrentarse. La secuencia y longitud del CDR3 varía en cada clon de LT, por ende cada tipo de CDR3 representa un “clonotipo” específico (Gorski *et al.*, 1994). El tamaño de la región CDR3 va de 7-27 aminoácidos (Findly, Niagro y Dickerson, 2017). El número de secuencias de la cadena  $\beta$  (TRB) en un individuo, se ha estimado en  $10^9$ , y la diversidad potencial en la secuencia de aminoácidos en  $5 \times 10^{11}$  (Robins *et al.*, 2010; Mora y Walczak, 2016).

El reconocimiento y unión de un receptor a un antígeno específico estimula la proliferación masiva, conocida como expansión clonal de los linfocitos (Burnet, 1976). Durante la expansión clonal, los linfocitos “ingenuos” maduran en células efectoras que producen los receptores (BCRs/TCRs), y otra parte quedan como células de memoria hasta volver a ser estimuladas (Polonsky, Chain y Friedman, 2015). La exposición siguiente al mismo antígeno estimula a las células de memoria con el receptor específico del antígeno, y la respuesta inmune es más rápida y la afinidad al antígeno más fuerte (Silverstein, 2014).

La plasticidad del mecanismo permite al sistema inmune generar un repertorio de secuencias más grande de lo que podría brindar únicamente la línea germinal (Sadofsky, 2001). De esta forma el sistema inmune es capaz de crear receptores e inmunoglobulinas que reconozcan una amplia y casi ilimitada variedad de antígenos específicos.

### Herramientas biotecnológicas: Rep-Seq

El avance en las tecnologías de genómica y secuenciación han hecho posible el estudio y generación de datos genéticos a gran escala y mayor detalle (Hill, 2001). Estas herramientas han permitido generar diversos análisis inmunogenéticos, como la secuenciación masiva de receptores linfocitarios (RepSeq), utilizada principalmente en humanos (Benichou *et al.*, 2012; Niklas *et al.*, 2014).

El repertorio inmunológico es la antología de las proteínas de reconocimiento de antígenos presentes en la superficie de los LB y LT (Benichou *et al.*, 2012). Por esto, el estudio del SIA a través de su repertorio se ha convertido en la herramienta preferida para entender las

dinámicas inmunes (Emerson *et al.*, 2013; Lossius *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2015; Sui *et al.*, 2015; C.-Y. Wang *et al.*, 2017; Ritter *et al.*, 2017).

El repertorio inmune es altamente complejo, por lo que analizar y calcular la diversidad del mismo, se ha convertido en uno de los mayores retos. En las últimas dos décadas se han desarrollado distintas estrategias para analizar el repertorio. Por ejemplo, la citometría de flujo, la microscopía de fluorescencia y la PCR, las cuales permiten estudiar el repertorio de una sola célula (Maciejewski *et al.*, 2007; Dash, Wang y Thomas, 2015). La citometría de flujo se ha utilizado para medir la proporción del uso de genes V específicos y detectar poblaciones malignas de LT (Salameire *et al.*, 2009). Sin embargo, el análisis de los datos de la citometría de flujo en el repertorio inmune aún es limitado y la cantidad de información proporcionada es exigua (van der Geest *et al.*, 2015). Otras herramientas utilizadas han sido los anticuerpos monoclonales (mAbs) y la fluorescencia activada (FACS) (X. Hou *et al.*, 2016; X.-L. Hou *et al.*, 2016). Sin embargo, en ambas es difícil analizar la expresión de los genes y están limitadas a los TCRB-V conocidos (X.-L. Hou *et al.*, 2016).

Por otro lado, se han desarrollado técnicas moleculares cualitativas y cuantitativas más eficientes. Uno de ellos es la espectratificación del CDR3, el cual tiene la capacidad de analizar polimorfismos de la longitud de esta región (Gorski *et al.*, 1994). Sin embargo, no proporciona un análisis cuantitativo del repertorio completo, ni se puede estimar la diversidad de las secuencias (Matsumoto *et al.*, 2006). Otros métodos basados en PCR han permitido un acercamiento más profundo al repertorio. El PCR con múltiples cebadores dirigidos a la región V, se ha utilizado en diversos estudios en humano y ratón (van Dongen *et al.*, 2003; Boria *et al.*, 2008). Esta estrategia puede ser usada en ADN o ARN, y necesita muy poco material. Sin

embargo, la amplificación para cada gen puede no ser equitativa y su uso está limitado a los genes V conocidos y no detecta variantes alélicas (Bashford-Rogers *et al.*, 2014; Rosati *et al.*, 2017). Otra aproximación en muestras de RNA, es la amplificación rápida del extremo 5' del ADN complementario (5' RACE, por sus siglas en inglés). Esta herramienta está basada en la actividad terminal transferasa de la transcriptasa reversa, la cual es capaz de incorporar nucleótidos al extremo 3' del ADNc (Nature-Methods, 2005). De esta forma, permite obtener ADNc completo, independientemente del alelo V que contenga. Sin embargo posee baja eficiencia y produce amplificaciones no específicas (Bashford-Rogers *et al.*, 2014). Por último, otra propuesta es el PCR de anclaje de un solo extremo (Frohman, Dush y Martin, 1988). Este ha sido nombrado de forma alternativa como PCR de ligación de anclaje (LA-PCR, por sus siglas en inglés) (Troutt *et al.*, 1992). Esta estrategia está basada en la ligación directa de un oligonucleótido de secuencia conocida (ancla) al ADNc (Troutt *et al.*, 1992). El oligo ancla, fosforilado en su extremo 5' y bloqueado en el 3' (/5Phos/ NNN...NNN/3ddC/), es ligado al extremo 3' ADNc. El PCR se realiza únicamente con un cebador dirigido al oligo ancla y otro dirigido a la región constante del receptor (Gao y Wang, 2015). De esta forma, el LA-PCR permite la amplificación de toda la región VDJC, independientemente de las variantes del gen V utilizado.

A pesar del desarrollo de técnicas para amplificar el repertorio antigénico y el avance emergente en la secuenciación masiva (NGS o HTS), las aproximaciones y estrategias de análisis y secuenciación siguen siendo un problema. La primera disyuntiva son las subunidades de los heterodímeros, donde las cadenas TCR $\alpha/\beta$  son más estudiadas que las TCR $\gamma/\delta$ , ya que la diversidad de las TCR $\gamma/\delta$  es menor, y su distribución anatómica está restringida a la piel y

mucosas (Bluestone *et al.*, 1991). La subunidad más utilizada en el análisis del RepSeq en el TCR $\alpha/\beta$  es la cadena  $\beta$  ya que se presentan de forma única en cada célula, contrario a la  $\alpha$  que puede haber dos expresadas en una misma célula (Padovan *et al.*, 1993). Además, la cadena  $\beta$  tiene un mayor potencial combinatorio por la presencia del gen D (Woodsworth, Castellarin y Holt, 2013).

La mayoría de los estudios se han centrado en la secuenciación de la región CDR3 únicamente (Freeman *et al.*, 2009; Kitaura *et al.*, 2016; Fozza *et al.*, 2017). La secuencia de CDR3, la región más variable de la cadena, proporciona información sobre el origen clonal, por lo que puede ser utilizado como identificador del linfocito (Calis y Rosenberg, 2014). Sin embargo, secuencias más largas que cubran la cadena completa, permiten la obtención de análisis más informativos, así como detectar hipermutaciones en los BCRs (Bashford-Rogers *et al.*, 2014), y mutaciones en genes en las regiones CDR1/2 en los TCRs; así como poder modelar las estructuras de los receptores y sus interacciones (Rosati *et al.*, 2017).

Dada la cantidad de secuencias generadas por HTS y la complejidad de los datos, estos requieren de herramientas bioinformáticas y análisis especializados. Sin embargo, las aproximaciones en el estudio del repertorio antigénico siguen siendo el mayor reto. El análisis del repertorio está dividido en dos procesos principales: el procesamiento de las lecturas, su ensamblaje y corrección; y el análisis de datos, el cual depende del objetivo del proyecto (Calis y Rosenberg, 2014). Dentro de lo que se puede analizar de las secuencias de los receptores se encuentran medidas de clonalidad, es decir la abundancia cada clonotipo (Dziubianau *et al.*, 2013). También es posible medir la diversidad de los clonotipos en un individuo o compararla entre individuos. Uno de los mayores obstáculos para el análisis del repertorio, es el análisis de

diversidad, ya que el tamaño de muestra es, generalmente limitado, y la cantidad de células obtenidas es solo una parte de lo que contiene un individuo (Benichou *et al.*, 2012). A pesar de que el repertorio total solo es un estimado, cada vez los análisis de diversidad se aproximan más a patrones que representan la realidad (Benichou *et al.*, 2012). La cuantificación de la diversidad total se realiza a través de estimaciones de los receptores no muestreados (Fisher, Corbet y Williams, 1943). También es posible analizar la longitud del CDR3, ya que es un indicador de variación en la selección para transcritos del marco de lectura (C.-Y. Wang *et al.*, 2017). El análisis de los clonotipos compartidos y la correlación de repertorios entre individuos y entre poblaciones, permite observar las fuerzas de selección y las dinámicas eco-evolutivas de cada sistema. Finalmente, el análisis de aminoácidos de CDR3 permite observar los cambios no sinónimos de las variaciones en las secuencias (INDELS) (Boyd *et al.*, 2010; Glanville *et al.*, 2011).

En la última década se han desarrollado múltiples líneas de comando y herramientas bioinformáticas para el análisis del repertorio inmunitario (Kidd *et al.*, 2014). Algunas de las herramientas computacionales para el análisis de las secuencias, asignación de genes, clonotipos y mediciones de diversidad son, IMGT (Lefranc *et al.*, 2009), Decombinator (Thomas, Heather, Ndifon, *et al.*, 2013), RTRC (Gerritsen *et al.*, 2016), IMSEQ (Kuchenbecker *et al.*, 2015), MixCR (Bolotin *et al.*, 2013, 2015), tcR (Nazarov *et al.*, 2015), DivE (Laydon, Bangham y Asquith, 2015), VDJviz (Bagaev *et al.*, 2016) y LymAnalyzer (Yu, Ceredig y Seoighe, 2016), entre otras.

La comparación de repertorios entre individuos y poblaciones ha tomado fuerza, ya que se ha comprobado que existen clonotipos compartidos, denominados “públicos”, y clonotipos “privados”, cuando se presenta en pocos individuos de la población (Madi *et al.*,

2014). Los repertorios antigénicos varían entre individuos dependiendo de la línea germinal y los diversos factores de historia de vida (Hoehn *et al.*, 2016). La abundancia de cada clonotipo depende de la exposición antigénica, es decir, clonotipos altamente abundantes en un individuo son resultado de la expansión clonal del linfocito en respuesta a un antígeno (Sui *et al.*, 2015).

La información resultante del análisis del repertorio inmune permite identificar los patrones de secuencias compartidas entre individuos y poblaciones. A pesar de su extensa aplicación en áreas como biomedicina, principalmente en humanos y animales modelo, este tipo de herramientas no se han utilizado en el estudio de poblaciones silvestres. Asimismo, aun no se ha estudiado la relación del repertorio antigénico de un organismo en relación a su ambiente y geografía.

## El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California

### **Descripción de la especie**

El lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828), es un mamífero carnívoro perteneciente a la superfamilia Pinnipedia. Los pinnípedos incluyen tres familias: Phocidae, en la que se encuentran las focas comunes y elefantes marinos; Odobenidae, donde se encuentran las morsas; y Otariidae, a la que pertenecen 14 especies de lobos marinos y lobos finos (King, 1983).

La especie es gregaria, y establece colonias a lo largo de su distribución costera al Noreste del Pacífico (Peterson *et al.*, 1967). A pesar de ser un mamífero acuático, lleva a cabo

diversas actividades como la reproducción y crianza, en hábitats terrestres. Son animales poligínicos y durante la temporada de reproducción los machos establecen territorios donde las hembras pueden entrar y salir libremente (Peterson *et al.*, 1967; Hernandez, 2009). La especie presenta dimorfismo sexual marcado, el cual se observa desde la etapa sub-adulta (5-8 años de edad), cuando los machos desarrollan una cresta sagital externa, pelaje más oscuro, y son de mayor tamaño (Bartholomew, 1970). Las hembras alcanzan la madurez sexual a los cuatro o cinco años de edad, y tienen un tamaño de 1.8 m de alto y un peso aproximado de 110 kg, mientras que los machos miden aproximadamente 2.4 m y llegan a pesar más de 350 kg (Heath y Perrin, 2009). Estos últimos alcanzan la madurez sexual a los siete u ocho años. Las crías nacen entre finales de mayo y julio, y generalmente nace solamente una cría por hembra (King, 1983).

Desde hace varias décadas, el lobo marino de California se encuentra protegido por la Norma Oficial Mexicana SEMARNAT-NOM-059, al igual que todas las especies de mamíferos marinos. La implementación de estas leyes de protección ha permitido que varias poblaciones se recuperen de un pasado de explotación, donde fueron blanco del aprovechamiento comercial (Zavala-Gonzalez y Mellink, 2000). Específicamente, el lobo marino de California se considera de “menor preocupación” de acuerdo con la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), debido a su creciente tendencia demográfica y amplia distribución (Aurioles-Gamboa y Hernández-Camacho, 2015b). Sin embargo, recientemente ha habido importantes eventos de mortalidad en el sur de California, los cuales se deben a anomalías oceanográficas (NOAA Fisheries, 2018).

La población total se conforma por aproximadamente 387,646 animales, ubicados en 21 colonias reproductivas, con la mayor parte de la población repartida entre las tres colonias de las islas del canal, San Miguel, San Nicolás y San Clemente, en la costa Californiana (Aurioles-Gamboa y Hernández-Camacho, 2015a). Estos se alimentan principalmente de sardina (*Sardinops sagax*), anchoveta del norte (*Engraulis mordax*), calamar (*Doryteuthis opalescens* y *Dosidicus gigas*), merluza del Pacífico (*Merluccius productus*), jurel (*Trachurus symmetricus*), serrano de aguas profundas (*Aequidens Serranus*), anchoveta del Pacífico (*Cetengraulis mysticetus*) y pulpo rojo (*Octopus rubescens*) (Lowry y Carretta, 1999; Aurioles-Gamboa y Camacho-Ríos, 2007; Porras-Peters *et al.*, 2008).

La especie se distribuye a lo largo de la costa este del Pacífico, desde la Columbia Británica en Canadá (51°N), hasta el sur de Baja California y en zonas insulares del Golfo de California en México (19°N) (Lowry y Maravilla-Chavez, 2003). La reproducción ocurre entre mayo y agosto, en islas del Golfo de California y en islas del oeste de Baja California y sur de California (Peterson *et al.*, 1967; Carretta *et al.*, 2009).

### **Biogeografía de *Z. californianus* en el Golfo de California**

El Golfo de California o Mar de Cortés (22-32°N y 105-107°W) es un ambiente excepcional que mantiene un ecosistema altamente diverso. Las variaciones climáticas y oceanográficas, así como la interacción de las costas de la península de Baja California y el continente, han generado diferencias biogeográficas a lo largo del Golfo (Case, Cody y Ezcurra, 2002; Lluch-Cota, 2004). Por esto, el estudio de distintos organismos como plantas, aves,

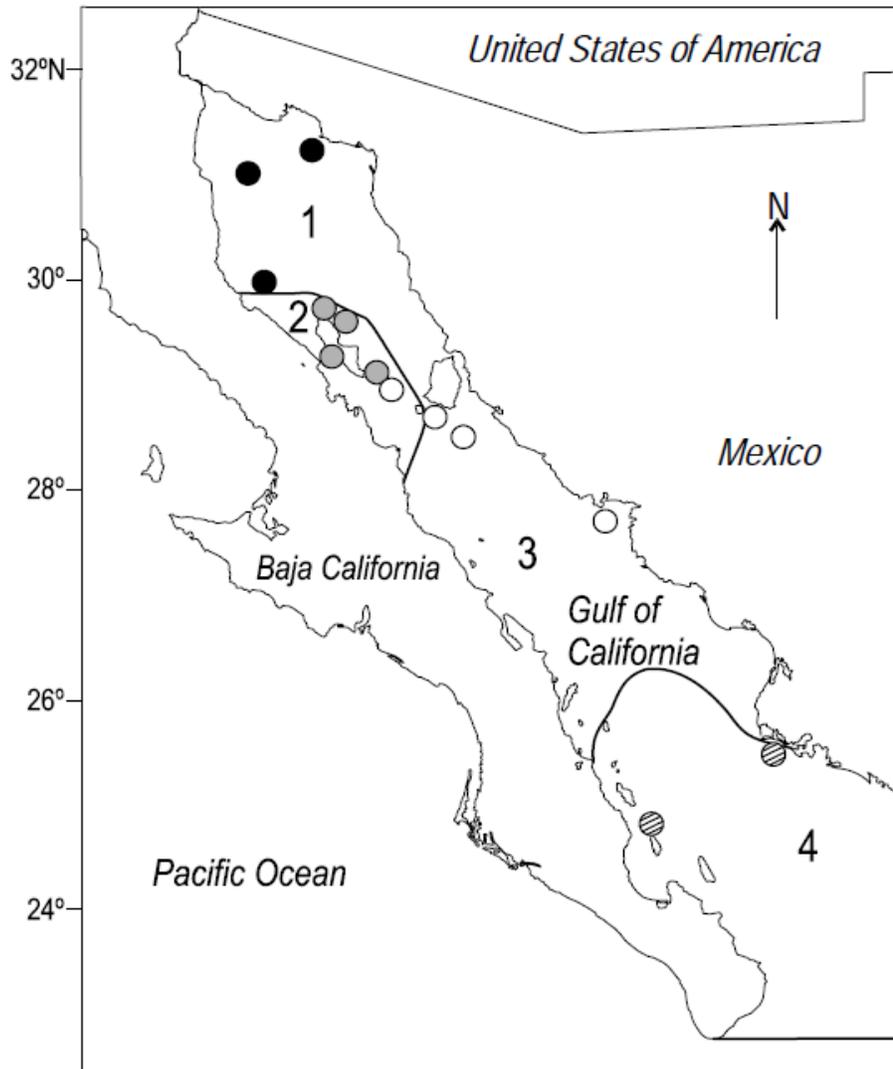
reptiles, peces y mamíferos, y su interacción con los distintos factores biogeográficos conforman un escenario de investigación natural. El Golfo de California comprende 244 islas, de las cuales 13 son utilizadas como colonias reproductivas por el lobo marino de California. Debido a las variaciones biofísicas que presenta el Golfo, las colonias presentan distintas características biogeográficas, ecológicas y genéticas.

La regionalización de las colonias reproductivas del Golfo de California y el Pacífico ha sido establecida de acuerdo a datos físicos-geográficos, ecológicos y biológicos. Por ejemplo, por datos hidrográficos (Sverdrup, 1941), productividad primaria oceánica (Lluch-Cota y Arias-Aréchiga, 2000; Lluch-Cota, 2004), y distancias geográficas (González-Suárez *et al.*, 2009). Datos ecológicos como la temperatura superficial oceánica, concentración de clorofila, diversidad de dieta y concentraciones de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ , entre otros (Szteren y Auriol-Gamboa, 2011). En el caso de datos biológicos, se ha regionalizado por diferencias anatómicas craneales (Zavaleta-Lizárraga, 2003), y hábitos alimenticios de la especie (García-Rodríguez y Auriol-Gamboa, 2004). A nivel genético, con base en variación genética mitocondrial y en la configuración de los genes DRB del MHC II (Maldonado *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2009), se ha demostrado que la población de lobo marino de California se separa en grupos dentro del Golfo de California, y difiere de la población del Pacífico. En conjunto, de acuerdo con estas características se han propuesto dividirlo en tres unidades de manejo, Norte, Centro y Sur (Zavaleta-Lizárraga, 2003; Schramm *et al.*, 2009). Sin embargo, al conjuntar los datos biogeográficos y ecológicos, se observó que es más parsimonioso y estadísticamente significativo considerar cuatro regiones: Norte, Angel de la Guarda, Centro y Sur (Fig. 1.1)

(Lluch-Cota y Arias-Aréchiga, 2000; Garcia-Rodriguez y Auriolles-Gamboa, 2004; Lluch-Cota, 2004; González-Suárez *et al.*, 2009; Szteren y Auriolles-Gamboa, 2011).

En términos de estudios sobre sus enfermedades, a la fecha se han estudiado algunas condiciones de relevancia poblacional en la especie. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de patógenos como *Uncinaria* spp. (Lyons *et al.*, 2011), *Cyptosporidium* y *Giardia* spp. (Adell *et al.*, 2014), *Toxoplasma gondii* (Migaki, Allen y Casey, 1977; Carlson-Bremer *et al.*, 2015), *Leptospira interrogans* (Gulland *et al.*, 1996; Colagross-Schouten *et al.*, 2002; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003); y algunos virus con potencial patógeno como Anellovirus (Ng *et al.*, 2009), Papillomavirus (Rivera *et al.*, 2012), y Herpesvirus (Buckles *et al.*, 2006), entre otros. Algunas de estas infecciones han sido descritas en vida libre y su prevalencia analizada en diferentes regiones de la distribución de la especie. Por ejemplo, se ha observado un gradiente de mayor prevalencia de *Leptospira* spp. hacia las islas del Norte del Golfo de California (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Avalos-Téllez *et al.*, 2016). Por otro lado, las prevalencias de Adenovirus Otárino-1 (*OtAdV-1*) y de Rotavirus del lobo marino de California (*Csl RV*) parecen incrementarse hacia las islas del Sur del Golfo de California (Soto-García, 2014).

Más allá de los patógenos ya descritos y tomando en cuenta que la especie se enfrenta a muchos más microorganismos, incluyendo factiblemente algunos no conocidos, a la fecha se



**Figura 1.1** Mapa de las cuatro regiones ecológicas del Golfo de California, propuesta por Lluch-Cota y Arias-Aréchiga (2000). En negro: Región Norte, Gris: Angel de la Guarda; Blanco: Región Central; y Gris rayado: Región Sur. Modificado de Szteren y Aurióles-Gamboá

desconoce cómo varía la exposición a los antígenos a lo largo de la distribución de la especie.

Una de las razones de esta limitación obedece a que los estudios epidemiológicos se han enfocado en uno o varios patógenos determinados. En ese sentido, la serología y la detección

por PCR son específicos, y por ende imposibilitan determinar la gama completa de antígenos a los que ha sido expuesto un hospedero.

De esta manera, el uso de las herramientas moleculares de RepSeq en una especie silvestre como el lobo marino de California, permite profundizar y comparar el repertorio inmune de la población a nivel local y regional, en un contexto ecoinmunológico. A partir de la identificación de los clonotipos linfocitarios públicos y privados, y su agrupamiento por similitud, se puede inferir la exposición diferencial a antígenos específicos de acuerdo a las colonias. Por lo tanto, en este capítulo se buscó caracterizar el repertorio de TRB (cadena B del TCR) del lobo marino de California, para poder estudiar posteriormente su variación espacial en un contexto biogeográfico, tomando en cuenta las variables ecológicas para cada región.

### 1.3 Hipótesis

- Se puede amplificar la cadena variable del TRB de *Zalophus californianus* utilizando como referencia la secuencia del TRB de *Canis familiaris*.
- La diversidad antigénica de los TCR circulantes del lobo marino de California, *Zalophus Californianus*, varía espacialmente de acuerdo con su distribución geográfica y ecológica.

### 1.4 Objetivo

Caracterizar el repertorio de receptores de linfocitos T circulantes (TCR) del lobo marino de California a lo largo de su distribución en el Golfo de California y el Pacífico Norte.

Objetivos específicos:

- (i) Amplificar la cadena B del TCR de *Z. californianus*.
- (ii) Observar la variación de la diversidad antigénica de los TCR circulantes del lobo marino de California en un contexto biogeográfico.

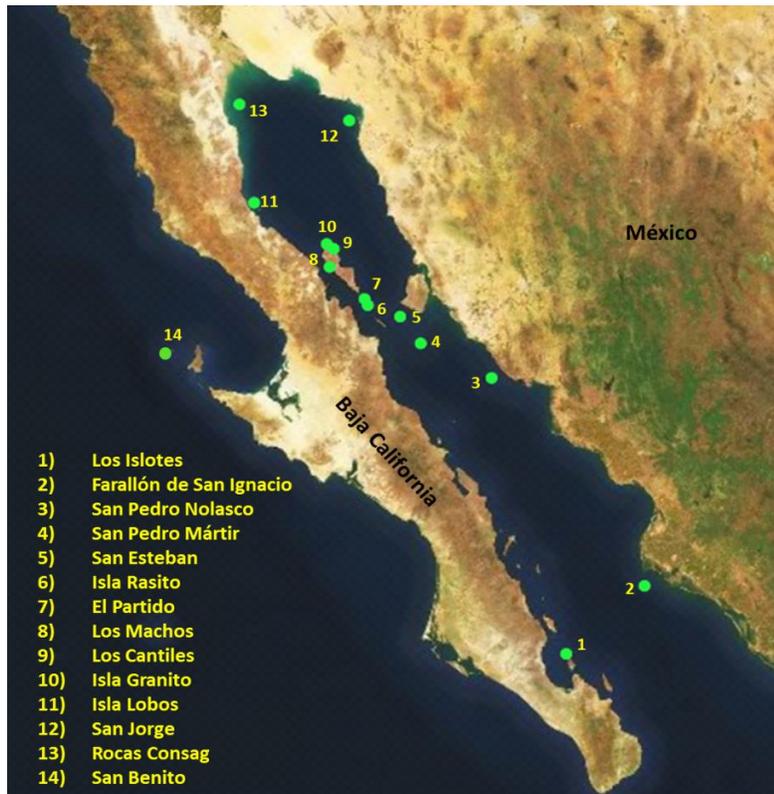
### 1.5 Métodos

*“Evolution might have taken different routes to achieve a functionally similar goal.”*  
(J. Kurtz )

#### Colecta de muestras

La toma de muestras se llevó a cabo en el mes de julio del 2016 en las 13 colonias reproductivas del Golfo de California: Islotes (24°59'N, 110°401'W), Farallón de San Ignacio (25°437'N,

109°377'W), San Pedro Nolasco (27°966'N, 111°378'W), San Pedro Mártir (28°380'N, 112°306'W), San Esteban (28°700'N, 112°576'W), Rasito (28°836'N, 112°998'W), Partido (28°912'N, 113°043'W), Machos (29°293'N, 113°500'W), Granito (29°564'N, 113°539'W), Cantiles (29°506'N, 113°447'W), Lobos (30°051'N, 114°488'W), San Jorge (31°013'N, 113°244'W), y Rocas Consag (31°203'N, 114°680'W). Posteriormente, en julio del 2017 se obtuvieron muestras de la Isla de San Benito Oeste, Baja California; localizada en el Océano Pacífico (28°18' N, 115°35' W), 25 km al oeste de Isla Cedros (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** Mapa de las 14 colonias reproductivas muestreadas, 13 dentro del Golfo de California y una en el Pacífico Norte.

En cada colonia se capturaron, mediante redes mariposeras de captura y bajo contención manual, de 10 a 25 crías (dos a tres meses de edad) y de 2 a 7 hembras adultas. A cada individuo se le tomaron medidas morfométricas, las crías se pesaron con una báscula colgante vertical. Se colectaron 15 ml de sangre de la vena glútea caudal en tres tubos de vacío Vacutainer. El primer tubo contenía heparina sódica, y la muestra de sangre se homogenizó y centrifugó inmediatamente después de su colecta a 4000 rpm por 15 min en una centrífuga clínica para obtener la capa leucocitaria. Esta se almacenó en un criotubo con solución de RNAlater que se mantuvo en un termo con nitrógeno líquido y en otro criotubo con etanol al 90%. La segunda muestra se colectó en un tubo con ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y se usó para la determinación del número total de leucocitos, hematocrito y realización de frotis sanguíneos para conteo diferencial de leucocitos. La muestra se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para separar el plasma y mediante un refractómetro clínico se determinó la gravedad específica como un aproximado de la cantidad de proteínas plasmáticas. La tercera muestra se colectó en un tubo sin anticoagulante; se dejó coagular por al menos 30 minutos y se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para separar el suero. Este se almacenó en criotubos en un termo de nitrógeno líquido.

### **Extracción de ARN y amplificación del TRB- $\beta$**

A partir de la capa leucocitaria almacenada en los criotubos con RNAlater, se extrajo el ARN total mediante el protocolo de TRIzol . Una vez incubados 1 hora con TRIzol, se utilizaron jeringas de insulina de 31G x 6mm para romper las células y obtener mayor cantidad de material. La separación de proteínas se llevó a cabo con cloroformo (200 $\mu$ l/1ml Trizol), y la

precipitación de ARN con acetato de sodio 3M (el 10% del volumen obtenido) y un volumen de isopropanol frío. El ARN obtenido se cuantificó con NanoDrop™, y se almacenó a -80°C hasta su retrotranscripción. La retrotranscripción del ARN se ejecutó con el kit QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado y el ADNc obtenido se almacenó a -20°C.

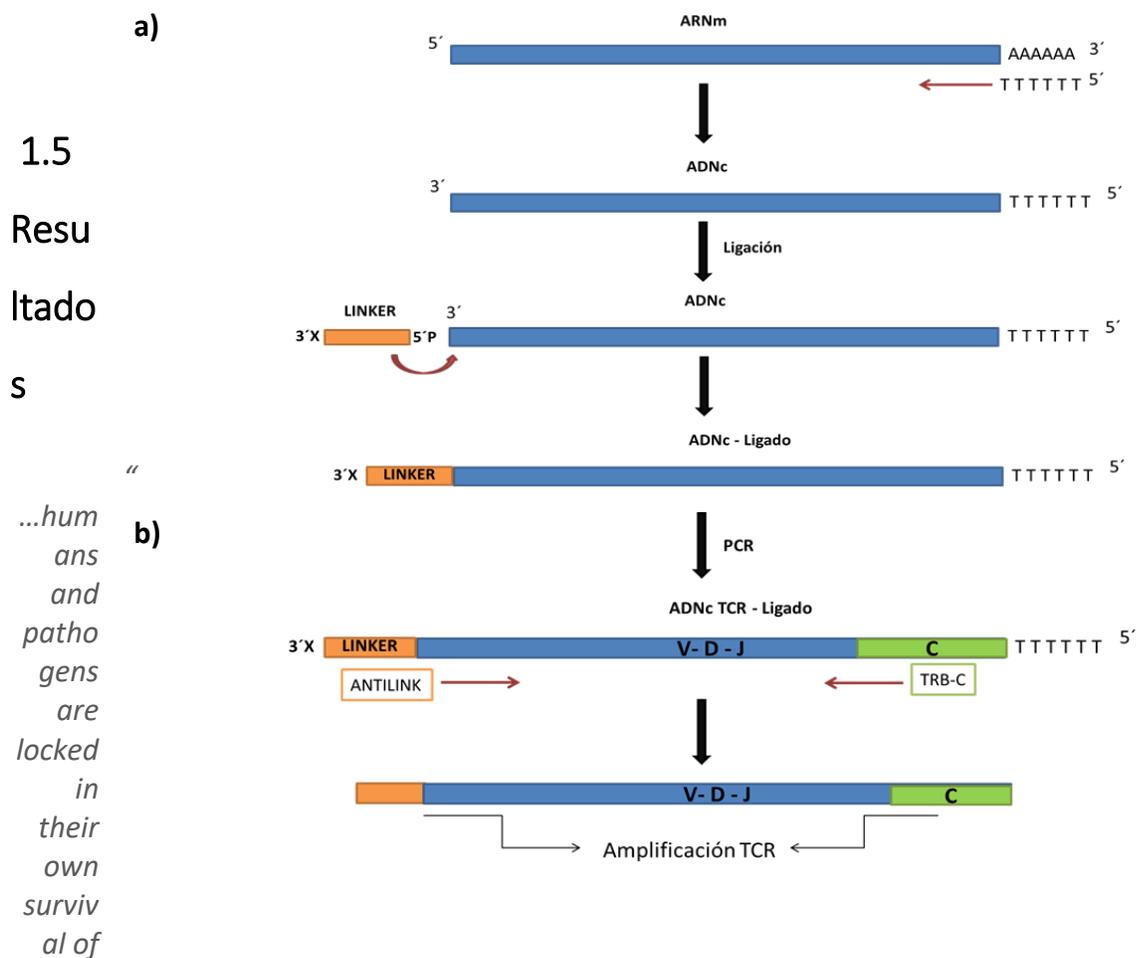
La amplificación de la región conservada del TRB (TRBC) se realizó con oligos específicos para esta región diseñados a partir del genoma (NC\_006598.3) y secuencias de TRB transcritas de perro (*Canis familiaris*), disponibles en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se realizó PCR de tiempo final con las muestras de ADNc para distintas combinaciones de cebadores. La primer amplificación y secuenciación exitosa de la región constante se llevó a cabo con el cebador CB2L\_F (Cuadro 1.1) basado en un estudio previo (Mineccia *et al.*, 2012). Debido a que la amplificación con el CB2L\_f amplificaba otras regiones de forma inespecífica, a partir de la secuencia obtenida con este, se diseñó un oligo específico para la región TRBC de *Z. californianus*, denominado ZACA\_TRBC5 (Cuadro 1.1). Este se utilizó para efectuar la amplificación de la región TRB completa.

**Cuadro 1.1** Oligos utilizados para la amplificación del TRB de *Z. californianus*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
CB2L_f	TGGTTGCGSGGGTTGTGC
ZACA_TRBC5	CCAGGTTCTCTAGTACGGTGAG
Linker	5'-(Phos) TTTAGTGAGGGTTAATAAGCGGCCGCGTCGTGACTGGGAGCGC 3' (special: 3ddC)
Antilink	GCGGCCGCTTATTAACCCTCACTAAA

Las amplificaciones se realizaron a través del PCR de anclaje (LA-PCR) (Gao y Wang, 2015). Se diseñó un oligo “ancla” (LINKER) de 43pb fosforilado en su extremo 5' y bloqueado en su 3' con ddCTP (Cuadro 1.1). El LINKER se diseñó basado en la secuencia de un estudio previo (Troutt *et al.*, 1992). El LINKER se ligó al extremo 3' del ADNc (FIG. 1.3a), con el kit de ligación T4 RNA Ligasa (*Promega*), siguiendo el protocolo recomendado, en un volumen final de 40µl (200-500 ng de cDNA, 250ng del LINKER, 4µl del T4 RNA Ligasa 10X Buffer, 20µl PEG 40%, BSA 0.05µg/µl, 1µl de T4 RNA Ligasa). Se hizo una reacción control con ddH<sub>2</sub>O en lugar de la ARN ligasa T4. La mezcla de ligación se incubó a 37°C por 30 minutos, y para finalizar la reacción, los productos se calentaron a 65°C por 15 minutos, y se almacenaron a -20°C. Se llevó a cabo la amplificación por PCR de tiempo final con el cebador dirigido al LINKER (Antilink) y el cebador de la región constante del TRB, ZACA-TRB5 (Fig. 1.3b). La amplificación por PCR de tiempo final se elaboró con 2µl del producto ligado como template en una reacción final de 30µl (PCR Buffer 1X (*invitrogen*), Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1mM concentración final, dNTPs 0.4mM, BSA 0.2µg/µl concentración final y 0.12µl Taq Polimerasa recombinante). En una reacción inicial, únicamente con el ANTILINK (0.3µM concentración final) para la síntesis de la segunda cadena de ADNc, se incubó 3 minutos a 94°C, 5 minutos a 72°C, y se enfriaron a 4°C. Posteriormente se añadió el cebador de la región constante ZACA-TRB5 (0.3µM) y se incubaron 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de reacciones d PCR a 94°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 10 minutos, seguido del enfriamiento a 4°C. La amplificación del producto por PCR se comprobó por electroforesis, en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio 5µg/ml.

Finalmente, para constatar que el producto generado a partir del LA-PCR correspondía al TRB, se clonó con el kit para pCR™ 4-TOPO®, TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor, y se mandaron a secuenciar a Macrogen Korea. La identidad del TRB se confirmó a través del programa IMGT/V-QUEST versión 3.4.9 (www.imgt.org/IMGT\_vquest/vquest) (Giudicelli, Chaume y Lefranc, 2004; Brochet, Lefranc y Giudicelli, 2008). Como genoma de referencia se utilizó el del perro con el locus TRB. Una vez confirmada la identidad del TRB, se ligaron y amplificaron de la misma forma las 60 muestras.



**Figura 1.3** Esquema del método LA-PCR utilizado para amplificar el TRB del lobo marino de California (ZACA\_TRB). a) Ligación del oligo “ancla” denominado LINKER al extremo 3’ del ADNc. b) PCR del ADNc ligado, se utilizó un cebador dirigido al LINKER, denominado Antilinker, y el oligo específico de la región constante del TRB (TRB-C).

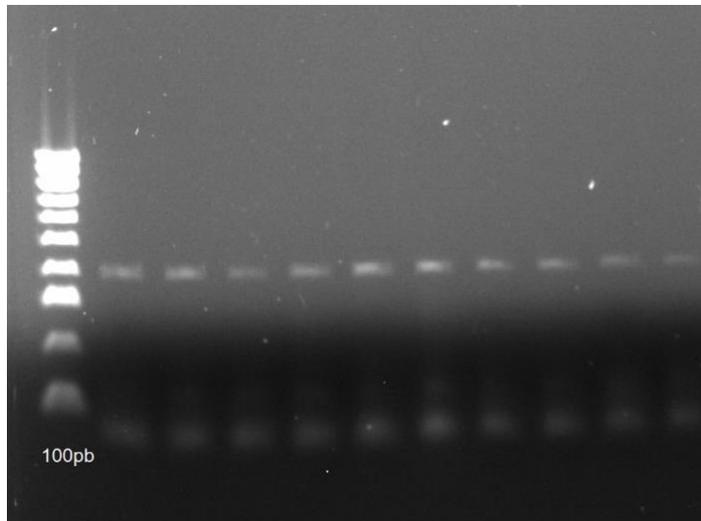
*the-fittest battle"*

*(J. Travis)*

## Amplificación y caracterización preliminar del ZACA\_TRB

Se obtuvo un total de 60 muestras de hembras adultas de 14 islas, 13 dentro del Golfo de California y una del Pacífico Mexicano (Cuadro 1.2). Se extrajo exitosamente ARN total a partir de la capa flogística, y posterior a su retrotranscripción, se ligó el LINKER al extremo 3' del ADNc. La amplificación por PCR de tiempo final de la región TRB a partir de los cebadores Antilink y ZACA-TRB5 generó un fragmento de aproximadamente 400pb (Fig. 1.4). La corroboración de identidad del producto se obtuvo por secuenciación, con la cual se obtuvo la primera secuencia de TRB de esta especie "ZACA\_TRB" (*Zalophus californianus* TRB).

La secuencia obtenida se analizó en el programa IMGT/V-QUEST, el cual permite la identificación de los genes V, D y J y los alelos, del directorio de referencia IMGT. La secuencia analizada concordó con la secuencia correspondiente del perro, sin ningún codón de paro, lo que corresponde a un transcrito productivo. Esta secuencia mostró 87.81-89.61% de identidad con un el gen V- alelo TRBV29\*01 y 86% con el gen J- alelo TRBJ2-1\*01.



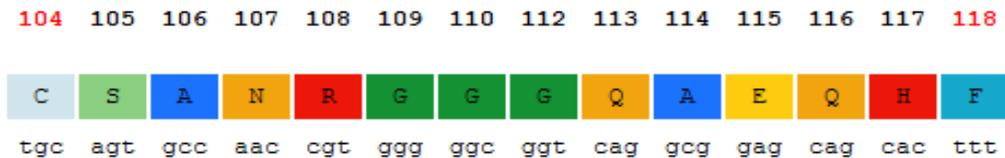
**Figura 1.4** Gel de agarosa de la amplificación del TRB de ADNc de *Z. californianus*, con los oligos Antilink y ZACA\_TRB5, amplificado por LA-PCR

**Cuadro 1. 2** Nombre de la colonia reproductiva de *Z. californianus* de la que se obtuvieron las muestras (n), la región ecológica a la que pertenece, y el año en el que se tomaron las muestras.

<b>Isla</b>	<b>n</b>	<b>Región</b>	<b>Año</b>
Islotes	7	Sur	2016
San Pedro Noasco	2	Centro	2016
San Pedro Mártir	3	Centro	2016
San Esteban	3	Centro	2016
Rasito	3	Centro	2016
Partido	3	AG	2016
Machos	5	AG	2016
Granito	3	AG	2016
Cantiles	3	AG	2016
Lobos	4	Norte	2016
San Jorge	7	Norte	2016
Rocas Consag	4	Norte	2016
San Benito	3	Pacífico	2017

La numeración única del IMGT ha definido las regiones del marco de lectura (FR-IMGT) y las regiones complementarias determinantes (CDR-IMGT) de la siguiente forma (Lefranc *et al.*, 2003). La región FR1 comprende los primeros 25-26 aminoácidos, con la primer cisteína conservada en el aminoácido 23. La región FR2 corresponde a las posiciones 39-55 de los aminoácidos, con el triptófano conservado en la posición 41. La región FR3 va de la posición 66 a la 104, y posee un aminoácido hidrofóbico conservado en la posición 89, así como la segunda cisteína en la posición 104. La región CDR1 comprende las posiciones 27 a 38, la CDR2 de la 56 a la 65 y la CDR3 del 105 al 117.

La secuencia de unión VDJ/CDR3 de la secuencia analizada fue de 42 nucleótidos (14 aminoácidos) (Fig. 1.5). En el Cuadro 1.3 se muestra la anotación de la región VDJ proporcionada por IMGT/Automat, la cual arrojó la longitud y posición de las regiones FR y CDR, así como la posición de los aminoácidos conservados. Además, a través de la anotación de IMGT con IMGT/Collier de perles, se generó un modelo 2D del receptor, de acuerdo a la clase de aminoácidos y sus características (Fig. 1.6).



**Figura 1.5** Análisis en el IMGT/V-QUEST de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos correspondientes a la región de unión CDR3 del TRB amplificado.

La segunda hipótesis de este capítulo, la cual tenía la intención de comparar la diversidad antigénica de los TCR circulantes del lobo marino de California espacialmente de acuerdo con su distribución geográfica y ecológica, no pudo ser abordada por falta de tiempo debido a problemas logísticos durante la secuenciación en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMD-UNAM, Cuernavaca, Morelos, México). Sin embargo, las muestras están siendo procesadas para obtener los resultados y más adelante abordar la hipótesis propuesta.

**Cuadro 1. 3** Datos arrojados por IMG/Automat de la secuencia de TRB amplificada. Se muestran las principales regiones del receptor: FR (Frameworks), CDR (Complementarity determining región), y aminoácidos de referencia conservados. La longitud (L) o Posición (P) de cada región; y la secuencia de aminoácidos correspondiente.

<b>Región</b>	<b>Longitud/Posición</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
VDJ_FRs	L: 26.17.38.10	GALLSQKPRRDICQRGTSMTIQCEVDTQLTLMFWYRQLPRQSLILIATA NQGMEATYESGFTKDKFPISRPTSMFSTLTVNNLSLEDSSFYFCSANRG
VDJ_CDRs	L: 5.7.12	GGQAEQHFGPGTRLTVL
FR1-IMG/	P: AA 1 a 26	GALLSQKPRRDICQRGTSMTIQCEVD
1 <sup>st</sup> -CYS	P: AA 13	C
CDR1-IMG/	P: AA 27 a 38	TQLTL
FR2-IMG/	P: AA 39 a 55	MFWYRQLPRQSLILIAT
Cons-TRP	P: AA 41	W
CDR2-IMG/	P: AA 56 to 65	ANQGMEA
FR3-IMG/	P: AA 66 a 104	TYESGFTKDKFPISRPTSMFSTLTVNNLSLEDSSFYFC
CDR3-IMG/	P: AA 105 a 117	SANRGGGQAEQH





## 1.6 Discusión

En este capítulo se presentó la primera aproximación para la amplificación de la cadena variable del TRB de linfocitos de una especie de vida libre no modelo (*Zalophus californianus*). Ya estaba demostrada la utilidad del LA-PCR en linfocitos de humano, especie para la cual existe extensa información genómica, y las muestras de sangre o cultivo celular se procesan directamente posterior a su toma de muestra (Troutt *et al.*, 1992; Gao y Wang, 2015). La correcta amplificación del repertorio antigénico a partir de ARN necesita primordialmente cantidades de material genético adecuadas (Benichou *et al.*, 2012). El principal reto del uso de herramientas de secuenciación en muestras de especies de vida libre, es la posibilidad de obtención de muestras viables. En este capítulo se determinó la amplificación del TRB de la extracción de ARN de la capa leucocitaria de muestras de sangre total de CSL obtenidas directamente en campo. Además, demostramos que a pesar de no disponer de la información genómica de la especie, es posible amplificar el TRB a través de un solo par de primers.

El primer acercamiento de la amplificación se llevó a cabo con pares de oligos diseñados a partir del alineamiento de las secuencias de ARN del TRB de *C. familiaris*, la especie más cercana de la cual se tiene información genómica. Sin embargo, la amplificación no fue específica, lo que sugiere que, a pesar de la cercanía entre especies, y la poca variación que hay en la secuencia de la región conservada del receptor, fue necesario utilizar un oligo específico para la TRBC de la especie estudiada. Por lo tanto, a partir de su amplificación, clonación y secuenciación, se diseñaron primers específicos para la región constante del TRB de *Z.*

*californianus* (ZACA-TRBC). Estos fueron utilizados para la amplificación específica del TRB a través del LA-PCR, la cual demostró ser una herramienta ventajosa para ser usada cuando no se conoce la información genética del extremo 3' de las secuencias del ADNc.

A pesar de no contar con la información genómica de la especie, el análisis de la secuencia obtenida a partir de las bases de datos de *C. familiaris* en el IMGT fue óptimo. Se obtuvo una coincidencia de ~90% con genes V, D y J de *C. familiaris*, y fue posible identificar completamente la región CDR3 del receptor. Sin embargo, es posible que mucha de la información del TRB no pueda ser observada, ya que la variación del receptor es muy alta. No obstante, a partir de la secuenciación del repertorio, podremos obtener los distintos genes V,D y J presentes en el lobo marino de California.

Finalmente, no fue posible incluir en este capítulo la caracterización biogeográfica del repertorio antigénico. Sin embargo, actualmente se está realizando la secuenciación del mismo para poder efectuar el análisis y comprobar la segunda hipótesis del proyecto. Además, con los resultados obtenidos se tendrá acceso a información genética única de la especie para poder observar el efecto de las condiciones ambientales sobre esta en vida libre.

## **1.7 Conclusión**

Este capítulo presenta el primer registro de la amplificación de un TCR de una especie de vida libre, el lobo marino de California. Se desarrolló una aproximación de LA-PCR para demostrar su utilidad en la obtención del TRB en muestras leucocitarias de este otárido. Se obtuvo y caracterizó la primera secuencia de TRB de *Z. californianus*, y se corroboró el uso de la información disponible de *C. familiaris* como referencia para la especie. La perspectiva de este

trabajo es generar el repertorio antigénico del lobo marino de California. Una vez que se cuente con las secuencias, se podrá comparar el repertorio antigénico individual y poblacional de acuerdo con los factores biogeográficos presentes en la distribución poblacional del lobo marino de California.

# **CAPÍTULO 2. Modificación en la regulación de genes inmunes y metabólicos en el lobo marino de California: consecuencias de las anomalías climáticas**

## **2.1 Introducción**

*“The adaptability and resistance to stress are fundamental prerequisites for life”*

(H. Selye, 1950)

La supervivencia y éxito reproductivo de una especie es alterada constantemente por su ambiente. Los organismos deben ser capaces de sobrevivir a la gran variedad de condiciones de estrés, como el incremento repentino en la temperatura que puede dañar estructuras celulares e interferir con funciones esenciales (Richter, Haslbeck y Buchner, 2010). Existen dos formas en las que una población persiste en respuesta a los cambios ambientales: adaptación local y plasticidad fenotípica (Stillman y Armstrong, 2015). Sin embargo, existen eventos climáticos tan agresivos que rebasan el límite de las respuestas plásticas de un organismo (Urban, Richardson y Freidenfelds, 2014).

Durante el invierno boreal de 2013 se detectó un incremento anómalo de más de 3 °C en la temperatura superficial del mar en las costas de Alaska. Esta anomalía, denominada “La Mancha” (Bond *et al.*, 2015), se extendió a través de Océano Pacífico NE hasta las costas de Baja California. Para 2015, se registraron alteraciones climáticas como sequías y bajas temperaturas, así como alteraciones en la productividad primaria, reducción en la abundancia

de peces e incremento en el número de eventos de varamientos de mamíferos marinos (Chust *et al.*, 2014; Milstein, 2014; Galbraith, 2015).

Las anomalías climáticas y oceanográficas actúan como causantes de cambio y disminución de la distribución y diversidad de especies marinas y terrestres (Trillmich y Ono, 1991; Sagarin *et al.*, 1999; Acevedo-Whitehouse y Duffus, 2009). Dado el contexto ambiental actual, el interés en observar el efecto del cambio climático en distintas especies ha crecido en las últimas dos décadas, y en paralelo, la diversidad de métodos y modelos empleados para su estudio también ha incrementado (Merilä y Hendry, 2014). El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ha cambiado la forma de analizar las respuestas de las poblaciones a los cambios ambientales (Stillman y Armstrong, 2015). Entre estas, la transcriptómica, que se refiere al conjunto completo de los transcritos en una célula en un momento determinado, ha sido utilizada para observar la relación entre el genotipo o fenotipo de una población y su ambiente (Oomen y Hutchings, 2017). Uno de los métodos favoritos para mapear y cuantificar el transcriptoma, es la secuenciación de ARN (conocido como RNA-Seq), el cual proporciona una mayor cobertura y resolución del transcriptoma de un organismo o de un tejido específico (Kukurba y Montgomery, 2015).

A pesar de los avances en las tecnologías de secuenciación y en los análisis bioinformáticos, el uso de estas herramientas en el estudio de poblaciones silvestres es muy pobre. Los mamíferos marinos, que pertenecen a un nivel trófico alto y se caracterizan por ser longevos, son especies centinelas, es decir, indicadores de cambios y salud del ecosistema marino (Gulland y Hall, 2007; Bossart, 2011). Estudios en diversas especies han mostrado que distintos factores de estrés, como la restricción nutricional, choque térmico, estrés oxidativo,

daño al ADN, e hipoxia, entre otros, ocasionan cambios en el patrón de expresión genético (Spriggs, Bushell y Willis, 2010). Sin embargo, a la fecha se desconoce cuál es el impacto de fenómenos ambientales atípicos y severos sobre la huella transcriptómica de organismos centinelas. Como centinelas oceánicos, los mamíferos marinos reflejan los efectos de las variaciones ambientales de manera natural, brindando además, información sobre el estado de salud oceánico (Gulland y Hall, 2007; Bossart, 2011). En este contexto, el objetivo de este capítulo fue determinar el efecto de la anomalía ambiental La Mancha sobre la expresión génica de los leucocitos circulantes de crías y hembras adultas de CSL.

## 2.2 Antecedentes

*“Perhaps one of the biggest challenges for cells is responding to their ever-changing environment”*

(Chen et al 2010)

### La anomalía climática “La Mancha”

La anomalía climática conocida como “La Mancha” fue observada como un incremento repentino en la temperatura superficial oceánica en el Golfo de Alaska durante el invierno boreal de 2013 (Bond *et al.*, 2015), que fue culpable de diversos efectos negativos en el ecosistema marino. La masa de agua caliente se extendió rápidamente por el Pacífico NE, alcanzando las costas de Baja California en México en el 2014. Para el verano de 2015 La Mancha cubrió todo el Pacífico NE, el cual fue simultáneamente impactado por la anomalía oceanográfica de El Niño-Oscilación del Sur (ENSO) (NOAA, 2015). El incremento en la SST fue de más de 2.5 °C por encima del promedio histórico (Bond *et al.*, 2015). El tamaño de la masa

de agua fue de casi 2000 km de ancho, con una profundidad aproximada de 100 m (Kintisch, 2015).

El desarrollo de La Mancha se atribuye a una “cresta” de alta presión atmosférica (PA), denominada “*Ridiculously Resilient Ridge*” (Swain, 2013). Este proceso impidió el intercambio de calor del océano a la atmósfera, debilitando los vientos y por consiguiente se limitó el desplazamiento de aguas frías profundas (Kintisch, 2015). Los patrones climáticos observados han sugerido que la anomalía climática es parte de los cambios cíclicos conocidos como oscilaciones decadales del Pacífico (PDO por sus siglas en inglés) (Hartmann, 2015). Relacionado también con la presencia de ENSO durante el pico de temperatura más alto en el 2015-2016 (Tseng, Ding y Huang, 2017). El PDO puede persistir con temperaturas frías o cálidas por periodos de 4 a 20 años, y los cambios son abruptos e inesperados (Kintisch, 2015; NOAA, 2018).

La anomalía presentada durante estos años tuvo efectos negativos tanto en continente, como en el océano. Hubieron cambios climáticos poco comunes como sequías severas en algunas ciudades y bajas temperaturas en otras (Seager *et al.*, 2015). Un incremento en la SST puede alterar el ecosistema marino a distintos niveles (Henson *et al.*, 2017; Frölicher y Laufkötter, 2018). En el caso de La Mancha, el incremento en la SST alteró la productividad primaria y en consecuencia, la abundancia de peces (Chust *et al.*, 2014; McClatchie *et al.*, 2016). Así mismo, se reportó un incremento masivo del florecimiento de algas tóxicas (*Pseudo-nitzschia*), y con ellas incrementaron los brotes de ácido domoico en la costa del Pacífico NE (McCabe *et al.*, 2016). También se registró un incremento en el número de varamientos de lobo marino de California (CSL, por sus siglas en inglés), y un decremento de 52% la abundancia

poblacional de esta especie en el Pacífico Mexicano (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016; McClatchie *et al.*, 2016). Asimismo, del 2013 al 2016, se reportó un evento de mortalidad inusual de esta especie en el sur de California (NOAA Fisheries, 2018). Además, la disminución en la disponibilidad de presas durante estos años, representó un incremento en el esfuerzo de forrajeo y modificación de la dieta de las hembras de CSL (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016). Como resultado, las crías de CSL nacidas durante la anomalía 2014-2015 tuvieron reservas energéticas limitadas, presentando una condición corporal exigua, alteraciones celulares eritrocitarias y disminución en la capacidad de respuesta inmune (Banuet-Martínez *et al.*, 2017; Flores-Morán *et al.*, 2017).

### Respuestas de estrés celular

Fue en 1962, al someter a *Drosophila melanogaster* a un choque térmico, que se descubrió que la exposición a altas temperaturas induce la expresión de genes específicos (Ritossa, 1962). Más tarde, estas proteínas fueron identificadas como “proteínas de choque térmico” (HSP, por sus siglas en inglés) (Tissières, Mitchell y Tracy, 1974). Ese fue uno de los primeros estudios que permitió entender que los organismos responden al estrés ambiental.

Las respuestas de estrés celular (CSR, por sus siglas en inglés) y de homeostasis celular (CHR), representan la reacción de defensa de las células al daño provocado por fuerzas ambientales o estímulos externos que afectan negativamente la homeostasis (Kültz, 2005). Las CSR son respuestas temporales, mientras que las CHR permanecen activas hasta que las condiciones ambientales cambien nuevamente (Kültz, 2005). El objetivo de las CHR es restaurar la homeostasis celular, y son activadas por sensores de estrés específico que monitorean los

cambios en variables ambientales (Miyakawa *et al.*, 1999; Enjalbert, Nantel y Whiteway, 2003; Reiser, Raitt y Saito, 2003). Por otro lado, el objetivo de las CSR es proteger la integridad macromolecular y el potencial óxido-reducción (redox) celular (Kültz, 2005).

El proteoma mínimo de las respuestas de estrés comprende a 44 proteínas conservadas entre dominios (Cuadro 2.1). Sus funciones abarcan procesos celulares y mecanismos fisiológicos como el control del ciclo celular, detección de lípidos membranales, reparación, estabilización y protección de macro y micromoléculas, regulación y detección del redox, eliminación de proteínas dañadas y control del metabolismo (Kültz, 2003). Cuando el estrés sobrepasa el umbral de tolerancia, o las respuestas de supervivencia no son exitosas, se activan mecanismos de muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis (Fulda *et al.*, 2010).

Existen distintos tipos de estresores celulares que abarcan radiación, agentes químicos, agentes biológicos, estrés oxidativo y alteraciones osmóticas, térmicas y nutricionales, entre otras. La forma en que las células son capaces de detectar el estrés es mediante la integridad de sus moléculas. Por ejemplo, un choque térmico provoca la alteración estructural de las proteínas, lo cual induce la expresión de proteínas chaperonas (Nollen *et al.*, 1999). Otro mecanismo de detección es la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS respectivamente, por sus siglas en inglés); las cuales actúan como mensajeros secundarios en las vías de señalización en las CSR (Mikkelsen y Wardman, 2003). También, el monitoreo de daño en el ADN, en proteínas y en la membrana celular, es un mecanismo de activación de CSR y CHR (Kültz, 2005).

La membrana celular es esencial para la supervivencia y correcto funcionamiento de las células, y representa una de las estructuras macromoleculares más sensibles a la

temperatura (Balogh *et al.*, 2013). Además, en la membrana interactúan lípidos y proteínas con un papel relevante en distintos procesos celulares (Escribá *et al.*, 2008). La composición lipídica, la saturación de ácidos grasos (AG) y la fluidez de la estructura membranal son inductores de elementos de respuesta a daño y tolerancia en membrana (Parasassi *et al.*, 1991; Steels, Learmonth y Watson, 1994; Zeng *et al.*, 1999).

La regulación de lípidos y proteínas en la membrana permite a los organismos adaptarse a situaciones ambientales extremas. Por ejemplo, el cambio en la composición lipídica en las células cerebrales del pez *Cyprinus carpio* le permiten sobrevivir a cambios de temperatura en un rango que va desde 4 °C en invierno hasta los 25 °C en verano (Buda *et al.*, 1994). La fluidez de la membrana también juega un papel importante en la adaptación a cambios ambientales (Beney y Gervais, 2001). Su regulación se da a través de la modificación en la saturación lipídica, lo que permite el cambio en la fluidez membranal (Khaware, Koul y Prasad, 1995). Una de las proteínas relacionadas con la regulación de la fluidez membranal durante condiciones de frío extremo son las desaturasas (Los *et al.*, 1993). En *Saccharomyces cerevisiae*, la transcripción del gen OLE1, una desaturasa de ácidos grasos regulada en respuesta a la fluidez membranal, es reprimida por ácidos grasos insaturados en condiciones anaeróbicas (Fujiwara *et al.*, 1998). Otra propiedad regulada por la composición de ácidos grasos es la adhesión celular. Se ha observado que altas temperaturas y bajo pH cambian las proporciones de ácidos grasos de la membrana celular, con un incremento en la tasa de AG-insaturados a AG-saturados, lo que modifica la capacidad de adhesión de las células (Haddaji *et al.*, 2017).

No solamente ocurren cambios a nivel membranal ante los estresores celulares. El ADN es el material más vulnerable dentro de la célula (Roos y Kaina, 2006). El daño a esta molécula es detectado por proteínas que tienen la capacidad de reconocer lesiones en la cadena o alteraciones en la cromatina (Barzilai y Yamamoto, 2004). Estos daños abarcan el rompimiento de una o ambas cadenas de DNA (DSB o SSB, por sus siglas en inglés), por la formación de aductos de nucleótidos, modificación de bases o por emparejamiento erróneo de bases (Kültz, 2005). Estos eventos desencadenan procesos de reparación de ADN para asegurar la supervivencia de la célula y evitar la multiplicación de los daños a nivel local. Los tipos de reparación de ADN incluyen la reparación del emparejamiento erróneo o (MMR, por sus siglas en inglés), reparación de escisión de bases y nucleótidos, (NER y BER respectivamente, por sus siglas en inglés), reversión directa del daño y reparación de DSB mediante recombinación homóloga o no homóloga (Christmann *et al.*, 2003).

Por otro lado, el monitoreo del daño a las proteínas se da principalmente a nivel oxidativo o estructural. Algunas proteínas pueden ser reparadas por enzimas que revierten el daño oxidativo o que vuelven a plegar a las proteínas (Kültz, 2005). El plegamiento erróneo y la agregación de especies oligoméricas son propiedades tóxicas que comprometen la función celular (Dobson, 2003). La toxicidad se da por la pérdida estructural y consecuente interacción incorrecta de las proteínas con su función celular (Schaffar *et al.*, 2004; Bennett *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006). Si el daño inducido es muy severo, existen enzimas proteolíticas encargadas de degradar y reemplazar aquellas proteínas dañadas o anormales (Flick y Kaiser, 2012).

Una de las respuestas más importantes y mejor estudiadas del estrés celular es la respuesta de choque térmico o HSR (por sus siglas en inglés) (Balogh *et al.*, 2013). La HSR es una respuesta altamente conservada, desde arqueas y bacterias, hasta plantas y animales (Lindquist y Craig, 1988). Esta respuesta es la encargada de proteger a la célula de un ambiente proteotóxico (Mahat *et al.*, 2016). La HSR es activada en distintas condiciones de estrés como cambios abruptos de temperatura, radiación, hipoxia, agentes tóxicos, patógenos, inflamación o estrés oxidativo; y conlleva a la célula a desarrollar resistencia o tolerancia temporal (Nollen *et al.*, 1999; Balogh *et al.*, 2013). La activación de esta respuesta induce la transcripción de los genes que codifican para las HSP (Lindquist, 1986). Estas moléculas están presentes en casi todos los compartimentos intracelulares, incluso en las membranas (Horváth *et al.*, 2008). Se pueden clasificar de acuerdo a su peso molecular en HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, etc. (Kregel, 2002). En combinación con la reparación de ADN y monitoreo de proteínas, las proteínas chaperonas pueden actuar como bio-indicadores de estrés ambiental.

Finalmente, otros dos efectos universales del estrés celular son la supresión del crecimiento y proliferación celular, y la modulación del metabolismo. El arresto del crecimiento celular permite preservar energía y evitar la distribución de macromoléculas dañadas (Flick y Kaiser, 2012). También, se induce la activación los puntos de control del ciclo celular, para monitorear la integridad macromolecular antes de continuar las fases de replicación (Lambert y Carr, 2013; Barnum y O'Connell, 2014). Los ajustes metabólicos se dan a través de la modulación de la expresión genética, actividad de proteínas y flujo de metabolitos (Seo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2018). De esta forma, los recursos energéticos celulares

se alocan de forma distinta, lo que redirecciona el ATP y el NADPH de los procesos proliferativos a la estabilización y reparación molecular (Zhang *et al.*, 2015).

De esta manera, la función y supervivencia celular en un ambiente de cambio constante, recae en la operación coordinada de múltiples procesos (Chen *et al.*, 2010). La supervivencia celular depende de coordinar adecuadamente estos procesos, que han sido conservados a través de la evolución (Fulda *et al.*, 2010).

Regulación redox	Sensor / reparación de daño en ADN	Metabolismo de ag/ lípidos
Aldehído reductasa	MutS/MSH	Transportador ABC de aa de cadena larga
Glutation reductasa	MutL/MLH	CoA ligasa de ag de cadena larga
Tioredoxina	Topoisomerasa I/III	
Peroxiredoxina	RecA/Rad51	<b>Metabolismo energético</b>
Superóxido dismutasa		Citrato sintasa
MsrA/PMSR	<b>Chaperonas moleculares</b>	Transportador Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ATPasa
SelB	Petidil-prolil isomerasa	ARN ribosomal metiltransferasa
Prolina oxidasa	DnaJ/HSP40	Enolasa (glicólisis)
Quinona oxidoreductasa	GrpE (cofactor HSP70)	
YMN1 oxidoreductasa NADP-dep.	HSP60	<b>Otras funciones</b>
YIM4 putativa oxidoreductasa	DnaK/HSP70	Inositol monofosfatasa
Aldehído deshidrogenasa		Nucleósido difosfato kinasa
Isocitrato deshidrogenasa	<b>Degradación de proteínas</b>	Proteína hipotética YKP1
Succinato semialdehido deshidrogenasa	FtsH/subunidad reguladora de proteosoma	
6 fosfogluconato deshidrogenasa	Lon proteasa/ proteasa La	
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Serin proteasa	
2-hidroxiácido deshidrogenasa	Proteasa II/ prolil endopetidasa	
Hidroxiacilglutation hidrolasa	Aa aromáticos aminotransferasa	
	Aminobutirasa aminotransferasa	

**Cuadro 2. 1** Proteoma mínimo de las respuestas de estrés celular. Kültz (2005).

## Herramientas para medir la expresión genética: RNA-Seq

El número de genes que conforman al genoma de un organismo varía desde 480 en *Mycoplasma genitalium*, hasta 25,000 en humanos y cerca de 150,000 en otras eucariotas multicelulares como las plantas (Koonin, 2000). La identidad y actividad biológica de una célula es definida por la transcripción del conjunto de estos genes en moléculas de ARN (Mortazavi *et al.*, 2008). El conjunto de genes expresados en una célula en un momento particular se

conoce como “transcriptoma” (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). De esta forma, mientras el genoma proporciona una vista estática de la información genética y regulatoria de un organismo, el transcriptoma permite comprender cómo un mismo genoma da origen a distintos tipos celulares y cómo se regulan en respuesta a diversas condiciones ambientales (Kratz y Carninci, 2014).

Diversas técnicas y herramientas han sido desarrolladas para el análisis de la expresión genética. Entre ellas, el “*northern blot*” y el PCR cuantitativo (qPCR) han sido técnicas de preferencia por su precisión y sensibilidad (Gan *et al.*, 2011). Sin embargo, son técnicas costosas y laboriosas en estudios a gran escala, y están limitadas a medir pocos genes. Por otro lado, las técnicas de transcriptómica, desarrolladas en los últimos 20 años, permiten la cuantificación de la expresión genética completa de un organismo o de un tejido específico (Kukurba y Montgomery, 2015).

La primera tecnología de análisis transcriptómico de alto rendimiento y bajo costo fue aquella conocida como microarreglos (Schena *et al.*, 1995). Los microarreglos consisten en portaobjetos en los que se adhieren múltiples fragmentos de ADNc específicos para cada gen de interés (Brown y Botstein, 1999). En esta técnica, el ADNc es marcado con distintos fluorocromos e hibridado a los fragmentos en la laminilla, lo que permite cuantificar la intensidad de fluorescencia para cada gen, función y condición (Betts, 2002; Castro-Melchor, Le y Hu, 2012). Los microarreglos permiten medir entre 9000-40000 fragmentos por cm<sup>2</sup> (Vallin-Plous, 2007). No obstante, la técnica tiene muchas limitaciones, entre estas el que se requiere de conocimiento *a priori* sobre las secuencias a analizar, lo que limita su aplicación en especies no tradicionales, la hibridación cruzada con secuencias altamente similares y una baja precisión

para cuantificar genes poco expresados y altamente expresados, lo que requiere de validación por qPCR (Abdullah-Sayani, Bueno-de-Mesquita y van de Vijver, 2006; Casneuf, Van de Peer y Huber, 2007). Otra aproximación es a través de los métodos de secuenciación de secuencias marcadas, como EST, SAGE y CAGE (Horvath *et al.*, 2003; Shiraki *et al.*, 2003; Hu y Polyak, 2006). Sin embargo, también son técnicas laboriosas y de alto costo, y el rendimiento de las EST y la sensibilidad de SAGE y CAGE es muy bajo, por lo que se dificulta la cuantificación certera de la expresión de isoformas o de genes desconocidos (Kukurba y Montgomery, 2015).

La revolución del análisis transcriptómico surge con el desarrollo de la secuenciación de ADN de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés), o de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Esta herramienta, conocida como RNA-Seq o secuenciación de ARN, permite cuantificar de forma detallada y a un menor costo relativo, el transcriptoma de cualquier individuo (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). El RNA-Seq posee diversas ventajas sobre las técnicas mencionadas anteriormente. Primero, no es necesario conocer las secuencias ni genoma previamente, por lo que es posible reconstruir un transcriptoma *de novo* con ayuda de genomas de organismos con cercanía filogenética (Stanton *et al.*, 2017; Thunders, Cavanagh y Li, 2017; Carruthers *et al.*, 2018). También se pueden analizar secuencias parálogas, identificar polimorfismos nucleotídicos y analizar el efecto transcriptómico de los patrones de metilación (Cokus *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2008). Más aún, permite analizar millones de secuencias en una sola muestra (Shendure, 2008).

El primer paso del RNA-Seq, es la extracción del ARN de una muestra biológica con una calidad adecuada (RIN<sup>1</sup>), ya que la integridad del ARN puede tener un efecto en los resultados de secuenciación (Vennemann y Koppelkamm, 2010). Posteriormente el ARN es retrotranscrito y fragmentado en pequeñas secuencias de ADNc, con las cuales se construyen las librerías para secuenciación (Shendure, 2008; Hrdlickova, Toloue y Tian, 2017). Las librerías pueden construirse al unir adaptadores en las secuencias de ADNc, durante la primera síntesis de los fragmentos de ARN (Cloonan *et al.*, 2008). Otra forma de realizar la síntesis inicial en los fragmentos de ARN es uniendo hexámeros al azar antes de ligar adaptadores al ADNc sintetizado (Mortazavi *et al.*, 2008). Por otro lado, la ligación de los adaptadores puede realizarse directamente a los extremos 5'y 3'del ARN, y luego retrotranscribirlos (Lister *et al.*, 2008). Posteriormente, las librerías son secuenciadas en la plataforma de NGS seleccionada como Illumina, SOLiD o Roche 454 (Jazayeri *et al.*, 2015; Reuter, Spacek y Snyder, 2015). Este proceso genera millones de transcritos cortos de entre 25 y 300 pb, los cuales son mapeados a un genoma o transcriptoma de referencia, y los niveles de expresión estimados y comparados entre condiciones (Oshlack, Robinson y Young, 2010; Xu *et al.*, 2012).

Uno de los objetivos primarios en el análisis de RNA-Seq es identificar los genes y vías moleculares diferencialmente expresadas (DGE) entre dos o más condiciones biológicas (Zhang *et al.*, 2014). La estimación del nivel relativo de expresión de cada gen se realiza con base en el número de lecturas mapeadas durante el alineamiento, y la diferencia entre grupos se analiza

---

1 RIN o Número de Integridad de ARN: Es una medida de integridad de ARN que muestra la calidad del material genético. El valor se obtiene al analizar las proporciones de las bandas de los genes ribosómicos 28S y 18S en electroforesis en gel.

de forma estadística con métodos paramétricos o no paramétricos (Anders y Huber, 2010; Hardcastle y Kelly, 2010; Konishi, 2016).

Para realizar el mapeo de las lecturas con el genoma o transcriptoma de referencia, existen dos aproximaciones generales (Sackton, 2016). El primero consiste en mapear las lecturas a los transcritos de referencia, y utilizar el conteo estimado para el modelo estadístico. Esta aproximación es muy precisa, pero lenta. Para esta aproximación se han desarrollado diversos softwares como Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012), STAR (Dobin *et al.*, 2013), BWA (Li y Durbin, 2009), TopHat (Kim *et al.*, 2013), y RapMap (Srivastava *et al.*, 2016). Y para el análisis de expresión diferencial existen herramientas como baySeq (Hardcastle y Kelly, 2010) y EBSeq (Leng *et al.*, 2013), ambas basadas en aproximaciones Bayesianas. Otras herramientas de aproximación no paramétrica son NOIseq (Tarazona *et al.*, 2015) y SAMseq (Li y Tibshirani, 2013), mientras que DESeq (Anders y Huber, 2010) y DESeq2 (Love, Huber y Anders, 2014) se basan en distribuciones binomiales negativas; edgeR (Robinson y Smyth, 2007) utiliza modelos de dispersión de Poisson combinado con métodos Bayesianos; y lima+voom (Law *et al.*, 2014), basado en modelos lineares. La segunda aproximación, mucho más rápida, consiste en realizar pseudo-alineamientos (Sackton, 2016). Este método utiliza *k-mers* para asignar a las lecturas el transcrito más parecido. Salmon (Patro *et al.*, 2017), y Kallisto (Bray *et al.*, 2016) son las herramientas utilizadas en esta aproximación, y para realizar el análisis de expresión de los datos, la principal herramienta es Sleuth (Pimentel *et al.*, 2017).

Además de los análisis DGE, a partir de los datos de RNA-Seq se puede estudiar la expresión específica de alelos (ASE, por sus siglas en inglés). El análisis de ASE, se ha convertido en una herramienta importante para integrar la información del genoma y el transcriptoma

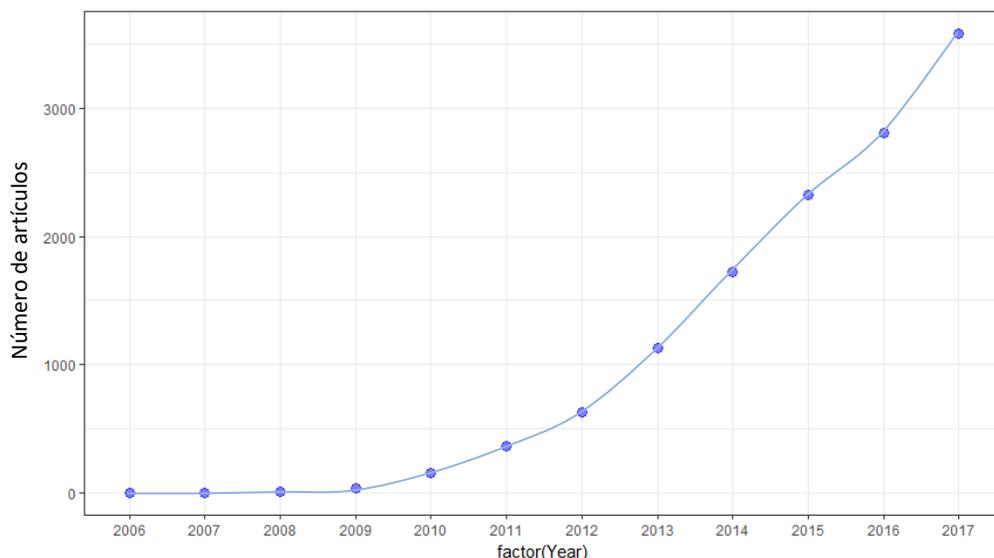
(Castel *et al.*, 2015). La expresión específica de alelos se refiere al fenómeno en el que dos alelos del mismo *loci* se expresan de forma diferencial por modificaciones postranscripcionales, epigenéticas, y variación en la actividad en *cis* (Gu y Wang, 2015). Por lo tanto, el análisis de ASE se basa en la comparación de la abundancia relativa de las copias alélicas de un transcrito en un organismo diploide (Raghupathy *et al.*, 2018). Es decir, cuantifica la variación en la expresión entre dos o más haplotipos. Esta aproximación, permite distinguir entre transcritos de dos haplotipos de un individuo al utilizar sitios heterocigotos (Pirinen *et al.*, 2015). Por lo tanto, es posible observar la regulación alélica en estados de salud y enfermedad (Wittkopp, Haerum y Clark, 2004; Tuch *et al.*, 2010), así como variaciones genéticas a nivel poblacional en nucleótidos simples, pérdida de función y efectos epigenéticos (Montgomery *et al.*, 2011; MacArthur *et al.*, 2012; Zhuo, Lamont y Abasht, 2017).

Analizar la ASE es aún más complicado que el análisis de DGE, ya que se requiere información genómica diploide. Además, debido a la similitud tan alta entre secuencias alélicas, el alineamiento de las lecturas al alelo correcto se vuelve un reto (Castel *et al.*, 2015; Nariai *et al.*, 2016). Sin embargo, se han desarrollado algunas herramientas para su estimación, por ejemplo ASARP (Li *et al.*, 2012), MBASED (Mayba *et al.*, 2014), GATK (Castel *et al.*, 2015), ASElux (Miao *et al.*, 2018), y EMASE (Raghupathy *et al.*, 2018).

La secuenciación masiva ha revolucionado las ciencias biológicas al proveer mayor precisión y cobertura de la información celular. Actualmente, la secuenciación de ARN es uno de los métodos favoritos para analizar la expresión genética a mayor profundidad. La aparición del RNA-Seq ha conferido una oportunidad única para estudiar cambios en la expresión genética bajo distintas condiciones, las cuales serán mencionadas brevemente a continuación.

## Aplicaciones del RNASeq

La identidad de una célula está determinada por los distintos patrones de expresión genética. El primer estudio transcriptómico en mamíferos se realizó en 1991 a partir de muestras de cerebro humano, con el objetivo principal de descubrir nuevos genes (Adams *et al.*, 1991). Quince años después se publicó el primer artículo que utilizó la secuenciación masiva como herramienta transcriptómica en la línea celular de cáncer prostático LNCaP (Bainbridge *et al.*, 2006). La “era” del dominio del RNA-Seq comenzó dos años después (McGettigan, 2013), cuando se publicaron algunos estudios transcriptómicos en levaduras y en diversas muestras de tejidos de otros organismos modelo (Mortazavi *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2008; Ugrappa Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008). Estos estudios mostraron la superioridad del RNA-Seq sobre las demás técnicas. A partir del 2014, el uso del RNA-Seq como herramienta transcriptómica incrementó considerablemente (Fig. 2.1).



**Figura 2.1** Uso del RNASeq en el tiempo. Artículos publicados desde el 2008 hasta el 2016. Medline trend: automated yearly statistics of PubMed results for any query. Alexandru Dan Corlan [cited 2017 Apr 27]. <http://dan.corlan.net/medline-trend.html>.

El uso del RNA-Seq ha sido muy diverso. En general se ha utilizado en el estudio de los patrones de expresión genética en eucariotas, y ha tomado fuerza en estudios biomédicos. Por ejemplo, se ha utilizado para estudiar la variación en estado de salud y enfermedad en tejidos complejos, así como células individuales (Mele *et al.*, 2015; Potter, 2018). Se han identificado múltiples genes expresados diferencialmente en pacientes con enfermedades autoinmunes como psoriasis, esclerosis múltiple, vitíligo, artritis, colitis, entre otras (Jabbari *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2016; Odhams, Cunninghame Graham y Vyse, 2017). También, el RNA-Seq se ha usado para el estudio y búsqueda de biomarcadores de cáncer (King *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018) y de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas (Costa *et al.*, 2013). Asimismo, a través del RNA-Seq dual, es posible obtener los perfiles de expresión genética de

un patógeno y su hospedero en procesos infecciosos en animales y plantas (Kimbrel *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2017; Gliddon *et al.*, 2018; Westermann y Vogel, 2018). Además, se ha observado el efecto fisiológico del consumo de drogas como la marihuana, el alcohol y la nicotina (Massimino, 2017; Silva *et al.*, 2018). Por otro lado, el RNA-Seq ha permitido profundizar en conocimiento del genoma y su regulación, con la creación de atlas genéticos (FANTOM Consortium *et al.*, 2014) y descripción de las variantes funcionales humanas (Lappalainen *et al.*, 2013).

Aparte del extenso uso del RNA-Seq en eucariotas multicelulares, esta herramienta ha jugado un papel importante en el entendimiento de los microorganismos unicelulares (Chen, Chen y Zhang, 2017). Los primeros reportes de transcriptomas microbianos a partir del RNA-Seq fueron en *Saccharomyces cerevisiae* (Ugrappa, Karl y Michael, 2010) y *Schizosaccharomyces pombe* (Wilhelm *et al.*, 2008). Ambos generaron información detallada de genes nuevos y describieron procesos celulares. El primero proporcionó información sobre el crecimiento vegetativo y el segundo sobre el ciclo celular. Actualmente se han obtenido y analizado a profundidad el transcriptoma de diversos microorganismos, como *Corynebacterium glutamicum* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013), *Listeria monocytogenes* (Oliver *et al.*, 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Aguilar-Ayala *et al.*, 2017), *Bacillus subtilis* (Xie *et al.*, 2015), el virus del molusco contagioso (Mendez-Rios *et al.*, 2016), el virus de Epstein-Barr (Lin *et al.*, 2010), entre otros (Croucher y Thomson, 2010; Tjaden, 2015; Zhou *et al.*, 2018). También, en paralelo al RNA-Seq se han desarrollado análisis metatranscriptómicos, en conjunto con análisis metagenómicos para el estudio del microbioma (Bikel *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 2017). Más aún, el

estudio meta-transcriptómico ha permitido analizar los perfiles de expresión de microorganismos que no pueden ser cultivados (Bashiardes, Zilberman-Schapira y Elinav, 2016).

La expresión genética es un proceso muy dinámico alterado por los cambios ambientales y requerimientos celulares (Abdullah-Sayani, Bueno-de-Mesquita y van de Vijver, 2006). El cambio climático global presenta un escenario único para comprender las respuestas de estrés, principalmente en especies obligadas a adaptarse a un único ecosistema, como organismos sésiles o sedentarios (Doney *et al.*, 2012; Somero, 2012). Para comprender las respuestas de estrés a cambios ambientales, el análisis transcriptómico permite identificar los genes que se expresan durante estas condiciones (Estruch, 2000; Kregel, 2002).

Numerosos estudios han investigado las respuestas de estrés a cambios ambientales a nivel genómico y transcriptómico (e.g. (Estruch, 2000; Doney *et al.*, 2012; Oomen y Hutchings, 2017)). Entre estos, está el estudio de las consecuencias a nivel poblacional, como la adaptación local y la migración (Schulte, 2007; De La Torre *et al.*, 2014), y la caracterización transcriptómica de las respuestas a temperaturas extremas. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés térmico los patrones de expresión cambian entre corales expuestos a altas temperatura, comparado con corales localmente adaptados (Barshis *et al.*, 2013). Bilyk y Cheng (2014) caracterizaron el transcriptoma del notothén pelado (*Pagothenia borchgrevinki*), un pez perciforme adaptado a habitar en temperaturas de -1.9 °C. Después de ser expuesto a 4 °C durante dos a cuatro días, identificaron cientos de genes expresados diferencialmente, entre estos, las chaperonas y poliubiquitinas, así como genes involucrados en el ciclo celular y la maquinaria transcriptómica, eran subregulados (Bilyk y Cheng, 2014). Por el contrario, en organismos expuestos a bajas temperaturas, se ha observado sobre-expresión en genes relacionados con la regulación de la

pared celular, lípidos, azúcar, y prolina; así como subregulación de vías metabólicas (Calzadilla *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018).

Además de la temperatura, otras variables ambientales, como el pH, salinidad y el oxígeno disuelto, han sido estudiadas. Moya y colaboradores (2012) observaron que la acidificación por CO<sub>2</sub> reprime el metabolismo y sobrerregula la síntesis de la matriz extracelular en estadios tempranos del desarrollo de los corales (Moya *et al.*, 2012). Por otro lado, Pespeni y colaboradores (2013) observaron la relación de esta misma variable sobre los patrones de selección alélica en el erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*. Los cambios alélicos se observaron en loci relacionados con la homeostasis de iones y síntesis de esteroides (Pespeni *et al.*, 2013). También, estudios de evolución han observado que la adaptación a un menor pH se da a través de la sobre-regulación de genes metabólicos y vías de producción de ATP (Evans *et al.*, 2017). Ambos estudios sugieren una adaptación local a través de estos procesos, que permiten la regulación del pH interno, para mantener la homeostasis ácido-base y potenciar la tolerancia (Pespeni *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2017).

Otro factor ambiental muy importante en la supervivencia y desarrollo de un organismo es la salinidad. La tolerancia a esta varía entre especies, y depende de su capacidad de osmorregulación. Se han propuesto diversas vías para la tolerancia salina, como el transporte de iones, regulación de la presión sanguínea y metabolismo de grasas (Gu *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Velotta *et al.*, 2017). Zhang y colaboradores (2017) analizaron el transcriptoma del hígado de la lubina moteada (*L. maculatus*), un pez con la capacidad de tolerar cambios de salinidad en el ambiente. Encontraron 455 DEG asociados con el potencial de adaptación a la salinidad, los cuales están relacionados con transporte de metabolitos y

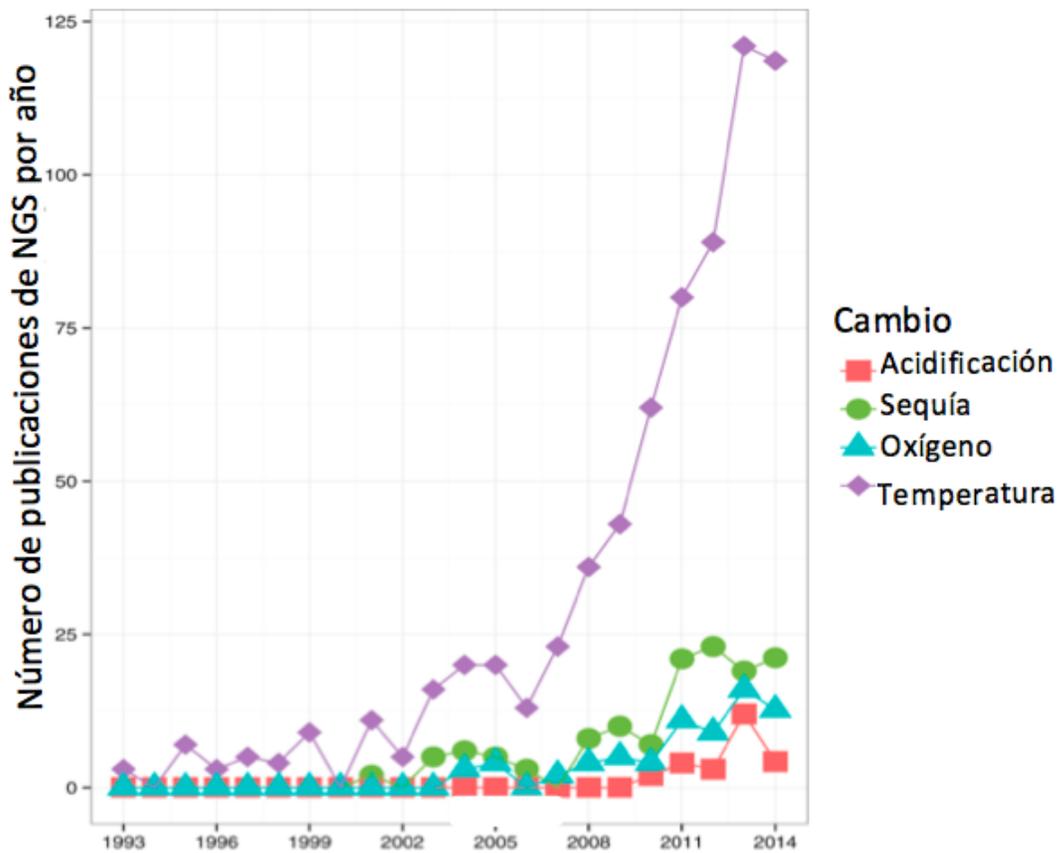
iones, metabolismo energético, respuestas inmunes y reorganización estructural; lo que sugiere que este órgano es importante para la osmorregulación (Zhang *et al.*, 2017).

Aparte del incremento en la temperatura y la acidificación oceánica, otra consecuencia del calentamiento global es la disminución en la concentración de oxígeno disuelto (IPCC, 2013). El estrés inducido por hipoxia se ha asociado a grandes cambios en la regulación transcripcional y modificaciones epigenéticas (Tse *et al.*, 2016). Principalmente se han asociado genes relacionados al transporte de oxígeno y iones, hemopoyesis, procesos de oxidación y reducción, así como procesos biosintéticos de hemoglobina y ácidos grasos de cadena larga (Long *et al.*, 2015). También, en condiciones de hipoxia aguda, se han observado perturbaciones en las vías de señalización del metabolismo de lípidos y muerte celular (Beck *et al.*, 2016). La tolerancia a este factor está asociado a la variación en la expresión de genes involucrados en la regulación de la permeabilidad epitelial (Sun *et al.*, 2015), represión de apoptosis celular (Yuan *et al.*, 2016), regulación del sistema inmune innato (Yum *et al.*, 2017); así como represión del metabolismo mitocondrial y reducción de las ROS (Ali *et al.*, 2012).

Finalmente, debido a que los cambios ambientales alteran más de una variable simultáneamente, diversos estudios han considerado los efectos de múltiples estresores. El perfil transcriptómico de individuos sometidos a múltiples estresores ha permitido obtener aquellos fenotipos resistentes, así como identificar genes involucrados en la tolerancia, y establecer modelos genéticos (Orsini *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017). Gasch y colaboradores (2000) observaron patrones de expresión de aproximadamente 900 genes en *S. cerevisiae*, en respuesta a transiciones ambientales como choque térmico y osmótico, restricción de nutrientes y exposición a agentes bioquímicos, entre otros (Gasch *et al.*, 2000). Por ejemplo,

Maor-Landaw y colaboradores (2017) analizaron el transcriptoma de corales sub-tropicales del Mar Rojo (*Stylophora pistillata*) y corales templados del Mediterráneo (*Balanophyllia europaea*), para estudiar el efecto del incremento gradual de la temperatura y la disminución del pH oceánico. Los perfiles obtenidos demostraron una sobrerregulación genética general, principalmente de genes involucrados en la generación de energía metabólica (Maor-Landaw *et al.*, 2017). Con resultados similares, Huth y Place (2016) demostraron una respuesta coordinada a condiciones duales de elevada temperatura y acidificación oceánica. Los resultados obtenidos señalaron que la respuesta a ambas condiciones es distinta cuando se presentan en tándem que cuando se presentan aisladas (Huth y Place, 2016). Otros estudios han involucrado procesos infecciosos o de competencia para observar la adaptación fisiológica a variaciones climáticas entre especies. Por ejemplo, Wang y colaboradores (2016) observaron el efecto del incremento en la temperatura en el proceso infeccioso de *Streptococcus agalactiae* en tilapias. Identificaron distintos perfiles de DEGs entre condiciones de temperatura, en donde a 22°C presentaron vías involucradas en respuestas inmunitarias; mientras que a 32°C expresaron genes involucrados en vías metabólicas de energía y de oxígeno (Wang *et al.*, 2016). En otro estudio sobre los patrones de expresión genética de *Streptococcus mutans* en respuesta a un péptido de estimulación de competencia genética, se reportó un incremento en los reguladores de unión de membrana, productores de bacteriocinas, el sistema de tolerancia de ácido y formación de biopelículas (Wenderska *et al.*, 2017).

En definitiva, el RNA-Seq ha revolucionado el estudio transcriptómico, permitiendo la generación de gran cantidad de información. El estudio del efecto o alteración en la expresión genética en respuesta a cambios ambientales a través de las técnicas de NGS ha incrementado en la última década (Fig. 2.2). Sin embargo, aún existe pocos estudios en especies no modelo en sus hábitats naturales.



**Figura 2.2** Representación de la cantidad de publicaciones realizadas en las últimas décadas que han utilizado las NGS para observar los cambios en la expresión genética en respuesta a distintos cambios ambientales. Modificado de Stillman y Armstrong. 2015.

## La teoría de los canjes bio-energéticos

Los recursos y energía disponibles para un organismo son limitados, por lo tanto, la selección natural debe favorecer su distribución para una eficacia biológica óptima (McDade, 2003). De esta forma, la designación de recursos para un proceso limitan los recursos disponibles para otro proceso (Long y Nanthakumar, 2004). Además, la distribución de los recursos varía entre individuos y especies de acuerdo a las estrategias reproductivas y de desarrollo, modificadas también por las condiciones ambientales (Chisholm *et al.*, 1993; Gross, 1996). Así, en un ambiente inestable, la mejor estrategia de reproducción sería generar un número grande de descendientes, de los cuales sobrevivan unos pocos; mientras que en un ambiente más estable, sería posible generar menor cantidad de descendientes pero invertir más en cada uno para incrementar la tasa de supervivencia (Cornwell *et al.*, 2006).

El uso y mantenimiento del sistema inmunitario es particularmente costoso, y compite directamente por recursos con otros procesos importantes como la reproducción y el crecimiento (Sheldon y Verhulst, 1996b). Factores como la interacción con parásitos, conflictos sexuales, estructura y genética poblacional, e interacciones interespecíficas, adicional a los factores abióticos, afectan las respuestas y procesos inmunitarios (Schulenburg *et al.*, 2009). Diversos estudios experimentales han demostrado de manera empírica la evidencia de que los procesos inmunitarios, como la fiebre (Buchanan, Peloso y Satinoff, 2003) y la inflamación (Merlo *et al.*, 2014) son metabólicamente caros. También se ha demostrado el incremento de la tasa metabólica basal posteriormente a un desafío inmunitario. Por ejemplo Martin y colaboradores (2003) desafiaron a individuos del gorrión doméstico, *Passer domesticus*, con un mitógeno, y observaron que la tasa metabólica incrementó un 29%, aproximadamente 4.20 kJ

por día, equivalente a la producción de medio huevo en esta especie (Martin, Scheuerlein y Wikelski, 2003). Eraud y colaboradores (2005) observaron en la tórtola turca, *Streptopelia decaocto*, que la producción de anticuerpos y la termorregulación incrementan la tasa metabólica en 8.5% y 5.27%, respectivamente (Eraud *et al.*, 2005). Ots y colaboradores (2001) observaron en el carbonero común, *Parus major*, un incremento de 9% en la tasa metabólica en individuos que montaron una respuesta inmunitaria. También, estos perdieron el 3% de masa corporal después del desafío (Ots *et al.*, 2001). Por otro lado, Bashir-Tanoli y Tinsley (2014) observaron el costo de la fecundidad asociado a la estimulación inmunitaria en *Drosophila melanogaster*. Posterior al desafío inmunitario, la fecundidad, la tasa metabólica y el consumo de alimento disminuyeron un 45%, 6% y 31%, respectivamente (Bashir-Tanoli y Tinsley, 2014). Ellos sugieren que el costo de la activación inmune se debe a la reducción en la ingesta de recursos por la anorexia inducida por la infección, lo que restringe la disponibilidad de recursos y resulta en la disminución de la tasa metabólica, y fecundidad limitada (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Bashir-Tanoli y Tinsley, 2014). Otros procesos inmunitarios energéticamente costosos son el cambio en el tamaño y renovación celular y proteica (Penning De Vries, 1975; Colditz, 2009). Un ejemplo es el incremento en la tasa de síntesis de proteínas de 141% en el hígado y 161% en plasma, en pollos sometidos a un desafío con lipopolisacárido de *E. coli* (Barnes *et al.*, 2002).

Por otro lado, otros caracteres de historia de vida como el esfuerzo reproductivo, la gestación y crianza también se correlaciona negativamente con la capacidad inmunitaria (Bonneaud *et al.*, 2003; Ardia, 2005). Se ha observado en hámsteres Siberianos que la respuesta inmunitaria humoral disminuye durante la gestación y la lactancia (Drazen, Trasy y Nelson,

2003). En *Ficedula hypoleuca* el tamaño de la nidada está relacionado con la respuesta inmune, donde los padres con mayor cantidad de crías poseen respuestas inmunitarias menores (Ilmonen, Taarna y Hasselquist, 2002; Ilmonen *et al.*, 2003). También, el incremento en la actividad sexual y esfuerzo reproductivo en *Hygrolycosa rubrofasciata*, *D. melanogaster* y *Ficedula hypoleuca*, suprimen la actividad inmunitaria (McKean y Nunney, 2001; Kilpimaa, Alatalo y Siitari, 2004; Ahtiainen *et al.*, 2005). De esta manera, la temporada reproductiva es un reto para los organismos, principalmente aquellos que deben asignar gran cantidad de recursos al desarrollo de caracteres sexuales secundarios y ornamentos (Moller, 1996). Por ejemplo estructuras sexuales exageradas como la pinza gigante del cangrejo violinista macho (*Uca pugilator*), la cual incrementa el gasto energético durante locomociones intensas (Tullis y Straube, 2017). También, en individuos de *Forficula auricularia* con baja condición corporal, el tamaño de las tijeretas tiene una correlación negativa con la concentración de hemocitos ante un desafío inmune (Körner *et al.*, 2017).

De esta manera, al ser la energía un recurso finito en condiciones naturales, los organismos se enfrentan constantemente a retos ambientales, y dependen de la calidad y cantidad del recurso disponible. Así, bajo condiciones extremas y privación de recursos, se espera que la asignación de recursos cambie dependiendo de la especie y del contexto.

## 2.3 Hipótesis

La transcripción sanguínea de genes involucrados en respuestas de estrés celular es mayor en individuos de *Z. californianus* muestreados durante años caracterizados por una anomalía climática que en individuos muestreados en un año de condiciones ambientales no anómalas.

La transcripción sanguínea de genes involucrados en metabolismo es menor en individuos de *Z. californianus* muestreados durante años caracterizados por una anomalía climática que en individuos muestreados en un año de condiciones ambientales no anómalas.

## 2.4 Objetivos

Determinar los efectos de la alteración oceanográfica-ambiental de La Mancha y ENSO sobre en la expresión genética sanguínea del lobo marino de California, *Z. californianus*.

### Objetivos específicos

Caracterizar el perfil transcripcional de la capa leucocitaria de individuos de *Z. californianus*.

Comparar el perfil transcripcional de la capa leucocitaria de hembras adultas de *Z. californianus* muestreados en un año de condiciones anómalas y un año de condiciones no anómalas

Comparar el perfil transcripcional de la capa leucocitaria de crías de *Z. californianus* muestreados en un año de condiciones anómalas y un año de condiciones no anómalas

## 2.5 Métodos

### Toma de muestras

Como parte de un proyecto de investigación más grande realizado en la Isla de San Benito Oeste, Baja California; localizada en el Océano Pacífico (28°18'12"N 115°35'24"O), 25 km al oeste de Isla Cedros, durante julio de 2014 se colectaron muestras de hembras adultas de lobo marino de California y en julio de 2015 se colectaron muestras de crías de lobo marino de California. De las muestras colectadas, tres hembras adultas y tres crías fueron seleccionadas para este estudio con el fin de comparar los perfiles transcripcionales con los de muestras de hembras adultas y crías colectadas en julio de 2017, año de condiciones ambientales normales.

La captura y manejo de las hembras se realizó mediante redes mariposeras y contención manual. Las crías fueron capturadas por asecho y contención manual. La toma de muestras se realizó de la misma forma que la descrita anteriormente en el Capítulo 1, sección 1.5.

### Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó a partir de la capa leucocitaria almacenada a -80° en RNAlater, con TRIZOL® (life technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez incubado el tejido con TRIZOL® a temperatura ambiente durante 1 hora, se homogeneizó el

producto mediante pases repetidos por jeringas estériles de 1 mL, para romper las células en su totalidad.

La calidad del ARN se midió con NanoDrop™, y por electroforesis en gel de agarosa. Se cargaron 100ng del ARN extraído en un gel de agarosa al 1.8% con cloro al 0.1%. Las muestras se mandaron a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMD-UNAM, Cuernavaca, Morelos, México).

### Construcción de las bibliotecas de RNASeq y secuenciación

La construcción de las bibliotecas de RNASeq se realizó con 2µg de ARN total. Se utilizó el protocolo de TruSeq® Strandend mRNA Sample Preparation Kit de Illumina, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previo a la secuenciación, cada biblioteca se analizó con Bioanalyzer para determinar el tamaño promedio de la biblioteca, y la concentración a través de una reacción de qPCR. La secuenciación se realizó con la plataforma de NextSeq (Illumina) de 2X75pb, con una profundidad de 10 millones de lecturas por librería. El análisis de calidad de las secuencias se realizó con FastQC versión 0.11.7.

### Análisis bioinformático

Debido a que el genoma del lobo marino de California no está completamente anotado, ni disponible a la comunidad científica; el mapeo de las secuencias se realizó utilizando como genoma de referencia el genoma del perro (*Canis familiaris*) (CanFam3.1, GCA\_000002285.2) y el de la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) (LepWed1.0, GCF\_000349705.1). El mapeo de las lecturas se realizó con el pseudo-alineador Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/>)

(Bray *et al.*, 2016). Para el análisis de genes diferencialmente expresados (DEG), se corrió el programa de Sleuth ([pachterlab.github.io/sleuth/](http://pachterlab.github.io/sleuth/)) (Pimentel *et al.*, 2017). La asignación genética y de categorías de Ontología Genética (GO) se realizó a través del programa BioMart-Ensembl (Haider *et al.*, 2009). Se tomó como indicador de los genes significativos un valor  $q \leq 0.05$ ; de estos, un valor  $b > 0$  para los genes sobre-regulados, y un valor  $b < 0$  para los genes sub-regulados.

Las anotaciones funcionales y de enriquecimiento se analizaron con PANTHER (Mi *et al.*, 2017), la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto, KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) (Bateman *et al.*, 2017), PhosphoSitePlus ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)) (Hornbeck *et al.*, 2015) y g:profiler (Uri Reimand *et al.*, 2016). Se construyeron redes biológicas con los genes sobre-regulados y sub-regulados, y se obtuvieron las posibles funciones con el predictor GeneMANIA (<https://genemania.org/>) (Warde-Farley *et al.*, 2010), Cytoscape (versión 3.5.0) (Montejo *et al.*, 2010), WebGestalt (J. Wang *et al.*, 2017), y REVIGO (<http://revigo.irb.hr/index.jsp?error=expired>) (Supek *et al.*, 2011). El análisis bioinformático se realizó en R studio version 3.5.0 (R Core Team, 2018).

## 2.6 Resultados

### Alineamiento de las secuencias de ARN

Se realizó la secuenciación profunda del transcriptoma de hembras adultas (2014:  $n = 3$ , 2017:  $n = 3$ ) y crías (2015:  $n = 3$ , 2017:  $n = 3$ ) de *Z. californianus*, para obtener el perfil de expresión genética en dos distintos años, un año en el que se presentó una anomalía climática, y un año

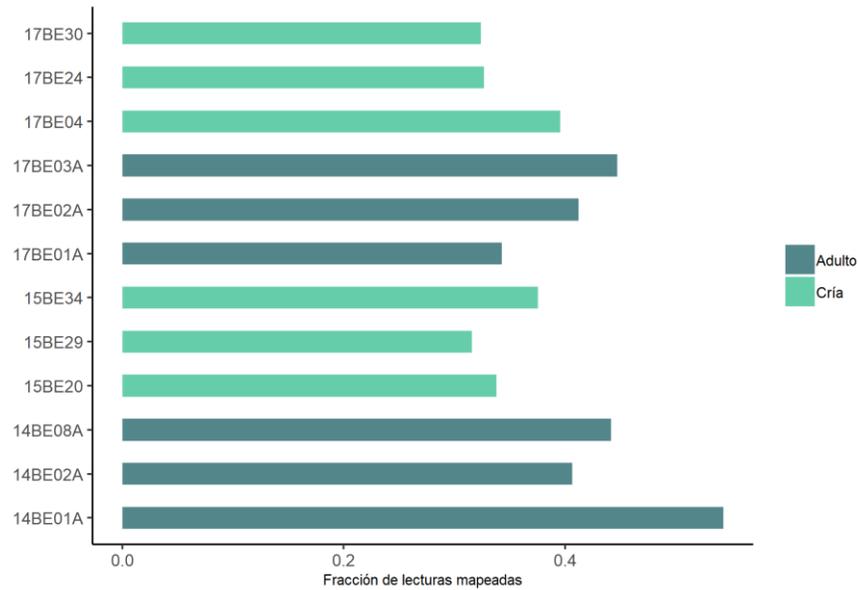
control o no anómalo (2017). Se obtuvo un total de 33 y 26.4, millones de lecturas para las muestras de adulto (2014 y 2017, respectivamente) y 27.3 y 30.8 millones de lecturas para las muestras de crías (2015 y 2017, respectivamente) (Cuadro 2.2). Las lecturas obtenidas en la secuenciación se alienaron con el pseudo-alineador Kallisto (Bray *et al.*, 2016) con el genoma del perro, y se logró el mapeo del 31-55% de las lecturas (Cuadro 2.2 y Fig. 2.3). El mapeo de las lecturas de las hembras adultas fue mayor que el de las crías, con una media de 43% en adultos y 34% en crías ( $t= 2.8856$ ,  $p= 0.022$ ) (Fig. 2.3).

**Cuadro 2. 2** Resumen del pseudo-alineamiento de las 12 muestras procesadas de *Z. californianus*, al utilizar las secuencias de ARN disponibles de *C. familiaris*. Número de lecturas obtenidas y mapeadas del RNA-seq de leucocitos de crías y hembras adultas.

<b>Muestra</b>	<b>Edad</b>	<b>Año</b>	<b>Procesadas</b>	<b>Mapeadas</b>
15BE20	Cría	2015	1.01E+07	3.42E+06
15BE29	Cría	2015	9.04E+06	2.86E+06
15BE34	Cría	2015	8.14E+06	3.06E+06
17BE04	Cría	2017	1.06E+07	4.20E+06
17BE24	Cría	2017	9.98E+06	3.26E+06
17BE30	Cría	2017	1.03E+07	3.32E+06
14BE01A	Adulto	2014	2.52E+06	1.37E+06
14BE02A	Adulto	2014	2.06E+07	8.37E+06
14BE08A	Adulto	2014	9.94E+06	4.39E+06
17BE01A	Adulto	2017	9.80E+06	3.36E+06
17BE02A	Adulto	2017	8.02E+06	3.30E+06
17BE03A	Adulto	2017	8.64E+06	3.86E+06

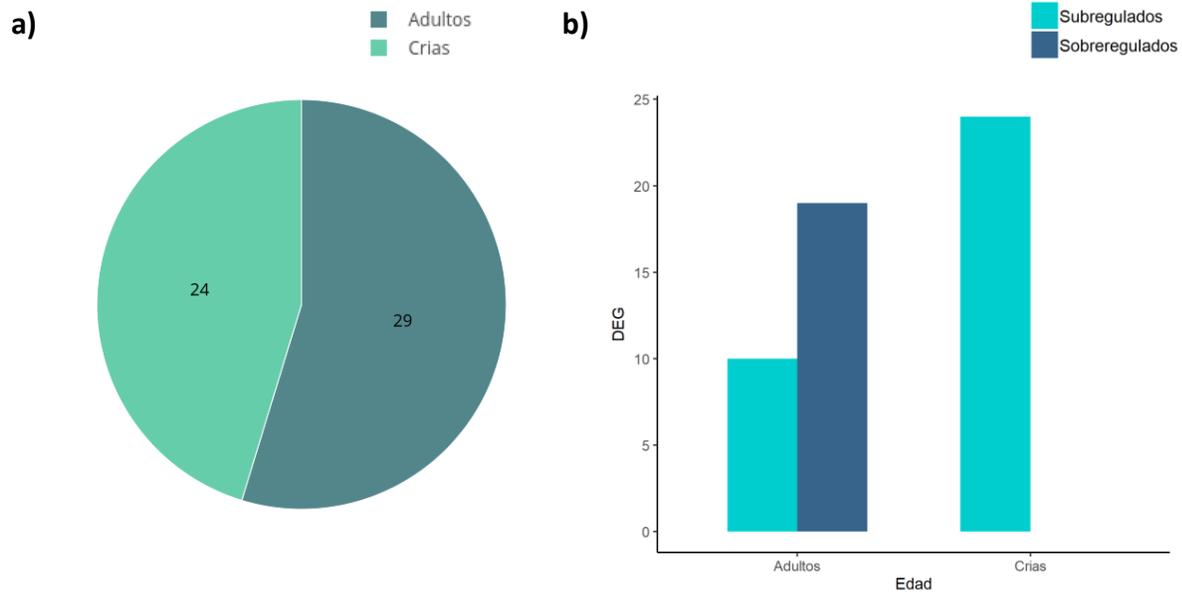
  

<b>Edad</b>	<b>Año</b>	<b>Total de lecturas</b>	<b>Lecturas mapeadas</b>
Adultos	2014	33,036,463	14,125,444
	2017	26,447,228	10,527,147
Crías	2015	27,310,923	9,340,698
	2017	30,845,375	10,781,807



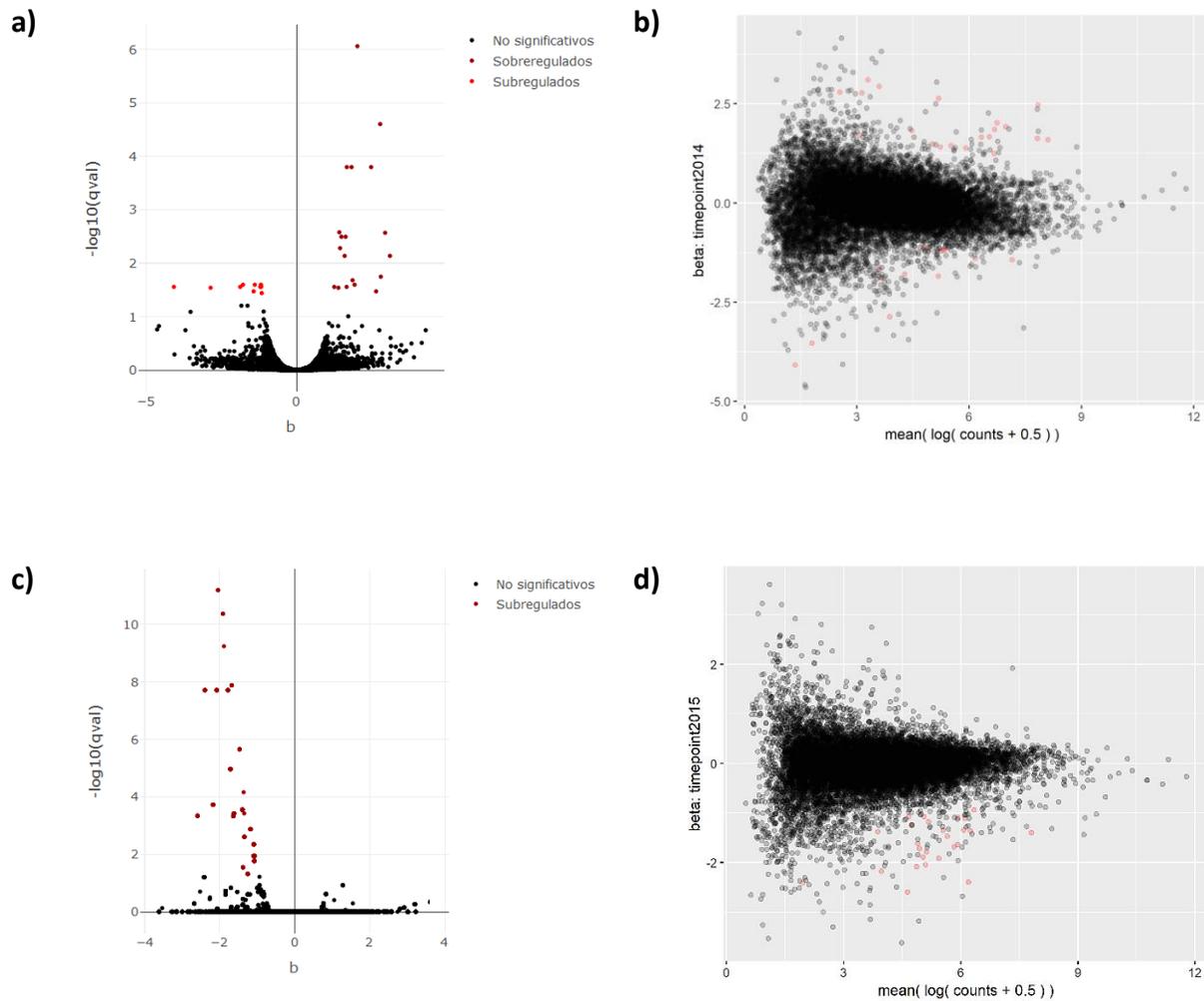
**Figura 2.3** Fracción de lecturas mapeadas durante el pseudo-alineamiento de las secuencias de *Z. californianus*. Se muestran las 12 muestras, seis de hembras adultas (oscuro) y seis de crías (claro).

El análisis de expresión diferencial identificó algunos genes que estaban diferencialmente expresados entre los dos años, para ambas edades (Fig. 2.4a); sin embargo los patrones fueron marcadamente distintos entre los dos grupos etarios. Hubo una mayor cantidad de genes sobre-regulados en hembras adultas, mientras que en las crías ningún gen estaba sobre-regulado (Fig. 2.4b). En la figura 2.5 se puede observar la tendencia de sobre-expresión de las adultas en el 2014, comparado con 2017 (Fig. 2.5a/b). En contraste, en las crías se observó una marcada tendencia a la sub-regulación genética (Fig. 2.5c/d).

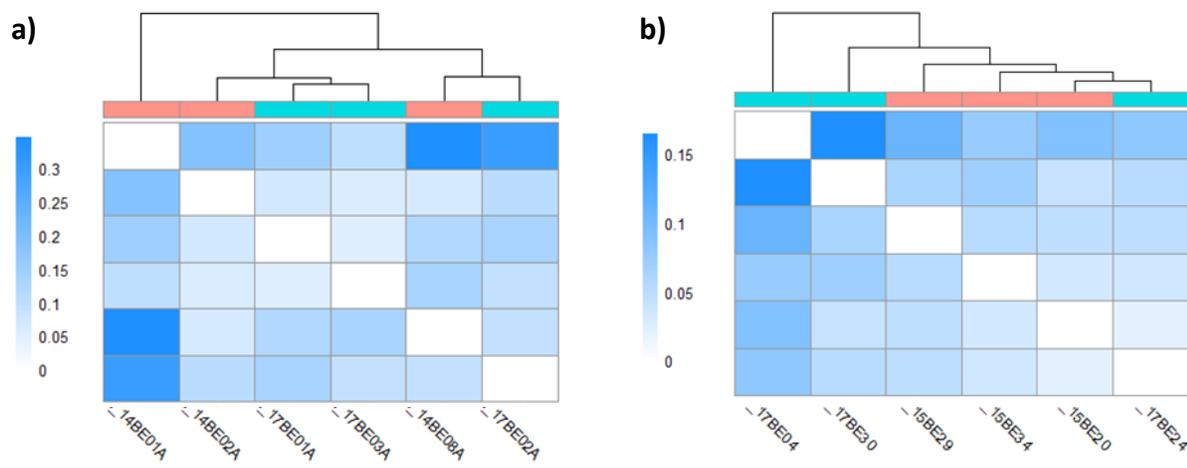


**Figura 2.4** : Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados (DEG) del análisis de RNA-seq de leucocitos de lobo marino de california de edad adulta y crías. **a)** Cantidad de genes diferencialmente expresados anotados (base en Ensembl). Se muestra el número de genes con un valor  $q < 0.05$  para ambas edades. **b)** Gráfico de barras que ilustra el número de genes sobre-expresados o sub-expresados en ambas edades.

Para explorar la similitud y diferencia entre las muestras, se realizó un mapa de agrupación o de calor, utilizando la divergencia de Jensen-Shannon (Fig. 2.6). Las hembras adultas muestreadas durante el 2014 mostraron mayor divergencia entre ellos, comparado con el 2017 (Fig. 2.6a). En las crías se observó lo contrario, los individuos muestreados en el 2017 mostraron mayor divergencia entre ellos, comparado con las crías del 2015 (Fig. 2.6b).



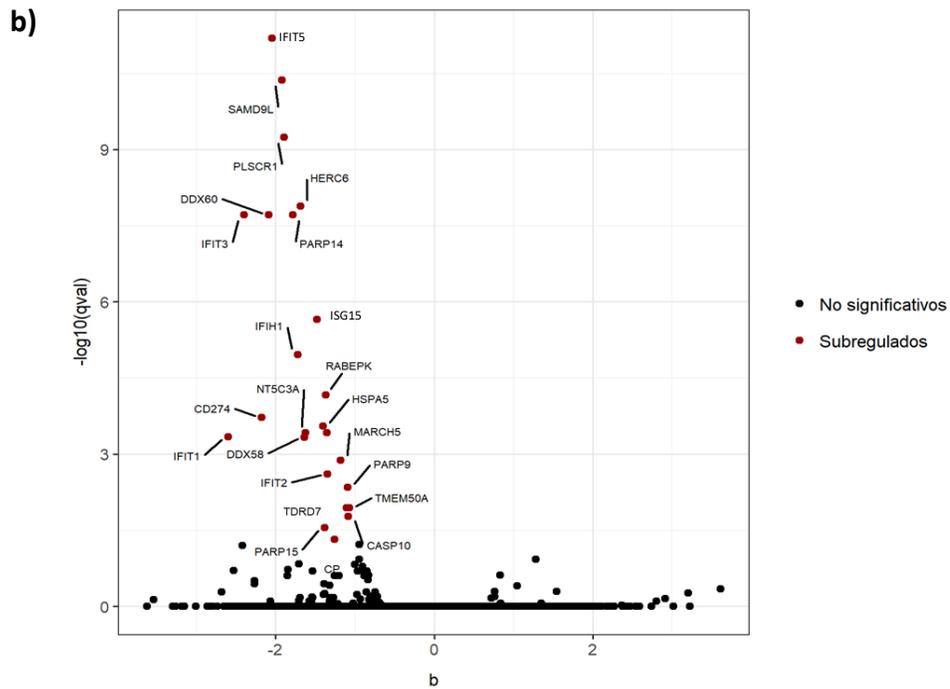
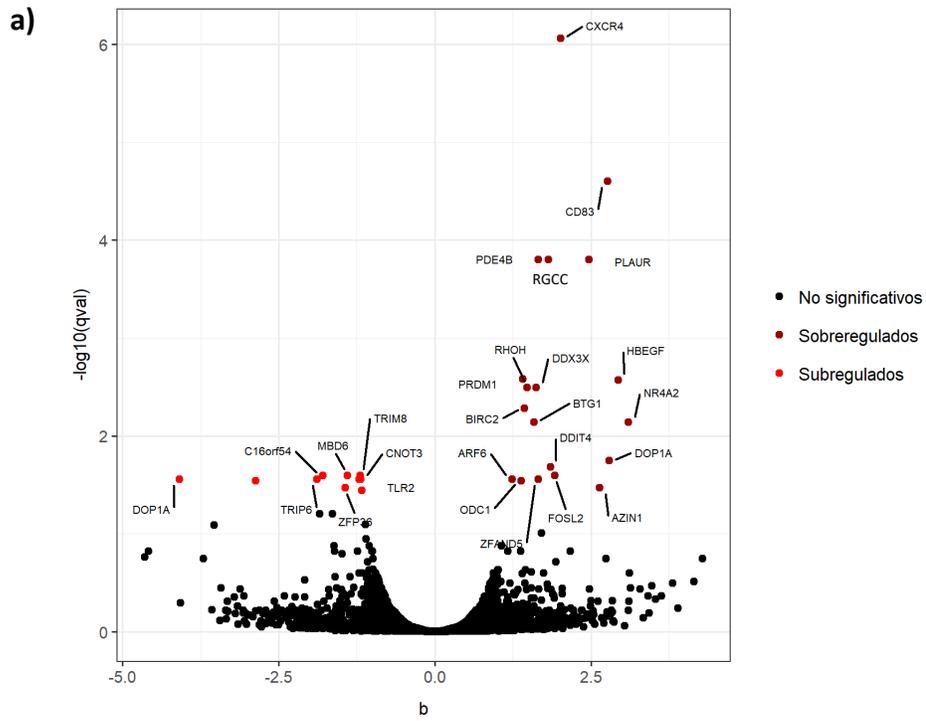
**Figura 2.4:** Análisis de expresión diferencial genética de hembras adultas (a y b) y crías (c y d) de *Z. californianus* muestreados en dos años. Gráficos de volcán que muestran el valor medio de expresión del log<sub>10</sub>(q-val) contra el coeficiente de regresión (valor b de la prueba de Wald), para los DEGs identificados en leucocitos de adultas (a) y crías (c) muestreados durante un año anómalo (2014 y 2015) y uno no anómalo (2017). En rojo se muestran los valores significativos ( $q < 0.05$ ) para  $b < 0$  (sub-regulados) y  $b > 0$  (sobre-regulados). **b y d)** Gráficos MA que muestran el valor b contra el nivel de conteo para cada gen entre las dos condiciones. Genes con un nivel de expresión similar entre los dos años aparecen cerca de  $y=0$ .



**Figura 2.5** Gráfico de calor que muestra la divergencia Jensen-Shannon entre muestras de distintos años de adultos (a) y crías (b) de *Z. californianus*.

### Análisis de ontología genética e identificación de DEG

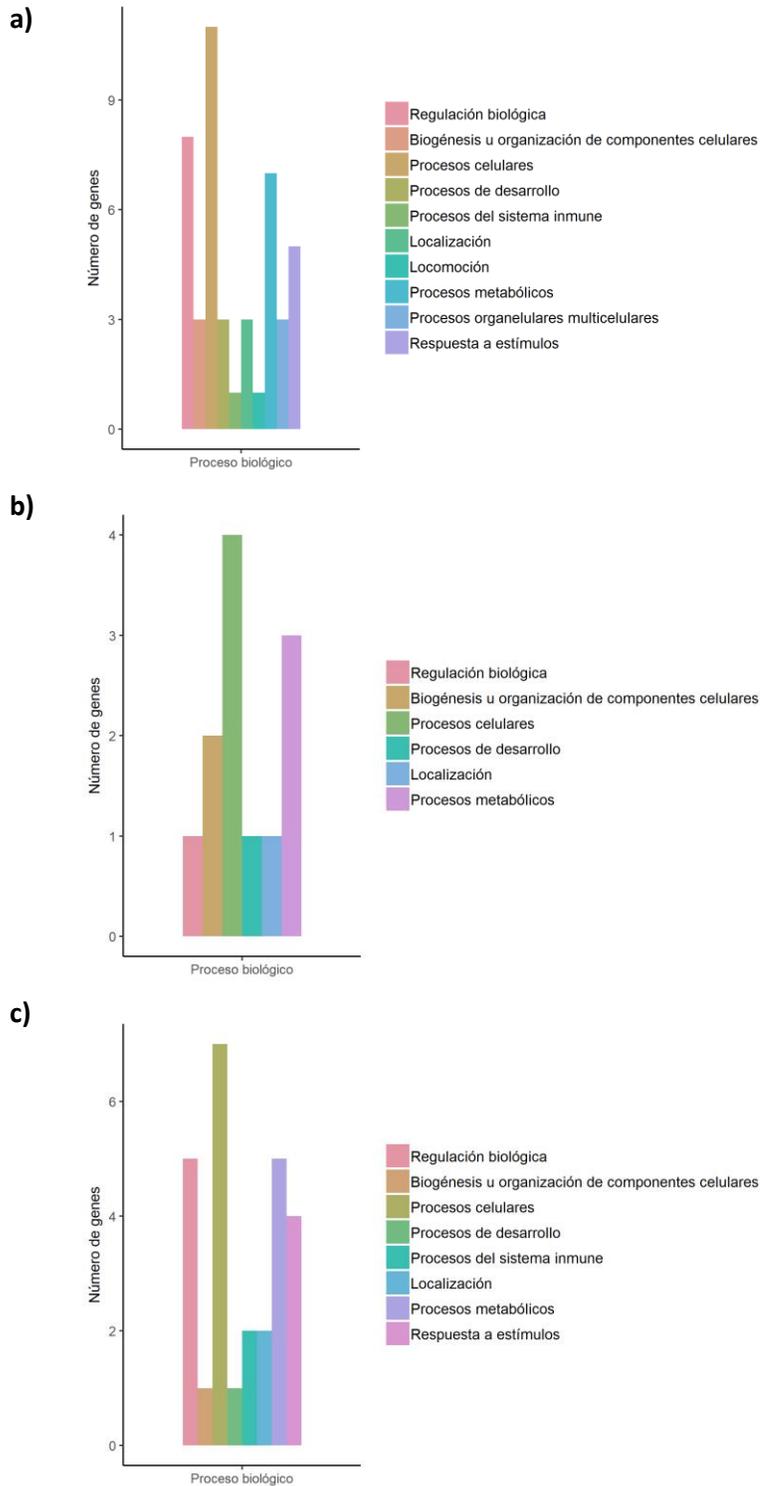
La ontología genética juega un papel muy importante en el análisis categórico del RNA-seq. Las categorías GO se analizaron en el Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>) a través de PANTHER (Mi et al., 2017) y REVIGO (Supek et al., 2011). En la figura 2.7 se muestran los gráficos de volcán con los nombres de los DEG's analizados, a partir del cual se pueden examinar los más significativos. En el caso de los DEG's sobre-regulados más sobresalientes de adultas fueron CXCR4, CD83, PDE48, RGCC y PLAUR (Fig. 2.7a). El valor de los genes sub-regulados parece más homogéneo, sin sobresalir de forma particular algún gen (Fig. 2.7a). Los DEG's sobresalientes sub-regulados de las crías fueron, IFIT5, SAMD9L, PLSCR1, IFIT3, DDX60, PARP14 y HERC6 (Fig. 2.7b).



**Figura 2.7** Gráficos de volcán con los sombres de los DEG's ( $q < 0.05$ ) sobre ( $b > 0$ ) y sub-regulados ( $b < 0$ ) en adultos (a) y crías (b) de *Z. californianus*.

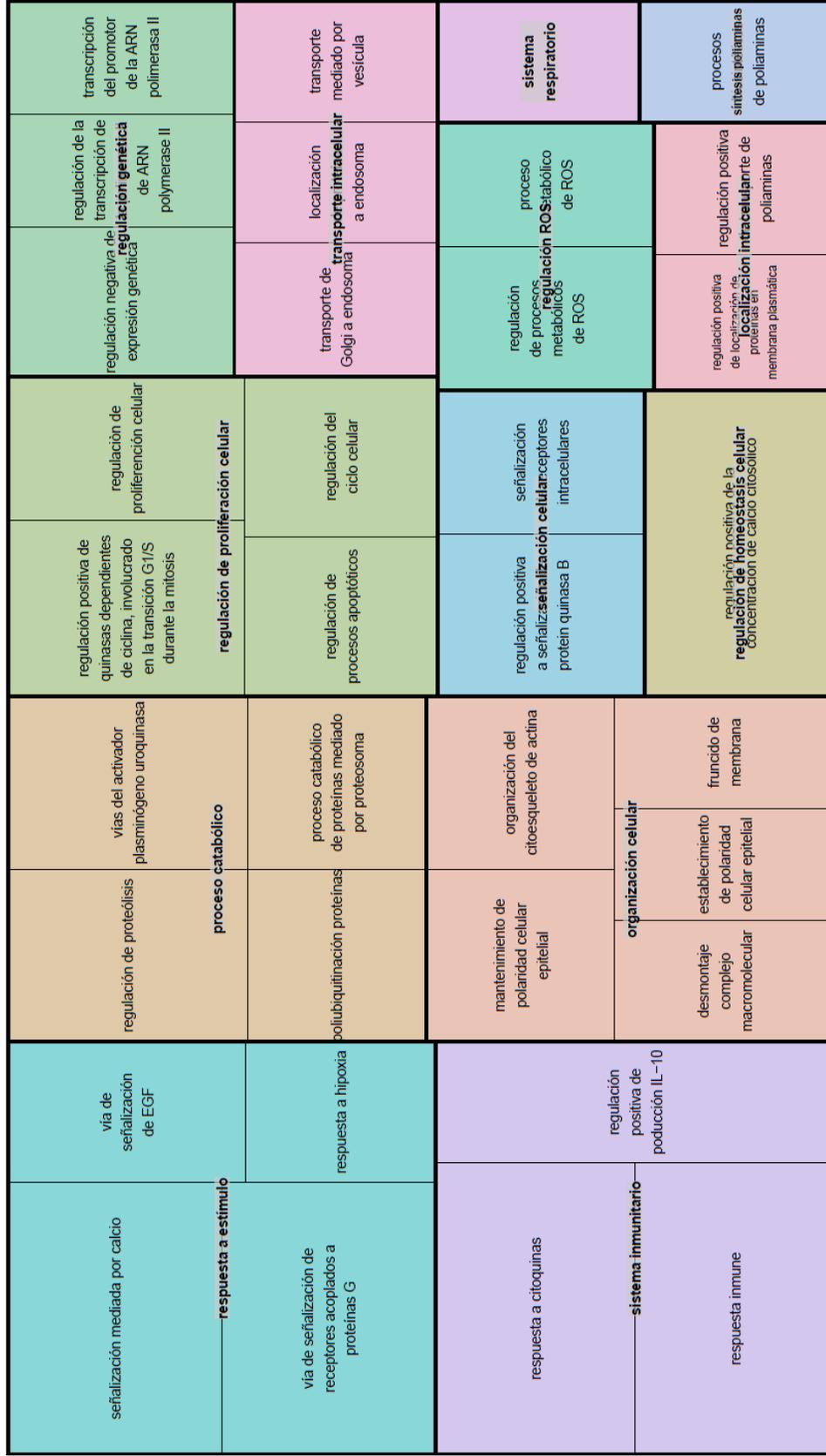
Los genes expresados en la sangre de las crías se agruparon en 151 categorías GO correspondientes a procesos biológicos, 74 a componentes celulares y 86 a funciones moleculares, para los 24 genes sub-regulados. En las hembras adultas se obtuvieron 66 categorías GO correspondientes a procesos biológicos, 33 a componentes celulares y 22 a funciones moleculares, para los nueve genes sub-regulados. Para los 20 genes sobre-regulados se obtuvieron 165 categorías GO de procesos biológicos, 70 de componentes celulares y 79 de funciones moleculares. El análisis se centró en los procesos biológicos, ya que esta se consideró la categoría más informativa (Fig. 2.8 y 2.9).

De las categorías desacatadas de los DEG's sobre-regulados agrupadas en los procesos biológicos de las hembras adultas, resaltaron las respuestas a estímulos, como ROS e hipoxia, así como las respuestas inmunitarias. También, se observaron procesos de regulación de proliferación celular, dirigida hacia la proliferación; y regulación genética de la transcripción, además de regulación metabólica de poliaminas, y catabolismo, particularmente de proteínas (Fig. 2.9a). De las categorías sub-reguladas de las hembras adultas destacaron mayormente las respuestas inmunitarias, procesos genéticos, así como el mantenimiento y diferenciación celular (Fig. 2.9b). Para las categorías sub-reguladas de las crías resaltaron procesos metabólicos y catabólicos, principalmente proteólisis; respuestas inmunitarias relacionadas con la producción de citoquinas y respuestas innatas hacia bacterias y virus, así como transporte endosómico. También resaltó la regulación negativa del ciclo celular y homeostasis celular, esencialmente en la regulación de iones (Fig 2.9c).



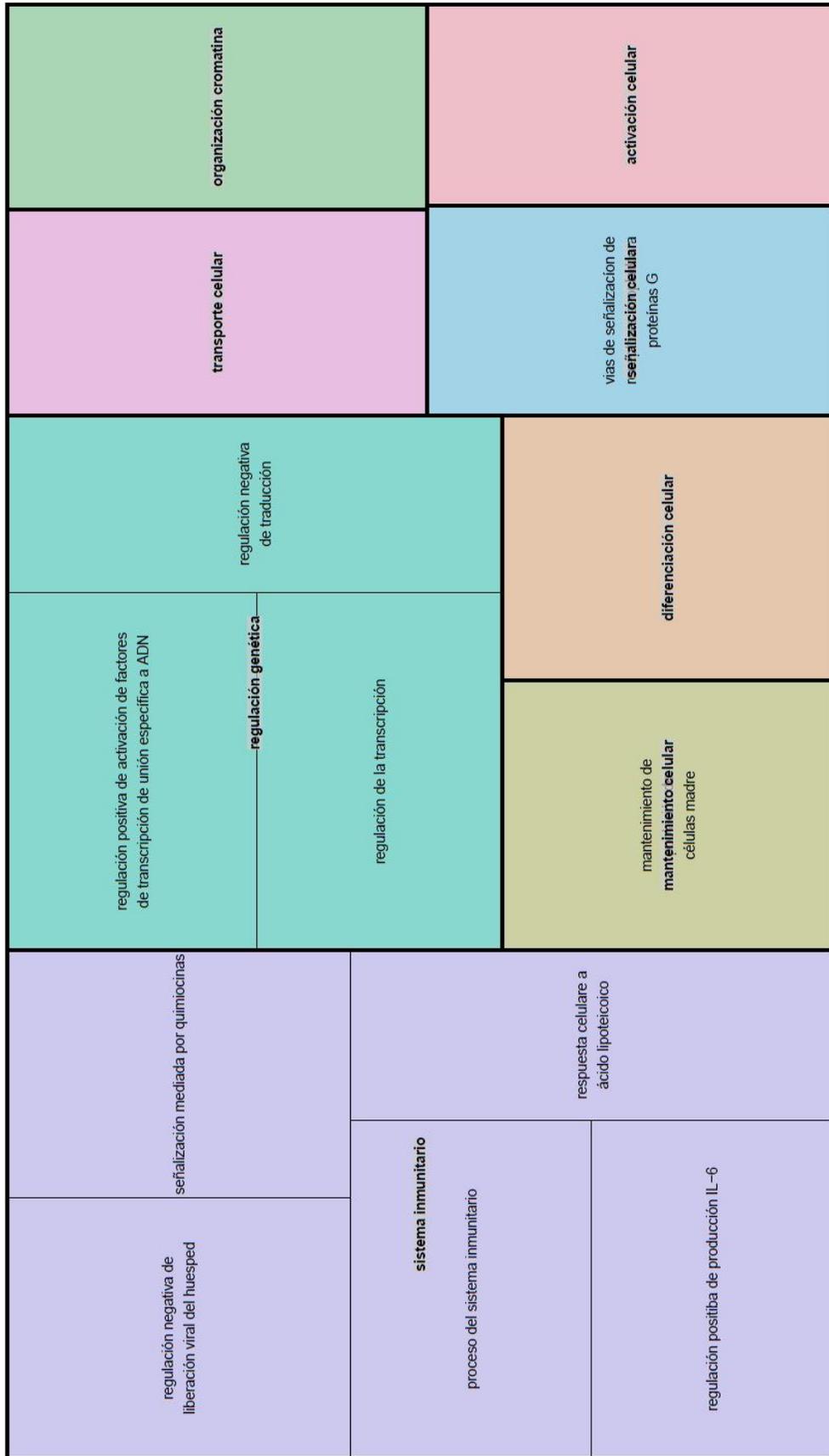
**Figura 2.6** Categorías GO de los procesos biológicos a los que pertenecen los genes DEG sobre-regulados (a) y sub-regulados (b) en hembras adultas adultos; y sub-regulados en crías (c) de *Z. californianus*.

a)



**Figura 2.7** Mapa de árbol de los procesos biológicos diferencialmente expresados para los DEG sobre-regulados (a) de los adultos. Cada rectángulo representa un grupo representativo de la categoría GO asignada, y cada grupo representativo se agrupó en grupos más grandes de términos relacionados, visualizados con colores distintos. El tamaño de cada rectángulo refleja el valor p (entre más grande el rectángulo, menor el valor p).

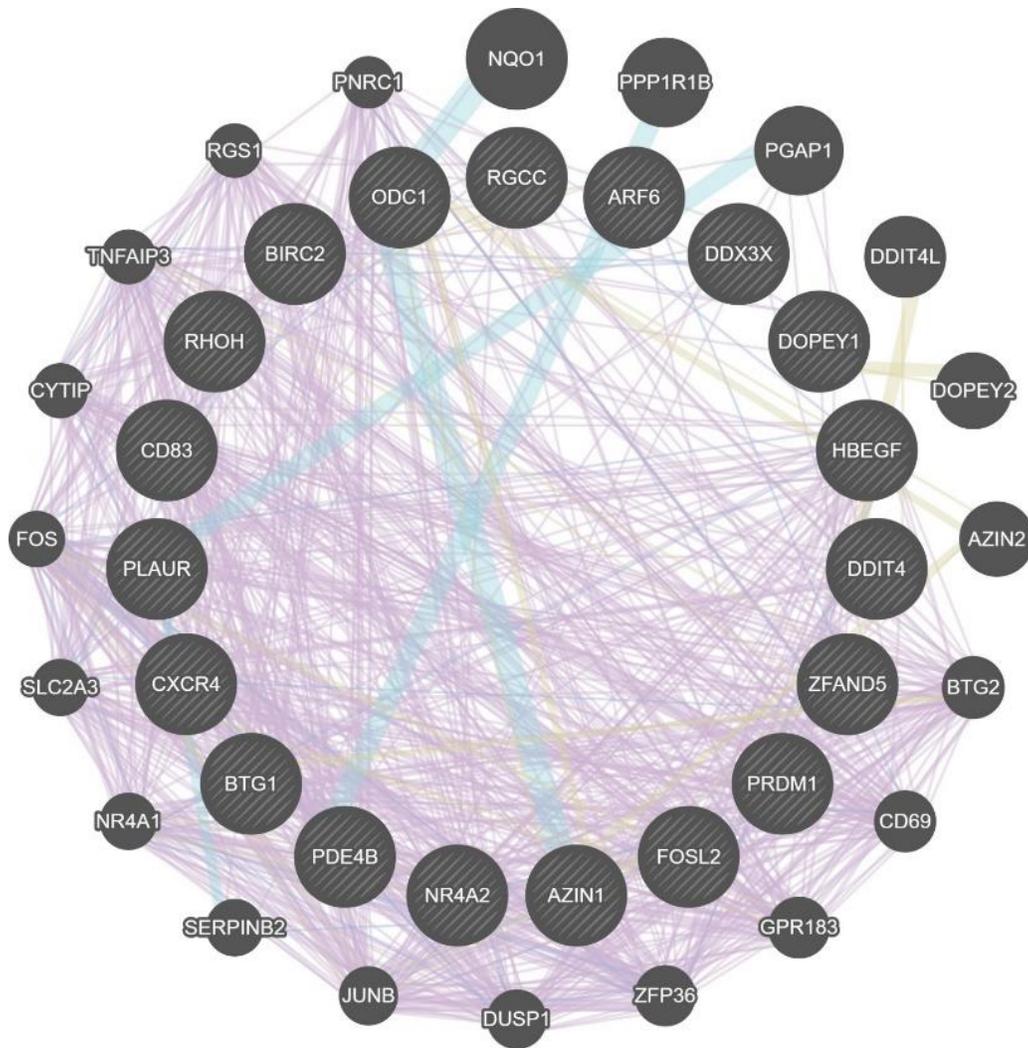
b)



**Figura 2.8 Continuación...** Mapa de árbol de los procesos biológicos diferencialmente expresados para los DEG sub-regulados **(b)** de los adultos. Cada rectángulo representa un grupo representativo de la categoría GO asignada, y cada grupo representativo se agrupó en grupos más grandes de términos relacionados, visualizados con colores distintos. El tamaño de cada rectángulo refleja el valor p (entre más grande el rectángulo, menor el valor p).



Se realizaron análisis de interacción y predicción genética utilizando Cytoscape (version 3.5.0) con GeneMania (Warde-Farley et al., 2010). Las redes de interacción se realizaron con los DEG's sobre- y sub-regulados para ambas edades, y se obtuvo la predicción de genes con funciones similares y que comparten propiedades similares (Fig. 2.10). Las funciones involucradas en los DEG's sobre-regulados de las hembras adultas fueron respuestas de regulación viral, sanación de heridas, catabolismo y procesamiento del extremo 3' y el acortamiento poly(A) de ARNm (Fig. 2.10a). Las funciones de los DEG's sub-regulados de las hembras adultas fueron procesos de catabolismo de ARN, actividad de receptores de reconocimiento de patógenos y mantenimiento y diferenciación de células madre (Fig. 2.10b). Para los DEG's sub-regulados de las crías se obtuvieron funciones involucradas en las respuestas de defensa del sistema inmune innato como respuesta a virus, a interferón I y producción de citoquinas (Fig. 2.10c). Las funciones de los DEG's de las crías fueron más constantes y con mayor similitud, por esto, la red de interacción genética de las crías se observa más sólida y con mayor cantidad de conectores, comparado con las redes de las hembras adultas.

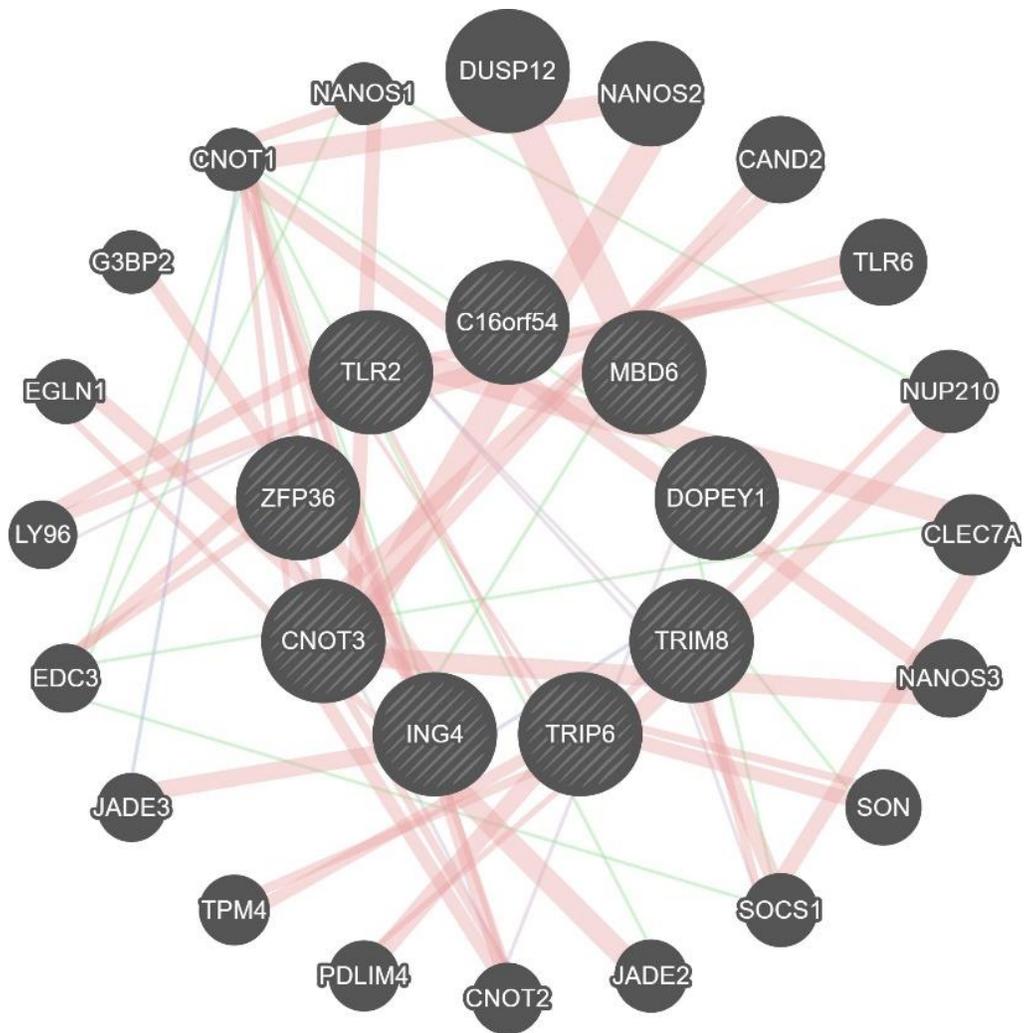


a)

#### Conexiones

- Co-expresión
- Vía señalización
- Dominios compartidos
- Co-localización

**Figura 2.10** Redes de interacción genética de los DEG's sobre-regulados (a) de adultos. Los genes predichos se encuentran en la parte exterior de la red, mientras que los DEG's obtenidos (círculos rayados) se encuentran en el interior. El color de los conectores muestra el tipo de interacción o relación que tienen los genes involucrados.

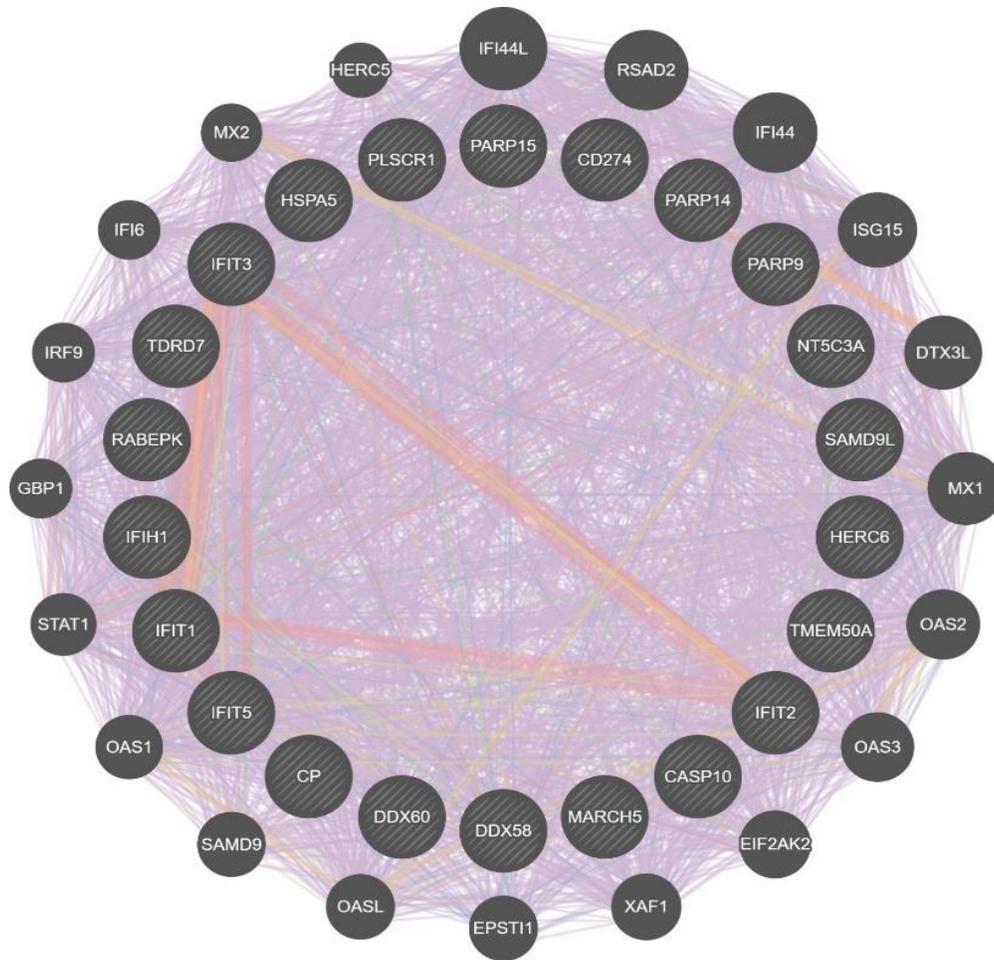


b)

**Conexiones**

- Interacción física
- Co-expresión
- Co-localización
- Interacción genética

**Figura 2.11 Continuación...** Redes de interacción genética de los DEG's sub-regulados (b) de adultos. Los genes predichos se encuentran en la parte exterior de la red, mientras que los DEG's obtenidos (círculos rayados) se encuentran en el interior. El color de los conectores muestra el tipo de interacción o relación que tienen los genes involucrados.



c)

### Conexiones

- Co-expresión
- Interacción física
- Predicción
- Dominios compartidos
- Co-localización
- Interacción genética

**Figura 2.12 Continuación...** Redes de interacción genética de los DEG's sub-regulados (c) de crías. Los genes predichos se encuentran en la parte exterior de la red, mientras que los DEG's obtenidos (círculos rayados) se encuentran en el interior. El color de los conectores muestra el tipo de interacción o relación que tienen los genes involucrados.

## Identificación de funciones relacionadas con el sistema inmunitario

Las categorías GO brindan información acerca de todas las funciones que se han estudiado y registrado para un gen en particular (Ashburner et al., 2000). Algunos de los DEG's obtenidos se expresan en distintos tipos celulares, no únicamente en leucocitos. Por esto, para profundizar en los procesos inmunitarios que se alteraron durante la anomalía climática, se identificaron para cada gen las funciones involucradas con este sistema. En el cuadro 2.3 se describen las funciones de cada gen, así como el proceso biológico general asociado (Cuadro 2.3).

Se encontraron 26 genes relacionados con respuestas inmunitarias, con 10 genes sobre-regulados y cuatro sub-regulados en hembras adultas, y 12 genes sub-regulados en crías. Sin embargo también se observaron de forma representativa 18 genes relacionados con el ciclo celular, 11 genes sobre-regulados y tres sub-regulados en hembras adultas, y cuatro sub-regulados en crías. En su mayoría, las hembras adultas sobre-regularon genes involucrados con la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (CD83, PDE4B, BIRC4, ZFAND5), y reguladores del ciclo celular y diferenciación-maduración celular (CXCR4, CD83, RGCC, PLAUR, PRDM1 HBEGF, RHOH, BIRC2, DDIT4, FOSL2, ODC1). Por otro lado, la mayoría de las funciones de los genes sub-regulados de las hembras adultas fueron la regulación negativa del ciclo celular e inducción de apoptosis (TRIM8, CNOT3, ING4) y la inducción del SII (TRIM8, TRIP6, ZFP36, TLR2). En el caso de las crías, todos los genes sub-regulados estuvieron relacionados principalmente con respuestas de defensa del SII y la presentación de antígenos (DDX58, DDX60, SAMD9L, CD274, PLSCR1, CP, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFIH1, HERC6, ISG15, PARP9, PARP14, HERC6, CASP10, HSPA5, PARP15).

**Cuadro 2. 3** DEG's sobre y sub-regulados en hembras adultas y crías de *Z. californianus*. Se indica la función regulatoria del gen, y las vías de señalización de las que forman parte, así como los procesos biológicos generales. \*Genes con funciones desconocidas o con mínima o nula relación a los procesos observados de forma general en el estudio.

Gen	Nombre	Función - vías señalización	Proceso biológico
<i>Genes sobre-regulados en adultos</i>			
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>	Codifica para un receptor de quimiocinas que induce señal para incrementar iones de calcio intracelular. Involucrado en hematopoyesis, vascularización y funciona como co-receptor retroviral. Regula la proliferación y supervivencia de linfocitos, así como procesos inflamatorios. Está también involucrado en vías de señalización en respuesta a hipoxia.	Respuesta inmunitaria. Proliferación celular. Homeostasis de iones.
<i>CD83</i>	<i>CD83 molecule</i>	Codifica para un co-receptor que juega un papel importante en la presentación de antígenos y activación de linfocitos. Regula negativamente la producción de IL4 y positivamente IL2 e IL10. Regula positivamente la diferenciación de células T alfa y beta.	Respuestas de defensa. Regulación de citoquinas y diferenciación de linfocitos.
<i>RGCC</i>	<i>Regulator of Cell Cycle</i>	Modula la actividad de las quinasas del ciclo celular CDK1 y PLK1. Inducido por p53 en respuesta a daño de ADN. Activado por el sistema del complemento.	Respuesta a daño de ADN. Regulador negativo del ciclo celular.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes sobre-regulados en adultos</i>			
<i>PDE4B</i>	<i>Phosphodiesterase</i>	Hidroliza el segundo mensajero del AMPc. Regula la quimiotaxis y homeostasis de neutrófilos, regula positivamente la producción de INF- $\gamma$ e IL2. Está involucrado también en el metabolismo de fármacos y hormonas.	Catabolismo de AMPc. Quimiotaxis y migración de leucocitos y linfocitos. Producción de citoquinas.
<i>PLAUR</i>	<i>Plasminogen activator, urokinase receptor</i>	Codifica para el receptor uPAR del activador del plasminógeno uroquinasa. Juega un papel importante en la formación de plamina. Actúa como regulador negativo de apoptosis, induciendo la proliferación, migración y adhesión celular.	Respuesta a daño en tejido. Coagulación celular. Regulación del ciclo celular.
<i>PRDM1</i>	<i>PR/SET domain 1</i>	Codifica para un factor de transcripción (BLIMP-1) que participa en la inhibición de la producción de INF. $\beta$ mediado por virus. Involucrado en la diferenciación y maduración de células T, NK y B.	Respuestas del SIA y SII. Respuesta de defensa viral.
<i>HBEGF</i>	<i>Heparin binding EGF like growth factor</i>	Codifica para un factor de crecimiento que regula la proliferación celular de macrófagos. Se une al receptor EGF y es un potente mitógeno. Esta involucrado en distintas vías de señalización de cáncer.	Proliferación celular.

<i>RHOH</i>	<i>Ras homolog family member H</i>	Regulador negativo de proliferación, supervivencia y mantenimiento celular del progenitor hematopoyético. Regulador del desarrollo de timocitos y señalización del TCR. Activación de células T y mastocitos, regula negativamente la activación de NF-kB por TNF.	Regulación de proliferación de leucocitos y linfocitos, y producción de citoquinas.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes sobre-regulados en adultos</i>			
<i>DDX3X</i>	<i>DEAD-Box Helicase 3 X-Linked</i>	Involucrado en la replicación y expresión viral. Inhibe la formación de células tumorales e incrementa la expresión del inhibidor de p21, regulando positivamente la apoptosis.	Respuesta de defensa viral. Regulación del ciclo celular.
<i>BIRC2</i>	<i>Baculoviral IAP repeat containing 2</i>	Codifica para la proteína multifuncional cIAP1 que regula las caspasas inhibiendo el proceso de apoptosis. Modula la señal inflamatoria regulando quinasas y la vía NF-kB. También, regula el SII via TLRs, NLRs Y rlrS.	Regulación SII y apoptosis.
<i>BTG1</i>	<i>BTG anti-proliferation factor 1</i>	Codifica para una proteína anti-proliferativa. Regula positivamente angiogénesis y las respuestas a estrés oxidativo.	Regulación del ciclo celular y estrés.
<i>NR4A2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2</i>	Codifica para un receptor nuclear, involucrado en la supresión de la activación de células dendríticas derivadas de médula ósea. Incrementa las células Treg y limita las células T efectoras. Reprime NF-Kb y potencia la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL10 y TGF-b.	Regulación de leucocitos y linfocitos, y producción de citoquinas.

<i>DOP1A</i>	<i>DOP1 leucine zipper like protein A</i>	Codifica para una proteína involucrada en el transporte vesicular Golgi-endosoma. Regula la morfología celular	Transporte intracelular.
<i>DDIT4</i>	<i>DNA damage inducible transcript 4</i>	Codifica para un inhibidor de mTOR durante condiciones de estrés. Su expresión favorece la progresión de cáncer.	Regulación del ciclo celular.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes sobre-regulados en adultos</i>			
<i>FOSL2</i>	<i>FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit</i>	Codifica para una proteína (FRA2) que es un factor de transcripción oncogénico inducido por citoquinas, hormonas y estrés. Al dimerizar con proteínas de la familia JUN forman el factor de transcripción AP1. Involucrado en la regulación de la proliferación, diferenciación y transformación celular. Principalmente se expresa en células T malignas maduras que expresan CCR4.	Regulación del ciclo celular.
<i>ARF6</i>	<i>ADP ribosylation factor 6</i>	Estimula la endocitosis mediada por clatrina, involucrada en la vía de fagocitosis y migración celular regulando el citoesqueleto de actina.	Regulación de motilidad celular
<i>ZFAND5</i>	<i>Zinc finger AN1-type containing 5</i>	Codifica para una proteína de unión a ARN, que incrementa la liberación de TNF e IL6 en macrófagos. Inducido por estímulos inflamatorios. Involucrada en la degradación de proteínas vía el sistema de ubiquitina-proteosoma. Regula la activación de NF-κB y apoptosis.	Regulación de inflamación. Proteólisis.

<i>ODC1</i>	<i>Ornithine decarboxylase 1</i>	Codifica para la enzima ODC de la vía de biosíntesis de poliamina, que cataliza la ornitina a putrecina. Regula positivamente proliferación celular.	Metabolismo glutation. Regulación de proliferación celular.
<i>AZIN1</i>	<i>Antizyme inhibitor 1</i>	Codifica para un regulador de homeostasis de poliaminas. Involucrada en el proceso biosintético de ornitina a putresina. Regula positivamente el transporte transmembranal de las poliaminas.	Regulación negativa del catabolismo.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<b>Genes sub-regulados en adultos</b>			
<i>TRIM8</i>	<i>Tripartite motif containing 8</i>	Juega un papel importante en el control de la proliferación celular, modulando a p53. Participa en la activación de la señalización de INF-g, TNF-a e IL1b.	Regulación negativa del ciclo celular. Regulación positiva SII.
<i>CNOT3</i>	<i>CCR4-NOT transcription complex subunit 3</i>	Forma parte del complejo CCR4-NOT, involucrado en la degradación de ARN. Previene muerte celular por necrosis, estabilizando el número de transcritos y manteniendo la viabilidad celular.	Metabolismo ARN.
<i>TRIP6</i>	<i>Thyroid hormone receptor interactor 6</i>	Codifica para un receptore tiroide, asociado con la adhesión celular y migración. Involucrado en la vía de señalización de los receptores tipo NOD, PRRs de detección de patógenos.	Regulación SII y migración celular.
<i>ING4</i>	<i>Inhibitor of growth protein</i>	Codifica par aun supresor de tumores que interactúa con p53, inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis.	Regulación del ciclo celular.
<i>ZFP36</i>	<i>ZFP36 ring finger protein like 1</i>	Codifica para una proteína (TTP) con actividad anti-inflamatoria, desestabilizando las secuencias de	Respuesta a heridas. Regulación inflamación.

		ARNm de TNF, IL2 COX2 y GM-CSF. Su deficiencia causa inflamación severa llegando a autoinmunidad.	
<i>TLR2</i>	<i>Toll-like receptor 2</i>	Codifica un receptor de reconocimiento de patógenos. Regula las respuestas del SII a lipoproteínas bacterianas, entre otros componentes. Activa NF-kB, secreción de citoquinas y las respuestas pro-inflamatoria.	Regulación SII.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<b>Genes sub-regulados en adultos</b>			
<i>DOPEY1</i>	<i>Dopey Family Member 1</i>	Codifica para una proteína involucrada en el transporte entre Golgi y endosoma.	Transporte endosomal.
<i>MBD6</i>	<i>Methyl-CpG binding domain protein 6</i>	Codifica una proteína de unión a heterocromatina. Regula a Oct4, un factor de transcripción que promueve la proliferación y renovación celular.	Regulación del ciclo celular.
<b>Genes subregulados en crías</b>			
<i>DDX58</i>	<i>DexD/H-box helicase 58</i>	Codifica para RIG-1, receptor del SII que actúa como sensor de ácidos nucleicos virales. Activa una cascada de respuestas antivirales, como citoquinas pro-inflamatorias.	Respuesta de defensa viral.
<i>DDX60</i>	<i>DEdD/H-box helicase 60</i>	Regula positivamente a DDX58 (RIG-1) y a IFIH1 (MDA5), en respuesta a infección viral.	Respuesta de defensa viral.
<i>SAMD9L</i>	<i>Sterile alpha motif domain-containing protein 9-like</i>	Podría estar involucrado en la fusión de endosomas. Codifica para un supresor de tumores y juega un papel en respuestas del SII a infección viral.	Fusión de vesículas endosomales.

<i>CD274</i>	<i>CD274 molecule / Programmed death ligand 1</i>	Codifica para una proteína de membrana (PD-L1), que es un receptor inhibitorio inmunitario, expresado por células T y B, así como células de tumores. La interacción con PDCD1 inhibe la activación de células T y producción de IFNG e IL10. Durante una infección o inflamación, previene respuestas autoinmunitarias y mantiene homeostasis de la respuesta.	Regulación de proliferación de células T y producción de citoquinas.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes subregulados en crías</i>			
<i>NT5C3A</i>	<i>5'-nucleotidase</i>	Codifica para una nucleotidasa y fosfotransferasa, involucrada en el catabolismo de nucleótidos. La deficiencia de P5N causa anemia hemolítica. También está involucrado en la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias bloqueando la señalización de NF-kB.	Metabolismo de nucleótidos y respuestas inflamatorias.
<i>MARCH5</i>	<i>Membrane associated ring-CH-type finger 5</i>	Codifica para una ubiquitin-ligasa E3, que actúa como regulador positivo de fisión mitocondrial. Juega un papel en la prevención de la senescencia celular como regulador del control de calidad mitocondrial.	Regulación del ciclo celular.
<i>PLSCR1</i>	<i>Phospholipid scramblase 1</i>	Regulador de la migración de fosfolípidos. Juega un papel en la formación del coágulo de fibrina, activación de mastocitos y reconocimiento de células apoptóticas.	Respuesta de defensa viral y apoptosis.

<i>CP</i>	<i>Ceruloplasmin</i>	Glicoproteína de unión y transporte de cobre. Tiene actividad ferroxidasa, involucrada en el transporte de hierro a través de la membrana celular. También, tiene actividad pro-inflamatoria derivada de macrófagos.	Transporte iones. Inflamación.
<i>IFIT1</i>	<i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	Codifica para una proteína antiviral inducida por IFN. Identifica los mensajeros virales de ARN que no poseen la 2'-O-metilación en el 5' cap.	Respuesta de defensa viral.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes subregulados en crías</i>			
<i>IFIT2</i>	<i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i>	Codifica para una proteína antiviral inducida por IFN. Identifica los mensajeros virales de ARN que no poseen la 2'-O-metilación en el 5' cap. Codifica para un receptor del SII citoplasmático, que actúa como sensor de ácidos nucleicos virales. Activa cascadas de respuestas antivirales e induce la producción de citoquinas proinflamatorias e interferón.	Respuesta de defensa viral. Respuesta de defensa viral.
<i>IFIT3</i>	<i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>		
<i>IFIT5</i>	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5</i>		
<i>IFIH1</i>	<i>Interferon induced with helicase C domain 1</i>		
<i>HERC6</i>	<i>HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6</i>		

<i>ISG15</i>	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>	Codifica para una proteína tipo ubiquitina. Es conjugada con proteínas intracelulares al ser estimulado por INF-a e INF-b. Activa a neutrófilos y eosinófilos, induce la secreción de IFN-g de monocitos y macrófagos.	Respuesta de defensa viral y bacteriana. Catabolismo de proteínas.
<i>PARP9</i>	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase family member 9</i>	Involucrado en la inducción de la expresión de genes de respuesta a IFN-g, y regula la activación de macrófagos via ribosilación-ADP de STAT1. También está involucrado en la regulación negativa de la actividad catalítica.	Respuesta de defensa viral. Regulación del catabolismo.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes subregulados en crías</i>			
<i>PARP14</i>	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 14</i>	Potenciador de la transcripción dependiente de STAT6. Regula la activación de macrófagos via ribosilación-ADP de STAT1. Codifica para una proteína anti-apoptótica y regula glicólisis aeróbica.	Respuesta de defensa innata.
<i>CASP10</i>	<i>Caspase 10</i>	Codifica para una caspasa involucrada en la activación de la cascada de apoptosis (via caspasas). Induce apoptosis en la vía de señalización de RIG-1 por presencia viral.	Respuesta de defensa viral e inducción de apoptosis.
<i>HSPA5</i>	<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 5</i>	Codifica para una proteína chaperona (HSPA5/BiP) encargada del plegamiento y ensamblaje de proteínas en retículo. Además de la exportación activa de proteínas y en el procesamiento y presentación de antígenos por MHC clase I.	Respuesta a estrés. Presentación de antígenos.

<i>RABEPK</i>	<i>Rab9 effector protein with kelch motifs</i>	Codifica para el efector requerido para el transporte endosómico trans-Golgi. Involucrado en endocitosis y exocitosis. Regula el transporte de los receptores de manosa 6 fosfato entre los endosomas tardíos y la red trans-Golgi.	Endocitosis y exocitosis.
<i>PARP15</i>	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 15</i>	Represor transcripcional del SI, y cataliza modificaciones post-traduccionales	Transcripción y traducción.
<i>TDRD7*</i>	<i>Tudor domain-containing protein 7</i>	Componente de gránulos de ARN involucrados en la regulación post-transcripcional. Se requiere para el desarrollo del lente ocular. Defectos en su regulación se relacionan con la presencia de cataratas.	Morfogénesis del lente ocular.
<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función - vías señalización</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>Genes subregulados en crías</i>			
<i>TMEM50A*</i>	<i>Transmembrane protein 50A</i>	Función desconocida. Su posición entre los genes RH ha sugerido que polimorfismos en este gene están relacionados a los haplotipos RH poblacionales.	Selección de haplotipos RH.

## 2.7 Discusión

La secuenciación de ARN o RNA-seq ha surgido como una herramienta novedosa y eficiente que ha cambiado la forma en la que se analizan los perfiles transcripcionales (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). A pesar de las facilidades que esta herramienta proporciona para el estudio genético en especies no-modelo (Hekman, Johnson y Kukekova, 2015; Eldem et al., 2017), se

han realizado pocos estudios en especies de vida libre (Barshis et al., 2013; Bilyk y Cheng, 2014; Morey et al., 2016; Maor-Landaw et al., 2017; Watson et al., 2017). El estudio de los procesos inmunitarios en especies de vida libre (disciplina conocida como eco-inmunología), permite obtener información acerca del estado de salud de los individuos en condiciones naturales, y observar el efecto de factores bióticos y abióticos naturales sobre las poblaciones (Fassbinder-Orth, 2014). El principal objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de una anomalía climática sobre la expresión genética de las células inmunitarias, leucocitos y linfocitos de una especie no modelo, el lobo marino de California, *Zalophus californianus*.

Se analizaron seis muestras de hembras adultas y seis de crías de CSL, tres de un año con condiciones climáticas anómalas (2014 y 2015, respectivamente), y un año sin condiciones climáticas anómalas, considerado como año control o de referencia (2017). El genoma del lobo marino de California no se encuentra completamente secuenciado ni disponible, por lo que las secuencias obtenidas del RNA-seq se mapearon con las secuencias de ARN de *C. familiaris* y *L. weddellii* disponibles en las bases de datos del Ensembl. El porcentaje de mapeo fue de entre 30 y 55 %, el cual, a pesar de ser tan bajo (Conesa et al., 2016), nos permitió realizar el primer acercamiento transcriptómico de la especie. Además, los transcritos que no mapearon con la base disponible, ahora disponibles para el lobo marino de California, dejan una ventana abierta para su posterior análisis cuando esté disponible la base de datos de esta especie.

A través del análisis de genes diferencialmente expresados, se obtuvieron aquellos que en comparación con el año control (2017), se encontraban sub-expresados o sobre-expresados en adultos y crías en el año anómalo (2014 y 2015). Primeramente, la diferencia de la tendencia de expresión genética entre edades, sobre-regulación en los adultos y sub-regulación en las

crías, sugiere que los procesos de respuesta a las condiciones de estrés son totalmente distintas entre la etapa temprana del desarrollo y la etapa de adulto. De igual forma, las redes de interacción y predicción genética construidas con los DEG's identificados, mostraron una diferencia estructural entre edades. Las redes de las hembras adultas mostraron menor cantidad de conexiones, comparado con la red de las crías. De forma contraria, la red de las crías presentó una alta cantidad de conexiones entre los DEG's obtenidos y los predichos, y las funciones fueron mucho más consistentes que las de las redes de las hembras. Estos resultados podrían ser evidencia de que las hembras y las crías responden de forma distinta bajo ciertas circunstancias, y que los procesos y respuestas que se llevan a cabo en las hembras son más heterogéneos. En humanos y organismos modelo, se sabe que las respuestas a situaciones de estrés dependen, entre otras cosas, de la edad (Novais et al., 2017). En los adultos, las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades son mucho más sutiles (Kelly et al., 2015), y el perfil transcripcional durante la enfermedad es altamente distinto en etapas tempranas (e.g. Pascual et al., 2016). De hecho, existe evidencia de que la variación en la expresión genética incrementa con la edad (Somel et al., 2006).

Los genes sobre-regulados de las hembras adultas estuvieron relacionados principalmente a funciones regulatorias pro-inflamatorias y de regulación positiva del ciclo celular. Uno de estos genes, y el que tuvo el valor q más alto, es el CXCR4, el cual codifica para el receptor de la quimiocina CXCL12. Se ha demostrado que este receptor está involucrado en el desarrollo y proliferación de linfocitos T y B, y en su ausencia, la población de linfocitos se ve severamente reducida (Ara et al., 2003). La expresión de CXCR4 se presenta en linfocitos ingenuos y de memoria (Fernandis, Cherla y Ganju, 2003). También, se ha visto que la expresión

de este receptor incrementa por la presencia de IL4, IL7 e IL15, que participan en la generación de memoria inmunitaria (Jourdan et al., 2000). De esta forma, este receptor y su ligando juegan un papel muy importante en la supervivencia de los linfocitos, y la generación de memoria (Klein y Rubin, 2004). Asimismo, el gen CD83, expresado también en células T y B activadas, presenta funciones de pro-inflamación y proliferación de linfocitos y células dendríticas (Aerts-Toegaert et al., 2007). Otros genes importantes sobre-regulados en los adultos fueron PDE4B y PLAUR, ambos involucrados en la vía del plasminógeno. La activación de PDE4B regula positivamente procesos inflamatorios (Komatsu et al., 2013), y la activación de PLAUR inhibe procesos apoptóticos (Gondi et al., 2007). En conjunto, con base en la sobre-regulación de estos genes en las hembras adultas muestreadas durante el 2014, se sugieren que estas tienen respuestas inmunológicas alteradas. Además, se infiere que las hembras adultas sufrieron una respuesta inflamatoria exacerbada, así como inducción de la proliferación de linfocitos T y B de manera anormal. Los genes sub-regulados de las hembras adultas confirman los procesos antes mencionados. Algunos de estos genes participan en vías de regulación negativa del ciclo celular, como TRIM8 e ING4. (Li *et al.*, 2015; Mastropasqua *et al.*, 2017) Esto quiere decir que, al estar sub-regulados, se inhibe la represión del ciclo celular, lo que induce la proliferación. De hecho, la sub-regulación de estos genes se ha correlacionado con cáncer en algunos tipos celulares (Li et al., 2009; Mastropasqua et al., 2017).

Por otro lado, las funciones de los genes sub-regulados de las crías forman parte de las vías de respuesta del sistema inmune innato. Principalmente de las vías de respuesta de defensa involucradas en la vía RIG-1, la cual es una de las principales vías de respuesta contra infecciones virales (Liu *et al.*, 2016). Los genes sobresalientes para estos procesos fueron IFIT5,

IFIT3, DDX58, DDX60, SAMD9L, PLSCR1 y PARP 14. La familia de genes IFIT son genes que codifican para proteínas que se unen y secuestran el ADN o ARN viral (Pichlmair *et al.*, 2011), además, se unen al factor de iniciación eucariota eIF3, lo que previene la transcripción (Fensterl y Sen, 2011). Los genes DDX codifican para una familia de proteínas caracterizadas por los motivos conservados "DEAD"(Asp-Glu-Ala-Asp) (Abdelhaleem, Maltais y Wain, 2003). Estas forman parte de un complejo involucrado en el reconocimiento viral con los receptores tipo Rlg, conocidos como RLRs; además de ser necesario para la expresión de interferón (Miyashita *et al.*, 2011; Onoguchi, Yoneyama y Fujita, 2011). SAMDL9 además de ser un supresor de tumores, juega un papel importante en la inhibición de la replicación viral, y es inducido también por INF (Tesi *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2018). Por otro lado, PLSCR1 está involucrado en el potenciamiento de la respuesta de IFN incrementando la expresión de genes antivirales (Dong *et al.*, 2004). Finalmente, PARP14 es un gen involucrado en procesos inflamatorios y metabólicos, por lo que su sub-regulación suprime la expresión de genes anti-inflamatorios en leucocitos (Iwata *et al.*, 2016).

Esto sugiere que los individuos nacidos durante la anomalía climática en el 2015 poseen un sistema inmunitario funcionalmente limitado. Esto fortalece los resultados de estudios previos sobre estos individuos, los cuales presentaron una menor condición corporal, concentración de glucosa, menor capacidad de inflamación y de IgG-A (Banuet-Martínez *et al.*, 2017). Con base en estos resultados, sería plausible que si un patógeno nuevo entrara a la población, estos individuos no podrían montar una respuesta de defensa adecuada. Además, se encontró otro gen importante involucrado en la regulación de la homeostasis inmunitaria, CD274, el cual previene respuestas auto-inmunitarias (Wilcox *et al.*, 2009).

La activación y mantenimiento del sistema inmunitario innato es costoso, mientras que la activación y mantenimiento del sistema inmunitario adaptativo no lo es. Lo costoso de este último es el desarrollo, contrario a lo que ocurre con los efectores innatos. McDade *et al.* (2016) generaron la hipótesis de que en condiciones de baja nutrición, baja exposición a patógenos y alto riesgo de mortalidad, los organismos favorecen la defensa del SII. Por el contrario, en condiciones de abundancia nutricional, alta exposición a patógenos y bajo riesgo de mortalidad, se favorece el SIA (McDade, Georgiev y Kuzawa, 2016). Tomando en cuenta esta propuesta, primero, los individuos muestreados durante la anomalía climática se encontraban en condiciones de baja nutrición. Segundo, hasta ahora no hay evidencia de un aumento de la exposición a patógenos durante la anomalía, sin embargo, no es descartable. Tercero, aunque no se conoce el riesgo de mortalidad, si se observó una disminución de cerca del 60% de la población durante la anomalía, incluyendo una baja en la producción de crías y la presencia de crías muertas por aparente inanición (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2016), además de los eventos de mortalidad acontecidos en California en 2013-2016 (NOAA Fisheries, 2018). De esta manera, los resultados de los adultos del 2014 mostraron tendencia a favorecer el funcionamiento del sistema inmune innato, lo que coincide con la hipótesis antes mencionada. Sin embargo, en las crías, se observó lo contrario. Parecen ser individuos con tan baja disponibilidad de recursos, que no pueden invertir ni lo mínimo en respuestas inmunitarias (Banuet-Martínez *et al.*, 2017).

El proceso de estrés es un cambio ambiental repentino que induce celular y molecular e induce respuestas adaptativas para compensar el daño. Se ha generado la idea de que la habilidad de sobrevivir a una condición de estrés generará tolerancia hacia una siguiente

condición más severa (Sóti y Csermely, 2007). Sin embargo, un cambio tan abrupto y agresivo como lo fue La Mancha (Bond *et al.*, 2015), podría generar un daño que sobrepasa las capacidades de tolerancia y adaptación. En el caso de las hembras adultas, se observó una sobre-expresión de la respuesta de estrés celular descrita, como regulación de ROS, proliferación celular e inducción del catabolismo (Kültz, 2005). Para las crías se observó una respuesta de estrés extra-limitada, con inducción de apoptosis y disminución en la regulación genética y el metabolismo celular.

Finalmente, el estrés ambiental durante etapas tempranas del desarrollo en los animales puede tener un efecto en la vida adulta, a través de cambios en la expresión genética (Romens *et al.*, 2015; Ow *et al.*, 2018). Las evidencias hasta ahora presentadas sobre los individuos gestados y nacidos durante una anomalía climática severa, indican que estos podrían tener efectos negativos o adaptativos en la maduración. Incluso, los efectos podrían llegar a trascender siguientes generaciones (Sosa-Larios, Cerbón y Morimoto, 2015; Horsthemke, 2018).

## 2.7 Conclusión

Los organismos vivos responden a los cambios ambientales de forma compleja. Los resultados de este capítulo añaden evidencia a la noción de que cambios ambientales impredecibles pueden impactar la fisiología y salud de los mamíferos marinos. Asimismo, los datos transcriptómicos observados refuerzan los estudios previos sobre el efecto en cambios genéticos y fenotípicos ocasionados por la anomalía climática del 2013-2015 en el Pacífico NE. Los efectos plásticos y adaptativos que podrían tener consecuencias a largo plazo en esta

población requieren ser estudiado desde distintos puntos de vista, en otros tejidos o sistemas fisiológicos, y con otras aproximaciones.

Este trabajo es el primer estudio que cuantifica la variación de la expresión genética de una población silvestre durante una anomalía climática severa. La observación de la marcada diferencia en la expresión genética entre grupos de lobos marinos de California muestreados, sugiere una respuesta de estrés celular consistente. Hay que destacar que los genes observados en este análisis son solo una pequeña parte de los genes que podrían estar jugando un papel en las respuestas de estrés en esta especie. Sin embargo, se encontró evidencia de que el uso del RNA-seq es una herramienta útil para capturar y analizar la expresión genética en un modelo no tradicional de vida libre, incluso con limitada información sobre su genoma.

### 3.1 Conclusión general

EL objetivo principal de esta tesis de maestría fue comprender los efectos de las modificaciones ambientales sobre el sistema inmunitario de un mamífero marino de vida libre. Este es el primer estudio eco-inmunológico en el que se utilizan dos aproximaciones de secuenciación masiva, el REP-seq y el RNA-seq, para evaluar el efecto ambiental sobre las respuestas del sistema inmune.

Las tecnologías de secuenciación y bioinformática se encuentran en auge. Se han convertido en una herramienta ideal para el estudio de modelos no tradicionales, en los que comúnmente se tienen pocos recursos genómicos disponibles. Esta tesis añade información sobre cómo las aproximaciones genómicas tienen el potencial de transformar la forma de los estudios ecológicos en modelos no tradicionales y emergentes. En el primer capítulo se

amplificó y secuenció la región variable del receptor de los linfocitos T, el cual permitirá estudiar el repertorio antigénico de la especie. En el futuro se podrá llevar a cabo el análisis de comparación del repertorio de acuerdo a la distribución biogeográfica de la especie. En el segundo capítulo se demostró como el uso del RNA-seq es una herramienta poderosa para observar el efecto de una variación ambiental sobre la salud de los organismos.

Este es uno de los primeros trabajos, a nivel mundial, en utilizar este tipo de herramientas de secuenciación masiva en un vertebrado de vida libre, con un enfoque eco-inmunológico. Además de ser un acercamiento ecológico novedoso, la información genética obtenida abre nuevos caminos para analizarla de forma específica. Las secuencias de genes identificados permitirán estudiar enfermedades presentes en la población, y quizás analizar el efecto futuro del impacto ambiental sobre esta especie. Por otro lado, las secuencias obtenidas de genes que no se lograron identificar representan un área importante para analizar regiones genómicas específicas de la especie.

## Referencias

- Abdelhaleem, M., Maltais, L. y Wain, H. (2003) "The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases", *Genomics*. Academic Press, 81(6), pp. 618–622. doi: 10.1016/S0888-7543(03)00049-1.
- Abdullah-Sayani, A., Bueno-de-Mesquita, J. M. y van de Vijver, M. J. (2006) "Technology Insight: tuning into the genetic orchestra using microarrays—limitations of DNA microarrays in clinical practice", *Nature Clinical Practice Oncology*. Nature Publishing Group, 3(9), pp. 501–516. doi: 10.1038/ncponc0587.
- Acevedo-Whitehouse, K. *et al.* (2002) "Disease susceptibility in California sea lions", *Nature*, 11264(3927), p. 35. doi: 10.1038/422035a.
- Acevedo-Whitehouse, K. *et al.* (2003) "Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California.", *Journal of wildlife diseases*, 39(1), pp. 145–151. doi: 10.7589/0090-3558-39.1.145.
- Acevedo-Whitehouse, K. y Duffus, A. L. J. (2009) "Effects of environmental change on wildlife health", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), pp. 3429–3438. doi: 10.1098/rstb.2009.0128.
- Adams, M. D. *et al.* (1991) "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.", *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 252(5013), pp. 1651–6. doi: 10.1126/SCIENCE.2047873.
- Adell, A. D. *et al.* (2014) "Molecular Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Mussels (*Mytilus californianus*) and California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from Central California", *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), pp. 7732–7740. doi: 10.1128/AEM.02922-14.
- Aerts-Toegaert, C. *et al.* (2007) "CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses", *European Journal of Immunology*, 37(3), pp. 686–695. doi: 10.1002/eji.200636535.

Aguilar-Ayala, D. A. *et al.* (2017) “The transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 17665. doi: 10.1038/s41598-017-17751-x.

Ahtiainen, J. J. *et al.* (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*. Wiley/Blackwell (10.1111), 18(4), pp. 985–991. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00907.x.

Alberts, B. *et al.* (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science.

Alberts, B. *et al.* (2008) “Chapter 25, The Adaptive Immune System.”, en *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science.

Ali, S. S. *et al.* (2012) “Hypoxia-Adaptation Involves Mitochondrial Metabolic Depression and Decreased ROS Leakage”, *PLoS ONE*. Editado por I. V. Lebedeva. Public Library of Science, 7(5), p. e36801. doi: 10.1371/journal.pone.0036801.

Allison, J. P. y Lanier, L. L. (1987) “Structure, Function, and Serology of the T-Cell Antigen Receptor Complex”, *Annual Review of Immunology*, 5(1), pp. 503–540. doi: 10.1146/annurev.iy.05.040187.002443.

Anders, S. y Huber, W. (2010) “Differential expression analysis for sequence count data”, *Genome Biology*. BioMed Central, 11(10), p. R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.

Ara, T. *et al.* (2003) “A Role of CXC Chemokine Ligand 12/Stromal Cell-Derived Factor-1/Pre-B Cell Growth Stimulating Factor and Its Receptor CXCR4 in Fetal and Adult T Cell Development in Vivo”, *Journal of Immunology*, 170, pp. 4649–4655. doi: 10.4049/jimmunol.170.9.4649.

Arala-Chaves, M. y Sequeira, T. (2000) “Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates?”, *Aquaculture*, 191(1), pp. 247–258. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00430-0.

Ardia, D. R. (2005) “Cross-Fostering Reveals an Effect of Spleen Size and Nest Temperatures on Immune Responses in Nestling European Starlings”, *Oecologia*, 145(2), pp. 327–334. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/20062420>.

- Ashburner, M. *et al.* (2000) "Gene Ontology: tool for the unification of biology", *Nature Genetics*, 25(1), pp. 25–29. doi: 10.1038/75556.
- Aurioles-Gamboa, D. y Camacho-Ríos, F. J. (2007) "Diet and Feeding Overlap of Two Otariids, *Zalophus californianus* and *Arctocephalus townsendi*: Implications to Survive Environmental Uncertainty", *Aquatic Mammals*, 33(3), pp. 315–326. doi: 10.1578/AM.33.3.2007.315.
- Aurioles-Gamboa, D. y Hernández-Camacho, J. (2015a) *Zalophus californianus*: *The IUCN Red List of Threatened Species*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T41666A45230310.en>.
- Aurioles-Gamboa, D. y Hernández-Camacho, J. (2015b) "Zalophus californianus. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: E.T4166645230310." Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T41666A45230310.en>.
- Avalos-Téllez, R. *et al.* (2016) "Pathogenic *Leptospira* serovars in free-living sea lions in the gulf of California and along the Baja California coast of Mexico.", *Journal of Wildlife Diseases*, 52(2), pp. 199–208. doi: 10.7589/2015-06-133.
- Bagaev, D. V *et al.* (2016) "VDJviz: a versatile browser for immunogenomics data", *BMC Genomics*, 17(1), p. 453. doi: 10.1186/s12864-016-2799-7.
- Bai, X. *et al.* (2015) "Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors", *Scientific Reports*, 5, p. 13664. doi: 10.1038/srep13664.
- Bainbridge, M. N. *et al.* (2006) "Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach", *BMC Genomics*, 7(7). doi: 10.1186/1471-2164-7-246.
- Balogh, G. *et al.* (2013) "Key role of lipids in heat stress management", *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, 587(13), pp. 1970–1980. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2013.05.016.
- Banuet-Martínez, M. *et al.* (2017) "Climatic anomaly affects the immune competence of

California sea lions”, *PLoS ONE*, 12(6). doi: 10.1371/journal.pone.0179359.

Barnes, D. M. *et al.* (2002) *Protein metabolism during an acute phase response in chickens\**, *Amino Acids*. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s726-002-8198-6.pdf> (Consultado: el 27 de julio de 2018).

Barnum, K. J. y O’Connell, M. J. (2014) “Cell cycle regulation by checkpoints.”, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. NIH Public Access, 1170, pp. 29–40. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_2.

Barshis, D. J. *et al.* (2013) “Genomic basis for coral resilience to climate change”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), p. 1387. doi: 10.1073/pnas.1210224110.

Bartholomew, G. A. (1970) “A model for the evolution of pinniped polygyny”, 24, pp. 546–559.

Barzilai, A. y Yamamoto, K.-I. (2004) “DNA damage responses to oxidative stress”, *DNA Repair*. Elsevier, 3(8–9), pp. 1109–1115. doi: 10.1016/J.DNAREP.2004.03.002.

Bashford-Rogers, R. J. M. *et al.* (2014) “Capturing needles in haystacks: a comparison of B-cell receptor sequencing methods”, *BMC Immunology*, 15(1), p. 29. doi: 10.1186/s12865-014-0029-0.

Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G. y Elinav, E. (2016) “Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research”, *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, p. BBI.S34610. doi: 10.4137/BBI.S34610.

Bashir-Tanoli, S. y Tinsley, M. C. (2014) “Immune response costs are associated with changes in resource acquisition and not resource reallocation”, *Functional Ecology*. Editado por I. Moore. Wiley/Blackwell (10.1111), 28(4), pp. 1011–1019. doi: 10.1111/1365-2435.12236.

Bateman, A. *et al.* (2017) “UniProt: the universal protein knowledgebase”, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(D1), pp. D158–D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099.

Beck, B. H. *et al.* (2016) “Hepatic transcriptomic and metabolic responses of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*) to acute and chronic hypoxic insult”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. Elsevier, 18, pp. 1–9. doi:

10.1016/J.CBD.2016.01.005.

Behrens, G. *et al.* (2004) "Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity", *Immunol Cell Biol*, 82(1), pp. 84–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01211.x>.

Beney, L. y Gervais, P. (2001) "Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses.", *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1–2), pp. 34–42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11693931> (Consultado: el 23 de julio de 2018).

Benichou, J. *et al.* (2012) "Rep-Seq: uncovering the immunological repertoire through next-generation sequencing", *Immunology*, 135(3), pp. 183–191. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03527.x.

Bennett, E. J. *et al.* (2005) "Global Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Nuclear or Cytoplasmic Protein Aggregates Precedes Inclusion Body Formation", *Molecular Cell*, 17, pp. 351–365. doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.021.

Berger, A. (2000) "Th1 and Th2 responses: what are they?", *BMJ : British Medical Journal*, 321(7258), p. 424. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27457/>.

Betts, J. C. (2002) "Critical Review Transcriptomics and Proteomics: Tools for the Identification of Novel Drug Targets and Vaccine Candidates for Tuberculosis", *IUBMB Life*, 53, pp. 239–242. doi: 10.1080/15216540290098990.

Beutler, B. (2004) "Innate immunity: an overview", *Innate Immunity*, 40(12), pp. 845–859. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005.

Biedermann, T., Ruckelshausen, M. y Carballido, J. L. M. (2004) *TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell Mediated Immune Responses of the Skin*, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. doi: 10.1111/j.1087-0024.2004.00829.x.

Bikel, S. *et al.* (2015) "Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome", *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, pp. 390–401. doi:

10.1016/j.csbj.2015.06.001.

Bilyk, K. T. y Cheng, C.-H. C. (2014) “RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic cryopelagic nototheniid fish *Pagothenia borchgrevinki*”, *Marine Genomics*. Elsevier, 18, pp. 163–171. doi: 10.1016/J.MARGEN.2014.06.006.

Bjorkman, P. J. (1997) “MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions”, *Cell*, 89(2), pp. 167–170. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80195-6.

Bluestone, J. A. *et al.* (1991) “Ligand Specificity and Repertoire Development of Murine TCR $\gamma\delta$  Cells”, en Pfeiffer K., Heeg K., Wagner H., Riethmüller G. (eds) *Function and Specificity of  $\gamma\delta$  T Cells*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 173. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 133–139. doi: 10.1007/978-3-642-76492-9\_18.

Blum, J. S., Wearsch, P. A. y Cresswell, P. (2013) “Pathways of Antigen Processing”, 31(1), pp. 443–473. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.

Boehm, T. *et al.* (2012) “VLR-Based Adaptive Immunity”, 30(1), pp. 203–220. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075038.

Bolotin, D. A. *et al.* (2013) “MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis”, 10(9), pp. 813–814. doi: 10.1038/nmeth.2555.

Bolotin, D. A. *et al.* (2015) “MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling”, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 12(5), pp. 380–381. doi: 10.1038/nmeth.3364.

Bond, N. A. *et al.* (2015) “Causes and impacts of the 2014 warm anomaly in the NE Pacific”, *Geophysical Research Letters*, 42(9), pp. 3414–3420. doi: 10.1002/2015GL063306.

Bonneaud, C. *et al.* (2003) “Assessing the cost of mounting an immune response.”, *The American naturalist*, 161(3), pp. 367–379. doi: 10.1086/346134.

Borghesi, L. y Milcarek, C. (2007) “Innate versus adaptive immunity: A paradigm past its prime?”, *Cancer Research*, 67(9), pp. 3989–3993. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0182.

Boria, I. *et al.* (2008) “Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable

regions”, *BMC Immunology*, 9, p. 50. doi: 10.1186/1471-2172-9-50.

Borst, J., Jacobs, H. y Brouns, G. (1996) “Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes”, *Current Opinion in Immunology*, 8(2), pp. 181–190. doi: 10.1016/S0952-7915(96)80056-2.

Bos, J. D. y Kapsenberg, M. L. (1986) “The skin immune system Its cellular constituents and their interactions”, *Immunology Today*, 7(7), pp. 235–240. doi: 10.1016/0167-5699(86)90111-8.

Bossart, G. D. (2011) “Marine mammals as sentinel species for oceans and human health.”, *Veterinary pathology*, 48(3), pp. 676–690. doi: 10.5670/oceanog.2006.77.

Bouvet, J.-P. (1994) “Immunoglobulin Fab fragment-binding proteins”, *International Journal of Immunopharmacology*, 16(5–6), pp. 419–424. doi: 10.1016/0192-0561(94)90031-0.

Bowen, L. *et al.* (2006) “MHC gene configuration variation in geographically disparate populations of California sea lions (*Zalophus californianus*)”, *Molecular Ecology*, 15(2), pp. 529–533. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02612.x.

Boyd, S. D. *et al.* (2010) “Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements”, *J Immunol*, 184. doi: 10.4049/jimmunol.1000445.

Boyd, S. D. *et al.* (2013) “Human lymphocyte repertoires in ageing”, *Curr Opin Immunol*, 25. doi: 10.1016/j.coi.2013.07.007.

Bray, N. L. *et al.* (2016) “Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification”, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 34(5). doi: 10.1038/nbt.3519.

Brazeau, M. D. y Friedman, M. (2015) “The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates.”, *Nature*. Europe PMC Funders, 520(7548), pp. 490–7. doi: 10.1038/nature14438.

Brochet, X., Lefranc, M.-. P. y Giudicelli, V. (2008) “IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis”, *Nucleic Acids Res*, 36. doi: 10.1093/nar/gkn316.

Brock, P. M. *et al.* (2013) “Applying the tools of ecological immunology to conservation: A test

case in the Galapagos sea lion”, *Animal Conservation*, 16(1), pp. 19–31. doi: 10.1111/j.1469-1795.2012.00567.x.

Brown, P. O. y Botstein, D. (1999) “Exploring the new world of the genome with DNA microarrays”, *Nature Genetics*, 21(1 Suppl), pp. 33–37. doi: 10.1038/4462.

Buchanan, J. B., Peloso, E. y Satinoff, E. (2003) “Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats”, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(5), pp. R1165–R1169. doi: 10.1152/ajpregu.00238.2003.

Buckles, E. L. *et al.* (2006) “Otarine Herpesvirus-1, not Papillomavirus, is Associated with Endemic Tumours in California Sea Lions (*Zalophus californianus*)”, *Journal of Comparative Pathology*, 135(4), pp. 183–189. doi: 10.1016/j.jcpa.2006.06.007.

Buda, C. *et al.* (1994) “Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 91(17), pp. 8234–8. doi: 10.1073/PNAS.91.17.8234.

Burnet, F. M. (1976) “A modification of Jerne’s theory of antibody production using the concept of clonal selection”, *CA: a cancer journal for clinicians*, 26(2), pp. 119–121.

Calis, J. J. A. y Rosenberg, B. R. (2014) “Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications”, *Trends in Immunology*, 35(12), pp. 581–590. doi: 10.1016/j.it.2014.09.004.

Calzadilla, P. I. *et al.* (2016) “Transcriptome Response Mediated by Cold Stress in Lotus japonicus”, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers, 7, p. 374. doi: 10.3389/fpls.2016.00374.

Cao, X. *et al.* (2016) “High throughput sequencing reveals the diversity of TRB-CDR3 repertoire in patients with psoriasis vulgaris”, *International Immunopharmacology*, 40, pp. 487–491. doi: 10.1016/j.intimp.2016.10.004.

Carlson-Bremer, D. *et al.* (2015) “Epidemiology and pathology of *Toxoplasma gondii* in free-ranging California sea lions (*Zalophus californianus*)”, *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), pp.

362–373. doi: 10.7589/2014-08-205.

Carretta, J. V *et al.* (2009) “US Pacific marine mammal stock assessments: 2009”. Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/usdeptcommercepub/114/>.

Carruthers, M. *et al.* (2018) “De novo transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species”, *BMC Genomics*, 19. doi: 10.1186/s12864-017-4379-x.

Case, T. J., Cody, M. L. y Ezcurra, E. (2002) *A new island biogeography of the Sea of Cortés*. New York: Oxford University Press.

Casneuf, T., Van de Peer, Y. y Huber, W. (2007) “In situ analysis of cross-hybridisation on microarrays and the inference of expression correlation”, *BMC Bioinformatics*, 8(1), p. 461. doi: 10.1186/1471-2105-8-461.

Castel, S. E. *et al.* (2015) “Tools and best practices for data processing in allelic expression analysis”, *Genome Biology*. BioMed Central, 16(1), p. 195. doi: 10.1186/s13059-015-0762-6.

Castro-Melchor, M., Le, H. y Hu, W.-S. (2012) “Transcriptome Data Analysis for Cell Culture Processes”, *Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 127, pp. 27–70. doi: 10.1007/10\_2011\_116.

Chen, F. *et al.* (2010) “Cellular stress responses: a balancing act.”, *Molecular cell*. Elsevier, 40(2), p. 175. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.008.

Chen, P.-W. *et al.* (2015) “Dynamics of the Heat Stress Response of Ceramides with Different Fatty-Acyl Chain Lengths in Baker’s Yeast”, *PLOS Computational Biology*. Editado por J. Stelling. Public Library of Science, 11(8), p. e1004373. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004373.

Chen, Z., Chen, L. y Zhang, W. (2017) “Tools for Genomic and Transcriptomic Analysis of Microbes at Single-Cell Level”, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 1831. doi: 10.3389/fmicb.2017.01831.

Chien, Y. y Jores, R. (1995) “ $\gamma\delta$  T Cells: T cells with B-cell-like recognition properties”, *Current Biology*, 5(10), pp. 1116–1118. doi: 10.1016/S0960-9822(95)00225-9.

Chisholm, J. S. *et al.* (1993) "Death, Hope, and Sex: Life-History Theory and the Development of Reproductive Strategies [and Comments and Reply]", *Current Anthropology*, 34(1), pp. 1–24. doi: 10.1086/204131.

Christmann, M. *et al.* (2003) "Mechanisms of human DNA repair: an update", *Toxicology*. Elsevier, 193(1–2), pp. 3–34. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00287-7.

Chust, G. *et al.* (2014) "Biomass changes and trophic amplification of plankton in a warmer ocean", *Global Change Biology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 20(7), pp. 2124–2139. doi: 10.1111/gcb.12562.

Ciofani, M. y Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007) "The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), pp. 463–493. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123547.

Clark, R. y Kupper, T. (2005) "Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity", *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4), pp. 629–637. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x.

Clevers, H. *et al.* (1988) "The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble", *Annual Review of Immunology*, 6(1), pp. 629–662. doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.003213.

Cloonan, N. *et al.* (2008) "Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing", *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 5(7), pp. 613–619. doi: 10.1038/nmeth.1223.

Cokus, S. J. *et al.* (2008) "Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning", *Nature*. Nature Publishing Group, 452(7184), pp. 215–219. doi: 10.1038/nature06745.

Colagross-Schouten, A. M. *et al.* (2002) "Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California.", *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), pp. 7–17. doi: 10.7589/0090-3558-38.1.7.

Colditz, I. G. (2009) "Allocation of resources to immune responses", en Rauw, W. M. (ed.)

*Resource allocation theory applied to farm animal production*. Wallingford, UK.: CABI, pp. 192–209. doi: 10.1079/9781845933944.0000.

Conesa, A. *et al.* (2016) “A survey of best practices for RNA-seq data analysis”. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8.

Cornwell, R. E. *et al.* (2006) “Reproductive strategy, sexual development and attraction to facial characteristics.”, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 361(1476), pp. 2143–54. doi: 10.1098/rstb.2006.1936.

Costa, A. I. *et al.* (2015) “Complex T-Cell Receptor Repertoire Dynamics Underlie the CD8+ T-Cell Response to HIV-1”, *Journal of Virology*, 89(1), pp. 110–119. doi: 10.1128/JVI.01765-14.

Costa, V. *et al.* (2013) “RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives”, *European Journal of Human Genetics*, 21, pp. 134–142. doi: 10.1038/ejhg.2012.129.

Cox, J. W. *et al.* (2017) “A fast and robust protocol for metataxonomic analysis using RNAseq data”, *Microbiome*. BioMed Central, 5(1), p. 7. doi: 10.1186/s40168-016-0219-5.

Croucher, N. J. y Thomson, N. R. (2010) “Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq.”, *Current opinion in microbiology*. Elsevier, 13(5), pp. 619–24. doi: 10.1016/j.mib.2010.09.009.

Cruse, J. M. y Lewis, R. E. (2000) *Atlas of Immunology*. 3a ed. CRC Press.

Dash, P., Wang, G. C. y Thomas, P. G. (2015) “Single-Cell Analysis of T-Cell Receptor  $\alpha\beta$  Repertoire”, en Humana Press, New York, NY, pp. 181–197. doi: 10.1007/978-1-4939-2963-4\_15.

Davis, M. M. y Bjorkman, P. J. (1988) “T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition”, *Nature*, 334(6181), pp. 395–402. doi: 10.1038/334395a0.

Dembic, Z. (2015a) “Chapter 3 - Activation of Cells of the Immune System”, en *The Cytokines of the Immune System*. Amsterdam: Academic Press, pp. 57–98. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124199989000031>.

Dembic, Z. (2015b) "Chapter 4 - The Role and Regulation of the Immune Responses", en *The Cytokines of the Immune System*. Amsterdam: Academic Press, pp. 99–122. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124199989000043>.

Deng, L. *et al.* (2013) "Structural insights into the evolution of the adaptive immune system.", *Annual review of biophysics*, 42(1), pp. 191–215. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130422.

Deng, X. *et al.* (2018) "Comparative transcriptome analysis reveals phytohormone signalings, heat shock module and ROS scavenger mediate the cold-tolerance of rubber tree", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 4931. doi: 10.1038/s41598-018-23094-y.

Dobin, A. *et al.* (2013) "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner", *Bioinformatics*. Oxford University Press, 29(1), pp. 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Dobson, C. M. (2003) "Protein folding and misfolding", *Nature*, 426(6968), pp. 884–890. doi: 10.1038/nature02261.

Doherty, P. C. y Zinkernagel, R. M. (1975) "A BIOLOGICAL ROLE FOR THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS", *Originally published as Volume 1, Issue 7922*, 305(7922), pp. 1406–1409. doi: 10.1016/S0140-6736(75)92610-0.

Doney, S. C. *et al.* (2012) "Climate Change Impacts on Marine Ecosystems", *Annual Review of Marine Science*. Annual Reviews , 4(1), pp. 11–37. doi: 10.1146/annurev-marine-041911-111611.

Dong, B. *et al.* (2004) "Phospholipid Scramblase 1 Potentiates the Antiviral Activity of Interferon", *JOURNAL OF VIROLOGY*, 78(17), pp. 8983–8993. doi: 10.1128/JVI.78.17.8983-8993.2004.

Dong, Y., Taylor, H. E. y Dimopoulos, G. (2006) "AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System", *PLOS Biology*, 4(7), p. e229. doi: 10.1371/journal.pbio.0040229.

van Dongen, J. J. M. *et al.* (2003) "Design and standardization of PCR primers and protocols for

detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936”, *Leukemia*, 17, p. 2257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>.

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*. NRC Research Press Ottawa, Canada , 81(8), pp. 1406–1413. doi: 10.1139/z03-120.

Dziubianau, M. *et al.* (2013) “TCR Repertoire Analysis by Next Generation Sequencing Allows Complex Differential Diagnosis of T Cell–Related Pathology”, *American Journal of Transplantation*, 13(11), pp. 2842–2854. doi: 10.1111/ajt.12431.

Eldem, V. *et al.* (2017) “Transcriptome Analysis for Non-Model Organism: Current Status and Best-Practices”, en *Applications of RNA-Seq and Omics Strategies - From Microorganisms to Human Health*. InTech. doi: 10.5772/intechopen.68983.

Elgert, K. D. (2009) *Immunology: Understanding The Immune System*. 2a ed. Blacksburg, Virginia: Wiley-BlackWell.

Elhanati, Y. *et al.* (2015) “Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1676). doi: 10.1098/rstb.2014.0243.

Elorriaga-Verplancken, F. R. *et al.* (2016) “Impact of the 2015 El Niño-Southern Oscillation on the Abundance and Foraging Habits of Guadalupe Fur Seals and California Sea Lions from the San Benito Archipelago, Mexico”. Editado por D. E. Crocker. Public Library of Science, 11(5), p. e0155034. doi: 10.1371/journal.pone.0155034.

Emerson, R. O. *et al.* (2013) *High-throughput sequencing of T cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer*. doi: 10.1002/path.4260.

Enjalbert, B., Nantel, A. y Whiteway, M. (2003) “Stress-induced Gene Expression in *Candida albicans* : Absence of a General Stress Response”, *Molecular Biology of the Cell*. Editado por E.

A. Craig, 14(4), pp. 1460–1467. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0546.

Eraud, C. *et al.* (2005) “The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs?”, *Functional Ecology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 19(1), pp. 110–118. doi: 10.1111/j.0269-8463.2005.00934.x.

Escribá, P. V. *et al.* (2008) “Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Wiley/Blackwell (10.1111), 12(3), pp. 829–875. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x.

Estruch, F. (2000) “Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast.”, *FEMS microbiology reviews*, 24(4), pp. 469–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978547> (Consultado: el 25 de julio de 2018).

Evans, T. G. *et al.* (2017) “Transcriptomic responses to seawater acidification among sea urchin populations inhabiting a natural pH mosaic”, *Molecular Ecology*, 26(8), pp. 2257–2275. doi: 10.1111/mec.14038.

FANTOM Consortium, T. *et al.* (2014) “A promoter-level mammalian expression atlas”, *Nature*. Nature Publishing Group, 507(7493), pp. 462–470. doi: 10.1038/nature13182.

Fassbinder-Orth, C. A. (2014) “Methods for Quantifying Gene Expression in Ecoimmunology: From qPCR to RNA-Seq”, *Integrative and Comparative Biology*. Oxford University Press, 54(3), pp. 396–406. doi: 10.1093/icb/icu023.

Fensterl, V. y Sen, G. C. (2011) “The ISG56/IFIT1 Gene Family”, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), pp. 71–78. doi: 10.1089/jir.2010.0101.

Fernandis, A. Z., Cherla, R. P. y Ganju, R. K. (2003) “Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45.”, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(11), pp. 9536–43. doi: 10.1074/jbc.M211803200.

Findly, R. C., Niagro, F. D. y Dickerson, H. W. (2017) “The expressed TCR $\beta$  CDR3 repertoire is

dominated by conserved DNA sequences in channel catfish”, *Developmental & Comparative Immunology*, 68, pp. 26–33. doi: 10.1016/j.dci.2016.11.010.

Fisher, R. A., Corbet, A. S. y Williams, C. B. (1943) “The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population”, *Journal of Animal Ecology*, 12(1), pp. 42–58. doi: 10.2307/1411.

Flick, K. y Kaiser, P. (2012) “Protein degradation and the stress response”, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(5), pp. 515–522. doi: 10.1016/j.semcd.2012.01.019.

Flores-Morán, A. *et al.* (2017) “Atypical Red Blood Cells Are Prevalent in California Sea Lion Pups Born during Anomalous Sea Surface Temperature Events”, *Physiological and Biochemical Zoology*, 90(5), pp. 564–574. doi: 10.1086/692919.

da Fonseca, R. R. *et al.* (2016) “Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms”, *Marine Genomics*, 30(Supplement C), pp. 3–13. doi: 10.1016/j.margen.2016.04.012.

Fozza, C. *et al.* (2017) “Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping”, *Journal of Immunological Methods*, 440, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.jim.2016.11.001.

Freeman, J. D. *et al.* (2009) “Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing”, *Genome Res*, 19. doi: 10.1101/gr.092924.109.

Frohman, M. A., Dush, M. K. y Martin, G. R. (1988) “Rapid Production of Full-Length cDNAs from Rare Transcripts: Amplification Using a Single Gene-Specific Oligonucleotide Primer”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), pp. 8998–9002. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/32873>.

Frölicher, T. L. y Laufkötter, C. (2018) “Emerging risks from marine heat waves”, *Nature Communications*. doi: 10.1038/s41467-018-03163-6.

Fugmann, S. D. (2010) “The origins of the Rag genes—From transposition to V(D)J recombination”, *Evolution of innate and adaptive immune recognition structures*, 22(1), pp. 10–16. doi: 10.1016/j.smim.2009.11.004.

Fujii, T., Nakagawa, H. y Murakawa, S. (1979) "Immunity in lamprey I. Production of haemolytic and haemagglutinating antibody to sheep red blood cells in Japanese lampreys", *Developmental & Comparative Immunology*, 3(Supplement C), pp. 441–451. doi: 10.1016/S0145-305X(79)80040-3.

Fujiwara, D. *et al.* (1998) "Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, ATF1 and  $\Delta$ -9 fatty acid desaturase gene, OLE1 by unsaturated fatty acids", *Yeast*, 14(8), pp. 711–721. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980615)14:8<711::AID-YEA263>3.0.CO;2-8.

Fulda, S. *et al.* (2010) "Cellular stress responses: cell survival and cell death.", *International journal of cell biology*. Hindawi, 2010, p. 214074. doi: 10.1155/2010/214074.

Galbraith, R. (2015) "The blob" in Pacific Ocean might be to blame for California drought, erratic US weather - studies — RT US News. Disponible en: <https://www.rt.com/usa/248749-blob-pacific-california-drought/> (Consultado: el 23 de julio de 2018).

Galson, J. D. *et al.* (2015) "BCR repertoire sequencing: different patterns of B-cell activation after two Meningococcal vaccines.", *Immunology and cell biology*, 93(10), pp. 885–895. doi: 10.1038/icb.2015.57.

Gan, Y. *et al.* (2011) "A Comparison Between Northern Blotting and Quantitative Real-Time PCR as a Means of Detecting the Nutritional Regulation of Genes Expressed in Roots of *Arabidopsis thaliana*", *Agricultural Sciences in China*. Elsevier, 10(3), pp. 335–342. doi: 10.1016/S1671-2927(11)60012-6.

Gao, F. y Wang, K. (2015) "Ligation-anchored PCR unveils immune repertoire of TCR-beta from whole blood", *BMC Biotechnology*, 15(1), p. 39. doi: 10.1186/s12896-015-0153-9.

García-Rodríguez, F. J. y Aurióles-Gamboa, D. (2004) "Spatial and temporal variation in the diet of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico", *Fishery Bulletin*, 102(1), pp. 47–62. Disponible en: <http://aquaticcommons.org/15030/>.

Gasch, A. P. *et al.* (2000) "Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to

Environmental Changes”, *Molecular Biology of the Cell*. Editado por P. A. Silver, 11(12), pp. 4241–4257. doi: 10.1091/mbc.11.12.4241.

Gasteiger, G. y Rudensky, A. Y. (2014) “Interactions between innate and adaptive lymphocytes”, *Nat Rev Immunol*, 14(9), pp. 631–639. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3726>.

van der Geest, K. S. M. *et al.* (2015) “Quantifying Distribution of Flow Cytometric TCR-V $\beta$  Usage with Economic Statistics”, *PLOS ONE*, 10(4), p. e0125373. doi: 10.1371/journal.pone.0125373.

Gerritsen, B. *et al.* (2016) “RTCR: a pipeline for complete and accurate recovery of T cell repertoires from high throughput sequencing data”, *Bioinformatics*, 32(20), pp. 3098–3106. doi: 10.1093/bioinformatics/btw339.

Giudicelli, V., Chaume, D. y Lefranc, M.-P. (2004) “IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V–J and V–D–J rearrangement analysis”, *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), pp. W435–W440. doi: 10.1093/nar/gkh412.

Glanville, J. *et al.* (2011) “Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108. doi: 10.1073/pnas.1107498108.

Gliddon, H. D. *et al.* (2018) “Genome-wide host RNA signatures of infectious diseases: discovery and clinical translation”, *Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 153(2), pp. 171–178. doi: 10.1111/imm.12841.

Gondi, C. S. *et al.* (2007) “Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway.”, *International journal of oncology*, 31(1), pp. 19–27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17549401> (Consultado: el 22 de octubre de 2018).

González-Suárez, M. *et al.* (2009) “Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: redefining management stocks”, *Molecular Ecology*, 18(6), pp. 1088–1099. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04093.x.

Gorski, J. *et al.* (1994) “Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping: Correlation with immune status.”, *The*

*Journal of Immunology*, 152(10), p. 5109. Disponible en:

<http://www.jimmunol.org/content/152/10/5109.abstract>.

Granick, J. L., Simon, S. I. y Borjesson, D. L. (2012) "Hematopoietic Stem and Progenitor Cells as Effectors in Innate Immunity". doi: 10.1155/2012/165107.

Graves, R. (1955) *The Greek Myths*. 1a ed. Penguin books.

Groscurth, P. y Filgueira, L. (1998) "Killing Mechanisms of Cytotoxic T Lymphocytes", *Physiology*, 13(1), p. 17. Disponible en: <http://physiologyonline.physiology.org/content/13/1/17.abstract>.

Gross, M. R. (1996) "Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes", *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 11(2), pp. 92–98. doi: 10.1016/0169-5347(96)81050-0.

Gu, F. y Wang, X. (2015) "Analysis of allele specific expression - a survey", *Tsinghua Science and Technology*, 20(5), pp. 513–529. doi: 10.1109/TST.2015.7297750.

Gu, J. *et al.* (2015) "Transcriptomic responses of corpuscle of Stannius gland of Japanese eels (*Anguilla japonica*) to changes in water salinity.", *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 5, p. 9836. doi: 10.1038/srep09836.

Gulland, F. M. D. *et al.* (1996) "Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981–1994", *Journal of Wildlife Diseases*, 32(4), pp. 572–580. doi: 10.7589/0090-3558-32.4.572.

Gulland, F. M. D. y Hall, A. J. (2007) "Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease", *EcoHealth*, 4(2), pp. 135–150. doi: 10.1007/s10393-007-0097-1.

Guy-Grand, D. *et al.* (2003) "Extrathymic T Cell Lymphopoiesis: Ontogeny and Contribution to Gut Intraepithelial Lymphocytes in Athymic and Euthymic Mice", *The Journal of Experimental Medicine*, 197(3), pp. 333–341. doi: 10.1084/jem.20021639.

Haas, W., Pereira, P. y Tonegawa, S. (1993) "Gamma/Delta Cells", *Annual Review of Immunology*, 11(1), pp. 637–685. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225.

Haddaji, N. *et al.* (2017) "Effect of environmental stress on cell surface and membrane fatty acids of *Lactobacillus plantarum*", *Archives of Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 199(9), pp. 1243–1250. doi: 10.1007/s00203-017-1395-9.

Haider, S. *et al.* (2009) "BioMart Central Portal—unified access to biological data", *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_2), pp. W23–W27. doi: 10.1093/nar/gkp265.

Halle, S. *et al.* (2016) "In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity", *Immunity*, 44(2), pp. 233–245. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.010.

Hardcastle, T. J. y Kelly, K. A. (2010) "baySeq: Empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data", *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 11(1), p. 422. doi: 10.1186/1471-2105-11-422.

Hartmann, D. L. (2015) "Pacific sea surface temperature and the winter of 2014", *Geophysical Research Letters*. Wiley-Blackwell, 42(6), pp. 1894–1902. doi: 10.1002/2015GL063083.

Hauton, C. y Smith, V. J. (2007) "Adaptive immunity in invertebrates: A straw house without a mechanistic foundation", *BioEssays*, 29(11), pp. 1138–1146. doi: 10.1002/bies.20650.

Heath, C. B. y Perrin, W. F. (2009) "C - California, Galapagos, and Japanese Sea Lions: *Zalophus californianus*, *Z. wollebaeki*, and *Z. japonicus*", en *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*. London: Academic Press, pp. 170–176. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123735539000468>.

Hein, W. R. y Mackay, C. R. (1991) "Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system", *Immunology Today*, 12(1), pp. 30–34. doi: 10.1016/0167-5699(91)90109-7.

Hekman, J. P., Johnson, J. L. y Kukekova, A. V (2015) "Transcriptome Analysis in Domesticated Species: Challenges and Strategies.", *Bioinformatics and biology insights*. SAGE Publications, 9(Suppl 4), pp. 21–31. doi: 10.4137/BBI.S29334.

Henry, V. J. *et al.* (2014) "OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis", *Database*, 2014, pp. bau069–bau069. doi: 10.1093/database/bau069.

- Henson, S. A. *et al.* (2017) "Rapid emergence of climate change in environmental drivers of marine ecosystems", *Nature Publishing Group*, 8(14682). doi: 10.1038/ncomms14682.
- Hernandez, C. C. J. (2009) *Demography of California sea lion colonies in the Gulf of California Mexico*. Arizona State University.
- Hill, A. V. S. (2001) "Immunogenetics and genomics", *Lancet*, 357(9273), pp. 2037–2041. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05117-5.
- Hirose, J. *et al.* (2002) "A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow", *Immunological Reviews*, 189(1), pp. 28–40. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.18904.x.
- Hoehn, K. B. *et al.* (2016) "The Diversity and Molecular Evolution of B-Cell Receptors during Infection", *Molecular Biology and Evolution*, 33(5), pp. 1147–1157. doi: 10.1093/molbev/msw015.
- Hornbeck, P. V. *et al.* (2015) "PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 43(D1), pp. D512–D520. doi: 10.1093/nar/gku1267.
- Horsthemke, B. (2018) "A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 2973. doi: 10.1038/s41467-018-05445-5.
- Horvath, D. P. *et al.* (2003) "Arabidopsis microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species", *The Plant Journal*. Wiley/Blackwell (10.1111), 34(1), pp. 125–134. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01706.x.
- Horváth, I. *et al.* (2008) "Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones". doi: 10.1016/j.bbamem.2008.02.012.
- Hou, X.-L. *et al.* (2016) "Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire", *Genes Immun*, 17(3), pp. 153–164. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/gene.2016.9>.

Hou, X. *et al.* (2016) "Analysis of the Repertoire Features of TCR Beta Chain CDR3 in Human by High-Throughput Sequencing", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(2), pp. 651–667. Disponible en: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000445656>.

Hrdlickova, R., Toloue, M. y Tian, B. (2017) "RNA-Seq methods for transcriptome analysis", *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1), p. e1364–n/a. doi: 10.1002/wrna.1364.

Hu, M. y Polyak, K. (2006) "Serial analysis of gene expression", *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 1(4), pp. 1743–1760. doi: 10.1038/nprot.2006.269.

Hu, W. *et al.* (2017) "Comparative physiological and transcriptomic analyses provide integrated insight into osmotic, cold and salt stress tolerance mechanisms in banana", *Scientific Reports*, 7(1), p. 43007. doi: 10.1038/srep43007.

Huth, T. J. y Place, S. P. (2016) "RNA-seq reveals a diminished acclimation response to the combined effects of ocean acidification and elevated seawater temperature in *Pagothenia borchgrevinkii*", *Marine Genomics*. Elsevier, 28, pp. 87–97. doi: 10.1016/J.MARGEN.2016.02.004.

Ilmonen, P. *et al.* (2003) "Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation", *Oecologia*. Springer-Verlag, 136(1), pp. 148–154. doi: 10.1007/s00442-003-1243-2.

Ilmonen, P., Taarna, T. y Hasselquist, D. (2002) "Are incubation costs in female pied flycatchers expressed in humoral immune responsiveness or breeding success?", *Oecologia*. Springer Berlin Heidelberg, 130(2), pp. 199–204. doi: 10.1007/s004420100804.

Iwata, H. *et al.* (2016) "PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 12849. doi: 10.1038/ncomms12849.

Jabbari, A. *et al.* (2012) "Transcriptional Profiling of Psoriasis Using RNA-seq Reveals Previously Unidentified Differentially Expressed Genes", *Journal of Investigative Dermatology*, 132(1), pp. 246–249. doi: 10.1038/jid.2011.267.

- Janeway, C. *et al.* (2009) *Inmunobiología de Janeway*. México: McGraw-Hill.
- Jazayeri, S. M. *et al.* (2015) "RNA-SEQ: A Glance at technologies and methodologies", *Acta Biológica Colombiana*, 20(2). doi: 10.15446/abc.v20n2.43639.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. y Rudensky, A. Y. (2012) "Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function", *Annual Review of Immunology*, 30(1), pp. 531–564. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- Jourdan, P. *et al.* (2000) "Cytokines and Cell Surface Molecules Independently Induce CXCR4 Expression on CD41 CCR7 Human Memory T Cells", *Journal of Immunology*, 165, p. 716'724. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.716.
- Jung, D. y Alt, F. W. (2004) "Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation", *Cell*, 116(2), pp. 299–311. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00039-X.
- Katz, D. H. (1977a) "IX - Functional Properties of B Lymphocytes", en *Lymphocyte Differentiation, Recognition, and Regulation*. Academic Press, pp. 343–381. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124016408500149>.
- Katz, D. H. (1977b) "V - Ontogeny of the Two Major Classes of Lymphocytes", en *Lymphocyte Differentiation, Recognition, and Regulation*. Academic Press, pp. 119–151. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124016408500101>.
- Katz, D. H. y Benacerraf, B. (1972) "The Regulatory Influence of Activated T Cells on B Cell Responses to Antigen", en Kunkel, F. J. D. and H. G. (ed.) *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 1–94. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277608606835>.
- Kelly, C. P. *et al.* (2015) "Advances in diagnosis and management of celiac disease.", *Gastroenterology*. Elsevier, 148(6), pp. 1175–86. doi: 10.1053/j.gastro.2015.01.044.
- Khaware, R. K., Koul, A. y Prasad, R. (1995) "High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*.", *Biochemistry and molecular biology international*, 35(4), pp. 875–80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627136> (Consultado: el 28 de mayo

de 2018).

Kidd, B. A. *et al.* (2014) "Unifying immunology with informatics and multiscale biology", *Nat Immunol*, 15(2), pp. 118–127. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2787>.

Kilpimaa, J., Alatalo, R. V y Siitari, H. (2004) "Trade-offs between sexual advertisement and immune function in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*).", *Proceedings. Biological sciences. The Royal Society*, 271(1536), pp. 245–50. doi: 10.1098/rspb.2003.2568.

Kim, D. *et al.* (2013) "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions", *Genome Biology*. BioMed Central, 14(4), p. R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.

Kimbrel, J. A. *et al.* (2011) "RNA-Seq for Plant Pathogenic Bacteria", *Genes*, 2, pp. 689–705. doi: 10.3390/genes2040689.

King, J. E. (1983) *Seals of the world*. 2a ed. British Museum (Natural History), London, UK, and Cornell University Press, Ithaca, New York.

King, L. E. *et al.* (2016) "Differential RNA-seq analysis comparing APC-defective and APC-restored SW480 colorectal cancer cells", *Genomics Data*. Elsevier, 7, pp. 293–296. doi: 10.1016/J.GDATA.2016.02.001.

Kintisch, E. (2015) "Marine science. 'The Blob' invades Pacific, flummoxing climate experts.", *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 348(6230), pp. 17–8. doi: 10.1126/science.348.6230.17.

Kitaura, K. *et al.* (2016) "A new high-throughput sequencing method for determining diversity and similarity of T cell receptor (TCR)  $\alpha$  and  $\beta$  repertoires and identifying potential new invariant TCR  $\alpha$  chains", *BMC Immunology*, 17, p. 38. doi: 10.1186/s12865-016-0177-5.

Klasing, K. C. (2004) "The costs of immunity", 50(6), pp. 961–969.

Klein, J. (1998) "In an immunological twilight zone.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 95(20), pp. 11504–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751693> (Consultado: el 7 de agosto de

2018).

Klein, J. y Hořejší, V. (1997) *Immunology*. 2a ed. Oxford: Blackwell Science.

Klein, R. S. y Rubin, J. B. (2004) “Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity.”, *Trends in immunology*. Elsevier, 25(6), pp. 306–14. doi: 10.1016/j.it.2004.04.002.

Komatsu, K. *et al.* (2013) “Inhibition of PDE4B suppresses inflammation by increasing expression of the deubiquitinase CYLD”, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 1684. doi: 10.1038/ncomms2674.

Konigshofer, Y. y Chien, Y. (2006) “ $\gamma\delta$  T cells — innate immune lymphocytes?”, *Innate lymphocytes/Transplantation/Immunogenetics*, 18(5), pp. 527–533. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.008.

Konishi, T. (2016) “Parametric analysis of RNA-seq expression data”, *Genes to Cells*. Wiley/Blackwell (10.1111), 21(6), pp. 639–647. doi: 10.1111/gtc.12372.

Koonin, E. V. (2000) “How many genes can make a cell: The Minimal-Gene-Set Concept”, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1(1), pp. 99–116. doi: 10.1146/annurev.genom.1.1.99.

Körner, M. *et al.* (2017) “Condition-Dependent Trade-Off Between Weapon Size and Immunity in Males of the European Earwig”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 7988. doi: 10.1038/s41598-017-08339-6.

Kratz, A. y Carninci, P. (2014) “The devil in the details of RNA-seq”, *Nature Biotechnology*, 32, p. 882. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3015>.

Kregel, K. C. (2002) “Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance”, *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society Bethesda, MD, 92(5), pp. 2177–2186. doi: 10.1152/jappphysiol.01267.2001.

Kuchenbecker, L. *et al.* (2015) “IMSEQ—a fast and error aware approach to immunogenetic

sequence analysis”, *Bioinformatics*, 31(18), pp. 2963–2971. doi: 10.1093/bioinformatics/btv309.

Kukurba, K. R. y Montgomery, S. B. (2015) “RNA Sequencing and Analysis”, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), p. pdb.top084970. doi: 10.1101/pdb.top084970.

Kültz, D. (2003) “Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function.”, *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 18), pp. 3119–24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909693> (Consultado: el 22 de octubre de 2018).

Kültz, D. (2005) “Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response”, *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews, 67(1), pp. 225–257. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635.

Kurtz, J. y Armitage, S. A. O. (2006) “Alternative adaptive immunity in invertebrates”, *Trends in Immunology*, 27(11), pp. 493–496. doi: 10.1016/j.it.2006.09.001.

De La Torre, A. R. *et al.* (2014) “Adaptation and exogenous selection in a *Picea glauca* × *Picea engelmannii* hybrid zone: implications for forest management under climate change.”, *The New phytologist*. Wiley-Blackwell, 201(2), pp. 687–99. doi: 10.1111/nph.12540.

Lambert, S. y Carr, A. M. (2013) “Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models”, *Current Opinion in Genetics & Development*. Elsevier Current Trends, 23(2), pp. 132–139. doi: 10.1016/J.GDE.2012.11.009.

Langmead, B. y Salzberg, S. L. (2012) “Fast gapped-read alignment with Bowtie 2”, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 9(4), pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.

Lappalainen, T. *et al.* (2013) “Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans”, *Nature*, 501. doi: 10.1038/nature12531.

Law, C. W. *et al.* (2014) “voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts”, *Genome Biology*. BioMed Central, 15(2), p. R29. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r29.

Laydon, D. J., Bangham, C. R. M. y Asquith, B. (2015) “Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach”, 370(1675). doi: 10.1098/rstb.2014.0291.

- Lefranc, M.-P. *et al.* (2003) "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", *Dev Comp Immunol*, 27. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00039-3.
- Lefranc, M.-P. *et al.* (2009) "IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®", *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_1), pp. D1006–D1012. doi: 10.1093/nar/gkn838.
- Leng, N. *et al.* (2013) "EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments", *Bioinformatics*. Oxford University Press, 29(8), pp. 1035–1043. doi: 10.1093/bioinformatics/btt087.
- Li, B. *et al.* (2016) "Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers", 48(7), pp. 725–732. doi: 10.1038/ng.3581.
- Li, D. *et al.* (2014) "Profiling the T-cell receptor repertoire of patient with pleural tuberculosis by high-throughput sequencing", *Immunology Letters*, 162(1, Part A), pp. 170–180. doi: 10.1016/j.imlet.2014.08.012.
- Li, G. *et al.* (2012) "Identification of allele-specific alternative mRNA processing via transcriptome sequencing", *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 40(13), p. e104. doi: 10.1093/nar/gks280.
- Li, H. y Durbin, R. (2009) "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform", *Bioinformatics*. Oxford University Press, 25(14), pp. 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li, J. y Tibshirani, R. (2013) "Finding consistent patterns: A nonparametric approach for identifying differential expression in RNA-Seq data", *Statistical Methods in Medical Research*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 22(5), pp. 519–536. doi: 10.1177/0962280211428386.
- Li, M. *et al.* (2009) "Reduced expression and novel splice variants of *ING4* in human gastric adenocarcinoma", *The Journal of Pathology*, 219(1), pp. 87–95. doi: 10.1002/path.2571.
- Li, M. *et al.* (2015) "Delivery of inhibitor of growth 4 (ING4) gene significantly inhibits

proliferation and invasion and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 7380. doi: 10.1038/srep07380.

Li, Z. *et al.* (2015) “Comprehensive analysis of the T-cell receptor beta chain gene in rhesus monkey by high throughput sequencing”, 5, p. 10092. doi: 10.1038/srep10092.

Lin, K.-H. *et al.* (2018) “RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 2672. doi: 10.1038/s41598-018-21065-x.

Lindquist, S. (1986) “The Heat-Shock Response”, *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), pp. 1151–1191. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.

Lindquist, S. y Craig, E. A. (1988) “The Heat-Shock Proteins”, *Annual Review of Genetics*, 22(1), pp. 631–677. doi: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.

Linthicum, D. S. y Hildemann, W. H. (1970) “Immunologic Responses of Pacific Hagfish”, *The Journal of Immunology*, 105(4), p. 912. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/105/4/912.abstract>.

Lister, R. *et al.* (2008) “Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis”, *Cell*. Cell Press, 133(3), pp. 523–536. doi: 10.1016/J.CELL.2008.03.029.

Litman, G. W., Rast, J. P. y Fugmann, S. D. (2010) “The origins of vertebrate adaptive immunity”, *Nature reviews. Immunology*, 10(8), pp. 543–553. doi: 10.1038/nri2807.

Liu, H. M. *et al.* (2016) “Regulation of Retinoic Acid Inducible Gene-I (RIG-I) Activation by the Histone Deacetylase 6-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)”, *EBIOM*, 9, pp. 195–206. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.015.

Lluch-Cota, S. E. (2004) “Gulf of California”, en *Marine Ecosystems of the North Pacific*. PICES Spec. Publ., p. 1280.

Lluch-Cota, S. E. y Arias-Aréchiga, J. P. (2000) “La importancia de considerar la existencia de los Centros de Actividad Biológica para las regionalizaciones del océano: El caso del Golfo de California. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (Eds.), , pp.

255–264.”, en *Lluch-Belda D, Elorduy-Garay J, Lluch-Cota SE, Ponce-Díaz G (eds.), BAC: Centros de Actividad Biológica del Pacífico mexicano*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, pp. 255–263.

Lochmiller, R. L. y Deerenberg, C. (2000) “Trade-Offs in Evolutionary Immunology: Just What Is the Cost of Immunity?”, *Oikos*, 88(1), pp. 87–98. doi: doi:10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x.

Long, K. Z. y Nanthakumar, N. (2004) “Energetic and nutritional regulation of the adaptive immune response and trade-offs in ecological immunology”, *American Journal of Human Biology*, 16(5), pp. 499–507. doi: 10.1002/ajhb.20064.

Long, Y. *et al.* (2015) “Transcriptional events co-regulated by hypoxia and cold stresses in Zebrafish larvae”, *BMC Genomics*. BioMed Central, 16(1), p. 385. doi: 10.1186/s12864-015-1560-y.

Los, D. *et al.* (1993) “The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803”, *FEBS Letters*, 318(1), pp. 57–60. doi: 10.1016/0014-5793(93)81327-V.

Lossius, A. *et al.* (2014) “High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells”, *European Journal of Immunology*, 44(11), pp. 3439–3452. doi: 10.1002/eji.201444662.

Love, M. I., Huber, W. y Anders, S. (2014) “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”, *Genome Biology*. BioMed Central, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Lowry, M. S. y Carretta, J. V (1999) “Market squid (*Loligo opalescens*) in the diet of California sea lions (*Zalophus californianus*) in southern California (1981-1995)”, *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report*, pp. 196–207. Disponible en: [http://calcofi.org/publications/calcofireports/v40/Vol\\_40\\_Lowry\\_\\_Carretta.pdf](http://calcofi.org/publications/calcofireports/v40/Vol_40_Lowry__Carretta.pdf).

Lowry, M. S. y Maravilla-Chavez, O. (2003) “Recent abundance of California sea lions in western Baja California, Mexico and the United States”, en, pp. 485–497. Disponible en: <https://137.110.142.7/publications/CR/2005/2005Lowry.pdf>.

- Lyons, E. T. *et al.* (2011) "Investigations of peritoneal and intestinal infections of adult hookworms (*Uncinaria* spp.) in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) pups on San Miguel Island, California (2003)", *Parasitology Research*, 109(3), pp. 581–589. doi: 10.1007/s00436-011-2289-4.
- MacArthur, D. G. *et al.* (2012) "A Systematic Survey of Loss-of-Function Variants in Human Protein-Coding Genes", *Science*, 335(6070), pp. 823–828. doi: 10.1126/science.1215040.
- MacGillivray, D. M. y Kollmann, T. R. (2014) "The role of environmental factors in modulating immune responses in early life.", *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 5, p. 434. doi: 10.3389/fimmu.2014.00434.
- Maciejewski, J. P. *et al.* (2007) "Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones.", *Folia histochemica et cytobiologica*, 45(1), pp. 5–14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17378239> (Consultado: el 7 de agosto de 2018).
- Madi, A. *et al.* (2014) "T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity", *Genome Research*, 24(10), pp. 1603–1612. doi: 10.1101/gr.170753.113.
- Mahat, D. B. *et al.* (2016) "Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation", *Molecular Cell*, 62(1), pp. 63–78. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.025.
- Maldonado, J. E. *et al.* (1995) "Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from southern California and the gulf of California", *Marine Mammal Science*, 11(1), pp. 46–58. doi: 10.1111/j.1748-7692.1995.tb00273.x.
- Mann, E. R. (2014) "Review: Skin and the Immune System", *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*, 4(3). doi: 10.4172/2155-9554.S2-003.
- Maor-Landaw, K. *et al.* (2017) "Mediterranean versus Red sea corals facing climate change, a transcriptome analysis". doi: 10.1038/srep42405.

- 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. Biological sciences / The Royal Society*, 270(1511), pp. 153–158. doi: 10.1098/rspb.2002.2185.
- Massimino, L. (2017) "In silico gene expression profiling in *Cannabis sativa*", *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd, 1, p. 6'69. doi: 10.12688/F1000RESEARCH.10631.1.
- Mastropasqua, F. *et al.* (2017) "TRIM8 restores p53 tumour suppressor function by blunting N-MYC activity in chemo-resistant tumours.", *Molecular cancer*. BioMed Central, 16(1), p. 67. doi: 10.1186/s12943-017-0634-7.
- Mathis, D. y Benoist, C. (2004) "Back to Central Tolerance", *Immunity*, 20(5), pp. 509–516. doi: 10.1016/S1074-7613(04)00111-6.
- Matsumoto, Y. *et al.* (2006) "CDR3 Spectratyping Analysis of the TCR Repertoire in Myasthenia Gravis", *The Journal of Immunology*, 176(8), p. 5100. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.5100.
- Matzinger, P. (2002) "The danger model: a renewed sense of self", *Science*, 296(5566), pp. 301–305. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/296/5566/301.short>.
- Maxwell, S. M. *et al.* (2013) "Cumulative human impacts on marine predators", *Nature Communications*, 4, p. 2688. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3688>.
- Mayba, O. *et al.* (2014) "MBASED: allele-specific expression detection in cancer tissues and cell lines", *Genome Biology*. BioMed Central, 15(8), p. 405. doi: 10.1186/s13059-014-0405-3.
- McCabe, R. M. *et al.* (2016) "An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions", *Geophysical Research Letters*. Wiley-Blackwell, 43(19), p. 10,366–10,376. doi: 10.1002/2016GL070023.
- McClatchie, S. *et al.* (2016) "Food limitation of sea lion pups and the decline of forage off central and southern California", *Royal Society Open Science*. The Royal Society, 3(3), p. 150628. doi: 10.1098/rsos.150628.
- McDade, T. W. (2003) "Life history theory and the immune system: Steps toward a human ecological immunology", *American Journal of Physical Anthropology*, 122(S37), pp. 100–125.

doi: 10.1002/ajpa.10398.

McDade, T. W., Georgiev, A. V y Kuzawa, C. W. (2016) “Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans”, *Evolution, Medicine, and Public Health*. Oxford University Press, 2016(1), pp. 1–16. doi: 10.1093/emph/eov033.

McGettigan, P. A. (2013) “Transcriptomics in the RNA-seq era”, *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Current Trends, 17(1), pp. 4–11. doi: 10.1016/J.CBPA.2012.12.008.

McKean, K. A. y Nunney, L. (2001) “Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(14), pp. 7904–9. doi: 10.1073/pnas.131216398.

Medzhitov, R. (2002) “Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System”, *Science*, 296(5566), pp. 298–300. doi: 10.1126/science.1068883.

Mele, M. *et al.* (2015) “The human transcriptome across tissues and individuals”, *Science*, 348(6235), pp. 660–665. doi: 10.1126/science.aaa0355.

Mellanby, R. J., Thomas, D. C. y Lamb, J. (2009) “Role of regulatory T-cells in autoimmunity”, *Clinical Science*, 116(8), p. 639. doi: 10.1042/CS20080200.

Mendez-Rios, J. D. *et al.* (2016) “Molluscum Contagiosum Virus Transcriptome in Abortively Infected Cultured Cells and a Human Skin Lesion.”, *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 90(9), pp. 4469–4480. doi: 10.1128/JVI.02911-15.

Meng, X. *et al.* (2018) “A paralogous pair of mammalian host restriction factors form a critical host barrier against poxvirus infection.”, *PLoS pathogens*. Public Library of Science, 14(2), p. e1006884. doi: 10.1371/journal.ppat.1006884.

Merilä, J. y Hendry, A. P. (2014) “Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence”, *Evolutionary Applications*. Wiley/Blackwell (10.1111), 7(1), pp. 1–14. doi: 10.1111/eva.12137.

Merlo, J. L. *et al.* (2014) “PHA-induced inflammation is not energetically costly in the

subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos)", *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 175, pp. 90–95. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.05.021.

Mi, H. *et al.* (2017) "PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements", *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D183–D189. doi: 10.1093/nar/gkw1138.

Miao, Z. *et al.* (2018) "ASElux: an ultra-fast and accurate allelic reads counter", *Bioinformatics*. Editado por Z. Bar-Joseph, 34(8), pp. 1313–1320. doi: 10.1093/bioinformatics/btx762.

Migaki, G., Allen, J. F. y Casey, H. W. (1977) "Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*).", *American journal of veterinary research*, 38(1), pp. 135–136.

Mikkelsen, R. B. y Wardman, P. (2003) "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms", *Oncogene*, 22(37), pp. 5734–5754. doi: 10.1038/sj.onc.1206663.

Milstein, M. (2014) *Unusual North Pacific warmth jostles marine food chain - Northwest Fisheries Science Center, Northwest Fisheries Science Center*. Disponible en: [https://www.nwfsc.noaa.gov/news/features/food\\_chain/](https://www.nwfsc.noaa.gov/news/features/food_chain/) (Consultado: el 23 de julio de 2018).

Mineccia, M. *et al.* (2012) "New insight into the genomic structure of dog T cell receptor beta (TRB) locus inferred from expression analysis", *Developmental & Comparative Immunology*, 37(2), pp. 279–293. doi: 10.1016/j.dci.2012.03.010.

Miyakawa, H. *et al.* (1999) "Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 96(5), pp. 2538–42. doi: 10.1073/PNAS.96.5.2538.

Miyashita, M. *et al.* (2011) "DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling.", *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology Journals, 31(18), pp. 3802–19. doi: 10.1128/MCB.01368-10.

- Moller, A. P. (1996) "The cost of secondary sexual characters and the evolution of cost-reducing traits", *Ibis*. Wiley/Blackwell (10.1111), 138(1), pp. 112–119. doi: 10.1111/j.1474-919X.1996.tb04317.x.
- Montgomery, S. B. *et al.* (2011) "Rare and Common Regulatory Variation in Population- Scale Sequenced Human Genomes", *PLoS Genet*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pgen.1002144.
- Montejo, J. *et al.* (2010) "GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop", *Bioinformatics*, 26(22), pp. 2927–2928. doi: 10.1093/bioinformatics/btq562.
- Mora, T. y Walczak, A. M. (2016) "Quantifying lymphocyte receptor diversity".
- Morey, J. S. *et al.* (2016) "RNA-Seq analysis of seasonal and individual variation in blood transcriptomes of healthy managed bottlenose dolphins.", *BMC genomics*. BioMed Central, 17(1), p. 720. doi: 10.1186/s12864-016-3020-8.
- Mortazavi, A. *et al.* (2008) "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq", *Nature Methods*, 5(7), pp. 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226.
- Mosser, D. M. y Edwards, J. P. (2008) "Exploring the full spectrum of macrophage activation", 8(12), pp. 958–969. doi: 10.1038/nri2448.
- Moya, A. *et al.* (2012) "Whole Transcriptome Analysis of the Coral *Acropora millepora* Reveals Complex Responses to CO<sub>2</sub>-driven Acidification during the Initiation of Calcification", *Molecular Ecology*, 21(10), pp. 2440–2454. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05554.x.
- Nariai, N. *et al.* (2016) "A Bayesian approach for estimating allele-specific expression from RNA-Seq data with diploid genomes", *BMC Genomics*. BioMed Central, 17(S1), p. 2. doi: 10.1186/s12864-015-2295-5.
- Nature-Methods (2005) "Rapid amplification of 5' complementary DNA ends (5' RACE)", *Nature Methods*, 2, p. 629. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0805-629>.
- Nazarov, V. I. *et al.* (2015) "tcR: an R package for T cell receptor repertoire advanced data analysis", *BMC Bioinformatics*, 16(1), p. 175. doi: 10.1186/s12859-015-0613-1.

- Ng, T. F. F. *et al.* (2009) “Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions.”, *The Journal of general virology*, 90(Pt 5), pp. 1256–1261. doi: 10.1099/vir.0.008987-0.
- Niklas, N. *et al.* (2014) “Qualifying high-throughput immune repertoire sequencing”, *Cellular Immunology*, 288(1–2), pp. 31–38. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.02.001.
- NOAA (2015) *EL NIÑO/SOUTHERN OSCILLATION (ENSO) DIAGNOSTIC DISCUSSION*. Disponible en: [http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/enso\\_disc\\_jul2018/ensodisc.pdf](http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/enso_disc_jul2018/ensodisc.pdf) (Consultado: el 23 de julio de 2018).
- NOAA (2018) *Pacific Decadal Oscillation (PDO), National Oceanic and Atmospheric Administration*. Disponible en: <https://www.ncdc.noaa.gov/teleconnections/pdo/> (Consultado: el 19 de junio de 2018).
- NOAA Fisheries (2018) *2013-2017 California Sea Lion Unusual Mortality Event in California | NOAA Fisheries, Marine life in distress, West Coast, National*. Disponible en: <https://www.fisheries.noaa.gov/national/marine-life-distress/2013-2017-california-sea-lion-unusual-mortality-event-california> (Consultado: el 5 de noviembre de 2018).
- Nollen, E. A. *et al.* (1999) “In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance.”, *Molecular and cellular biology*, 19(3), pp. 2069–79. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022894> (Consultado: el 23 de julio de 2018).
- Novais, A. *et al.* (2017) “How age, sex and genotype shape the stress response”. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.11.004.
- Odhams, C. A., Cunninghame Graham, D. S. y Vyse, T. J. (2017) “Profiling RNA-Seq at multiple resolutions markedly increases the number of causal eQTLs in autoimmune disease”, *PLOS Genetics*. Editado por T. Lappalainen. Public Library of Science, 13(10), p. e1007071. doi: 10.1371/journal.pgen.1007071.
- Oettinger, M. A. (1996) “Cutting apart V(D)J recombination”, *Current Opinion in Genetics &*

*Development*, 6(2), pp. 141–145. doi: 10.1016/S0959-437X(96)80042-6.

Ohno, S. (1976) “Promethean Evolution as the Biological Basis of Human Freedom and Equality.”, *The Johns Hopkins University Press.*, 19(4), pp. 527–532.

Oliver, H. F. *et al.* (2009) “Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs”, *BMC Genomics*, 10(1), p. 641. doi: 10.1186/1471-2164-10-641.

Onoguchi, K., Yoneyama, M. y Fujita, T. (2011) “Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors”, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), pp. 27–31. doi: 10.1089/jir.2010.0057.

Oomen, R. A. y Hutchings, J. A. (2017) “Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing”, *FACETS*, 2(2), pp. 610–641. doi: 10.1139/facets-2017-0015.

Orsini, L. *et al.* (2016) “*Daphnia magna* transcriptome by RNA-Seq across 12 environmental stressors”, *Scientific Data*, 3, p. 160030. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sdata.2016.30>.

Oshlack, A., Robinson, M. D. y Young, M. D. (2010) “From RNA-seq reads to differential expression results”, *Genome Biology*. BioMed Central, 11(12), p. 220. doi: 10.1186/gb-2010-11-12-220.

Ots, I. *et al.* (2001) “Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits.”, *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 268(1472), pp. 1175–1181. doi: 10.1098/rspb.2001.1636.

Ow, M. C. *et al.* (2018) “Early experiences mediate distinct adult gene expression and reproductive programs in *Caenorhabditis elegans*.”, *PLoS genetics*. Public Library of Science, 14(2), p. e1007219. doi: 10.1371/journal.pgen.1007219.

Padovan, E. *et al.* (1993) “Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells”, *Science*, 262(5132), p. 422. doi: 10.1126/science.8211163.

Pålsson-McDermott, E. M. y O’Neill, L. A. J. (2007) “Building an immune system from nine

- domains”, *Biochemical Society Transactions*, 35(6), p. 1437. doi: 10.1042/BST0351437.
- Pan, Q. *et al.* (2008) “Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing”, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 40(12), pp. 1413–1415. doi: 10.1038/ng.259.
- Pancer, Z. y Cooper, M. D. (2006) “The evolution of adaptive immunity”, *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp. 497–518. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090542.
- Parasassi, T. *et al.* (1991) “Alterations in erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime.”, *International journal of radiation biology*, 59(1), pp. 59–69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671076> (Consultado: el 23 de julio de 2018).
- Pascual, V. *et al.* (2016) “Different Gene Expression Signatures in Children and Adults with Celiac Disease”, *PLOS ONE*, 11(2). doi: 10.1371/journal.pone.0146276.
- Pasparakis, M., Haase, I. y Nestle, F. O. (2014) “Mechanisms regulating skin immunity and inflammation”, *Nat Rev Immunol*, 14(5), pp. 289–301. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3646>.
- Patro, R. *et al.* (2017) “Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression”, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 14(4), pp. 417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197.
- Paul, W. E. y Zhu, J. (2010) “How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?”, *Nature reviews. Immunology*, 10(4), pp. 225–235. doi: 10.1038/nri2735.
- Peeters, J. G. C. *et al.* (2016) “Autoimmune disease-associated gene expression is reduced by BET-inhibition”, *Genomics Data*. Elsevier, 7, pp. 14–17. doi: 10.1016/J.GDATA.2015.11.004.
- Penning De Vries, F. W. T. (1975) “The Cost of Maintenance Processes in Plant Cells”, *Annals of Botany*. Oxford University Press, 39(1), pp. 77–92. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084919.
- Pereira, T. *et al.* (2018) “Quantitative Operating Principles of Yeast Metabolism during Adaptation to Heat Stress.”, *Cell reports*. Elsevier, 22(9), pp. 2421–2430. doi:

10.1016/j.celrep.2018.02.020.

Pespeni, M. H. *et al.* (2013) “Evolutionary change during experimental ocean acidification”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), p. 6937. doi: 10.1073/pnas.1220673110.

Peterson, R. *et al.* (1967) “The natural history and behavior of the California sea lion”, *American Society of Mammalogists, Stillwater, Oklahoma*, Special Pu, p. 116. Disponible en: <http://www.getcited.org/pub/101247246>.

Pfeifer-Sancar, K. *et al.* (2013) “Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique.”, *BMC genomics*. BioMed Central, 14, p. 888. doi: 10.1186/1471-2164-14-888.

Pichlmair, A. *et al.* (2011) “IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA”, *Nature Immunology*, 12(7), pp. 624–630. doi: 10.1038/ni.2048.

Pimentel, H. *et al.* (2017) “Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty”, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 14(7), pp. 687–690. doi: 10.1038/nmeth.4324.

Pirinen, M. *et al.* (2015) “Assessing allele-specific expression across multiple tissues from RNA-seq read data”, *Bioinformatics*, 31(15), pp. 2497–2504. doi: 10.1093/bioinformatics/btv074.

Polonsky, M., Chain, B. y Friedman, N. (2015) “Clonal expansion under the microscope: studying lymphocyte activation and differentiation using live-cell imaging”, *Immunology And Cell Biology*, 94, p. 242. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2015.104>.

Porras-Peters, H. *et al.* (2008) “Trophic level and overlap of sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico”, *Marine Mammal Science*. Wiley/Blackwell (10.1111), 24(3), pp. 554–576. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00197.x.

Potter, S. S. (2018) “Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease”, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, p. 1. doi: 10.1038/s41581-018-0021-7.

R Core Team (2018) "R: A Language and Environment for Statistical Computing". Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponible en: <https://www.r-project.org/>.

Raghupathy, N. *et al.* (2018) "Hierarchical analysis of RNA-seq reads improves the accuracy of allele-specific expression", *Bioinformatics*. Editado por A. Valencia, 34(13), pp. 2177–2184. doi: 10.1093/bioinformatics/bty078.

Rajewsky, K., Forster, I. y Cumano, A. (1987) "Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse", *Science*, 238(4830), p. 1088. doi: 10.1126/science.3317826.

Rathmell, J. C. y Thompson, C. B. (2002) "Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease", *Cell*, 109(2, Supplement 1), pp. S97–S107. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00704-3.

Reiser, V., Raitt, D. C. y Saito, H. (2003) "Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure.", *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 161(6), pp. 1035–40. doi: 10.1083/jcb.200301099.

Reuter, J. A., Spacek, D. y Snyder, M. P. (2015) "High-Throughput Sequencing Technologies", *Mol Cell*, 58(4), pp. 586–597. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.

Richards, M. H. y Nelson, J. L. (2000) "The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic Approach", *Molecular Biology and Evolution*, 17(1), pp. 146–155. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026227.

Richmond, J. M. y Harris, J. E. (2014) "Immunology and Skin in Health and Disease", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12), p. a015339. doi: 10.1101/cshperspect.a015339.

Richter, K., Haslbeck, M. y Buchner, J. (2010) "The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death", *Molecular Cell*. Cell Press, 40(2), pp. 253–266. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.10.006.

Ritossa, F. (1962) "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila", *Experientia*. Birkhäuser-Verlag, 18(12), pp. 571–573. doi: 10.1007/BF02172188.

Ritter, J. *et al.* (2017) "T-cell repertoires in refractory coeliac disease", *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311816.

- Rivera, R. *et al.* (2012) "Characterization of a novel papillomavirus species (ZcPV1) from two California sea lions (*Zalophus californianus*)", *Veterinary Microbiology*, 155, pp. 257–266. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.027.
- Robins, H. S. *et al.* (2010) "Overlap and effective size of the human CD8(+) T-cell receptor repertoire", *Science translational medicine*, 2(47), p. 47ra64-47ra64. doi: 10.1126/scitranslmed.3001442.
- Robinson, M. D. y Smyth, G. K. (2007) "Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance", *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2881–2887. doi: 10.1093/bioinformatics/btm453.
- Rock, K. L., Reits, E. y Neefjes, J. (2016) "Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules", *Trends in Immunology*, 37(11), pp. 724–737. doi: 10.1016/j.it.2016.08.010.
- Roitt, I. M. y Delves, P. J. (2001) *Roitt's essential immunology*. 10th ed. Oxford, UK ; Malden, MA: Blackwell Science.
- Romens, S. E. *et al.* (2015) "Associations between early life stress and gene methylation in children.", *Child development*. Wiley-Blackwell, 86(1), pp. 303–9. doi: 10.1111/cdev.12270.
- Roos, W. P. y Kaina, B. (2006) "DNA damage-induced cell death by apoptosis", *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Current Trends, 12(9), pp. 440–450. doi: 10.1016/J.MOLMED.2006.07.007.
- Rosati, E. *et al.* (2017) "Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis", *BMC Biotechnology*, 17(1), p. 61. doi: 10.1186/s12896-017-0379-9.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. y Wilson, I. A. (2006) "How TCRs Bind MHCs, Peptides, and Coreceptors", *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp. 419–466. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658.
- Sackton, T. (2016) *RNA-Seq differential expression workshop, Harvard FAS Informatics*. Disponible en: <https://informatics.fas.harvard.edu/rna-seq-differential-expression-workshop.html> (Consultado: el 14 de agosto de 2018).
- Sadofsky, M. J. (2001) "The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease",

*Nucleic Acids Research*, 29(7), pp. 1399–1409. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC31291/>.

Sagarin, R. R. D. *et al.* (1999) “Climate-related change in an intertidal community over short and long time scales”, *Ecological ...*, 69(4), pp. 465–490. doi: 10.1890/0012-9615(1999)069[0465:CRCIAI]2.0.CO;2.

Salameire, D. *et al.* (2009) “Efficient characterization of the TCR repertoire in lymph nodes by flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 75A(9), pp. 743–751. doi: 10.1002/cyto.a.20767.

Schaffar, G. *et al.* (2004) “Cellular Toxicity of Polyglutamine Expansion Proteins: Mechanism of Transcription Factor Deactivation”, *Molecular Cell*. Cell Press, 15(1), pp. 95–105. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2004.06.029.

Schatz, D. G. y Swanson, P. C. (2011) “V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation”, *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 167–202. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132552.

Schena, M. *et al.* (1995) “Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.”, *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 270(5235), pp. 467–70. doi: 10.1126/SCIENCE.270.5235.467.

Schramm, Y. *et al.* (2009) “Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion”, *Marine Biology*, 156(7), pp. 1375–1387. doi: 10.1007/s00227-009-1178-1.

Schulenburg, H. *et al.* (2009) “Introduction. Ecological immunology”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1513), pp. 3–14. doi: 10.1098/rstb.2008.0249.

Schulte, P. M. (2007) “Responses to environmental stressors in an estuarine fish: Interacting stressors and the impacts of local adaptation”, *Journal of Thermal Biology*. Pergamon, 32(3), pp. 152–161. doi: 10.1016/J.JTHERBIO.2007.01.012.

Seager, R. *et al.* (2015) *Causes and Predictability of the 2011-14 California Drought*. NY.

Disponible en: <http://cpo.noaa.gov/MAPP/californiadroughtreport> (Consultado: el 19 de junio

de 2018).

Seo, Y.-S. *et al.* (2011) "Towards Establishment of a Rice Stress Response Interactome", *PLoS Genetics*. Editado por P. S. Schnable. Public Library of Science, 7(4), p. e1002020. doi: 10.1371/journal.pgen.1002020.

Seong, S.-Y. y Matzinger, P. (2004) "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses", *Nature Reviews Immunology*, 4(6), pp. 469–478. Disponible en: <http://www.nature.com/nri/journal/v4/n6/abs/nri1372.html>.

Sheldon, B. C. y Verhulst, S. (1996a) "Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology", *Trends in Ecology & Evolution*, 11(8), pp. 317–321. doi: 10.1016/0169-5347(96)10039-2.

Sheldon, B. C. y Verhulst, S. (1996b) "ecology", 5347(96), pp. 317–321.

Shendure, J. (2008) "The beginning of the end for microarrays?", *Nature Methods*, 5(7), pp. 585–587. doi: 10.1038/nmeth0708-585.

Shiraki, T. *et al.* (2003) "Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), pp. 15776–15781. doi: 10.1073/pnas.2136655100.

Silva, C. P. *et al.* (2018) "The influence of adolescent nicotine exposure on ethanol intake and brain gene expression", *PLOS ONE*. Editado por A. E. Ryabinin. Public Library of Science, 13(6), p. e0198935. doi: 10.1371/journal.pone.0198935.

Silverstein, A. M. (2009) "Immune System: Promethean Evolution", *Science*. Editado por J. Sills, 325(5939), p. 393. doi: 10.1126/science.325\_393b.

Silverstein, A. M. (2014) "Promethean Evolution: A Comparison of the Immune and Neural Systems.", *Project MUSE*, 57(4), pp. 449–469. doi: 10.1353/pbm.2014.0034.

Somel, M. *et al.* (2006) "Gene expression becomes heterogeneous with age.", *Current biology : CB*. Elsevier, 16(10), pp. R359–60. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.024.

Somero, G. N. (2012) "The Physiology of Global Change: Linking Patterns to Mechanisms", *Annual Review of Marine Science*. Annual Reviews , 4(1), pp. 39–61. doi: 10.1146/annurev-marine-120710-100935.

Sompayrac, L. M. (2016) *How the Immune System Works*. 5a ed. Editado por Willey-Blackwell. UK: Wiley-BlackWell.

Sosa-Larios, T. C., Cerbón, M. A. y Morimoto, S. (2015) "Epigenetic alterations caused by nutritional stress during fetal programming of the endocrine pancreas.", *Archives of medical research*. Elsevier, 46(2), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.01.005.

Sóti, C. y Csermely, P. (2007) "Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease", *Journal of Biosciences*. Springer-Verlag, 32(3), pp. 511–515. doi: 10.1007/s12038-007-0050-z.

Soto-García, L. A. (2014) *Variación espacial y temporal de la prevalencia de Adenovirus Otárico 1 ((OTADV-1) y Rotavirus lobo marino de California (CSL RV) en crías de Zalophus californianus en el Golfo de California y Pacífico Mexicano*. Universidad Autónoma de Querétaro.

Sowder, J. T. et al. (1988) "A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor.", *The Journal of Experimental Medicine*, 167(2), p. 315. doi: 10.1084/jem.167.2.315.

Spicuglia, S., Franchini, D. M. y Ferrier, P. (2006) "Regulation of V(D)J recombination", *Lymphocyte development / Tumour immunology*, 18(2), pp. 158–163. doi: 10.1016/j.coi.2006.01.003.

Spriggs, K. A., Bushell, M. y Willis, A. E. (2010) "Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress", *Molecular Cell*. Cell Press, 40(2), pp. 228–237. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.09.028.

Srivastava, A. et al. (2016) "RapMap: a rapid, sensitive and accurate tool for mapping RNA-seq reads to transcriptomes", *Bioinformatics*, 32(12), pp. i192–i200. doi: 10.1093/bioinformatics/btw277.

Stanton, K. A. *et al.* (2017) "A Whole-Transcriptome Approach to Evaluating Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies: A Case Study in *Mimulus*", *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 7(4), pp. 1085–1095. doi: 10.1534/g3.116.038075.

Stearns, S. C. (1989) *Trade-offs in life-history evolution, Functional Ecology*. Disponible en: [https://www.britishecologicalsociety.org/100papers/100\\_Ecological\\_Papers/100\\_Influential\\_Papers\\_073.pdf](https://www.britishecologicalsociety.org/100papers/100_Ecological_Papers/100_Influential_Papers_073.pdf) (Consultado: el 31 de julio de 2018).

Steels, E. L., Learmonth, R. P. y Watson, K. (1994) "Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically", *Microbiology*. Microbiology Society, 140(3), pp. 569–576. doi: 10.1099/00221287-140-3-569.

Stillman, J. H. y Armstrong, E. (2015) "Genomics Are Transforming Our Understanding of Responses to Climate Change", *BioScience*, 65(3), pp. 237–246. doi: 10.1093/biosci/biu219.

Sui, W. *et al.* (2015) "Composition and variation analysis of the TCR  $\beta$ -chain CDR3 repertoire in systemic lupus erythematosus using high-throughput sequencing", *Molecular Immunology*, 67(2, Part B), pp. 455–464. doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.012.

Sultan, M. *et al.* (2008) "A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome.", *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 321(5891), pp. 956–60. doi: 10.1126/science.1160342.

Sun, L. *et al.* (2015) "Claudin multigene family in channel catfish and their expression profiles in response to bacterial infection and hypoxia as revealed by meta-analysis of RNA-Seq datasets", *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 13, pp. 60–69. doi: 10.1016/j.cbd.2015.01.002.

Supek, F. *et al.* (2011) "REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms", *PLoS ONE*. Editado por C. Gibas. Public Library of Science, 6(7), p. e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800.

Sverdrup, H. U. (1941) *The Gulf of California: preliminary discussion on the cruise of the E.W. Scripps in February and March 1939*. 6a ed. Pacific Sci. Cong. Proc.

Swain, D. (2013) *The extraordinary California dry spell continues: 2013 will probably be the driest year on record* : *California Weather Blog, Weather West*. Disponible en: <http://weatherwest.com/archives/1021> (Consultado: el 19 de junio de 2018).

Szteren, D. y Auriolles-Gamboa, D. (2011) "Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California Regionalización ecológica de las colonias reproductivas de *Zalophus californianus*, como herramienta para su conservación en el Golfo de Ca", *Ciencias Marinas*, 37(3), pp. 349–368. Disponible en: <http://scielo.unam.mx/pdf/ciemar/v37n3/v37n3a9.pdf>.

Szteren, D., Auriolles, D. y Gerber, L. R. (2006) "Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico", *Sea Lions of the World. Alaska Sea Grant College Program, Fairbanks*, pp. 369–384. Disponible en: <http://nsgd.gso.uri.edu/aku/akuw04003/ak-sg-06-01p369-404.pdf>.

Tarazona, S. *et al.* (2015) "Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 43(21), p. gkv711. doi: 10.1093/nar/gkv711.

Teng, G. y Papavasiliou, F. N. (2007) "Immunoglobulin Somatic Hypermutation", *Annual Review of Genetics*, 41(1), pp. 107–120. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130340.

Tesi, B. *et al.* (2017) "Gain-of-function SAMD9L mutations cause a syndrome of cytopenia, immunodeficiency, MDS, and neurological symptoms.", *Blood*. The American Society of Hematology, 129(16), pp. 2266–2279. doi: 10.1182/blood-2016-10-743302.

Thomas, N., Heather, J., Ndifon, W., *et al.* (2013) "Decombinator: a tool for fast, efficient gene assignment in T-cell receptor sequences using a finite state machine", *Bioinformatics*, 29(5), pp. 542–550. doi: 10.1093/bioinformatics/btt004.

Thomas, N., Heather, J., Pollara, G., *et al.* (2013) "The immune system as a biomonitor: explorations in innate and adaptive immunity", *Interface Focus*, 3(2), p. 20120099. doi: 10.1098/rsfs.2012.0099.

Thunders, M., Cavanagh, J. y Li, Y. (2017) “De novo transcriptome assembly, functional annotation and differential gene expression analysis of juvenile and adult *E. fetida*, a model oligochaete used in ecotoxicological studies.”, *Biological research*. BioMed Central, 50(1), p. 7. doi: 10.1186/s40659-017-0114-y.

Tissi eres, A., Mitchell, H. K. y Tracy, U. M. (1974) “Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs”, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 84(3), pp. 389–398. doi: 10.1016/0022-2836(74)90447-1.

Tjaden, B. (2015) “De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data”, *Genome Biology*. BioMed Central, 16(1), p. 1. doi: 10.1186/s13059-014-0572-2.

Trillmich, F. y Limberger, D. (1985) “Drastic effects of El Niño on Galapagos pinnipeds”, *Oecologia*, 67(1), pp. 19–22. Disponible en:  
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00378445>.

Trillmich, F. y Ono, K. A. (1991) *Pinnipeds and El Niño: Responses to Environmental Stress*. 1a ed. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Troutt, A. B. *et al.* (1992) “Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), pp. 9823–9825.

Tse, A. C.-K. *et al.* (2016) “Hypoxia alters testicular functions of marine medaka through microRNAs regulation”, *Aquatic Toxicology*. Elsevier, 180, pp. 266–273. doi: 10.1016/J.AQUATOX.2016.10.007.

Tseng, Y.-H., Ding, R. y Huang, X. (2017) “The warm Blob in the northeast Pacific—the bridge leading to the 2015/16 El Niño”, *Environmental Research Letters*. IOP Publishing, 12(5), p. 054019. doi: 10.1088/1748-9326/aa67c3.

Tuch, B. B. *et al.* (2010) “Tumor Transcriptome Sequencing Reveals Allelic Expression Imbalances Associated with Copy Number Alterations”, *PLoS ONE*. Editado por T. Ravasi. Public Library of Science, 5(2), p. e9317. doi: 10.1371/journal.pone.0009317.

Tullis, A. y Straube, C. H. T. (2017) “The metabolic cost of carrying a sexually selected trait in the

male fiddler crab *Uca pugilator*.”, *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 220(Pt 20), pp. 3641–3648. doi: 10.1242/jeb.163816.

Ugrappa, N., Karl, W. y Michael, S. (2010) “RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis”, *Current Protocols in Molecular Biology*, 89(1), p. 4.11.1-4.11.13. doi: 10.1002/0471142727.mb0411s89.

Ugrappa Nagalakshmi *et al.* (2008) “The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing”, *Science*, 320. doi: 10.1126/science.1158441.

Urban, M. C., Richardson, J. L. y Freidenfelds, N. A. (2014) “Plasticity and genetic adaptation mediate amphibian and reptile responses to climate change”, *Evolutionary Applications*, 7(1), pp. 88–103. doi: 10.1111/eva.12114.

Uri Reimand, J. ” *et al.* (2016) “g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update)”, *Nucleic Acids Research*, (1). doi: 10.1093/nar/gkw199.

Vallin-Plous, C. (2007) “Microarreglos de ADN y sus aplicaciones en investigaciones biomédicas”, *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 38(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/1812/181221636005/> (Consultado: el 20 de junio de 2018).

Velotta, J. P. *et al.* (2017) “Transcriptomic imprints of adaptation to fresh water: parallel evolution of osmoregulatory gene expression in the Alewife”, *Molecular Ecology*, 26(3), pp. 831–848. doi: 10.1111/mec.13983.

Vennemann, M. y Koppelkamm, A. (2010) “Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations”, *Forensic Science International*. Elsevier, 203(1–3), pp. 76–82. doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2010.07.007.

Venturi, V. *et al.* (2008) “The molecular basis for public T-cell responses?”, *Nat Rev Immunol*, 8(3), pp. 231–238. doi: 10.1038/nri2260.

Vera-Massieu, C. *et al.* (2015) “Activation of an inflammatory response is context-dependent during early development of the California sea lion”, *Royal Society Open Science*, 2(4), p.

150108. doi: 10.1098/rsos.150108.

Villadangos, J. A. (2001) "Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them", *Molecular Immunology*, 38(5), pp. 329–346. doi: 10.1016/S0161-5890(01)00069-4.

Wang, C.-Y. *et al.* (2017) "Analysis of the CDR3 length repertoire and the diversity of T cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chains in swine CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes", *Molecular Medicine Reports*, 16(1), pp. 75–86. doi: 10.3892/mmr.2017.6601.

Wang, J. *et al.* (2017) "WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(1), pp. 130–137. doi: 10.1093/nar/gkx356.

Wang, L. *et al.* (2016) "RNA-Seq revealed the impairment of immune defence of tilapia against the infection of *Streptococcus agalactiae* with simulated climate warming", *Fish & Shellfish Immunology*. Academic Press, 55, pp. 679–689. doi: 10.1016/J.FSI.2016.06.058.

Wang, T. *et al.* (2017) "The Different T-cell Receptor Repertoires in Breast Cancer Tumors, Draining Lymph Nodes, and Adjacent Tissues", *Cancer Immunology Research*, 5(2), p. 148. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0107.

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. (2009) "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics", *Nature Reviews Genetics*, 10(1), p. 57. doi: 10.1038/nrg2484.

Warde-Farley, D. *et al.* (2010) "The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function", *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), pp. 214–220. doi: 10.1093/nar/gkq537.

Watson, F. L. *et al.* (2005) "Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects", *Science*, 309(5742), p. 1874. doi: 10.1126/science.1116887.

Watson, H. *et al.* (2017) "Transcriptome analysis of a wild bird reveals physiological responses to the urban environment". doi: 10.1038/srep44180.

Wenderska, I. B. *et al.* (2017) "Transcriptional Profiling of the Oral Pathogen *Streptococcus*

mutans in Response to Competence Signaling Peptide XIP.”, *mSystems*. American Society for Microbiology Journals, 2(1), pp. e00102-16. doi: 10.1128/mSystems.00102-16.

Westermann, A. J. y Vogel, J. (2018) “Host-Pathogen Transcriptomics by Dual RNA-Seq”, en *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 59–75. doi: 10.1007/978-1-4939-7634-8\_4.

Wickramasinghe, S. N., Porwit, A. y Erber, W. N. (2011) “CHAPTER 2 - Normal bone marrow cells: Development and cytology”, en *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2a ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 19–44. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978070203147200002X>.

Wilcox, R. A. *et al.* (2009) “B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders.”, *Blood*. The American Society of Hematology, 114(10), pp. 2149–58. doi: 10.1182/blood-2009-04-216671.

Wilhelm, B. T. *et al.* (2008) “Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution”, *Nature*. Nature Publishing Group, 453(7199), pp. 1239–1243. doi: 10.1038/nature07002.

Wilson, J. A. C. *et al.* (2017) “RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation”, *PLOS Pathogens*. Editado por M. T. Heise. Public Library of Science, 13(2), p. e1006155. doi: 10.1371/journal.ppat.1006155.

Wittkopp, P. J., Haerum, B. K. y Clark, A. G. (2004) “Evolutionary changes in cis and trans gene regulation”, *Nature*. Nature Publishing Group, 430(6995), pp. 85–88. doi: 10.1038/nature02698.

Woodsworth, D. J., Castellarin, M. y Holt, R. A. (2013) “Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease”, *Genome Medicine*, 5(10), p. 98. doi: 10.1186/gm502.

Xie, S. *et al.* (2015) “Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings.”, *BMC microbiology*. BioMed Central, 15(1), p. 21. doi: 10.1186/s12866-015-0353-4.

Xu, J. *et al.* (2012) “RNA-Seq analysis implicates dysregulation of the immune system in schizophrenia”, *BMC Genomics*, 13(Suppl 8), p. S2. doi: 10.1186/1471-2164-13-S8-S2.

Xu, Z. *et al.* (2015) “Transcriptome Profiling and Molecular Pathway Analysis of Genes in

Association with Salinity Adaptation in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*”, *PLOS ONE*. Editado por M.-J. Virolle. Public Library of Science, 10(8), p. e0136506. doi: 10.1371/journal.pone.0136506.

Yang, Z. *et al.* (2017) “A comprehensive analysis of the germline and expressed TCR repertoire in White Peking duck”, *Scientific Reports*, 7, p. 41426. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41426>.

Yu, Y., Ceredig, R. y Seoighe, C. (2016) “LymAnalyzer: a tool for comprehensive analysis of next generation sequencing data of T cell receptors and immunoglobulins”, *Nucleic Acids Research*, 44(4), pp. e31–e31. doi: 10.1093/nar/gkv1016.

Yum, L. K. *et al.* (2017) “Transcriptomes and expression profiling of deep-sea corals from the Red Sea provide insight into the biology of azooxanthellate corals”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 6442. doi: 10.1038/s41598-017-05572-x.

Yuseff, M.-I. *et al.* (2013) “How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity”, *Nature Reviews Immunology*, 13(7), pp. 475–486. doi: 10.1038/nri3469.

Zavala-Gonzalez, A. y Mellink, E. (2000) “Historical exploitation of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico”, *Marine Fisheries Review*, 62(1), pp. 35–40. Disponible en: <http://aquaticcommons.org/9758/>.

Zavaleta-Lizárraga, L. (2003) *Variaciones geográficas en morfometría craneal en machos adultos de lobo marino de California (Zalophus californianus) en México*. CICIMAR, Instituto Politécnico Nacional.

Zeng, F. *et al.* (1999) “The effects of La(III) on the peroxidation of membrane lipids in wheat seedling leaves under osmotic stress”, *Biological Trace Element Research*. Humana Press, 69(2), pp. 141–150. doi: 10.1007/BF02783865.

Zhang, N. y Bevan, M. J. (2011) “CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System”, *Immunity*, 35(2), pp. 161–168. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

Zhang, Q. *et al.* (2015) “Adaptive Posttranslational Control in Cellular Stress Response Pathways

and Its Relationship to Toxicity Testing and Safety Assessment”, *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 147(2), pp. 302–316. doi: 10.1093/toxsci/kfv130.

Zhang, X. *et al.* (2017) “RNA-Seq analysis of salinity stress–responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)”, *PLOS ONE*. Editado por P. Xu. Public Library of Science, 12(3), p. e0173238. doi: 10.1371/journal.pone.0173238.

Zhang, Z. H. *et al.* (2014) “A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data”, *PLoS ONE*. Editado por P. Provero. Public Library of Science, 9(8), p. e103207. doi: 10.1371/journal.pone.0103207.

Zhou, C. *et al.* (2018) “Characterization of viral RNA splicing using whole-transcriptome datasets from host species”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 3273. doi: 10.1038/s41598-018-21190-7.

Zhu, M. *et al.* (2009) “The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters”, *Nature*. Nature Publishing Group, 458(7237), pp. 469–474. doi: 10.1038/nature07855.

Zhuo, Z., Lamont, S. J. y Abasht, B. (2017) “RNA-Seq Analyses Identify Frequent Allele Specific Expression and No Evidence of Genomic Imprinting in Specific Embryonic Tissues of Chicken”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 11944. doi: 10.1038/s41598-017-12179-9.