



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura de Microbiología

**“Ontogenia de la tolerancia inmune entérica neonatal del elefante marino
del Norte, *Mirounga angustirostris*”**

Opción de Titulación:

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Microbiología

Presenta:

Karla Aideé Zamora y Cuevas

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura de Microbiología

“Ontogenia de la tolerancia inmune entérica neonatal del elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*”

Opción de Titulación:
Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Microbiología

Presenta:

Karla Aideé Zamora y Cuevas

Dirigido por:

Karina A. Acevedo Whitehouse

SINODALES

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse

Presidente

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez

Secretario

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

M. en C. Marina Banuet Martínez

Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2021
México

Resumen

El elefante marino del Norte (*Mirounga angustirostris*), es una especie de la familia phocidae que ha sido un modelo único entre mamíferos en términos del dimorfismo sexual extremo que despliega en la etapa adulta. Incluso en la etapa neonatal, hay un dimorfismo sexual en la diversidad del bacterioma entérico. En conjunto, estas diferencias reflejan las historias de vida entre machos y hembras. Dadas esas historias de vida y el contexto ecosistémico en el que ha evolucionado la especie resulta interesante entender las dinámicas moleculares que llevan a tales dimorfismos en función del ambiente y su ontogenia. En esta tesis se analizaron los datos morfométricos, sanguíneos y de expresión génica asociada a *TLR4*, un gen importante para el reconocimiento de bacterias Gram negativas y la inmunomodulación. Entre inicios de febrero y finales de marzo del 2019, en el Archipiélago de San Benito, Baja California, se colectaron 30 muestras de mucosas entéricas y sanguíneas de crías de elefante marino del Norte y se re-muestraron a lo largo del destete temprano. Se corroboró el patrón de ayuno asociado a medidas morfométricas y la variación en los conteos sanguíneos acorde a lo reportado en años anteriores. Además, fue explorado el patrón de la expresión del gen *TLR4* entre sexos. Se encontró que las hembras sobre expresan este gen en comparación con los machos, pero solamente durante el destete tardío (Prueba Wilcoxon, $W = 54$, $p = 0.0152$). Esto podría significar que las hembras incrementan la expresión del gen *TLR4* en el destete tardío dada la modulación de su microbiota, aunado al factor esterooidal y su historia de vida. Por último, se modeló la dinámica del receptor TLR4 en un sistema de ecuaciones diferenciales para comprender bajo un contexto hipotético la localización espacial del receptor dentro de una célula. Acorde a los datos de expresión, se logró la estabilidad del modelo, lo que indica que la dinámica del receptor en las células entéricas de crías de elefante marino presenta una actividad intermedia o moderada, entre la membrana plasmática y el espacio intracelular. Este es el primer estudio que aborda el entendimiento del sistema de inmunotolerancia entérico del elefante marino del Norte desde la perspectiva del receptor TLR4.

Palabras clave: Dimorfismo sexual, elefante marino del Norte, ontogenética, *Mirounga angustirostris*, morfometría, tolerancia inmune.

Abstract

The Northern Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*) is a unique phocid in terms of its marked sexual dimorphism. Given its life history and the ecosystem in which it has evolved, it is interesting to understand the molecular dynamics of sexual dimorphism, according to the environment and its ontogenetic patterns. This thesis analyzes morphometric data, blood counts and relative transcriptional level of TLR4, a gene important for recognizing Gram-negative bacteria and immunomodulation. Enteric and blood samples were collected from 30 pups that were resampled along their early weaning in the San Benito islands, Baja California between early February and the end of March in 2019. Differences in morphometric measurements and variation in blood parameters were examined according to the fasting stage and compared to what was reported previously. Inter-sexual differences in the expression of the TLR4 gene were also examined. Female elephant seals overexpressed this gene compared to males, but only in late weaning (Wilcoxon Test, $W = 54$, p -value = 0.0152). This could mean that the females overexpress the TLR4 gene in late weaning given the modulation of their microbiota together with the steroidal factor and life history. Finally, the dynamics of the TLR4 receptor were modelled using differential equations to understand, under a hypothetical context, the spatial location of the receptor within a cell. According to the data on transcription levels, we obtained a stable spiral point, which indicates that the receptor dynamics in the enteric cells of sea elephant pups has an intermediate or moderate activity and is mostly located between the plasma membrane and the intracellular space. This is the first study to seeks to understand the role of the immune tolerance in the enteric epithelium of the north elephant seal by the TLR4 perspective.

Key words: Sexual dimorphism, ontogenetic, *Mirounga angustirostris*, morphometry, Northern elephant seal, immune tolerance

Declaratoria de autoría

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

Confirmando que las ideas aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dedicado 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 que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado

Dedicatoria

Principalmente agradezco a mis padres Elsa e Ignacio. También, un profundo agradecimiento a todos mis tutores científicos de la Universidad Autónoma de Querétaro, gracias a ellos, hoy puedo considerarme una Microbióloga en desarrollo. Gracias a mis hermanas Mildred y Montse quienes siempre estuvieron para mí. Gracias a mi abuelita Nieves por apoyarme tanto día con día y gracias a mi abuelita Carmen por la herencia epigenética y su pasión por la ciencia.

Gracias también a aquellos miembros del laboratorio quienes nunca dejaron de motivarme y siempre me inspiran a ir por más. Agradezco a mi pareja, por ayudarme a concluir este ciclo en mi vida, gracias Alonso. Pero, sobre todo, gracias por todas las preguntas, críticas y desafíos. Ha sido un honor redactar esta tesis.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro que me ha abierto las puertas del conocimiento desde el bachiller hasta la licenciatura, particularmente un agradecimiento a la Facultad de Ciencias Naturales. De igual modo, agradezco al laboratorio de Ecoinmunología y Fisiología de la Conservación que me brindó la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación en sus instalaciones. Agradezco el financiamiento otorgado por parte del Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación UAQ (FOFI 2018-2020) "Ontogenia de la tolerancia inmune entérica neonatal del elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*".

Agradezco a la Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse responsable del protocolo de investigación y quien amablemente me invitó a colaborar. También agradezco a la M. Sc Nami Rosario Morales Durán quien me compartió su conocimiento acerca del modelo y la Cooperativa Pescadores Nacionales de Abulón quienes nos facilitaron realizar el muestreo en el Archipiélago de San Benito, Baja California Norte. Por último, un gran agradecimiento a mis sinodales que contribuyeron a la reconstrucción y mejora del presente trabajo, gracias al Dr. Roberto Álvarez Martínez, Dr. Fausto Arellano Carbajal y M. C. Banuet Martínez.

INDICE

INTRODUCCIÓN	14
RESUMEN GRÁFICO DE LA TESIS	17
ANTECEDENTES	18
Perspectiva global del sistema inmune de tolerancia.....	18
Ecología microbiana del epitelio entérico	23
Microbioma intestinal del elefante marino del Norte e inmunidad neonatal	29
Estructura y evolución de los TLR	32
Vía de señalización de TLR4 con LPS de bacterias comensales	36
Modelado matemático de la dinámica TLR4	41
El elefante marino del Norte como modelo de estudio	45
JUSTIFICACIÓN	49
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	50
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	53
RESULTADOS	78
Variación en las medidas morfométricas de las crías durante el destete.....	78
Dimorfismo sexual en las medidas morfométricas y condición corporal	80

Variación en los parámetros sanguíneos a lo largo del destete temprano.....	81
Expresión relativa del gen TLR4 en mucosas entéricas del elefante marino del Norte	85
Modelo matemático de la dinámica celular de TLR4.....	90
DISCUSIÓN	91
PERSPECTIVAS	98
CONCLUSIÓN	100
BIBLIOGRAFÍA	100
ANEXO I	116
ANEXO II	118
ANEXO III	119
ANEXO IV	121

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de Figuras

Figura 1.- Tolerancia inmune.	19
Figura 2.- Estructura del sistema digestivo. (Modificado de National Academy of Sciences, 2006).....	26
Figura 3.- Vías de tolerancia en el epitelio entérico mediadas por PRR y ligandos microbianos (Swiatczak et al., 2015).	28
Figura 4.- Microbioma intestinal de crías de elefante marino del Norte, <i>Mirounga angustirostris</i>	30
Figura 5.- Diversidad beta del microbioma intestinal de crías de elefante marino del Norte, <i>Mirounga angustirostris</i>	31
Figura 6.- Evolución de los TLR en metazoa.	35
Figura 7.- Sección transversal de la interacción LPS con MD-2.	37
Figura 8.- Estructura del complejo molecular TLR4/MD2/LPS. En verde se observa el TLR4, en azul la proteína MD2 y en rosa el LPS bacteriano.	38
Figura 9.- Ensamble del complejo molecular y la señalización generalizada río abajo.	40
Figura 10.- Simulación matemática del modelo (Imagen tomada de Stan et al., 2018).....	43
Figura 11.- Crías de elefante marino, temporada de muestreo febrero-marzo del 2019. Estas crías de aproximadamente 4-6 semanas de desarrollo practican en grupos el buceo a lo largo del día. Foto: Karla A. Zamora y Cuevas.....	46
Figura 12.- Ciclo de vida de <i>Mirounga angustirostris</i>	47
Figura 13.- Zona de muestreo, archipiélago del Pacífico Norte, San Benito. (Imagen modificada de García-Aguilar et al., 2018)	53
Figura 14.- Marcaje de cría recién destetada con peróxido de hidrógeno.	54
Figura 15.- Etiqueta de registro del muestreo colocada en la aleta posterior	55
Figura 16.- Digitalización de una cría de elefante marino. Basado en el modelo Morales-Durán et al 2018 (ID: 18B- 01). Imagen creada por Arq. Alonso Emerson Davis.....	62

Figura 17.- Fórmula para la determinación de un cono truncado. Cada color representa un cono truncado para estimar el volumen y multiplicarlo por la longitud y el perímetro dentro del modelo matemático Imagen creada por Arq. Alonso Emerson Davis.....	62
Figura 18.- Bandas ribosomales 28S y 18S en gel de electroforesis para verificar la integridad del ARN de la mucosa entérica de elefantes marinos. Gel de agarosa al 1.8%.	64
Figura 19.- Concentración de ARN de mucosas anales.	65
Figura 20.- Calidad de ARN de mucosas anales.	65
Figura 21.- Curva de amplificación de los genes control GAPDH y RPS5.	66
Figura 22.- Pico de hibridación de los genes control GAPDH y RPS5 en función de la temperatura.	67
Figura 23.- Curva de hibridación de los genes control GAPDH y RPS5 en función de la temperatura (°C) y las unidades relativas de fluorescencia (RFU).	68
Figura 24.- Curva estándar del gen control GAPDH.	68
Figura 25.- Curva estándar del gen control RPS5.....	69
Figura 26.- Curva de amplificación del gen TLR4.	70
Figura 27.- Pico de hibridación del gen TLR4 en función de la temperatura.	71
Figura 28.- Curva de hibridación del gen TLR4 en función de la temperatura (°C).	72
Figura 29.- Curva estándar del gen TLR4.	73
Figura 30.- Valores de Ct (<i>cycle threshold</i>) para el gen control GAPDH y TLR4.....	73
Figura 31.- Valores de Ct (<i>cycle threshold</i>) para el gen control RPS5 y TLR4.	74
Figura 32.- Punto estable dentro del sistema de ecuaciones diferenciales. Representa la estabilidad del receptor TLR4 dentro de un monocito humano, $\phi = 1.2$	75
Figura 33 - Transición del receptor TLR4 dentro de un monocito. Esta dinámica se observa al inicio de la infección bacteriana (progresión de la respuesta pro-inflamatoria; $\phi < 1.2$).	76
Figura 34.- Atractor fractal; representa la sobre-expresión del mRNA del TLR4 y su localización irreversible en la membrana plasmática	76

Figura 35.- Capa de grasa lateral (mm) de crías de elefante marino del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019. Se observa una notable disminución de la capa de grasa acorde al ayuno post-destete.	78
Figura 36.- Longitud (cm) de crías de elefante marino del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	79
Figura 38.- Capa de grasa lateral se crías de elefante marino entre años de muestreo 2017 y 2019 (Datos de Morales-Durán, 2017).	80
Figura 39.- Capa de grasa lateral de crías de elefante marino del Norte hembras y machos.	80
Figura 40.- Longitud corporal de crías de elefante marino del Norte hembras y machos ..	81
Figura 41.- Promedio del porcentaje de linfocitos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	81
Figura 42.- Promedio del porcentaje de neutrófilos segmentados de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	82
Figura 43.- Promedio del porcentaje de basófilos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	83
Figura 44.- Promedio del porcentaje de monocitos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	84
Figura 45.- Promedio del porcentaje de eosinófilos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.	85
Figura 46.- Valores de Δ Ct de TLR4 respecto al gen control GAPDH durante el destete temprano (día 0) y durante el destete tardío (día 20).	85
Figura 47.- Valor de Δ Ct TLR4 entre crías machos y hembras en el destete temprano.	86
Figura 48.- Valor de Δ Ct TLR4 entre crías machos y hembras en el destete tardío.	87
Figura 49.- Diferencia del valor de Δ Ct TLR4 entre etapas de muestreo.	87
Figura 50.- Representación espacial de datos de expresión obtenidos de la qPCR del TLR4 en mucosas entéricas de crías de elefante marino, $\Phi = 0.61$; $\Phi = 0.78$, respectivamente.	90
Figura 51.- Histograma de la distribución de los datos asociados a la longitud (cm) de las crías de elefante marino muestreadas en la temporada reproductiva del 2019.	116

Figura 52.- Distribución de los datos asociados a la capa de grasa (mm) de las crías de elefante marino muestreadas en la temporada reproductiva del 2019.	117
Figura 53.- Estimación de la masa (kg) de las crías de elefante marino en el destete temprano, temporada reproductiva 2019. ns= no significativo	117
Figura 54.- Estimación de la masa (kg) de las crías de elefante marino en el destete tardío, temporada reproductiva 2019. ns= no significativo	117
Figura 55.- Pruebas de gradiente de temperatura para determinar la hibridación de los primers en el gen TLR4	118
Figura 56.- Pruebas de gradiente para determinar el pico de amplificación del gen TLR4.	118
Figura 57.- Distribución beta de los datos de expresión temprana del receptor TLR4, los datos se permutaron 1000 veces para conocer su tipo de distribución.	119
Figura 58.- Distribución beta de los datos de expresión tardía del receptor TLR4, los datos se permutaron 1000 veces para conocer su tipo de distribución.	120
Figura 59.- Matriz de correlación de variables morfométricas y de expresión génica. Se excluyeron los datos sanguíneos por escasez de información en el primer muestreo. (Método Spearman, función cor() en RStudio). LT= Longitud, C_G =Capa de grasa, X.delta.Ct = el valor de delta Ct durante la etapa de destete temprano (1), etapa de destete tardío (2). Avg Ct = Promedio de Ct para cada gen.	121
Figura 60.- Concentraciones esteroidales en sangre de crías de NES en ng/ml (Sherman-Cooney et al. 2005).....	121

Índice de Cuadros

Cuadro 1.- Tipos de células que conforman sistema entérico en mamíferos y su función principal para ejercer la homeostasis intestinal.	24
Cuadro 2.- Representación de x' , y' , z' en el modelo.....	42
Cuadro 3.- Parámetros del modelo ODE, de la vía TLR4 (Ecuación de Stan et al., 2018)	42
Cuadro 4.- Secuencias de cebadores que se utilizaron para el análisis con SYBR green para la cuantificación por PCR tiempo final y tiempo real.	57
Cuadro 5.- Cebadores utilizados para la amplificación de genes GAPDH, RPS5 y TLR4.....	61
Cuadro 6 - Interpretación de los valores de CT en qPCR (D'haene & Hellemans, 2010)	74
Cuadro 7 . Las variables morfométricas no son variables de respuesta respecto al valor de ΔCt de TLR4 del destete temprano respecto al sexo y grasa destete temprano.....	88
Cuadro 8 – El sexo funge como variable de respuesta explicativa respecto al valor de ΔCt de TLR4 en el destete tardío respecto a la grasa.	88
Cuadro 9 – Las variables morfométricas no son variables de respuesta respecto al valor de ΔCt de TLR4. (sexo y longitud destete temprano)	89
Cuadro 10 – El sexo funge como variable de respuesta explicativa respecto al valor de ΔCt de TLR4 en el destete tardío respecto a longitud	89

INTRODUCCIÓN

Desde la etapa fetal, los mamíferos placentados interactúan con microorganismos (Rautava et al., 2012, Parag et al., 2017, Weström et al., 2020). Durante todo el proceso de gestación hasta el nacimiento y desarrollo temprano, el sistema inmune se encarga de mantener en equilibrio la interacción del hospedero con la microbiota (Rodríguez et al., 2015, Weström et al., 2020), es decir, con los integrantes de las comunidades de microorganismos comensales que habitan en los epitelios, como la piel, los intestinos y el aparato urinario

Uno de los procesos fundamentales para que ocurra el establecimiento de la microbiota es la comunicación bidireccional molecular (CBM), ya que es la sucesión adecuada de múltiples vías de señalización lo que conduce al desarrollo de tolerancia entérica, y por ende a un fenotipo inmune funcional y homeostasis (Hornef et al., 2014, Barko et al., 2018). Estas cascadas de señalización específicas, paradójicamente, son las mismas que son activadas por las moléculas asociadas al daño tisular y que generan estados pro-inflamatorios (Swiatczak et al., 2015).

La ontogenia de la CBM requiere de patrones moleculares asociados a los microorganismos colonizadores, y receptores de reconocimiento de esos patrones (PRR) (Weng et al., 2013). En conjunto, los receptores determinan quienes se integrarán al microbioma mediante procesos dinámicos de selección negativa y positiva hacia los microorganismos con los que tiene contacto el neonato (Weng et al., 2013, Swiatczak et al., 2015). La selección positiva involucra procesos de tolerancia, en los cuales los efectores involucrados deben reconocer patrones moleculares asociados a los microorganismos (PAMPs) sin eliminarlos, como ocurre durante las respuestas inmunes de resistencia. Con base en las interacciones del hospedero neonato con los microorganismos comensales, la inmunomodulación entérica en etapas tempranas y tardías del desarrollo puede ser desregulada, llevando a problemas de salud. Incluso, diversas patologías crónicas o enfermedades autoinmunes en el humano se generan por la desregulación de la microbiota (Marchesi et al., 2015, Yang et al., 2015, Li et al., 2018). Algunos ejemplos son la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), la enfermedad de Crohn (CD), la colitis ulcerativa (UC), la enterocolitis necrosante (NEC), entre muchas otras (Marchesi et al., 2015).

Es parsimonioso pensar que los mismos procesos de regulación ocurren en poblaciones silvestres; sin embargo, a diferencia de lo que se sabe para el humano o modelos animales de laboratorio, el conocimiento acerca de la ontogenia inmune entérica neonatal en animales silvestres es escaso.

Resulta interesante contemplar los procesos de inmunotolerancia de especies silvestres sexualmente dimórficas en el contexto de historia de vida. Esto es porque se sabe que existen diferencias en la inversión de recursos energéticos entre sexos para algunas especies (Klein y Flanagan , 2016), pero poco se ha examinado si dicho dimorfismo puede observarse incluso a nivel de la inmunotolerancia relacionada con el establecimiento de la microbiota. Algunas especies, como el elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*, al alcanzar la madurez reproductiva exhibe diferencias marcadas en el tamaño, caracteres sexuales secundarios y comportamiento entre machos y hembras. Este dimorfismo se explica por una selección sexual, y requiere de una inversión diferencial de recursos energéticos y nutricionales entre sexos (Dubost, 2016; Lewis et al., 2006, Le Bouf et al., 1993). La inversión diferencial de recursos impacta el crecimiento y estrategias de vida, incluyendo sus efectores inmunes, como estrategia para maximizar su éxito reproductivo y supervivencia (Tobias et al., 2012, Lyon et al., 2012, Le Bouf et al., 1993).

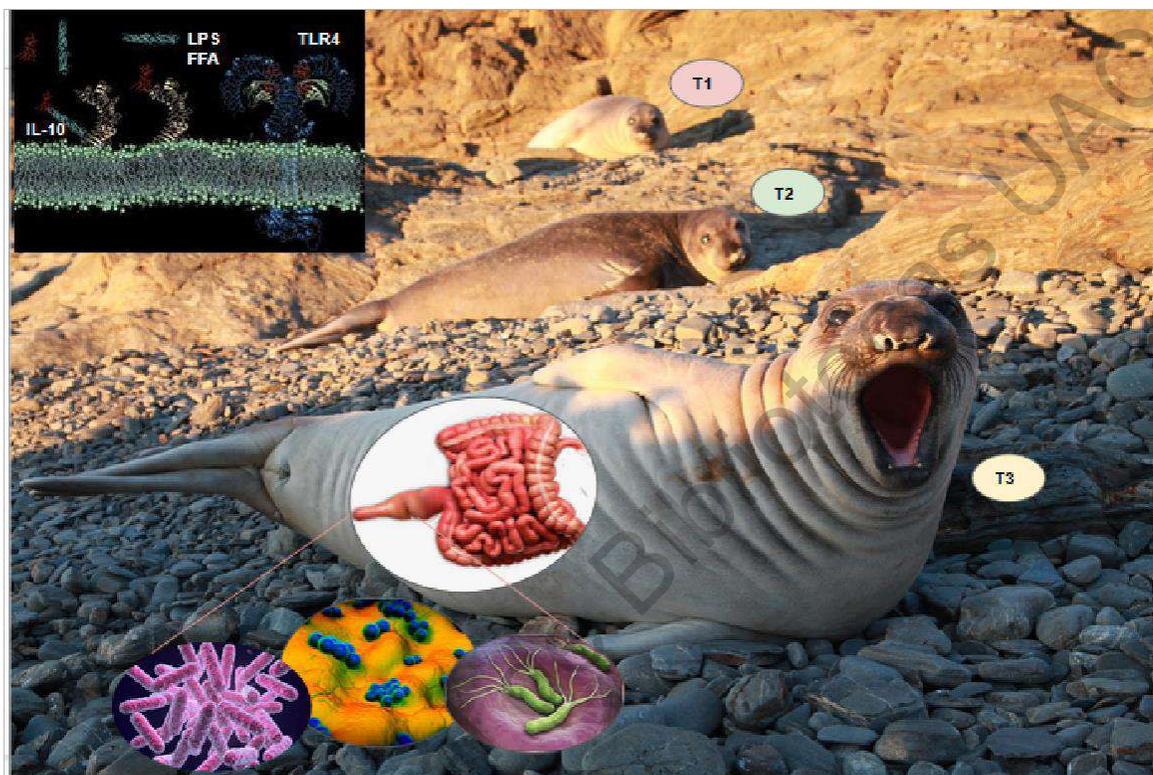
El dimorfismo sexual puede ser observable incluso en etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, en crías de elefante marino del Norte recién destetadas, cuando aún no hay diferencias en el tamaño, peso ni forma entre sexos, la capacidad sérica de inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* es mayor en las hembras que en los machos (Morales-Durán, 2018). Además, recientemente se demostró que al momento del destete la diversidad del microbioma entérico de esta especie es igual entre machos y hembras, pero al final del periodo neonatal es más diverso en los machos (Stoffel et al., 2020). Resulta interesante, ya que, al estar en una etapa de destete, la diferencia no puede deberse a variaciones en la dieta, y tampoco se ha observado una inversión diferencial de recursos maternos durante la lactancia en los fócidos (Hall et al., 2003). A partir de esa investigación se planteó la hipótesis de que el dimorfismo temprano en la microbiota

entérica del elefante marino del Norte se debe a una mayor tolerancia inmune de los machos en la etapa del destete.

La presente tesis propone analizar la expresión relativa del receptor Toll 4 (TLR4), un elemento central en el establecimiento de la microbiota entérica en crías de elefante de marino (Beutler et al., 2000, Kumar et al., 2009). Este receptor reconoce al lipopolisacárido de la membrana de bacterias Gram negativas y define una respuesta, ya sea pro o anti-inflamatorias (Beutler et al., 2000, Gay et al., 2006). El objetivo de esta tesis fue evaluar la expresión del receptor TLR4 en el epitelio entérico de crías de elefante marino del Norte para definir si hay un dimorfismo sexual en los niveles de expresión genética conforme al desarrollo neonatal.

Dirección General de Bibliotecas UAO

RESUMEN GRÁFICO DE LA TESIS



Tolerancia inmune entérica modulada por el receptor tipo Toll 4 e IL-10 ante lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas y ácidos grasos libres (FFA) propios del metabolismo y dieta de *Mirounga angustirostris*. El esquema denota tres estados de ayuno post-destete, relevantes para el presente estudio. T1 indica el tiempo del primer muestreo, al día uno de terminar la lactancia. T2 indica el segundo muestreo a los 15 días post-destete. T3 indica el último muestreo a los 30 días post-destete. La fotografía fue tomada en el periodo de muestreo en el Archipiélago de San Benito, Baja California Norte.

ANTECEDENTES

Perspectiva global del sistema inmune de tolerancia

El sistema inmune de tolerancia, se define como un proceso biológico-molecular encargado de modular la respuesta inmune ante el reconocimiento de antígenos propios y externos. Se trata de una red de comunicación celular basada tanto en la inmunidad innata como adaptativa. La premisa inicial de su acción es proteger al organismo de la inflamación crónica, enfermedades autoinmunes, alergias y proliferación celular descontrolada (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013, Schwartz et al., 2012, Khailaie et al., 2013). Además, tiene un papel fundamental en el establecimiento de la microbiota (Zhao & Elson, 2018; Ahern & Maloy 2020).

La inmutolerancia se basa en efectores del sistema inmune altamente regulados que brindan una respuesta polarizada dentro de un intervalo homeostático. Existen varios modelos matemáticos que intentan explicar las vías de regulación del sistema inmune de tolerancia (Eftimie et al., 2016, Khailaie et al., 2013). La ventaja de un acercamiento matemático es que permite entender cómo se desenvuelven múltiples variables dentro de un sistema complejo, sin depender en su totalidad de resultados o datos puramente empíricos. Actualmente, el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) cuenta con cientos de miles de genomas anotados, y este número crece rápidamente (Sayers et al., 2019). Los artículos con información experimental van en aumento a una tasa de velocidad mucho más alta que aquellos artículos que involucran un modelo matemático (Eftimie et al., 2016).

Los modelos matemáticos de la inmunología teórica surgieron en la década de los 60's y han evolucionado hasta nuestros días explicando múltiples procesos de interacción entre efectores inmunes, como la transducción de señales, variabilidad genética, transcripción de múltiples RNA, traducción y postraducción proteica, entre otros (Louzoun, 2007, Eftimie et al., 2016). Las vías de señalización celular de las respuestas inmunes son

amplias, en general, y la respuesta inmune de tolerancia puede comprenderse con cuatro vías (Fig. 1). Para entender mejor la tolerancia a antígenos foráneos se dedicará una sección para abordar los mecanismos principales tanto innatos como adaptativos que participan en estas respuestas, y posteriormente se abordará en otra sección al sistema inmune de tolerancia bajo el contexto de una perspectiva matemática.

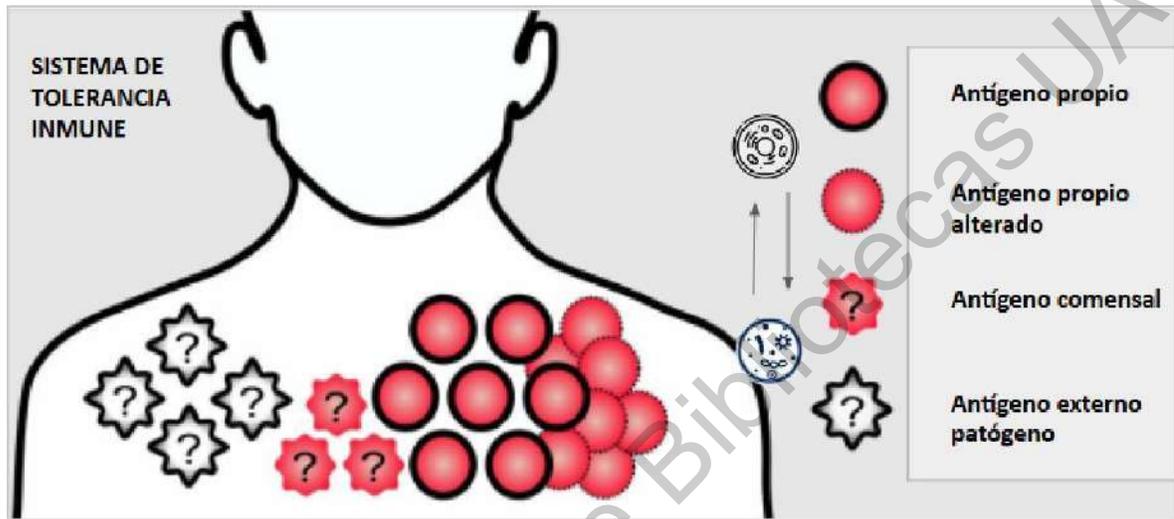


Figura 1.- Tolerancia inmune (Figura modificada de Khailaie et al., 2013). En el diagrama se muestran los diferentes tipos de antígenos a los que un hospedero se encuentra expuesto.

El primer caso es una respuesta hacia células propias del organismo, se basa en el reconocimiento de DAMPs y la maduración adecuada del repertorio linfóide necesario para evitar enfermedades autoinmunes y alergias. El segundo panorama es el reconocimiento de células propias alteradas que pueden desencadenar la proliferación maligna. El tercero consiste en el reconocimiento de la microbiota comensal que ha co-evolucionado bajo una configuración mutualista-comensal. El último caso de tolerancia se trata de microbios que no pertenecen al organismo y deben activar vías de señalización asociadas a patógenos. El organismo también genera tolerancia inmune ante dichos disturbios mediante puntos de retroalimentación negativa para contrarrestar efectos pro-inflamatorios exacerbados.

Existen cuatro tipos de tolerancia inmune (Fig. 1). El primer tipo de tolerancia es el que deriva en el reconocimiento del antígeno propio. Esto ocurre durante las primeras semanas del desarrollo en mamíferos, específicamente en el timo, médula ósea y órganos linfoides generadores (Abbas et al., 2015, Gilbert et al., 2015). En estos sitios, precursores linfoides originados por células madre hematopoyéticas empiezan a diferenciarse en linfocitos maduros debido a la transducción de señales y modificaciones en los receptores. Las poblaciones de linfocitos T maduran en el timo y los linfocitos B maduran en el bazo (Owen et al., 2015). Los linfocitos T expresan TCR (T cell receptor) y los linfocitos B expresan BCR (B cell receptor). Para que dichos receptores sean funcionales y no dañen al hospedero por auto-reconocimiento, deben pasar por múltiples procesos de selección con co-receptores (Kretschmer et al., 2006). Bajo dicha maduración, los TCR/BCR que poseen alta afinidad ante antígenos propios son eliminados por apoptosis (por múltiples vías) o bien, son suprimidos por otras poblaciones de linfocitos reguladores. Incluso se sabe que los linfocitos pueden editar sus receptores para invalidar su propio mecanismo y así no alterar la homeostasis del organismo (Owen et al., 2013, Abbas et al., 2015).

Este tipo de tolerancia, conocido como tolerancia central, regula el reconocimiento propio, si hay perturbaciones en su regulación se desarrollan enfermedades autoinmunes y alergias (McCoughtry et al., 2008, Schwartz et al., 2012). Su funcionamiento está basado en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Owen et al., 2003).

El segundo tipo de tolerancia regula el grado de proliferación y diferenciación celular. Este, es uno de los tipos de tolerancia menos estudiado, por lo que se entiende poco sobre la inestabilidad de su sistema y su relación con el cáncer (Kretschmer et al., 2006, Hebeisen et al., 2012). Las células tumorales pasan por estados transitorios antes de ser malignas para el organismo, hasta el momento se sabe que su desregulación se puede deber a múltiples causas como mutaciones en oncogenes. Lo que define a un conjunto de células tumorales es su estrategia invasiva irreversible para obtener más nutrientes y oxígeno (Abbas et al., 2015).

Los otros dos tipos de tolerancia inmune se encargan del reconocimiento molecular de antígenos externos, y son relevantes al tema de estudio del presente trabajo. Para que se lleve a cabo el proceso de reconocimiento a antígenos externos, existen múltiples vías de comunicación tanto del sistema inmune adaptativo como del sistema inmune innato. Sin embargo, para centralizar las ideas del presente trabajo solamente se recopila información del sistema inmune innato, específicamente hacia un PRR, el TLR4. Los receptores con patrones de reconocimiento (PRR, por sus siglas en inglés) se expresan en línea germinal y mantienen su estabilidad en función del tiempo y regulan una respuesta inmediata ante antígenos extrínsecos o intrínsecos (Owen et al., 2013, Abbas et al 2015).

Los microorganismos comensales presentan antígenos que han logrado mantener estabilidad con los receptores inmunes, y esto está conservado para múltiples especies (Margulis, 2009). La palabra simbiosis proviene del griego sym, que significa “juntos” y de bios, que significa “vida”. Miles de millones de años en interacción continua con los microorganismos ha permitido que se establezca un sistema de comunicación que nosotros como homínidos apenas logramos descifrar. La tolerancia inmune y la microbiota comensal son el resultado del fortalecimiento de dichas relaciones simbióticas mutualistas estables, en función del tiempo (Gilbert et al., 2015, Owen et al 2003, Abbas et al., 2015).

Actualmente, existe evidencia de que la microbiota tiene una implicación en multitud de procesos biológicos, fisiológicos y genéticos sobre los hospederos. La microbiota intestinal está involucrada en la correcta absorción de nutrientes, el desarrollo óptimo del tejido entérico, en la maduración de linfocitos T, aunado al desarrollo estable de otros sistemas (e.g. sistema nervioso, circulatorio, renal, hepático, entre otros) (Stappenbeck et al., 2002, Hooper 1998, Gilbert et al., 2015, Pasare y Medzhitov 2004). La desregulación de la microbiota, proceso conocido como disbiosis, puede inducir enfermedades crónicas (Marchesi et al., 2016, Abbas et al., 2005). En los mamíferos, los microorganismos que conforman la microbiota se comunican molecularmente de forma constante con células epiteliales e inmunes de los tejidos que colonizan. Los efectores inmunes que participan en las respuestas de tolerancia se encuentran formando parte de

las barreras moleculares de las cavidades con acceso directo al ambiente externo, y cada tipo de mucosa cuenta con efectores inmunes especializados (Espinosa de Aquino, 2017).

El cuarto tipo de tolerancia se da exclusivamente y de forma especializada ante patógenos, y reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los patógenos son microorganismos que se establecen de manera invasiva en el hospedero. La simbiosis que establecen es antagonista, considerada parasitismo. La selección natural tiene mayor presión sobre ellos porque dependen de múltiples factores tanto ambientales como genéticos. Por ejemplo, en términos del sistema entérico, la condición de la mucosa y la diversidad de la microbiota comensal pueden definir la estrategia de invasión de un microorganismo oportunista. Un ejemplo de esta dinámica es el aumento relativo de Bacteroidetes y la disminución de Firmicutes, que fomenta el establecimiento de Proteobacterias patógenas como *Helicobacter*, *Escherichia coli*, *Neisseria*, *Salmonella* o *Campylobacter* (Marchesi et al., 2015, Swiatczak et al., 2015).

Además de procesos infecciosos agudos, las bacterias no comensales pueden promover el desarrollo de enfermedades como enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), la enfermedad de Crohn (CD), la colitis ulcerativa (UC), la enterocolitis necrosante (NEC), entre muchas otras (Marchesi et al., 2015). Múltiples factores ambientales influyen en el desarrollo de dichas enfermedades, por mencionar algunos, la dieta, la predisposición genética o la presión de selección artificial asociada a medicamentos modifican el microbioma, entre otros (Becattini et al., 2016). Además, el establecimiento de microorganismos patógenos por un periodo extenso puede producir una sepsis lo que eventualmente lleva a la muerte del individuo. Esto puede atribuirse al daño celular endógeno que ocasiona el patógeno, pero también a la propia respuesta inmune pro-inflamatoria del organismo (Hand et al., 2016). En las siguientes secciones se describe la dinámica del sistema inmune entérico asociado a comensales o patógenos, análogo a la respuesta anti- o pro-inflamatoria.

Ecología microbiana del epitelio entérico

La ecología es la rama de la ciencia que se dedica al estudio de las interacciones entre seres vivos y el medio que los rodea (Margalef, 1974). La presente tesis se enmarca en la ecología desde la perspectiva molecular, al sistema inmune innato asociado a los TLR, receptores que han adquirido mutaciones en los genes que los codifican como resultado de una co-evolución de los hospederos con los microorganismos, desde hace cerca de 581 millones de años (Liu et al., 2020, Gilbert et al., 2018).

Los sistemas microbianos han tenido una gran relevancia para la evolución de las especies (Margulis, 2009). A lo largo de la evolución, los linajes celulares de los metazoarios adquirieron dependencia fisiológica con los microorganismos. Existe evidencia de que la microbiota regula el desarrollo y se encuentra implicada en procesos clave como la angiogénesis, regeneración celular, apoptosis, autofagia, desarrollo inmunitario y, por ende, supervivencia celular (Gilbert et al., 2018, Margulis, 2009). En términos generales, los animales contamos con sistemas complejos como el sistema entérico, respiratorio o neuroendocrino gracias a las simbiosis mutualistas y comensalistas con los microorganismos que conforman la microbiota (Gilbert et al., 2018).

En términos del sistema entérico, la parte más dinámica es la mucosa. La mucosa rectal cuenta con aproximadamente 50×10^9 leucocitos por cm^2 (Abbas et al., 2015). Es necesario que exista tal cantidad de células especializadas en la barrera del epitelio porque el número de bacterias es sumamente alto con aproximadamente 10^{14-16} bacterias en un gramo de intestino. Mantener el balance de esas comunidades microbianas sería complicado sin un sistema inmune. Los filos más abundantes de bacterias en el intestino son los Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacterias, aunque también hay algunas bacterias en baja abundancia de los filos Proteobacteria y Verrucomicrobia (Qin et al., 2010, Zhao & Elson, 2018). Asimismo, hay gran diversidad de células con función inmune especializadas de la mucosa intestinal (Martín, 2018) (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Tipos de células que conforman sistema entérico en mamíferos y su función principal para ejercer la homeostasis intestinal.

Células del tubo digestivo	Función
Células epiteliales	Secreción de moco, establecimiento de adhesinas (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).
Células M	Regulan el intercambio de antígenos entre la luz intestinal y la lámina propia (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).
Células de Paneth	Secreción de péptidos antimicrobianos (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).
Linfocitos B secretores	Generación de inmunoglobulinas neutralizantes (IgA e IgM) (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).
Células dendríticas	Captación y presentación de antígenos, maduración de linfocitos Treg, activación de linfocitos T citotóxicos intra-epiteliales, entre otros (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).
Macrófago intestinal	Fagocitosis de microorganismos y presentación de antígenos (Abbas et al., 2015).
Células caliciformes o células de goblet	Se encargan de la secreción de mucosa principalmente pero también péptidos antimicrobianos y citocinas (Abbas et al., 2015, Owen et al., 2013).

Múltiples factores se encuentran involucrados en la homeostasis intestinal dada la interacción entre las células del hospedero en el intestino y las bacterias. Estos incluyen factores físicos, químicos, y ambientales. El desarrollo de la microbiota entérica en los mamíferos placentados inicia durante el desarrollo embrionario, después de la diferenciación del endodermo; esto ocurre en carnívoros aproximadamente a las nueve semanas (Gilbert et al., 2018). Se requiere de otras capas germinales durante la gastrulación como lo es el ectodermo para la diferenciación del epitelio rectal y del mesodermo para el vínculo entre el sistema circulatorio y la formación de vellosidades en el epitelio entérico (Gilbert et al., 2018). La importancia del desarrollo temprano del sistema inmune intestinal queda de manifiesto por la rapidez de su formación. Por ejemplo, a las 12 semanas en humanos ya se cuenta con un repertorio funcional de linfocitos B y T en el intestino (Weström et al., 2020).

El transporte de microorganismos ocurre en la etapa fetal, a través de la placenta, el líquido amniótico y el cordón umbilical (Parag et al., 2017, Weström et al., 2020). Sin embargo, la maduración del sistema inmune y del epitelio entérico con todas sus variedades de células no ocurre hasta después del nacimiento (Weström et al., 2020), que es cuando se da la inoculación microbiana durante el paso por el canal de parto y la exposición a microorganismos del ambiente. Esto es un factor determinante para el establecimiento de las comunidades microbianas en el intestino.

Por otra parte, en mamíferos neonatales la maduración del sistema entérico goza de un suministro de nutrientes, efectores inmunes y antígenos microbianos producidos durante la lactancia como parte de la inversión materna, para asegurar la adaptación y crecimiento de la progenie. La leche materna contiene bacterias que regulan el desarrollo del epitelio entérico; entre ellas están especies de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Prevotella*, entre otras (Weström et al., 2020, Gobert y Lafaille, 2012)). A su vez, estas bacterias son reguladas por los anticuerpos maternos (Weström et al., 2020). La leche materna también contiene elementos reguladores como los péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas, histaninas), lisozimas, lactoferrinas, citocinas (pro y anti-inflamatorias), entre otros (Barko et al., 2008). Además, la leche materna cuenta con

elementos moleculares como los miRNA, microvesículas y ncRNA, los cuales regulan la expresión diferencial de genes en el sistema entérico de la cría (Barko et al., 2018).

Más adelante en el desarrollo del organismo, durante la vida media y adulta los animales con un sistema inmune sano regulan directamente las interacciones con su microbioma. Esta comunicación bidireccional ocurre de forma diferente entre las regiones del sistema entérico (Fig. 2) (Parag et al., 2017). El intestino delgado es la primera región; ahí se recibe el bolo alimenticio proveniente del estómago. El bolo se descompone en moléculas más simples por enzimas hidrolíticas, proteolíticas, glucolíticas, entre otras, y son liberadas vitaminas y ácidos grasos los cuales son transportados vía sanguínea a otras partes del cuerpo. La abundancia relativa de bacterias en el intestino delgado del humano es de $\sim 10^5$ por gramo (National Academy of Sciences, 2006). Conforme avanza el sistema digestivo, es decir, ya próximo al colon, hay mayor abundancia de bacterias, aproximadamente de 10^6 - 10^{14} bacterias en mamíferos (National Academy of Sciences, 2006).

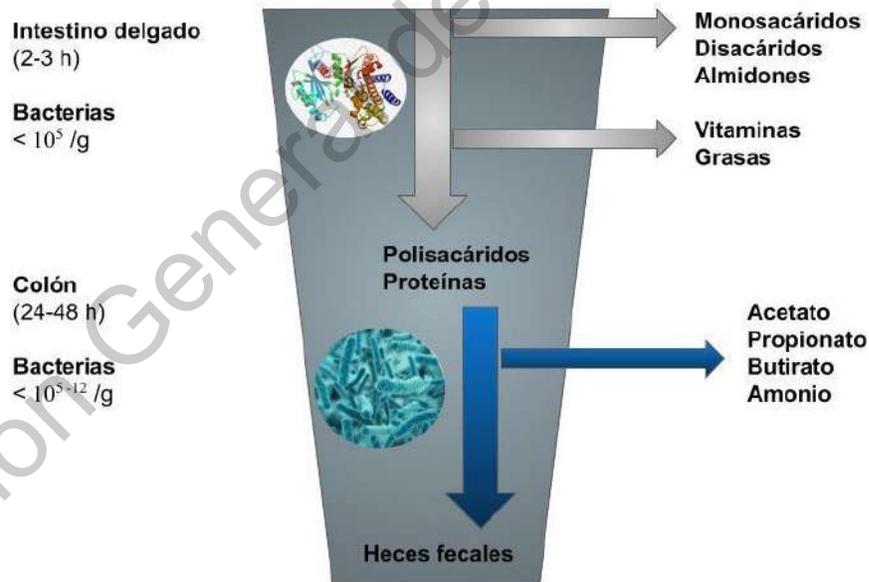


Figura 2.- Estructura del sistema digestivo. (Modificado de National Academy of Sciences, 2006).

El sistema entérico en mamíferos placentarios puede dividirse en estómago, intestino delgado, colon y el recto. La abundancia relativa de bacterias es mayor en la zona posterior caudal (National Academy of Sciences, 2006).

En el colon, las bacterias promueven la fermentación de polisacáridos que no pudieron degradar las enzimas celulares del compartimento anterior y se generan múltiples ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, *Short-chain fatty acids*), tales como el acetato, propionato y butirato. Dichos SCFA son absorbidos en la mucosa entérica y pasan al torrente sanguíneo para ser distribuidos como fuente energética. Su función es fungir directamente como fuente de carbono para producir energía en diferentes tipos celulares (National Academy of Sciences, 2006, Swiatczak et al., 2015).

En la parte final del sistema entérico los productos que no pudieron ser aprovechados para la extracción de energía son excretados en forma de heces (Fig. 2). En este sitio múltiples comunidades de microorganismos continúan asociados al epitelio entérico y la abundancia microbiana es aún mayor (National Academy of Sciences, 2006). Esta sección intestinal es relevante a la presente tesis ya que es aquí en donde se llevó a cabo la cuantificación de la transcripción relativa de un marcador asociado a la tolerancia a bacterias Gram negativas, específicamente hacia el lipopolisacárido (LPS) de membrana.

La interacción entre las bacterias y las células del intestino está regulada por señales moleculares de tolerancia (producidas por bacterias comensales) y señales de peligro (producidas por bacterias patógenas) a nivel de MAMPs y PAMPs, respectivamente, y de antígenos externos (Swiatczak et al., 2015). Los receptores PRR de los enterocitos son los que participan en estos procesos de comunicación (Owen et al., 2013).

Uno de los PRR son los TLR, que pueden estar asociados al factor de diferenciación mieloide (MyD88) (Fig. 3). Las vías de transducción responden por medio de vías de señalización intracelular (asociadas a la inflamación/anti-inflamación), como la vía NF- κ B, JNK y p38 MAPK. La respuesta puede ser mediada por MyD88 o independiente de MyD88 (Lu et al., 2008). La cascada de señalización intracelular de tolerancia regulada por el receptor Toll 4- LPS se profundiza en las siguientes secciones.

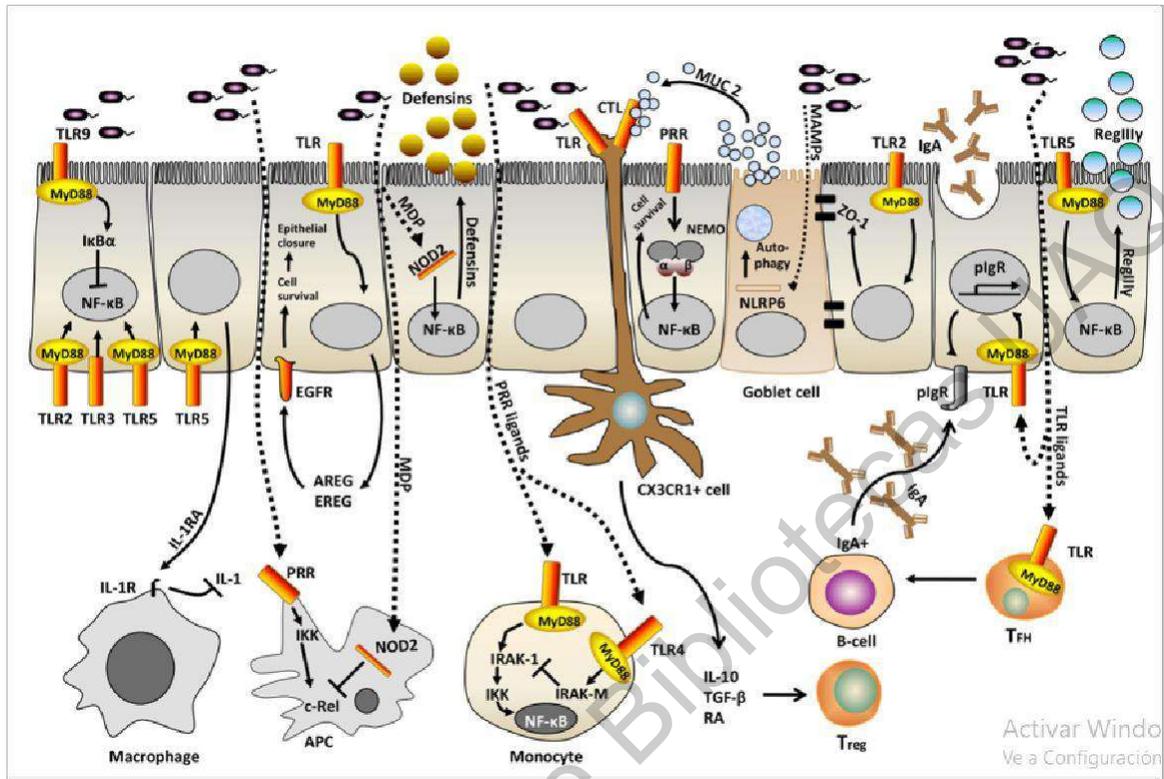


Figura 3.- Vías de tolerancia en el epitelio entérico mediadas por PRR y ligandos microbianos (Swiatczak et al., 2015).

La hilera superior de células representa a las células epiteliales. Abajo, están representadas las células inmunes del sistema entérico. Los receptores TLR reconocen bacterias y activan la vía de NF-κB de manera extra e intracelular. La vía NOD2 inhibe la respuesta pro-inflamatoria en células presentadoras de antígeno (APC). Las bacterias comensales también regulan las adhesinas entre enterocitos y la producción de péptidos antimicrobianos. Las células dendríticas regulan la expresión de IL-10, TGF-β y ácido retinoico para la maduración de linfocitos reguladores (Treg). Las células goblet producen mucinas y regulan la autofagia. Por último, la dinámica de los linfocitos T cooperadores (Treg) foliculares regula la maduración de células B para la producción de inmunoglobulinas IgA diméricas que son translocadas al exterior celular y reconocen antígenos bacterianos.

Reg3G reconoce peptidoglicano de bacterias gram positivas y actúa como péptido antimicrobiano (Swiatczak et al., 2015).

Microbioma intestinal del elefante marino del Norte e inmunidad neonatal

La diversidad del microbioma intestinal en diferentes órdenes de mamíferos ha evolucionado a diferentes tasas de divergencia. Se ha observado que específicamente en carnívoros depredadores la dieta se ha mantenido estable y esto ha tenido una implicación en la poca variabilidad en términos de la diversidad del microbioma (Nishida & Ochman, 2018). Basado en un análisis de secuenciación del 16S del microbioma de 112 especies y 14 filos, se afirmó que “los carnívoros depredadores albergan la menor cantidad y diversidad de microbios intestinales” comparado con los mamíferos herbívoros. Es interesante también que en carnívoros depredadores no se ha encontrado una correlación significativa entre la masa corporal y la diversidad microbiana del intestino (Nishida & Ochman, 2018), comparado con los mamíferos herbívoros (Godon et al., 2016). Es importante remarcar que estas generalizaciones se realizan en términos de órdenes de mamíferos y puede haber excepciones en función de las transiciones evolutivas de espacios terrestres a marítimos, la dieta, la edad, la historia de vida de cada especie e incluso su epigenética, entre muchas otras. Recientemente se realizó un análisis de las secuencias bacterianas específicamente de las mucosas entéricas de 40 crías de elefante marino (Stoffel et al., 2020). Se observó que el microbioma intestinal del elefante marino del Norte constitutivamente es típico de un mamífero placentado. La mayor parte de las bacterias corresponden a los filos Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria y Proteobacteria, en orden de mayor a menor abundancia después del destete materno (Stoffel et al., 2020). Algunos patrones de variación en la abundancia relativa fueron semejantes a las reportadas para otros mamíferos, como ratones y humanos (Larsen, 2017). Un ejemplo consistente, fue el aumento del género de *Prevotella* ante la independencia nutricional respecto a la disminución de *Bacteroides* (Stoffel et al., 2020), lo que también se observó para otras

especies (Parag et al., 2017). Los resultados de la abundancia relativa de filos bacterianos en función del tiempo se muestran en la Fig. 4, mientras que en la Fig. 5 se observa un escalado multidimensional (MDS) de la variación del microbioma en función del sexo y el tiempo de maduración intestinal.

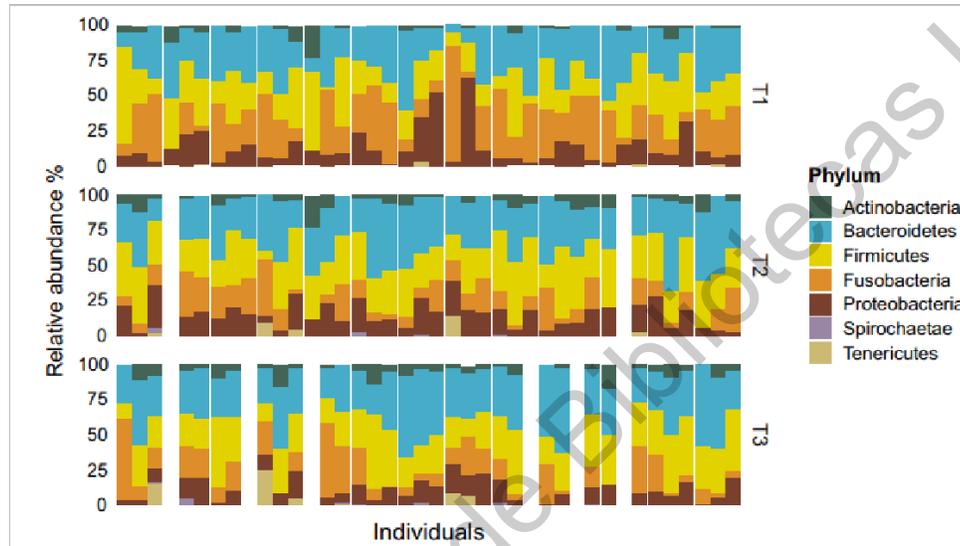


Figura 4.- Microbioma intestinal de crías de elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris* (Figura tomada de Stoffel et al., 2020).

El eje Y del gráfico expresa la abundancia relativa de bacterias en cuarenta elefantes marinos que se sitúan en el eje X. La imagen muestra tres tiempos de muestreo. T1 denota el primer muestreo de mucosas entéricas al final del periodo de lactancia (28 días). Al tiempo T2 y T3, los elefantes muestreados tenían 15 y 30 días de ayuno respectivamente.

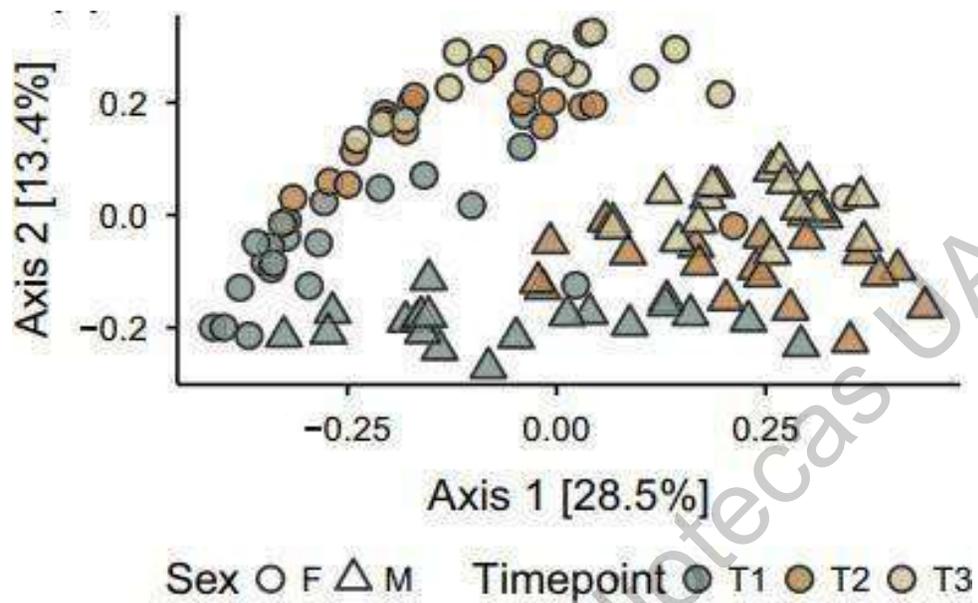


Figura 5.- Diversidad beta del microbioma intestinal de crías de elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*.

Para comprender mejor la diversidad de especies microbianas entre las comunidades de elefantes marinos se analizó el tipo de diversidad beta. Dicha variabilidad del microbioma fue explicada por el sexo y el tiempo de muestreo; en el eje “x” y “y” se representa el porcentaje de disimilitud entre filas bacterias por el método de Bray-Curtis (Figura tomada de Stoeffel et al., 2020).

El análisis de Bray Curtis se observa en el eje x que el 28.5% de la variabilidad se explica por la maduración del intestino en función del tiempo y el 13.4% de la variación del microbioma intestinal está explicado por el dimorfismo sexual (Stoffel et al., 2020). También se realizó un test PERMANOVA y el tiempo de muestro aunado al sexo explicaron el 15% de la variación de las secuencias del microbioma intestinal (edad: $R^2 = 0.15$, $p < 0.001$, sexo: $R^2 = 0.15$, $p < 0.001$) (Figura 5). La diversidad beta una transición del T1 al T3 y las poblaciones de bacterias fueron más o menos homogéneas para ambos sexos en el T1. Esto puede atribuirse a que los animales fueron alimentados con la misma fuente nutrimental lo que implica la misma transmisibilidad de efectores inmunes, bacterias, péptidos

antimicrobianos, entre otros (sección 3.2). La abundancia relativa de bacterias para el primer tiempo de muestreo (el destete), fue consistente para los filos más abundantes, Firmicutes (H: 51%, M: 48%) seguido por Bacteroidetes (H: 18%, M: 20%) y en filos menos abundantes se observó una mayor variación, siendo Fusobacteria en machos (13%) y Proteobacteria en hembras (14%) (Stoffel et al., 2020).

El cambio en la diversidad beta se observó de forma marcada en la transición del T1 al T2 ante la independencia nutrimental, siendo más abundantes los filos Bacteroidetes (H: 37%, M: 19%), Firmicutes (H: 32%, M: 46%) y Proteobacteria (H: 19%, M: 15%) (Stoffel et al., 2020). Con base en los cambios observados en el microbioma intestinal, este trabajo sugiere que la dinámica del receptor TLR4 será mayor durante el destete tardío aunado a un posible patrón dimórfico que contribuya al entendimiento de la variación de bacterias intestinales entre sexos, lo que constituye la pregunta central de la presente tesis.

Estructura y evolución de los TLR

Los receptores tipo Toll o TLR fueron la primer familia de PRR en ser descrita (Owen et al., 2013, O'Neill et al., 2013). La palabra Toll viene del alemán “argot” que significa raro o extraordinario, este nombre se asignó en función de la anomalía morfológica que se generaba ante una mutación puntual de un gen toll en el desarrollo del eje dorsal ventral en embriones de *Drosophila melanogaster* (Anderson et al., 1985). La primera vez que se reconoció la secuencia de nucleótidos de un receptor Toll, fue en 1991 dada su homología con el receptor de IL-1, el cual había sido clonado y secuenciado exitosamente unos años antes (Owen et al., 2013, Gay et al., 1991, O'Neill et al., 2013).

En términos estructurales, los TLR son glicoproteínas de aproximadamente 550 a 850 aminoácidos (Botos et al., 2011). Se dividen principalmente en tres partes. En primera instancia, la parte más conservada, el dominio intracelular (Liu et al., 2020), posee un dominio TIR, que significa receptor Toll de interleucina 1 (IL-1). Su relevancia radica en la transducción de señales intracelulares acoplada a múltiples adaptadores río abajo (Gay et

al., 2006, Gay et al., 1991, Botos et al., 2011). En medio, se encuentra un único dominio transmembranal el cual es importante para la movilización de todo el complejo a través de la membrana lipídica y la dimerización entre receptores o co-receptores (Botos et al., 2011, Gay et al., 2006). Por último, el tercer dominio es la región extracelular que se caracteriza por una alta hidrofobicidad ya que contiene regiones con múltiples repeticiones de leucinas (LRR, por sus siglas en inglés), las cuales poseen una carga eléctrica no polar (Gay et al., 2006, Botos et al., 2011). Típicamente, se considera en promedio que el ectodominio de TLR en mamíferos contiene de 19-25 LRR. La presencia de estos residuos en conjunto con los otros aminoácidos permite la generación de la forma tipo “herradura” tan particular de esta familia de proteínas (Botos et al., 2011).

Los receptores tipo Toll se dividen en aproximadamente de 10 a 13 familias en mamíferos, aunque cabe mencionar que su clasificación es variable entre especies (Liu et al., 2020, Owen et al., 2013, Botos et al., 2011, Kumar et al., 2009, Pasare et al., 2004). El más antiguo de los TLR presente en vertebrados deuterostomados es el TLR3, que tiene afinidad a moléculas de ARN de doble cadena (Tassia et al., 2017, Liu et al., 2020). Esto podría sugerir que antes de la expansión y diversificación de los TLR posiblemente hubo una clase de coevolución viral con los primeros segmentos de ARN estables en la Tierra (Tassia et al., 2017, Botos et al., 2011). Además, el gen que codifica al TLR3 se ha mantenido estable a pesar de las radiaciones y presiones de selección; esto se sabe porque el gen codificante a este receptor no mostró pseudogenización, pérdida o duplicación genética, durante millones de años (Liu et al., 2020).

Se debe reconocer que cada miembro de la familia TLR es un mundo por explorar y cuentan por su propia historia coevolutiva asociada a sus ligandos. Sin embargo, un breve consenso de su división en función de sus antígenos microbianos o PAMPs es la siguiente:

Los receptores TLR1, TLR6 y TLR2 tienen afinidad a lipopéptidos de bacterias Gram positivas y hongos. Pueden heterodimerizar entre ellos para ser aún más específicos hacia los antígenos del medio extracelular (TLR1/2, TLR6/2) (Botos et al., 2011, Kumar et al., 2009). El TLR5 reconoce flagelina bacteriana monomérica, y se sabe que este receptor juega un papel importante en la determinación de la microbiota en el intestino (Kumar et al.,

2009). Los receptores TLR7 y TLR8 tienen atracción al ARN de una cadena de origen bacteriano o viral. Se expresan regularmente de manera intracelular en membranas endosomales o en endolisosomas (Botos et al., 2011, Kumar et al., 2009). El TLR11 reconoce a la profilina de parásitos intracelulares (Kumar et al., 2009), interesantemente, los humanos carecemos de todos los miembros de esta familia (Botos et al., 2011). Finalmente, el TLR9 tiene afinidad al ADN, específicamente secuencias ricas en repeticiones CG que carecen de metilación (Botos et al., 2011, Gay et al., 2006, Kumar et al., 2009).

Los distintos TLRs forman parte vital de la respuesta inmune innata y la adaptativa (Pasare y Medzhitov 2004). Por un lado, promueven respuestas pro-inflamatorias ante agentes externos y regulan procesos como la producción de citocinas, fagocitosis, la activación del complemento y la expresión de péptidos antimicrobianos (Owen et al., 2013, Pasare y Medzhitov 2004, Gay et al., 2006). Por otro lado, también regulan la inmunotolerancia bajo procesos homeostáticos, lo que define si habrá supervivencia celular o en su defecto apoptosis (Kumar et al., 2006, Louzoun 2007, Khailaie et al., 2013). Otro factor que comparten es la heterodimerización u homodimerización de los dominios extracelulares para comprimir a su ligando de preferencia (Botos et al., 2011). La única excepción a este mecanismo tipo "sándwich" es el TLR4, pero se abordará a detalle más adelante. Los repertorios celulares en donde se expresan son múltiples y variables, pero en general pueden encontrarse en células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células dendríticas, células NK, linfocitos B, macrófagos, monocitos, mastocitos, neutrófilos, entre muchos otros (Owen et al., 2013, Kumar et al., 2006).

Hoy en día sabemos que las proteínas TLR probablemente aparecieron hace 581 millones de años en los metazoarios bilaterales y específicamente en los vertebrados se encuentran secuencias conservadas desde hace 542 millones de años (Liu et al., 2020). Interesantemente, el dominio extracelular de los TLR contiene múltiples repeticiones cisteínas (mcc TLR), en clados muy antiguos de especies de protóstomos (Liu et al., 2020). Durante el desarrollo y evolución de los deuterostomados, en algunos equinodermos y hemicordados se presentó una expansión de secuencias de TLR (Tassia et al., 2017). Se ha sugerido que dicha explosión sucedió por el contexto ecológico evolutivo y la transición de

ecosistemas acuático- terrestre. Sin embargo, posterior a dicha diversificación las secuencias de TLR en los vertebrados mandibulados, preservaron un único grupo de cisteínas dentro del dominio extracelular (scc TLR, por sus siglas en inglés) (Liu et al., 2020) (Fig. 6).

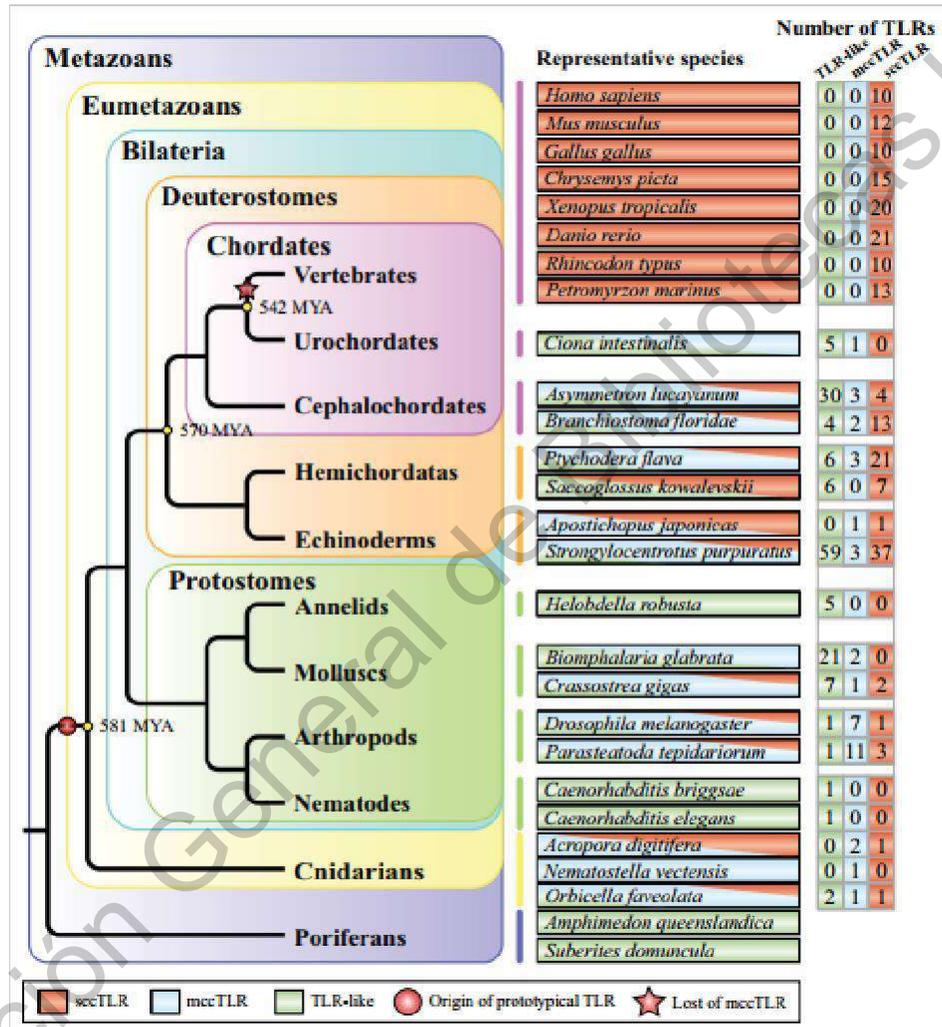


Figura 6.- Evolución de los TLR en metazoa. Hace aproximadamente 581 millones de años los TLR se divergieron en el reino animal. Del lado derecho se sintetizan los tipos de TLR, en azul se resaltan los dominios con cisteínas únicas y en rojo los dominios con múltiples cisteínas. Hace aproximadamente 542 millones de años en el clado de los vertebrados

dejaron de codificarse los TLR con múltiples grupos de cisteínas (Imagen tomada de Liu et al., 2020).

Vía de señalización de TLR4 con LPS de bacterias comensales

Pocos receptores en la historia de la inmunología han recibido tanta atención dentro de una familia de proteínas como ocurre con el TLR4 (O'Neill et al., 2013, Beutler et al., 2000). En mamíferos se ha observado que las proteínas TLR4 tienen aproximadamente 839 aminoácidos (Liu et al., 2020). El receptor TLR4 fue descrito por vez primera en 1998 y se reportó su especificidad a ligandos de bacterias Gram negativas, específicamente hacia el lipopolisacárido (LPS) membranal. El LPS bacteriano también conocido como endotoxina, es una estructura formada por dos núcleos denominados interior y exterior. El núcleo interior está enlazado con un lípido A. La otra parte del núcleo tiene enlaces covalentes con polisacáridos específicamente antígenos O susceptibles a hidroxilación (Beutler, 2000) (Fig. 7). Derivado de su investigación con TLR4, le fue otorgado el premio Nobel de Medicina a Bruce Beutler en el 2011 (O'Neill et al., 2013, Murdock et al., 2016). Su grupo de investigación observó que ratones homocigotos recesivos TLR4-/TLR4- presentaban una resistencia imprevista ante un inóculo bacteriano que teóricamente debería inducir a un choque séptico y, eventualmente, conducir a la muerte (Beutler et al., 2000, Murdock et al., 2016).

En la vía TLR4-LPS, el fragmento que interactúa con el co-receptor de TLR4, la proteína 2 de diferenciación mieloide (MD2, por sus siglas en inglés) reconoce la región que contiene lípidos tipo A (Fig. 7,8) (Gay et al., 2006, Botos et al., 2011). Esta asociación desencadena una cascada de señalización asociada al sistema inmune innato y adaptativo, sobre el que se profundizará más adelante (Owen et al., 2013, Pasare y Medzhitov, 2004). En general, el mecanismo del TLR4 regula una respuesta celular dual. La interacción TLR4-LPS puede producir una respuesta pro-inflamatoria causada por infecciones de bacterias patógenas oportunistas, o puede regular una cascada anti-inflamatoria que lleva a la

inducción de la tolerancia inmune asociada a bacterias comensales Gram negativas (Kurt et al., 2012, Owen et al., 2013, Swiatczak et al., 2015, Stan et al., 2018).

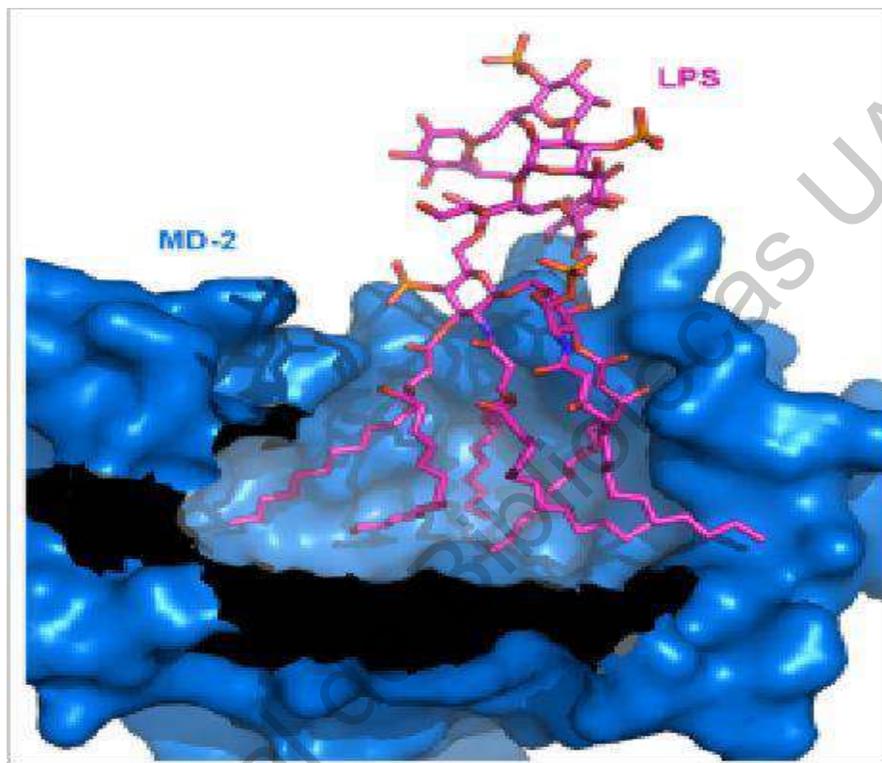


Figura 7.- Sección transversal de la interacción LPS con MD-2.

En color azul se ejemplifica la proteína MD-2 bajo interacción con el LPS específicamente el lípido A de color violeta (Tomada de Botos et al., 2011).

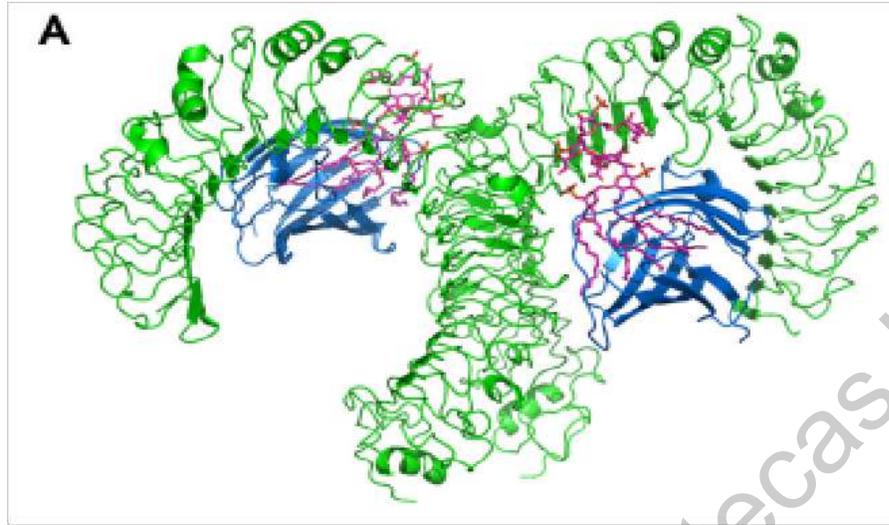


Figura 8.- Estructura del complejo molecular TLR4/MD2/LPS. En verde se observa el TLR4, en azul la proteína MD2 y en rosa el LPS bacteriano. En color verde se encuentran las horquillas en dimerización del receptor TLR4 bajo interacción con MD2 y LPS (Figura tomada de Botos et al., 2011).

La activación del TLR4 es bien conocida por su unión con el ligando LPS de bacterias Gram negativas, pero no es el único ligando con el que tiene afinidad. El TLR4 también puede reconocer PAMPs de hongos, parásitos, virus, plantas y también algunos DAMPs como las calgranulinas, proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90, fibrinógeno, fibronectina, B-defensinas y ácido hialurónico, entre otros (Loes et al., 2018, Kumar et al., 2009, Gauglitz et al., 2012, Oliveira et al., 2004, Gazzinelli et al., 2004, Burzyn et al., 2004, Kurt-jones et al., 2000, Byrd-Leifer et al., 2001). Por esto, el TLR4 reconoce también a los hongos levaduriformes como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* por medio de residuos de mananos de su pared celular, específicamente aquellos que cuentan con O-glicosilación (Gauglitz et al., 2012, Kumar et al., 2009). También se ha visto su afinidad a protozoos intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, ya que el glicosilfosfatidilinositol (GPI) de la pared del parásito se une a las proteínas adaptadoras por la misma vía del LPS (Oliveira et al., 2004, Gazzinelli et al., 2004). Como se verá más adelante, el hecho de que protozoos con GPI puedan activar la vía TLR4 es perceptible ya que un elemento esencial para la unión

del TLR4-LPS con su proteína adaptadora es un *cluster* de diferenciación conocido como CD14 (por sus siglas en inglés *Cluster Differentiation 14*) el cual se encuentra anclado a la membrana de células inmunes por medio de GPI (Gauglitz et al., 2012).

El TLR4 también reconoce proteínas virales. Por mencionar algunos, el virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés), un virus de RNA de cadena negativa el cual expresa una proteína de envoltura llamada proteína de fusión F, la cual activa la vía TLR4 por medio del adaptador CD14 e induce una respuesta proinflamatoria asociada a patógenos en macrófagos (Kurt-jones et al., 2000, Kumar et al., 2009). Otro virus que interactúa con TLR4 es el virus del tumor mamario de los ratones (MMTV, por sus siglas en inglés), este virus de doble cadena de RNA también es reconocido por la vía TLR4 en células dendríticas derivadas de médula ósea (Burzyn et al., 2004).

Incluso algunas fitomoléculas pueden ser reconocidas por TLR4. Por ejemplo, existe un compuesto lipofílico conocido como taxol (del pino, *Taxus brevifolia*), del Pacífico noroeste de América, que se mimetiza como LPS y si es presentado a macrófagos de ratón, activa la vía TLR4 tanto dependiente de MyD88 como la vía independiente (Byrd-Leifer et al., 2001).

Es importante mencionar que el receptor TLR4 es el único miembro de la familia de los TLR que utiliza co-receptores (Lu et al., 2008, Owen et al., 2013). Ya se profundizó anteriormente como sucede la interacción del complejo TLR4/LPS/MD-2. Dada dicha dimerización de complejos proteicos con el LPS, co-receptores de células inmunes unen su CD14 aunado a una proteína soluble conocida como proteína de unión a lípido (LPB, *lipid binding protein*) (Fig. 8). Ya en dinamismo, todos estos intermediarios moleculares inician la activación de vía intracelular mediada por la dependencia o independencia de MyD88 (Kumar et al., 2009, Lu et al., 2008). En general, el esquema de la Fig. 9 denota la activación de NF- κ B cuando la vía es dependiente de MyD88 en interacción con TIRAP (del inglés, Toll/interleukin-1 *receptor domain-containing adapter protein*). Cuando la vía no tiene dicho co-receptor, es decir la vía independiente de MyD88, se activa el interferón tipo I, por la proteína de membrana asociada a la cadena de translocación (TRAM, por sus siglas en

inglés) y el interferón beta inductor de adaptador con dominio TIR (TRIF, por sus siglas en inglés) (Kumar et al., 2009, Gay et al., 2006).

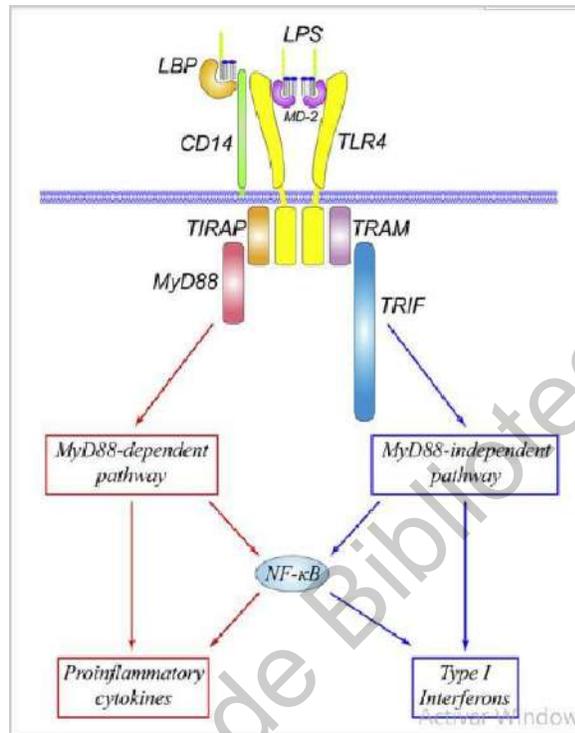


Figura 9.- Ensamble del complejo molecular y la señalización generalizada río abajo.

El complejo TLR4/MD-2/LPS reconoce los co-receptores CD14 y LBP. Esta unión permite la interacción de los dominios intracelulares TIR de los TLR4. A su vez esto recluta a TIRAP o TRAM en función de la dependencia con MyD88. Si la vía es dependiente de MyD88, TIRAP fosforila a IRAK (1,2,3,4) hasta activar NF-κB y producir citocinas pro-inflamatorias. En caso opuesto, la vía independiente a MyD88, se activa TRAM que fosforila a TRIF y continúa la vía hasta activar IFN tipo I (Imagen tomada de Lu et al., 2008).

Modelado matemático de la dinámica TLR4

Un modelo basado en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) de Stan et al., 2018, ejemplifica la dinámica del receptor TLR4 en monocitos humanos y compara los datos de expresión relativa (qPCR) con su modelo.

$$x'(t) = \phi(t) - y(t)z(t)$$

$$y'(t) = \alpha y(t) - \beta y(t) - a y(t)$$

$$z'(t) = \gamma z(t) - z(t)(y - \sigma)$$

Anteriormente se mencionó que la abstracción matemática es de suma importancia para poder entender los procesos complejos. El hecho de tener una variable experimental como la cuantificación de la expresión relativa de un gen no podría revelar patrones concretos si no son trasladados a un plano matemático. Por ejemplo, cuando se cuantifica la expresión del gen TLR4 sin conocer la localización espacial del receptor, el TLR4 podría encontrarse de manera sobre-expresada en membrana, por ejemplo, si el caso fuese una sepsis o una mayor abundancia relativa de bacterias Gram negativas en el epitelio entérico. O el caso opuesto, es posible que su sobre-expresión indique que no fueron necesarios de manera extracelular y se encontraban en endosomas, en la red de Golgi trans o retículo endoplásmico, etc.

Las variables de la ecuación se resumen en el Cuadro 2 y los parámetros para cada variable en el Cuadro 3.

Cuadro 2.- Representación de x' , y' , z' en el modelo.

Dentro del sistema de ecuaciones diferenciales cada variable x, y o z , representan un sitio de localización celular (Ecuación tomada de Stan et al., 2018).

Derivada	Sitio de localización del TLR4 dentro de la célula
x'	Tasa de cambio del TLR4 en la red de Golgi trans (TGN) y compartimiento de reciclaje endocítico (ERC)
y'	Tasa de cambio del TLR4 en endosomas o lisosomas
z'	Tasa de cambio en la membrana celular

Cuadro 3.- Parámetros del modelo ODE, de la vía TLR4 (Ecuación de Stan et al., 2018).

Parámetro	Interpretación del valor numérico
Φ	Tasa de producción de mRNA del TLR4
B	Tasa de transición del TLR4 de los lisosomas a los endosomas
A	Tasa de retroactividad de ERC a los endosomas
Γ	Tasa de tráfico celular del TLR4 desde la membrana hasta TGN
Σ	Tasa de tráfico celular del TLR4 desde la membrana hasta los endosomas

La ecuación $x'(t)$ representa el flujo del mRNA del receptor TLR4. La tasa de producción ϕ es un valor positivo porque se expresa constitutivamente. A dicha tasa se le resta un valor negativo que se multiplica por y' y z' . Es decir, se resta la concentración del TLR4 presente en endosomas, lisosomas o membrana celular. Únicamente se trata de la concentración presente red de Golgi trans (TGN) y compartimiento de reciclaje endocítico

(ERC). La ecuación $y'(t)$ representa el flujo de ERC a los endosomas tempranos. El valor α es negativo porque se refiere al proceso inverso de endosomas a ERC, aunado al flujo de los lisosomas/endosomas tardíos de β .

La ecuación z' describe la concentración de TLR4 en la membrana y cómo cambia en función de la disposición en TGN + ERC (γ) o endosomas tempranos (σ). Por ello, estos parámetros se restan en la ecuación porque implica que, si están en dichos organelos, no puede expresarse de forma extra membranal.

Al determinar los puntos de equilibrio o puntos fijos dentro del modelo planteado se grafican de la manera siguiente (Fig. 10). Se representa en el eje Z la concentración de mRNA de TLR4 en la superficie celular, en el eje X TGN/ERC y en el eje Y los endosomas tempranos. La primera simulación representa un punto fijo estable mediante la concentración basal de mRNA de TLR4 (Fig. 10a). Un aumento de bajo a medio en la concentración del mRNA de TLR4 refleja un punto fijo estable en espiral, en primer instancia incrementa la cantidad de TLR4 en la superficie celular pero eventualmente vuelve a disminuir (Fig. 10b). Por último, con una alta concentración de mRNA de TLR4 en la superficie celular, se establecen dos puntos fijos estables en donde el TLR4 queda de manera irreversible pasando de la superficie celular a endosomas tempranos (Fig. 10c). El modelaje concordó con los datos experimentales de Stan et al., (2018) de individuos con sepsis severa que eventualmente fallecieron.

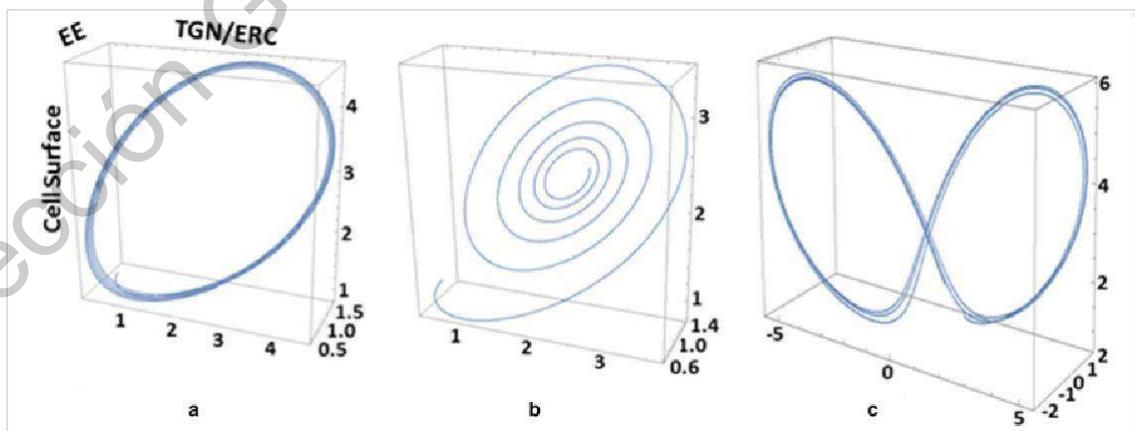


Figura 10.- Simulación matemática del modelo (Imagen tomada de Stan et al., 2018).

El presente trabajo pretende realizar una simulación matemática semejante con los datos experimentales obtenidos. Se predice que únicamente se hallará un punto de equilibrio estable dentro del sistema dado que el muestreo de crías de elefante marino se realizó en individuos aparentemente sanos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

El elefante marino del Norte como modelo de estudio

Mirounga angustirostris es un mamífero marino que se clasifica dentro de la superfamilia de los pinnípedos. Dentro de esta gran categoría se encuentran los otáridos, los odobénidos y los fócidos. El elefante marino del Norte pertenece a la familia Phocidae, dentro del orden Carnivora. Las especies de esta familia son consideradas las “focas verdaderas”, ya que acorde a análisis filogenéticos y su ADN mitocondrial, su clado fue el primero en surgir hace aproximadamente 22 millones de años (Arnason et al., 2006). El pariente más cercano al elefante marino del Norte es el elefante marino del Sur, *Mirounga leonina*. Estos animales pertenecen a la tribu Miroungini, la cual se sugiere que se separó a mediados del pleistoceno, hace 2.5 millones de años, por una especiación alopátrica. Es decir, por aislamiento geográfico. En ese entonces, las aguas ecuatoriales se enfriaron y cuando volvió a ascender la temperatura, los individuos se movieron hacia polos opuestos, dando lugar a cada especie (Boessenecker et al., 2016).

El elefante marino del Norte es un modelo relevante para el estudio de la tolerancia inmune, porque en contraste a otros pinnípedos como lobos marinos y morsas, su periodo de lactancia es corto y el cuidado parental post-destete es prácticamente nulo. Esto permite que se descarte la variación en la dieta y la preferencia de cuidado parental ante múltiples hipótesis. Los animales deben procurar su supervivencia porque una vez destetados están solos. Se alimentarán después de su periodo de lactancia hasta que por selección natural depreden por cuenta propia. El primer contacto con el mar ocurre a las dos semanas del destete aproximadamente y aprenden a bucear en grupos, a las seis semanas (Fig. 11). A los 3.5 meses emprenden su primer viaje al océano (Le Boeuf y Laws, 1994).



Figura 11.- Crías de elefante marino, temporada de muestreo febrero-marzo del 2019. Estas crías de aproximadamente 4-6 semanas de desarrollo practican en grupos el buceo a lo largo del día. Foto: Karla A. Zamora y Cuevas.

Se trata de una especie de alta resiliencia, y como se mencionó, los ayunos tanto en etapa neonatal como en estadio adulto son de vital importancia para la supervivencia de esta especie (Emlen y Lewis, 1977). Su estrategia central en términos de historia de vida es acumular una gran cantidad de energía en corto tiempo para sobrevivir periodos de ayuno extensos (Le Boeuf y Laws, 1994). De cierta forma esto ocurre al principio de su vida, y posteriormente en periodos de cambio de pelaje y en el periodo reproductivo (de diciembre a mediados de marzo). El tiempo en el mar y en tierra es variable en función de la edad del animal; pero, en general, la especie come, acumula energía en el mar y posteriormente la ocupa en tierra con fines reproductivos (Fig. 12). Una vez en terreno firme, los machos empiezan a pelear por la dominancia del territorio y las mejores hembras con fines copulativos (Le Boeuf y Laws, 1994).

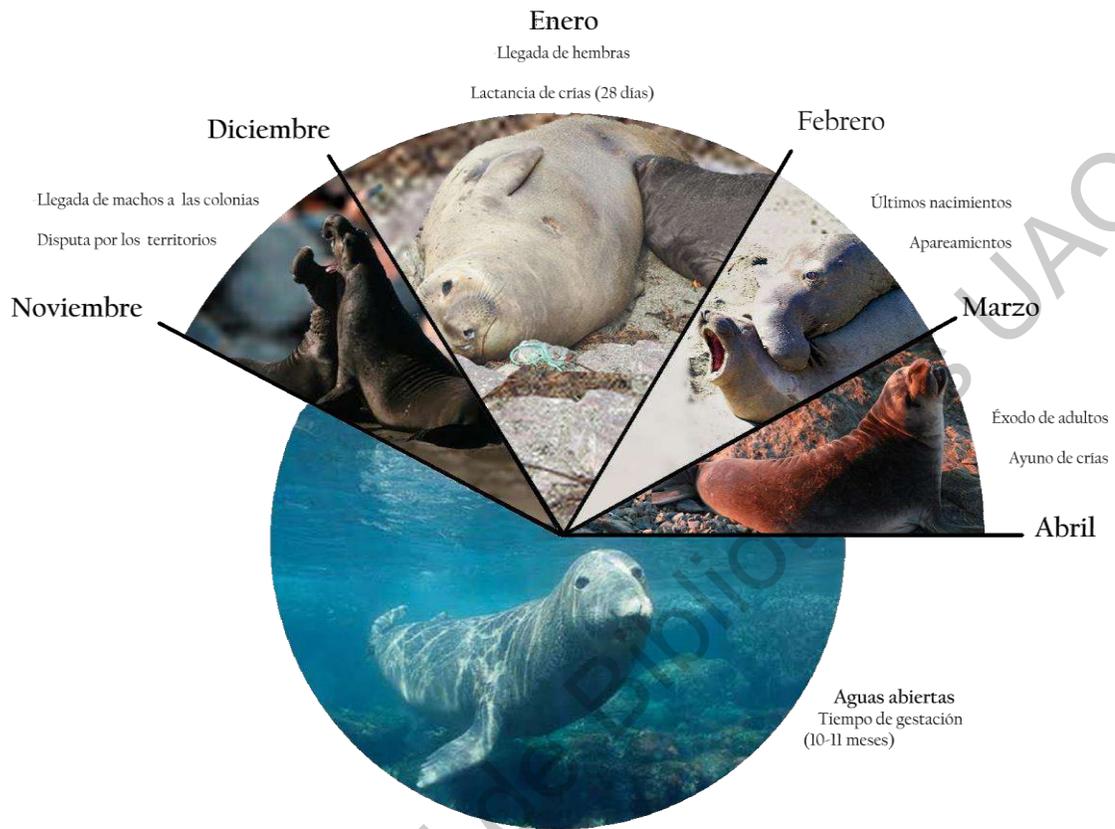


Figura 12.- Ciclo de vida de *Mirounga angustirostris*.

Las crías nacen entre enero y febrero una vez que las hembras llegan a las costas de Pacífico noroeste. Las crías cuentan con aproximadamente 28 días de lactancia, las hembras dan inicio a un desarrollo embrionario inmediato durante la lactancia (Le Boeuf, 1972). Esto implica que los siguientes 10-11 meses las hembras recorrerán su ruta migratoria en aguas abiertas preñadas invirtiendo en efectores inmunes para sus crías. La inversión energética en los machos en dicho sentido es menor, por ello sus rutas migratorias son extensas comparadas con las rutas migratorias de las hembras. En el periodo de noviembre y diciembre los machos llegan primero a las costas para delimitar territorios de dominancia. Figura realizada por el Dr. Ignacio Peñín Fernández y Karla A. Zamora y Cuevas.

Además, por estudios realizados previamente, se ha encontrado evidencia de que la inversión energética en términos de sistema inmune innato es más eficiente en las hembras respecto a los machos de esta especie (Morales-Durán 2017). Específicamente, se encontraron diferencias significativas en la inhibición sérica ex vivo de cultivos de *Escherichia coli*. Las crías hembra de elefante marino del Norte mostraron mayor capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria que los machos (Morales-Duran 2017). Interesantemente, esta diferencia solamente se observó en el periodo temprano del destete. Esto podría indicar que existe un patrón dimórfico en términos del sistema inmune innato durante la etapa neonatal. Si se observa dicho planteamiento desde un enfoque de inversión de recursos, el gasto que se realice en las hembras podría ser más consistente a largo plazo porque son las encargadas de la sustentabilidad de los individuos tanto por la inversión en el desarrollo embrionario como la producción de efectores inmunes para el periodo de lactancia (Le Boeuf y Laws, 1994, Morales-Duran 2017).

Finalmente, es sabido que deben emplearse nuevos modelos para entender mejor los procesos moleculares de tolerancia inmune. Se ha demostrado que existe una diferencia exacerbada en la expresión de citocinas en células inmunes de murinos respecto a las células inmunes de los humanos. Al parecer los ratones pueden suprimir de forma dosis dependiente la expresión de estas citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-6 (Warren et al., 2010), lo que no se ha observado en todas las especies estudiadas. En ese sentido, se entiende que el dimorfismo sexual y el sistema inmune no se comportan de la misma forma en diferentes modelos (Klein y Flanagan , 2016, Gal-Oz et al., 2019). Los modelos silvestres de mamíferos son necesarios para entender la respuesta inmune de tolerancia de forma integral. El elefante marino del Norte es un modelo interesante por su historia de vida, por su contexto filogenético y ecosistémico, aunado a su robusto dimorfismo sexual. En la presente tesis se dilucida el entendimiento de uno más de los patrones dimórficos para esta especie.

JUSTIFICACIÓN

El establecimiento de la tolerancia inmune entérica se desconoce para especies silvestres. Esta tesis estudió la inmunotolerancia entérica, un tema fundamental para el entendimiento de la comunicación molecular bidireccional entre enterocitos y bacterias negativas del tracto intestinal. En un contexto ecológico evolutivo la inmunotolerancia neonatal en este mamífero puede revelar similitudes o diferencias interesantes tanto en la expresión en función del tiempo como en términos del patrón dimórfico de la especie. Además, se investigó la condición de homeostasis intestinal con base en datos experimentales y con una perspectiva matemática. En ese sentido, la tesis constituye una investigación pertinente, innovadora, y de frontera, que une diversas disciplinas para entender un problema complejo.

Dirección General de Bibliotecas UAO

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.- ¿Existe dimorfismo sexual en la tolerancia inmune entérica neonatal del elefante marino del Norte?

2.- ¿La tolerancia inmune entérica neonatal del elefante marino del Norte varía a lo largo de los primeros 20 días del destete?

3.- ¿Las crías de elefante marino del Norte mantienen su homeostasis intestinal acorde a la predicción matemática?

Dirección General de Bibliotecas UAQ

HIPÓTESIS

Hipótesis 1

Los elefantes marinos del Norte en estado neonatal presentan dimorfismo sexual en la expresión relativa del gen TLR4 asociado a mucosas del epitelio entérico.

Predicción: Los machos tienen una menor expresión relativa del gen TLR4 que las hembras. Esto se espera porque se ha demostrado que los machos tienen mayor diversidad de bacterias gram negativas en el epitelio entérico (Stoffel et al., 2020). Lo que indica que son más tolerantes en comparación a las hembras.

Hipótesis 2

Los elefantes marinos del Norte varían la expresión del receptor TLR4 en estado neonatal respecto al post-destete tardío.

Predicción: La expresión del receptor TLR4 del epitelio entérico del elefante marino incrementa a lo largo del destete tardío. Esto se espera porque en múltiples mamíferos existe un aumento de bacterias intestinales a lo largo de la etapa neonatal, al haber más bacterias se espera una mayor expresión relativa de este receptor (Weström et al., 2020).

Hipótesis 3

El receptor TLR4 de los elefantes marinos del Norte mantiene la homeostasis acorde al modelo matemático.

Predicción: El receptor TLR4 de los elefantes marinos fluctúa en un puntos estables dinámicos a lo largo del destete temprano y tardío. Esto se espera porque los datos experimentales han demostrado que únicamente animales que fallecen por bacteremia pasan por puntos de inestabilidad sin retorno a la homeostasis (Stan et al., 2018).

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir el establecimiento de la tolerancia entérica neonatal de un vertebrado marino sexualmente dimórfico, el elefante marino del Norte, en función de la expresión relativa de un gen clave para las respuestas inmunes.

Objetivos específicos

Investigar el patrón de expresión del gen TLR4 asociado a la tolerancia inmune entérica en el elefante marino del Norte, de acuerdo al sexo de las crías.

Analizar las medidas morfométricas y los conteos sanguíneos para respaldar el estado de homeostasis que se sugiere mediante la expresión génica del receptor TLR4.

Unificar los datos experimentales con inmunología teórica mediante un modelaje matemático basado en ecuaciones diferenciales ordinarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Sitio de muestreo

El muestreo se realizó en el Archipiélago de San Benito ubicado a la altura de $28^{\circ} 18' 12''$ al Norte $115^{\circ} 35' 24''$ en el oeste del océano Pacífico. De acuerdo con la división política del país, estas islas pertenecen al estado de Baja California Norte, Ensenada. Las islas en conjunto cuentan con un área total de 3,899 km² (Fig.13). Las islas se identifican por su orientación geográfica y tamaño, la más grande es la isla del oeste, sitio donde se realizó el muestreo de acuerdo con la metodología propuesta por Morales-Duran (2017), asimismo, se encuentra la isla del medio y la isla del este. La zona de muestreo se dividió por territorios previamente analizados (territorio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) (Morales-Duran 2017).

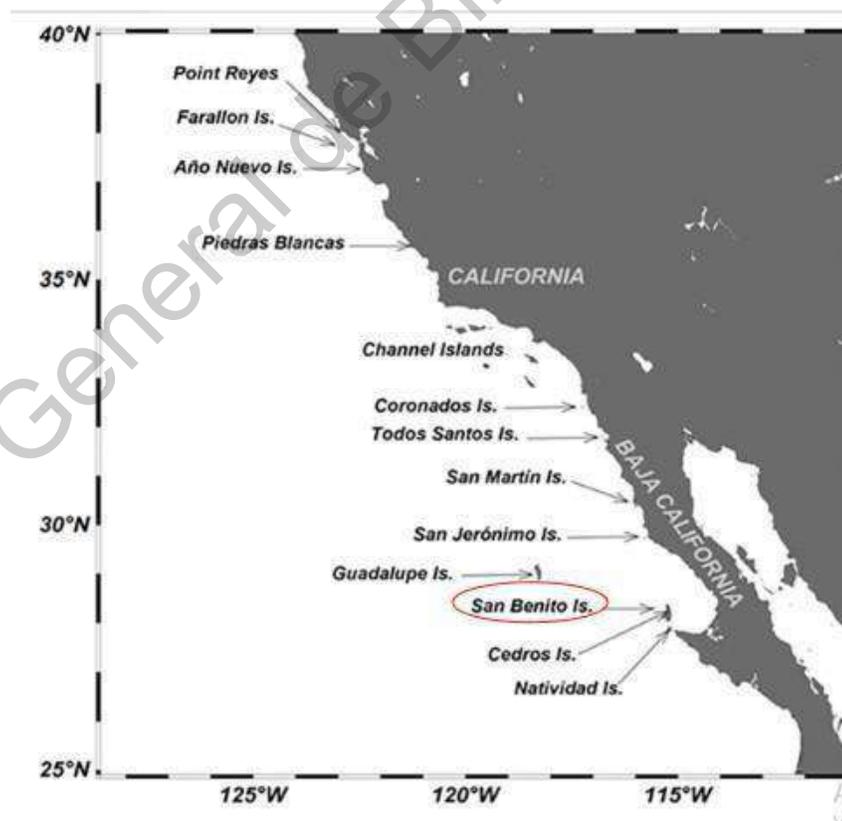


Figura 13.- Zona de muestreo, archipiélago del Pacífico Norte, San Benito. (Imagen modificada de García-Aguilar et al., 2018).

Marcaje y contención de animales

El primer paso empírico para determinar la edad de las crías fue el marcaje con peróxido de hidrógeno (Fig. 14). Se realizó una dilución 1:3 del peróxido de hidrógeno con un buffer comercial. Las crías lactan solamente 28 días, una vez destetadas se inmovilizaron mediante fuerza física y se utilizó una toalla mojada para ayudar a la contención, sin estresar a los animales. Esto permitió una sujeción craneodorsal.

Posteriormente, se sujetaron las aletas posteriores y dejó caer el peso corporal para lograr el control de la cría de elefante marino. La contención se realizó de manera manual física, con dos personas por cada individuo. Un tercer miembro del equipo realizó la toma de datos morfométricos y la colecta de muestras biológicas. También se colocaron etiquetas con un código único para su posterior identificación a los 10 y 20 días post-destete (Fig. 15).



Figura 14.- Marcaje de cría recién destetada con peróxido de hidrógeno.



Figura 15.- Etiqueta de registro del muestreo colocada en la aleta posterior

Colecta de datos morfométricos

Se tomó la longitud total de los animales con cinta métrica directamente en su eje antero-posterior. La toma fue desde el inicio de la nariz hasta la aleta posterior. En el primer muestreo se tomó el diámetro de los animales, pero al ser una medida con bastante variabilidad se ignoró dicha medición para el segundo y tercer tiempo. Por otro lado, se realizó el registro de la capa de grasa lateral de los animales. Para ello se utilizó un vernier, se sujetó la capa de grasa con la palma de la mano, en la zona dorsal de los animales. Los datos se colectaron por triplicado y se calculó la media geométrica de las réplicas. Asimismo, se registraron los tiempos de muestreo y anotaciones específicas para cada individuo.

Colecta de muestras biológicas

Mucosa anal

Se utilizaron cepillos citológicos estériles para la extracción de la mucosa anal. Se introdujo el cepillo en el conducto anal de los animales por duplicado aproximadamente de 8-17 cm. El primer cepillo se guardó en un microtubo estéril con etanol al 96% para la conservación

del ADN. El segundo cepillo se suspendió en una solución para conservar íntegro el ARN (RNAlater, Sigma, EEUA). Las muestras de mucosas se mantuvieron a temperatura ambiente en la sombra hasta su análisis en el laboratorio.

Sangre

Se utilizaron agujas (10 G) con sistema de vacío (Vacutainer, Becton Dickinson). La toma de muestra (7-10 ml) se extrajo de la vena intervertebral extradural. Se tomaron muestras en tres tubos, uno de los que con el primero con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y con el que se determinó el hematocrito y se realizaron los frotis sanguíneos para conteos celulares; segundo con heparina sódica, que después de centrifugar (3,200 rpm) por 15 minutos se usó para separar la capa flogística, misma que fue almacenada en criotubos con (RNAlater, Sigma, EEUA). El tercer tubo sin anticoagulante se utilizó para separar y recolectar el suero luego de una centrifugación a 3,200 rpm durante 15 minutos.

Conteos sanguíneos

Los frotis sanguíneos realizados en campo se fijaron con etanol al 90% acorde a la metodología de Morales-Duran durante 10 minutos. Se tiñeron con un hemocolorante (HYCEL N°548) para resaltar los núcleos de las diferentes células blancas y poder realizar el conteo. A cada laminilla se le adhirió un cubreobjetos y se determinó un cuadrante de 0.5 cm X 0.5 cm en la monocapa de conteo. Cada conteo se realizó por duplicado para corroborar el número aproximado de células blancas y disminuir el error. Para la cuantificación diferencial se utilizó la aplicación de Play Store, WBC Count versión 1.1.0.

Análisis molecular

Diseño de cebadores

Se realizaron alineamientos con secuencias de múltiples fócidos dada la ausencia del genoma de *Mirounga angustirostris* en la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se tomaron múltiples secuencias de fócidos cercanos filogenéticamente al elefante marino y como referencia se tomaron las secuencias de foca

Leptonychotes Weddelli (Ledje, 1996, Arnason et al., 2006). Se alinearon las secuencias de nucleótidos (TLR4, IL-10, IL-1, NLRP6, GAPDH, RPS5) con el programa CLUSTALW. Los cebadores se diseñaron en función de la paridad entre secuencias aunado ciertos criterios con el algoritmo en primer-BLAST. Posteriormente, las secuencias cortas (20- 22 nt), reverso y delantero se filtraron en la base de datos IDT (*Integrated DNA Technologies*) para corroborar sus propiedades tales como la probabilidad de autoplegamiento, porcentaje de guanina-citosina (GC), energía libre por complementariedad entre cebadores ($\Delta G > -60$ kcal/mol), temperatura de alineación (T_m) (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Cebadores utilizados para el análisis con SYBR green para la cuantificación por PCR tiempo final y tiempo real.

Algoritmo de diseño	Parámetros	Límite permisible
Primer-Blast	Tamaño del amplicón	70-300 pb
	Temperatura de hibridación y ciclo de PCR	Default
	Exones 5'	7
	Exones 3'	3
	Grupos taxonómicos de inclusión	Fócidos / Pinípedos
	GC	50-55%
	Autoplegamiento	< 3.00
	Autoplegamiendo en 3'	< 3.00
IDT - Analizador de oligos	Horquilla ΔG (kcal.mol ⁻¹)	> -6.00
	Auto dimerización ΔG (kcal.mol ⁻¹)	> -6.00
	Heterodimerización ΔG (kcal.mol ⁻¹)	> -6.00

Extracción de ARN de mucosas entéricas

La mucosa anal fue procesada para extraer el ARN a partir del cepillo citológico acorde a la metodología de Espinosa et al., 2017. Primero se realizó una agitación vórtex y después dos centrifugaciones a 16,000 G y 2,000 G respectivamente. Una vez obtenido suficiente pellet de mucosas se transfirió a un microtubo estéril y se añadieron 500 μ l de Trizol. A continuación, por medio de un rompimiento mecánico con jeringa de 29 G se traspasaron las células junto el Trizol aproximadamente ocho veces hasta homogeneizar las mucosas junto el Trizol y se incubaron una hora a temperatura ambiente. Para la degradación de proteínas se añadieron 100 μ l de cloroformo y se agitaron los tubos brevemente en el vórtex. Posteriormente, se dejaron incubar cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 19,000 G a 4°C. Se colectó la fase acuosa donde se encuentra el ARN y la fase orgánica con Trizol se almacenó a -80°C. A la fase acuosa se le añadió un volumen de isopropanol frío, 10% de acetato de sodio 3M y 1 μ l de glicógeno (Qiagen). Se incubó una hora a -20°C. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugó a 19,000 G durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante a contraluz con una micropipeta de 1000 μ l. El pellet de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua libre de RNasas, se agitó por inversión suavemente y se centrifugó a 19,000 G. Este procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, el pellet se dejó secar aproximadamente dos horas y se resuspendió en 25 μ l de agua grado molecular.

Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro capilar (Nanodrop ND 1000, Qiagen). Se colocó 1 μ l de muestra y se guardó la relación A260/280 como una medida de calidad de la extracción. Se repitieron las muestras que no se encontraban dentro del intervalo de A260/280 = 1.85 - 2.05. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Retrotranscripción y obtención de cDNA

Para realizar la retrotranscripción se utilizó el kit de transcripción reversa QuantiTect (Qiagen, EEUUA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la eliminación del ADN genómico se colocaron 2 μ l de gDNA *wipeout* y se utilizó como templado 40 ng/ μ l de ARN de cada muestra. Las reacciones se ajustaron a 14 μ l con agua grado molecular y se incubaron dos minutos a 42 °C. Posteriormente, se agregó a la reacción un mix con 1 μ l

retrotranscriptasa heterodimérica, 4 μL de buffer y 1 μL de cebadores aleatorios. Esta reacción se dejó incubar 30 minutos a 42 °C dado que el ARN de interés es largo y con múltiples estructuras secundarias. Finalmente, la retrotranscriptasa se inactivó a 95°C en el termociclador y se almacenaron las muestras de ADNc a -20°C.

PCR de tiempo final

La PCR de tiempo final se estandarizó con las siguientes concentraciones de reactivos:

0.2 μM - Desoxinucleótido trifosfato (dNTPs)

1.5 μM - Cloruro de magnesio (MgCl_2)

0.1 - 0.5 - μM cebadores 1X Buffer para PCR

1X Suero fetal bovino (BSA)

0.05 μL - Taq polimerasa

El ciclo de amplificación en el termociclador (Bio-Rad T100) se normalizó a 95°C - 3 minutos 1 ciclo, posteriormente 35 ciclos a 95°C - 1 min, después 30 s respecto la temperatura de hibridación para cada gen (49°C - 63.5°C), finalmente a 72°C para la elongación. El último ciclo de elongación se llevó a cabo a 72°C durante 10 minutos. Para evitar la desintegración de amplicones al momento de refrigeración la temperatura se mantiene a 4°C. La estandarización de la temperatura de hibridación se realizó con gradientes de temperatura. Se calculó aproximadamente la temperatura de hibridación de manera manual (adenina y timina = 2; guanina y citosina = 4), además de realizar el cálculo *in silico* IDT (Integrated DNA Technologies) con el ajuste de las concentraciones a utilizar. Se probaron en un rango de variabilidad de 10°C hasta encontrar la temperatura adecuada de amplificación.

Una vez realizada la PCR se realizaron geles de electroforesis al 1.8% de agarosa con 1 μL de bromuro de etidio por cada 40 μL de agarosa, para observar la presencia de bandas. Por cada reacción de PCR se utilizaron 3 μL del producto, 1 μL de buffer de carga, 2 μL de H₂O grado molecular. Para un volumen final de 6 μL . Para la escalera de 1kB se utilizaron 0.5 μL de escalera, 2 μL de H₂O y 1 μL de buffer de carga. Posteriormente, cada gel corrió en una

cámara de electroforesis a 100 V, 400 A, durante 30 minutos. Los geles se observaron bajo luz UV en un fotodocumentador y se realizaron ajustes de imagen en Image Lab versión 5.2.1. Una vez corroborada la amplificación en banda, se realizó la cuantificación con el método de qPCR.

PCR de tiempo real (qPCR)

Se realizaron diluciones seriadas de ADN complementario (ADNc). Para esto, se tomaron 10 μ L de cDNA en 10 μ L de agua grado molecular. Posteriormente, por cada 10 μ L se siguieron las diluciones en el siguiente orden 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. El máster mix se estandarizó por reacción:

5 μ L SYBR Green

0.3 - 0.18 μ L cebador delantero (ver Cuadro 5)

0.3 - 0.18 μ L cebador reverso (ver Cuadro 5) 4 μ L cDNA

3.4 μ L Agua grado molecular

Se transfirieron 7 μ L de reacción con 3 μ L de ADNc diluido. Se realizaron triplicados para cada curva. El análisis de las curvas de eficiencia se realizó con el Software CTX de Bio-Rad. Acorde a la correlación de Pearson se ajustaron las curvas con un $R^2 > 0.96$. E= 95-105%. Una vez realizado este paso se realizó la cuantificación con platos Hard Shell de 96 pozos. Se analizaron todas las muestras de ADNc en una dilución 1:10 y se repitió la reacción por duplicado. Los datos obtenidos se exportaron a Excel y se procesaron en R para el análisis de la cuantificación.

Cuadro 5.- Cebadores utilizados para la amplificación de genes GAPDH, RPS5 y TLR4

CEBADOR	5'–3'
GAPDH NES Fw	CAGAACATCATCCCTGCCTC
GAPDH NES_Rv	CTGCTTCACCACCTTCTTGA
RPS5_NES_Fw	GACGATCATTCCTTTCTCCTC
RPS5_NES_Rv	GCCTTCCTGCTGCTCAATA
TLR-4_Fw	TTTCAGCTCTGCCTTCACTAC
TLR-4_Rv	TGGGACACCACGACAATAAC

Análisis estadísticos

Para los datos de medidas morfométricas y conteo sanguíneo, se analizó la clase de distribución de las variables y la homocedasticidad de los datos. Con los datos que mantuvieron normalidad y homocedasticidad en la varianza se realizaron pruebas paramétricas. Se realizaron pruebas de T- de student y ANOVA para las poblaciones con una distribución normal. Para el análisis de poblaciones con una distribución no Gaussiana se utilizaron las pruebas no paramétricas Wilcoxon y Kruskal Wallis. Todos los datos se procesaron en R versión 1.3.1073.

Respecto al análisis de expresión relativa, se tomaron en cuenta únicamente los valores que mostraban una desviación estándar < 1.5 entre réplicas. Se comparó el valor del Ct de los genes control respecto al gen de interés para corroborar que los datos fueran consistentes acorde a su expresión y posteriormente se compararon los valores con el paquete "pcr" de R (Ahmed & Kim, 2018).

Estimación de la masa con medidas morfométricas y fotogramétricas

Se utilizó el software AutoCAD 2018 para digitalizar fotografías de las crías y mediante un modelo de segmentación propuesto por Morales-Durán et al., (2018). Se escaló la medida obtenida de la longitud de los animales y calculó el volumen de cada segmento (Fig. 16 y 17).

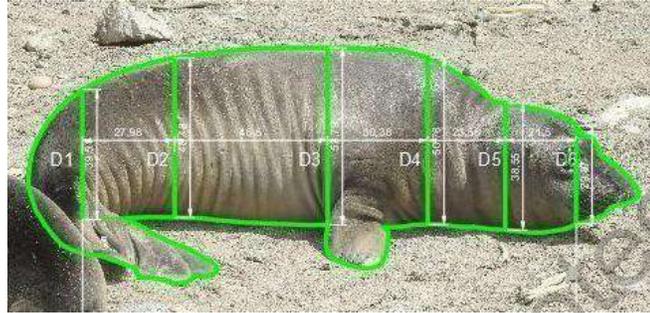


Figura 16.- Digitalización de una cría de elefante marino. Basado en el modelo Morales-Durán et al 2018 (ID: 18B- 01). Imagen creada por Arq. Alonso Emerson Davis.

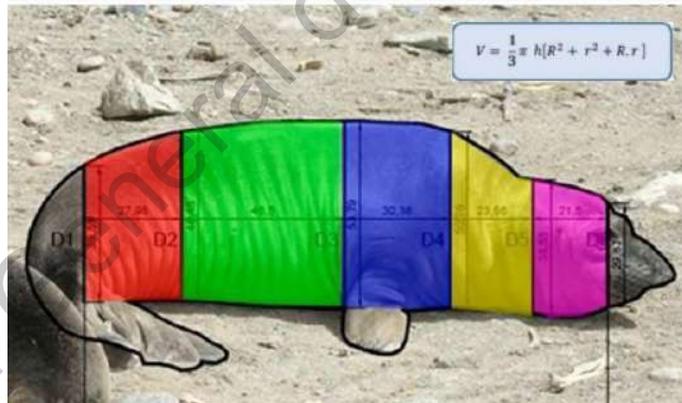


Figura 17.- Fórmula para la determinación de un cono truncado. Cada color representa un cono truncado para estimar el volumen y multiplicarlo por la longitud y el perímetro dentro del modelo matemático Imagen creada por Arq. Alonso Emerson Davis.

Los modelos matemáticos que se utilizaron fueron los mismos que fueron propuestos por Morales-Durán et al., 2018, los cuales son de tipo potencia.

MODELO
$M = 84.208(VOL^{0.1545})(L^{0.8626})(P^{1.5145})$

Elaboración del modelo matemático

El modelo se realizó con el lenguaje de programación R, se utilizó el software de R junto con su interfaz de R studio, versión 1.3.1073. Las librerías que se utilizaron fueron “deSolve” y “scatterplot3d” (Soetaert et al., 2010; Ligges et al., 2003). El conjunto de derivadas descritas en el marco teórico por Stan et al., 2018 se expresaron en forma de función.

Se replicaron los resultados para el valor de ϕ (phi) correspondiente a la tasa de expresión del mRNA del receptor TLR4 con datos de individuos humanos. Posteriormente, se graficó con base a la misma función y parámetros iniciales con el valor de ϕ para cada cría de elefante marino. El valor del *fold change* se calculó con base en el doble delta Ct (Fórmula: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$), asimismo, el $\Delta\Delta Ct$ fue el resultado de la resta del ΔCt menos el promedio grupal del ΔCt .

Análisis de expresión en R

El análisis de expresión relativa se realizó con las librerías “pcr”, “ggplot”, “cowplot” (Ahmed & Kim, 2018). Los archivos generados por el software CFX Manager (Bio-Rad) se transfirieron por medio de Excel (.csv) a R Studio (Livak & Schmittgen, 2001).. Se ingresaron los resultados de la curva estándar y la cuantificación (valores de Ct) para cada muestra. La información anexa (.csv) incluye los promedios y la desviación estándar de cada una de las 6 diluciones (.5, .25, 0.125, 0.06, 0.03 y 0.01) y los datos de la cuantificación (Yuan et al., 2006). Los datos se obtuvieron por duplicado. Se agruparon las variables por tiempo de muestreo (destetado, post-destete) y también entre machos y hembras.

Se analizó la distribución de los datos y con base a estos resultados se calculó significancia estadística con pruebas Wilcoxon y posteriormente se realizaron modelos de regresión lineal volviendo los datos de expresión quasibinomiales, asimismo se aplicaron pruebas F de Fisher para corroborar los resultados significativos.

Estandarización del análisis molecular

Se corrieron las muestras de ARN en gel de agarosa para verificar las bandas ribosomales (Fig. 18). No fue posible observar las bandas ribosomales en todas las muestras, pero se validaron por su relación 260/280 y su concentración mayor a 25 ng/ μ l (Fig. 19



Figura 18.- Bandas ribosomales 28S y 18S en gel de electroforesis para verificar la integridad del ARN de la mucosa entérica de elefantes marinos. Gel de agarosa al 1.8%. Escalera 1000 pb.

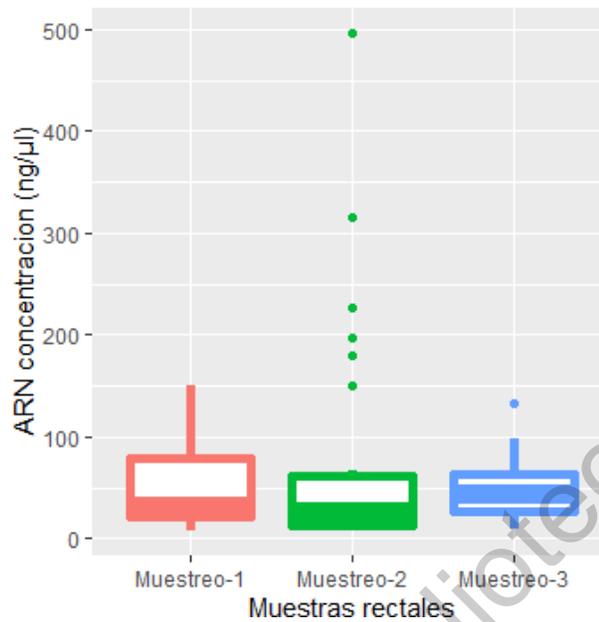


Figura 19.- Concentración de ARN de mucosas anales.

Se estandarizaron las muestras a una relación 260/280 (Fig. 20) y. Se preparó un stock con una cantidad de 40 ng/μl y a partir de dicha concentración se realizó una retrotranscripción por muestra.

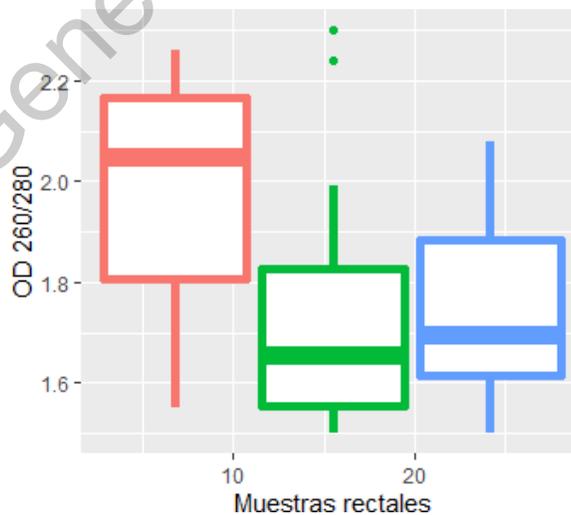


Figura 20.- Calidad de ARN de mucosas anales.

Posteriormente, se realizaron las curvas estándar para cada gen acorde a la metodología. Se utilizaron dos genes control. El gen control de expresión temprana fue GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) y el gen de expresión tardía fue RPS5 (ribosomal protein S5). Las curvas de amplificación y puntos de hibridación de ambos genes se observan en las figuras 21, 22 y 23. Las curvas estándar para el gen GAPDH y RPS5 se observan en las figuras 24 y 25.

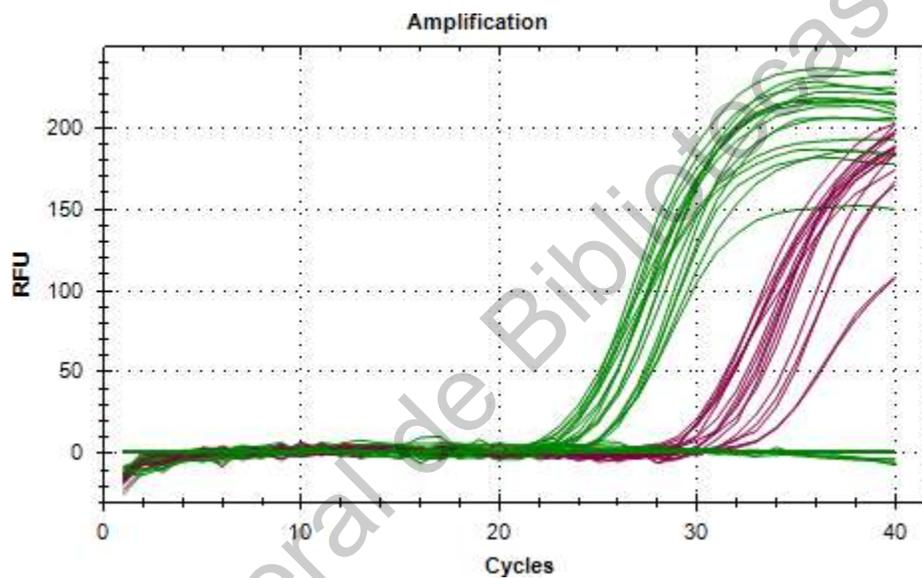


Figura 21.- Curva de amplificación de los genes control GAPDH y RPS5.

En color verde se observa el gen GAPDH y en morado el gen RPS5. El eje Y del gráfico representa las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y el eje X los ciclos de amplificación. El gen GAPDH es un gen de expresión temprana y RPS5 un gen de expresión tardía.

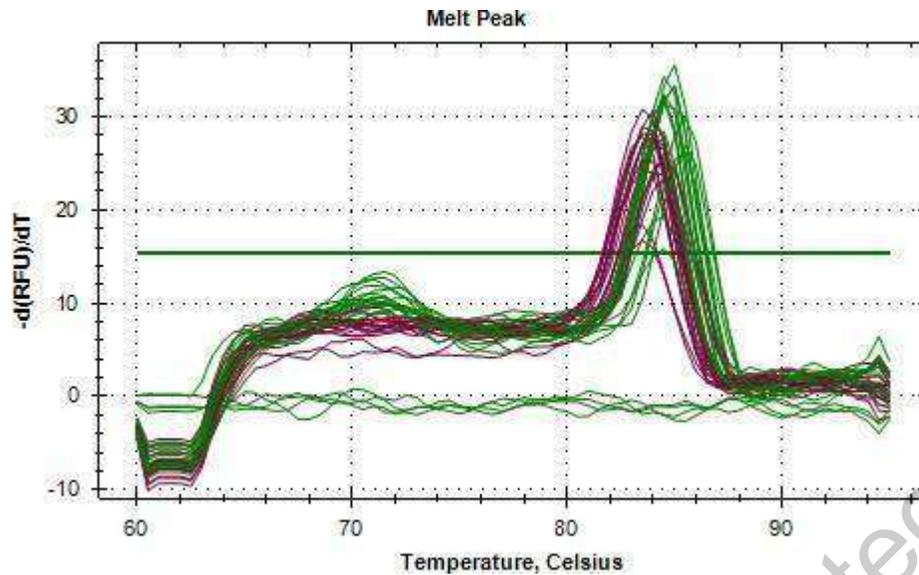


Figura 22.- Pico de hibridación de los genes control GAPDH y RPS5 en función de la temperatura.

En color verde se observa el gen GAPDH y en morado el gen RPS5. El eje Y del gráfico representa las unidades relativas de fluorescencia (RFU) asociadas al diferencial de temperatura (dT). El eje X representa la temperatura a la cual se elevó el pico de amplificación acorde a la fluorescencia del SYBR Green. Las líneas que se observan por debajo son el control negativo para cada gen y el control sin templado, NTC (por sus siglas en inglés, no template control).

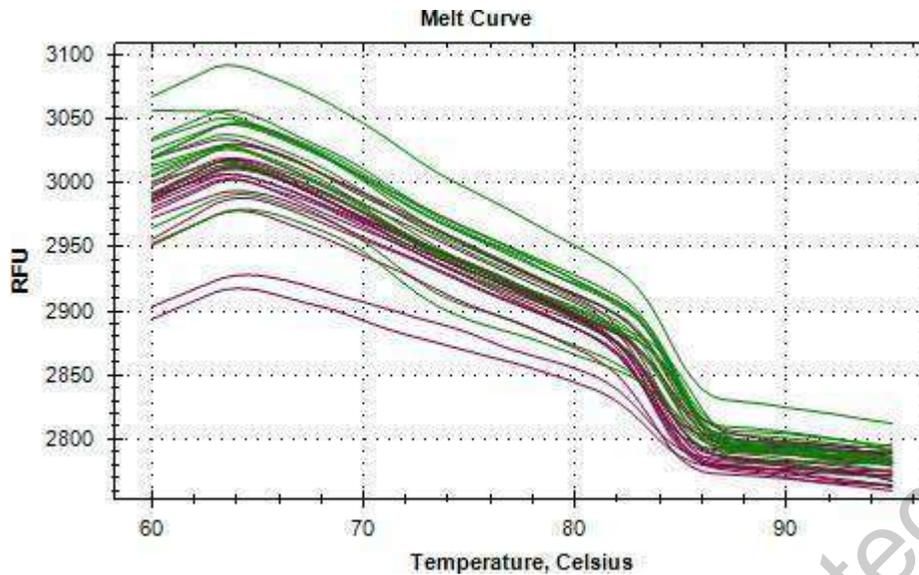


Figura 23.- Curva de hibridación de los genes control GAPDH y RPS5 en función de la temperatura (°C) y las unidades relativas de fluorescencia (RFU).

En color verde se observa el gen GAPDH y en morado el gen RPS5.

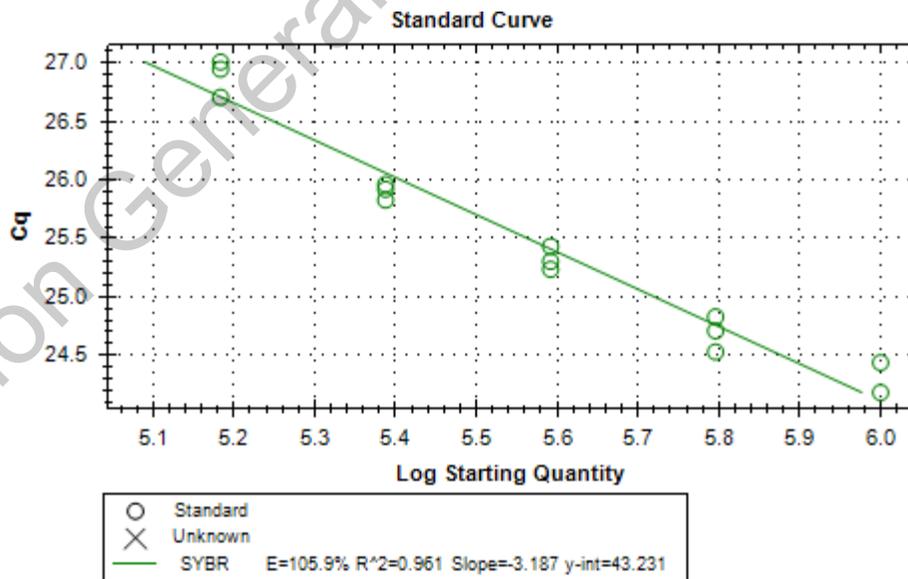


Figura 24.- Curva estándar del gen control GAPDH.

El eje Y se representa el ciclo de cuantificación (Cq, por siglas en inglés, *quantification cycle*). El eje X ilustra el logaritmo de la cantidad de ADN complementario que se colocó por cada celda. La curva estándar se realizó por triplicado, cada punto representa una réplica del resultado. La eficiencia por cada ciclo de replicación fue del 105.9%, la correlación de la amplificación por cada ciclo fue de $R^2 = 0.961$ y la pendiente fue de -3.187.

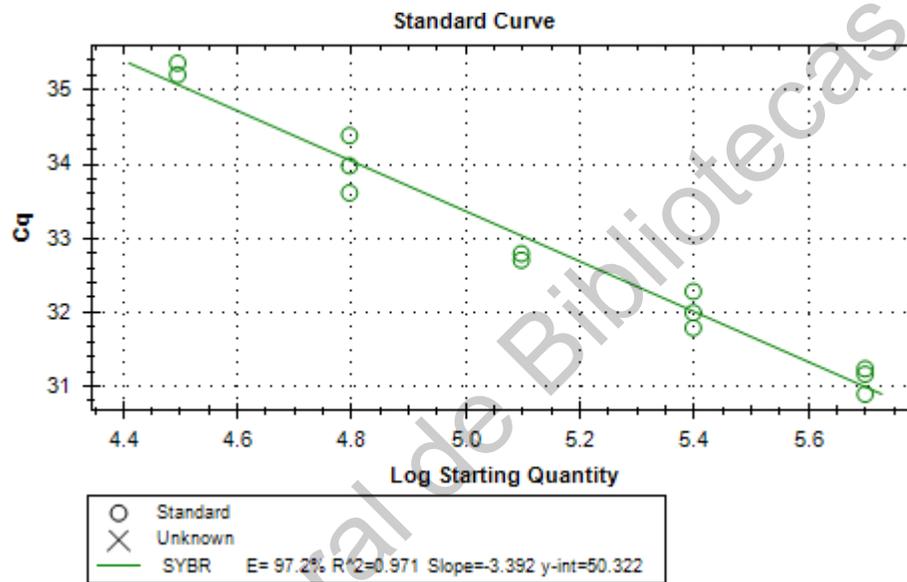


Figura 25.- Curva estándar del gen control RPS5.

El eje Y se representa el ciclo de cuantificación (Cq, por siglas en inglés, *quantification cycle*). El eje X ilustra el logaritmo de la cantidad de ADN complementario que se colocó por cada celda. La curva estándar se realizó por triplicado, cada punto representa una réplica del resultado. La eficiencia por cada ciclo de replicación fue del 97.2%, la correlación de la amplificación por cada ciclo fue de $R^2 = 0.971$ y la pendiente fue de -3.392.

Una vez que se obtuvieron los estándares de los genes de expresión constitutiva se estandarizó la curva para el gen TLR4. La temperatura de hibridación tanto para los genes control como para el TLR4 fue de 54.2 °C, esto se verificó por medio de gradientes de

temperatura (anexo II). La curva de amplificación y los puntos de hibridación para este gen se muestran en las figuras 26, 27, 28 y 29.

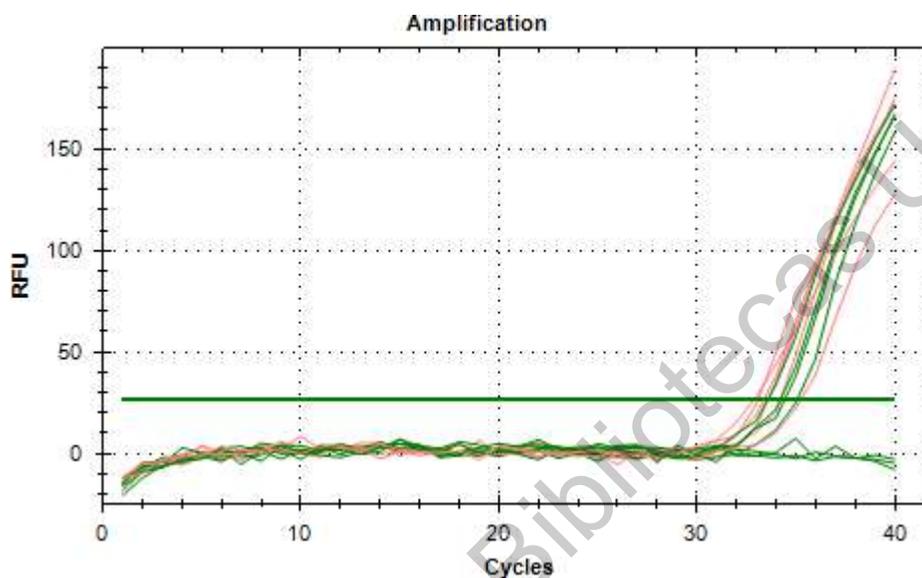


Figura 26.- Curva de amplificación del gen TLR4.

Los colores representan el duplicado de diluciones seriadas del mix de cDNA que se realizó para obtener la curva. El eje Y del gráfico representa las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y el eje X los ciclos de amplificación.

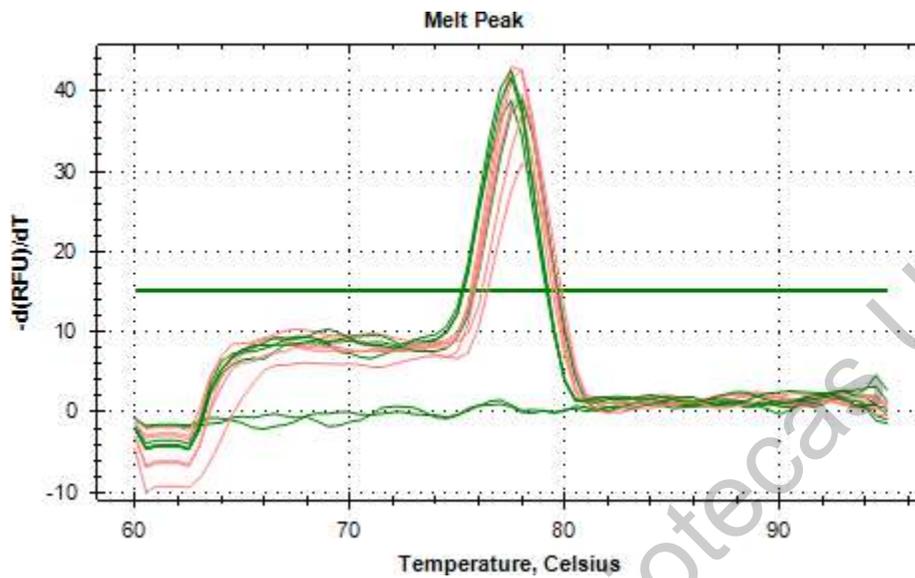


Figura 27.- Pico de hibridación del gen TLR4 en función de la temperatura.

Los colores representan la réplica del mix de diluciones que se utilizó para el experimento. El eje Y del gráfico representa las unidades relativas de fluorescencia (RFU) asociadas al diferencial de temperatura (dT). El eje X representa la temperatura a la cual se elevó el pico de amplificación acorde a la fluorescencia del SYBR Green. Las líneas que se observan por debajo son el control negativo para cada gen y el control sin templado, NTC (por sus siglas en inglés, no template control).

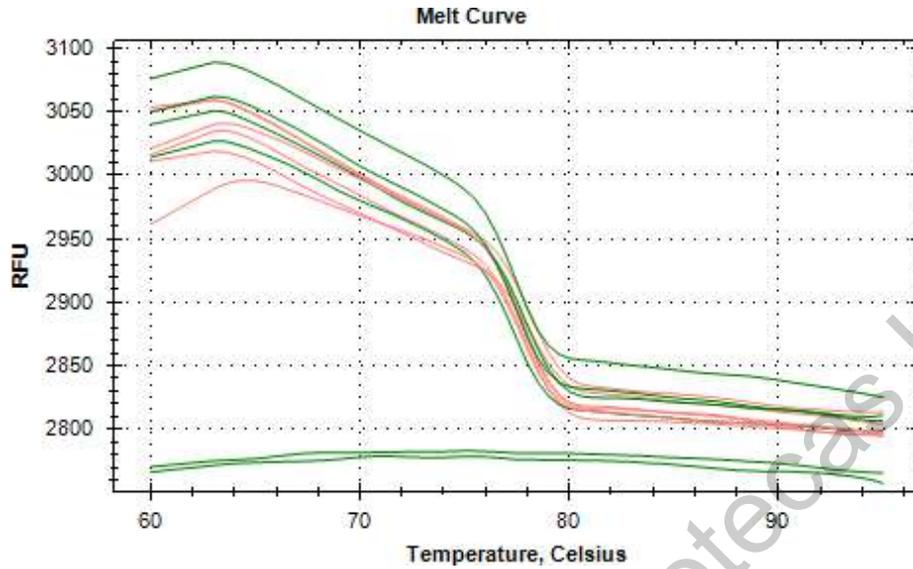


Figura 28.- Curva de hibridación del gen TLR4 en función de la temperatura (°C).

El eje Y del gráfico representa las unidades relativas de fluorescencia (RFU). El eje X representa la temperatura a la cual se mantuvo el pico de amplificación acorde a la fluorescencia. Las líneas de abajo representan el NTC y el NC.

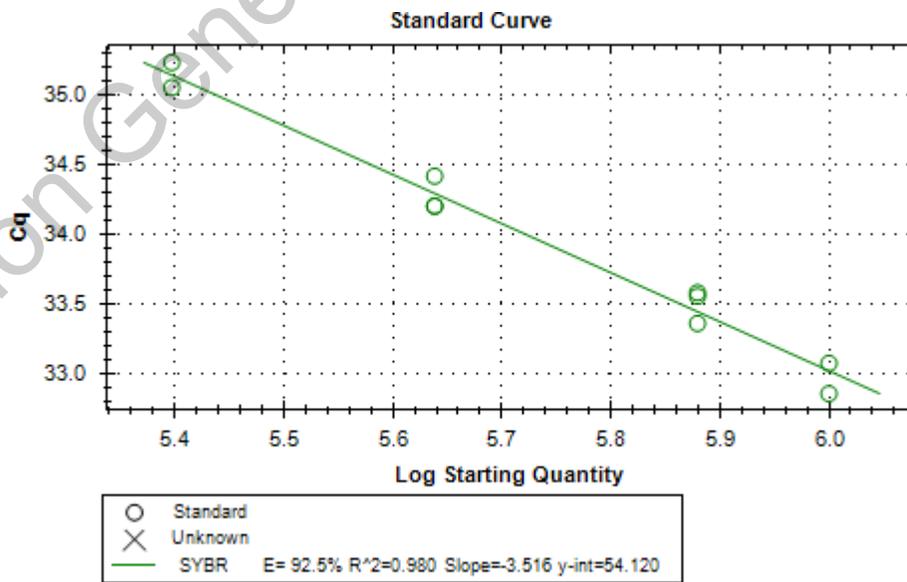


Figura 29.- Curva estándar del gen TLR4.

El eje Y se representa el ciclo de cuantificación (Cq, por siglas en inglés, quantification cycle). El eje X ilustra el logaritmo de la cantidad de ADN complementario que se colocó por cada celda. La curva estándar se realizó por triplicado, cada punto representa una réplica del resultado. La eficiencia por cada ciclo de replicación fue del 92.5%, la correlación de la amplificación por cada ciclo fue de $R^2 = 0.98$ y la pendiente fue de -3.516 .

Una vez que se logró la estandarización de los controles GAPDH, RPS5 y del gen de interés TLR4, se realizó la cuantificación por PCR de tiempo real de todas las muestras. La acumulación de la señal fluorescente (Ct) por cada ciclo de replicación es inversamente proporcional a la cantidad de ADN que hay en cada muestra, (a menor Ct, mayor cantidad de ácidos nucleicos hay en la muestra). Se muestra en la figura 30 el valor Ct para el gen GAPDH y TLR4; en la figura 31 respectivamente para RPS5 y TLR4.

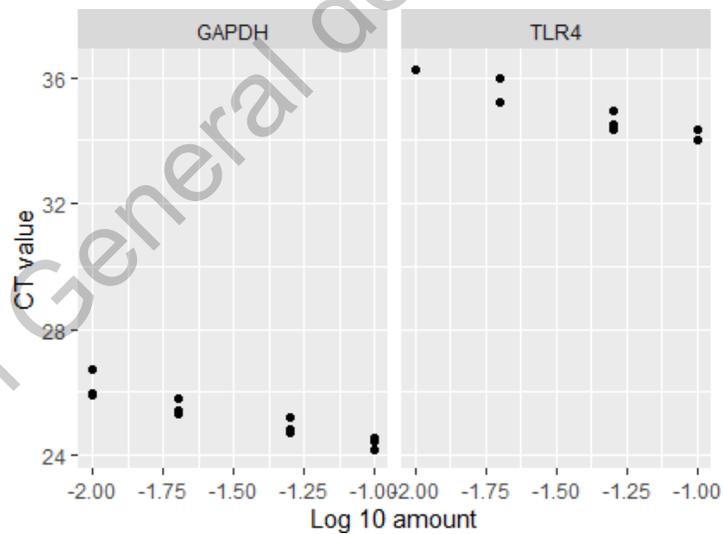


Figura 30.- Valores de Ct (*cycle threshold*) para el gen control GAPDH y TLR4.

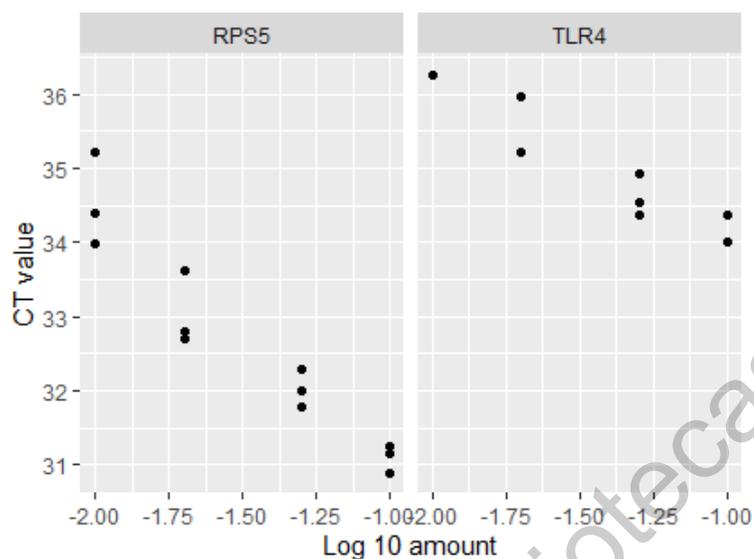


Figura 31.- Valores de Ct (cycle threshold) para el gen control RPS5 y TLR4.

Posteriormente se analizó el ΔCt (la diferencia en los valores de Ct para el gen de interés y el gen housekeeping). Esto se realizó con la finalidad de normalizar el gen TLR4 con GAPDH/RPS5 y tener una medida relativa de su expresión para cada muestra. Se eliminaron del análisis los datos outlier (Ct 38-40) (Cuadro 6).

Cuadro 6 - Interpretación de los valores de CT en qPCR (D'haene & Hellemans, 2010).

Valores de Ct	Interpretación
<29	Son reacciones positivas fuertes indicativas de abundante ácido nucleico diana en la muestra.
30-37	Son reacciones positivas indicativas de cantidades moderadas de ácido nucleico.
38-40	Son reacciones débiles indicativas de cantidades mínimas de ácido nucleico diana que podrían representar contaminación ambiental

Modelo matemático de la dinámica TLR4 en elefantes marinos del Norte

Se utilizó el programa de R con su interfaz R Studio versión 4.0.4. Se utilizaron las librerías “deSolve” y “scatterplot3d” (Soetaert et al., 2010; Ligges et al., 2003). Se replicó la ecuación diferencial y se modeló en primera instancia con los valores teóricos obtenidos de monocitos humanos (Stan et al., 2018). Se puede observar en las siguientes figuras la transición de un estado de homeostasis (Figs. 32 y 33) a un estado pro-inflamatorio en función a la exposición de bacterias Gram negativas (LPS) (Fig. 34).

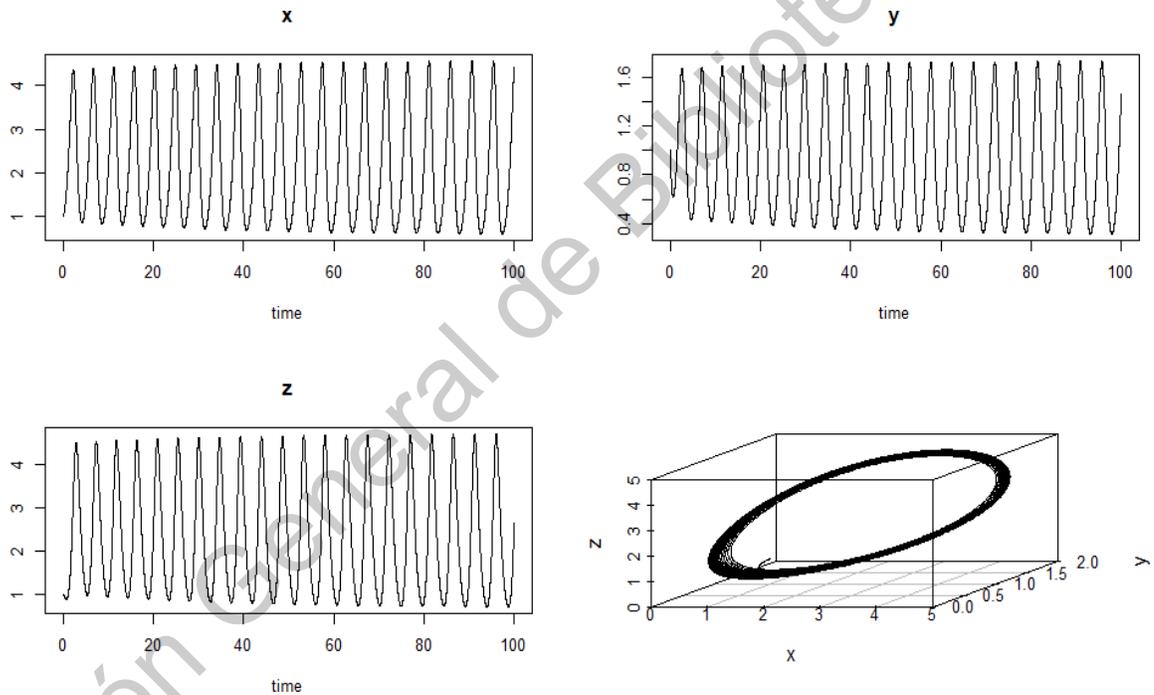


Figura 32.- Punto estable dentro del sistema de ecuaciones diferenciales. Representa la estabilidad del receptor TLR4 dentro de un monocito humano, $\phi = 1.2$.

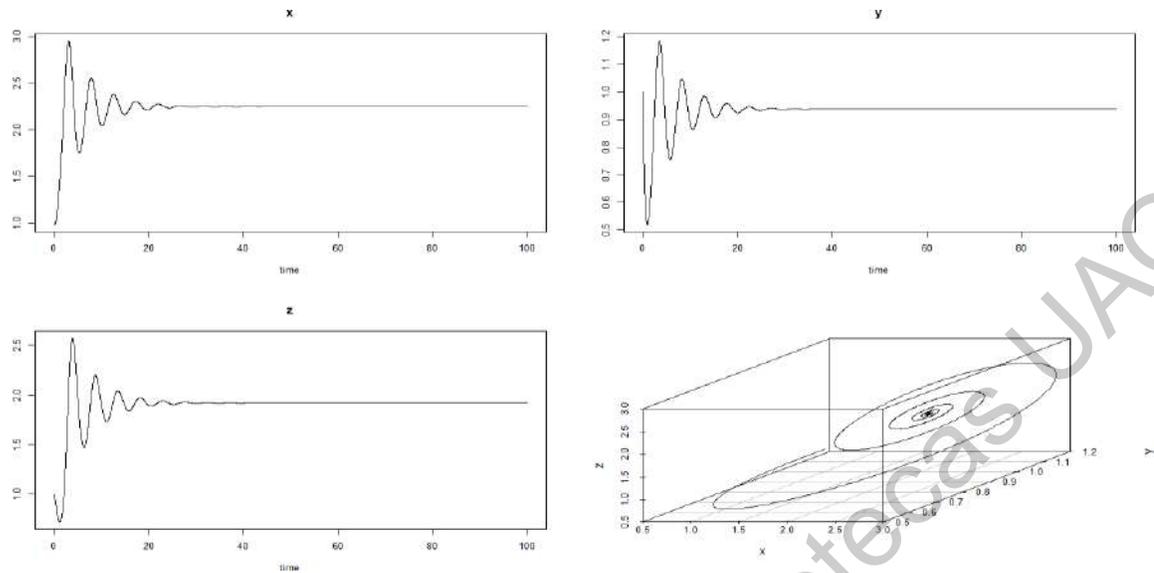


Figura 33 - Transición del receptor TLR4 dentro de un monocito. Esta dinámica se observa al inicio de la infección bacteriana (progresión de la respuesta pro-inflamatoria; $\phi < 1.2$).

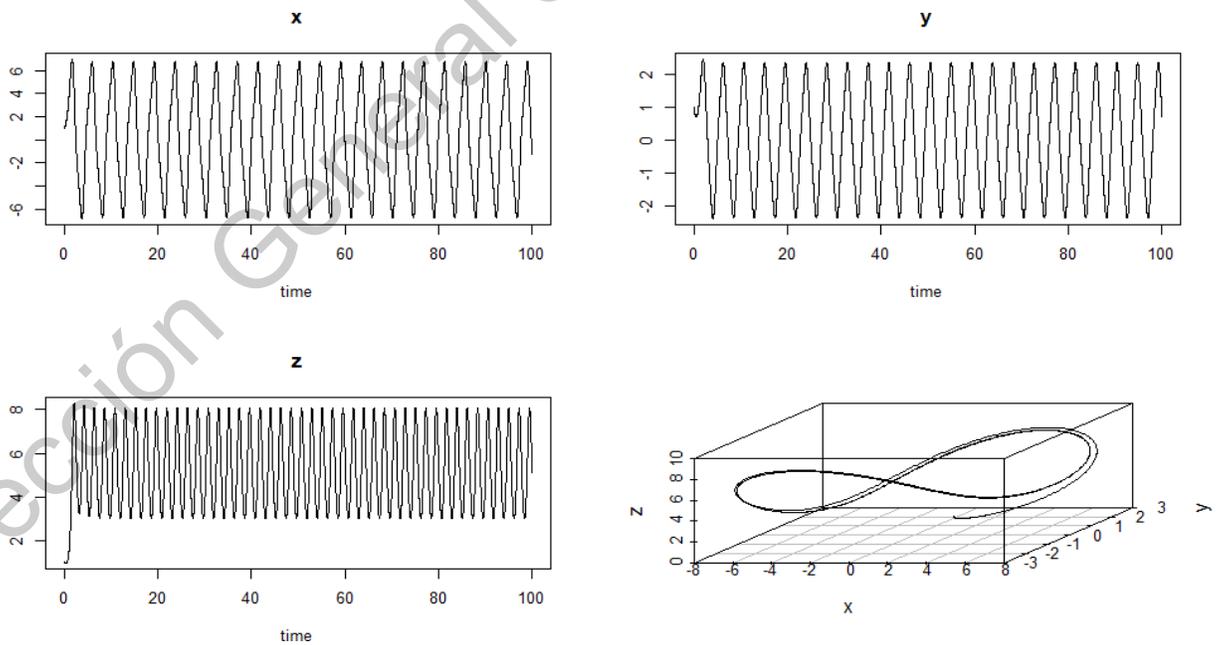


Figura 34.- Atractor fractal; representa la sobre-expresión del mRNA del TLR4 y su localización irreversible en la membrana plasmática.

Esto ocurre en monocitos de individuos humanos durante la sepsis severa que eventualmente lleva a la muerte; $\phi > 1.2$.

Se tomó como dato central (ϕ , phi) para modelar la dinámica del receptor TLR4 de las mucosas de crías de elefante marino. Para calcularlo nos basamos en el método 2- $\Delta\Delta C_t$ propuesto por Stan et al., 2018.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESULTADOS

Variación en las medidas morfométricas de las crías durante el destete

Se incluyeron 30 crías en este estudio, 14 machos y 16 hembras. Los datos obtenidos de la capa de grasa lateral mostraron normalidad (Shapiro Wilk; $W=0.97609$, $p = 0.09571$) y homocedasticidad (F-test = 0.90717, $df = 29$; $p = 0.7949$; ver Anexo I). Tanto la capa de grasa lateral, como la masa de las crías disminuyó entre el inicio del destete y el final del estudio, 20 días después. Específicamente, la capa de grasa lateral de los elefantes marinos recién destetados respecto a los elefantes con 20 días de ayuno varió significativamente (Prueba t de Student; $t = 11.615$, $df = 57.863$, $p < 2.2e-16$; Fig. 35), disminuyendo en un 42.1% promedio.

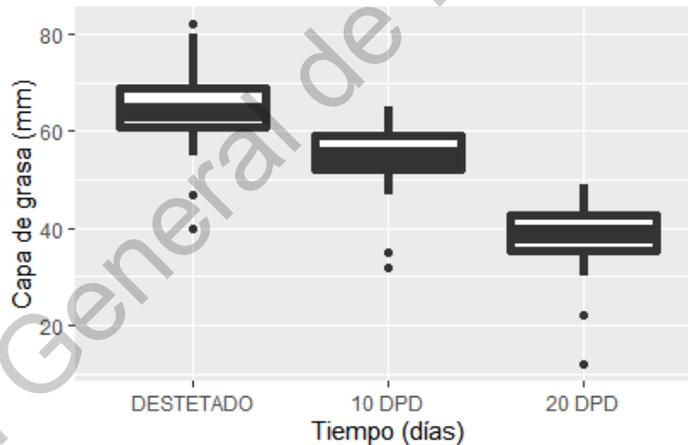


Figura 35.- Capa de grasa lateral (mm) de crías de elefante marino del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019. Se observa una notable disminución de la capa de grasa acorde al ayuno post-destete.

En términos de la longitud de las crías, estos valores también mostraron normalidad (Shapiro-Wilk; $W=0.98158$, $p = 0.2323$) y homocedasticidad (F-test = 0.93565, $df = 29$; $p =$

0.8581) (Anexo I). Se observó evidencia del crecimiento, ya que la longitud de los animales recién destetados y la registrada al día 20 post-destete varió (Prueba T de Student; $t = -2.6316$, $df = 57.936$, $p = 0.01087$; Fig. 36), siendo 3.7% más largos que al momento del destete.

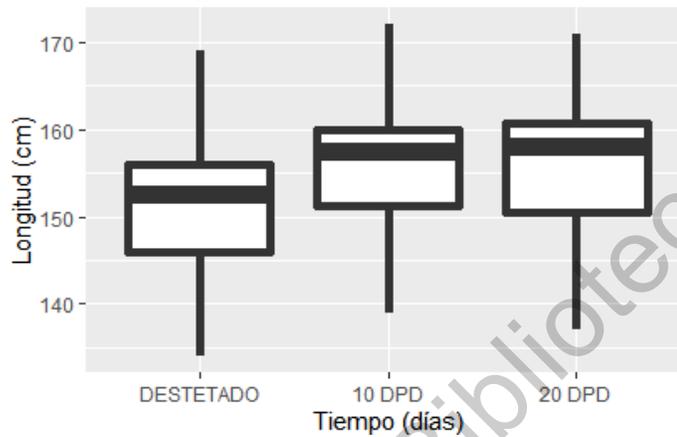


Figura 36.- Longitud (cm) de crías de elefante marino del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

Se analizó también la variación en la capa de grasa y longitud entre años de muestreo a crías de elefante marino. Se observó que hubo una diferencia estadística en relación a la longitud (Prueba Wilcoxon, $W = 6037.5$, $p = 0.01571$; Fig. 37), y también en la capa de grasa lateral (Prueba Wilcoxon, $W = 8173$, $p = 3.303e-14$, Fig. 38), siendo más grandes y más largos en la temporada de muestreo del año 2019.

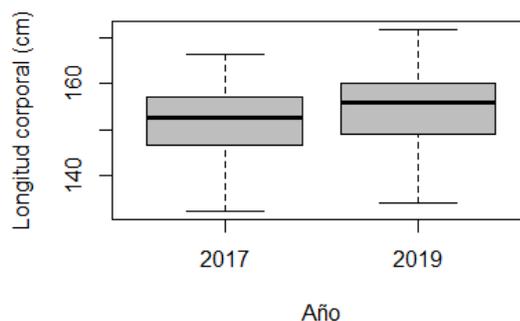


Figura 37.- Longitud corporal de las crías de elefante marino entre años de muestreo 2017 y 2019 (Datos de Morales-Durán, 2017).

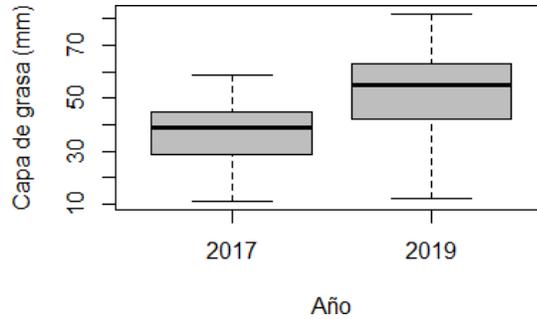


Figura 38.- Capa de grasa lateral se crías de elefante marino entre años de muestreo 2017 y 2019 (Datos de Morales-Durán, 2017).

Dimorfismo sexual en las medidas morfométricas y condición corporal

No se observaron diferencias significativas entre sexos en el grosor de la capa de grasa lateral (Fig. 39), ni en la longitud (Fig. 40).

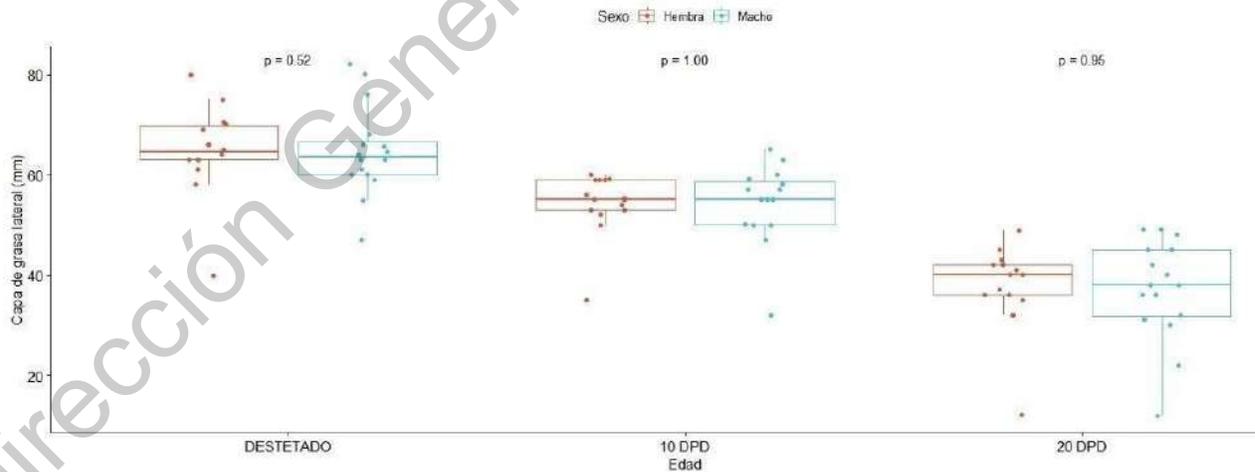


Figura 39.- Capa de grasa lateral de crías de elefante marino del Norte hembras y machos.

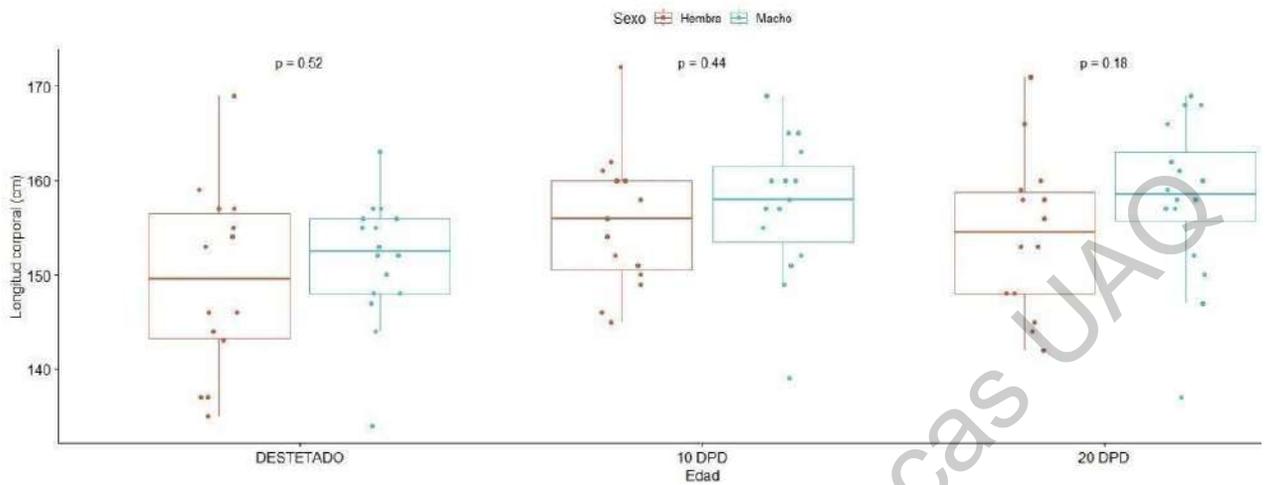


Figura 40.- Longitud corporal de crías de elefante marino del Norte hembras y machos.

Variación en los parámetros sanguíneos a lo largo del destete temprano

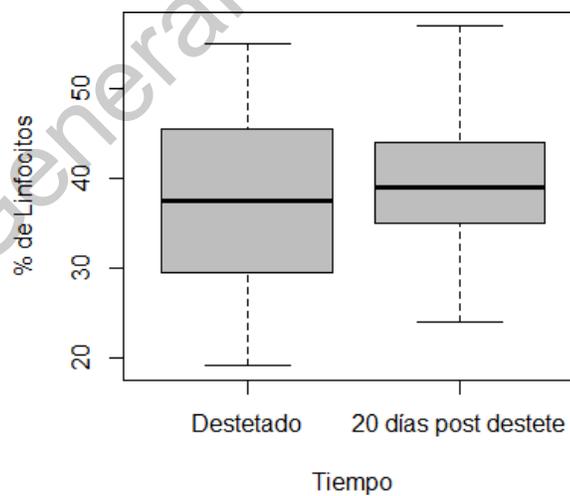


Figura 41.- Promedio del porcentaje de linfocitos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

Los resultados de los conteos sanguíneos fueron semejantes a los reportados con anterioridad por Morales-Durán, 2017 y Yochem et al., 2008. Los linfocitos no variaron a lo largo del destete temprano (Rango Wilcoxon, $W = 281.5$, $p = 0.4845$; Fig. 41).

Los neutrófilos y basófilos tuvieron una ligera variación siendo significativamente más abundantes a los 20 días post- destete (Rango Wilcoxon, $W = 203$, $p = 0.04489$; $W = 184.5$, $p = 0.01816$; Fig. 42 y 43 respectivamente).

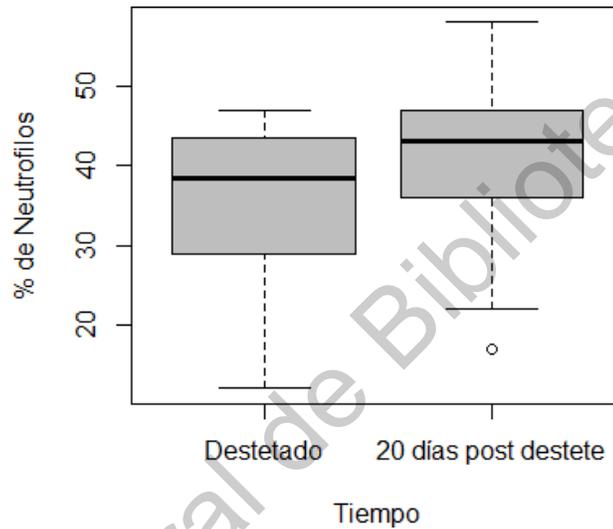


Figura 42.- Promedio del porcentaje de neutrófilos segmentados de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

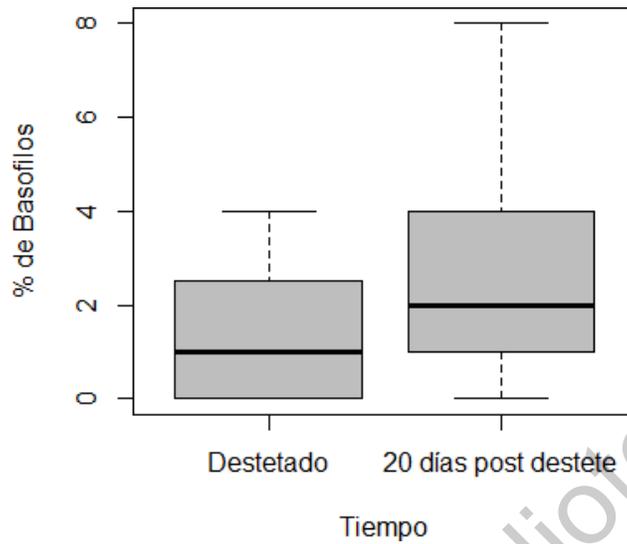


Figura 43.- Promedio del porcentaje de basófilos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

Los monocitos disminuyeron al día 20 post-destete de manera significativa (Rango Wilcoxon, $W = 629.5$, $p = 3.205e-07$). Los eosinófilos presentaron una tendencia semejante pero no significativamente (Wilcoxon, $W = 390.5$, $p = 0.2708$). Fig. 44 y 45, respectivamente.

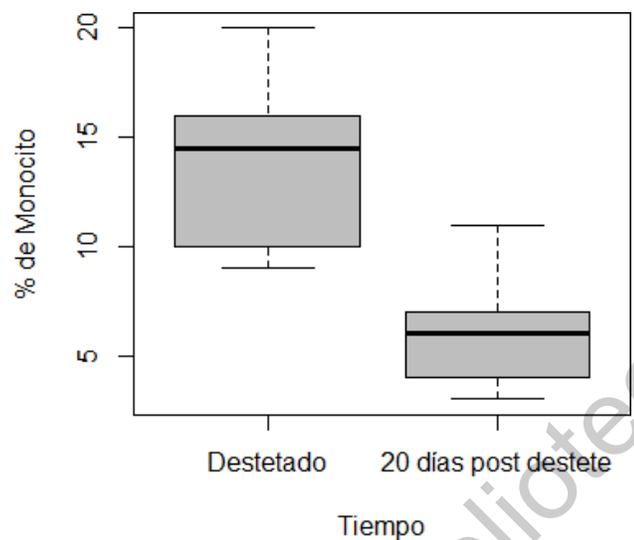


Figura 44.- Promedio del porcentaje de monocitos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

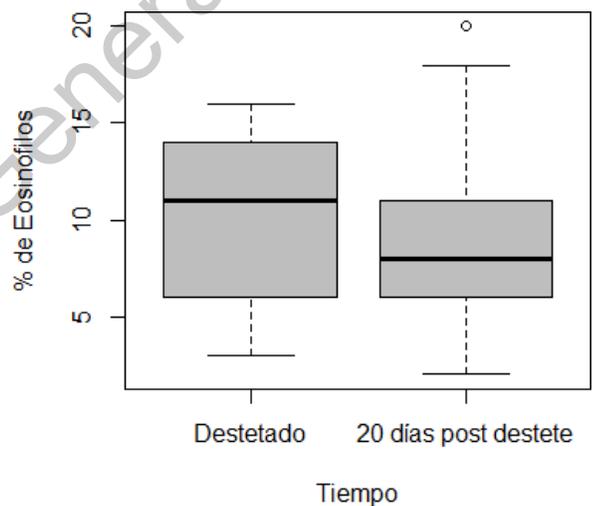


Figura 45.- Promedio del porcentaje de eosinófilos de elefantes marinos del Norte. Muestreo de febrero-marzo 2019.

Expresión relativa del gen TLR4 en mucosas entéricas del elefante marino del Norte

Los datos de expresión presentaron una distribución tipo beta (Anexo III, Fig 57 y 58), la media del valor de ΔCt del gen TLR4 del primer muestreo fue de -0.8121667, y para el destete tardío fue de -3.998667 (Fig. 46), los valores de ΔCt no variaron estadísticamente entre las etapas de muestreo, (Wilcoxon, $W = 482$, $p = 0.6438$).

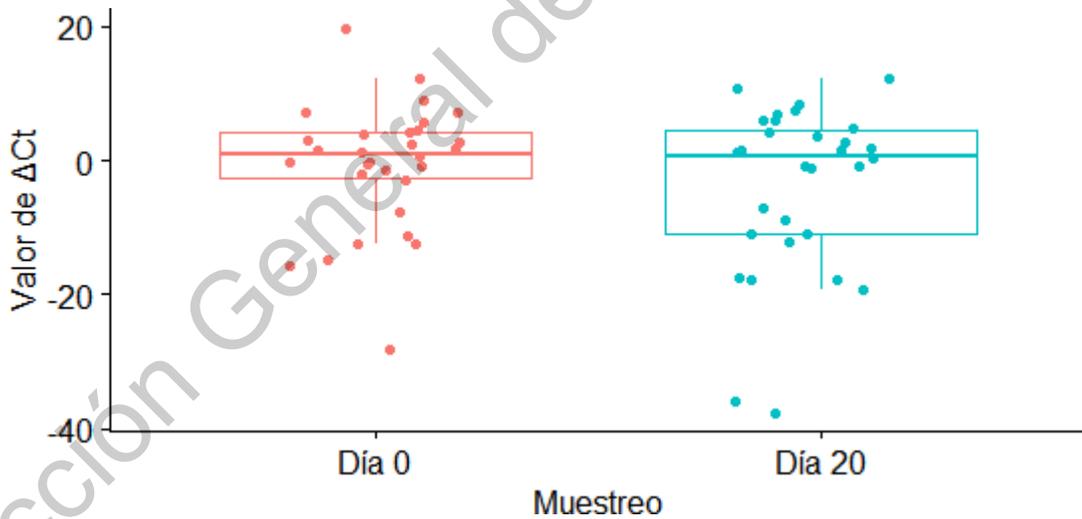


Figura 46.- Valores de ΔCt de TLR4 respecto al gen control GAPDH durante el destete temprano (día 0) y durante el destete tardío (día 20).

Tampoco se encontró diferencia significativa en la expresión relativa del TLR4 en la etapa del destete temprano entre sexos (Prueba Wilcoxon, $W = 124$, $p\text{-value} = 0.6374$; Fig. 47).

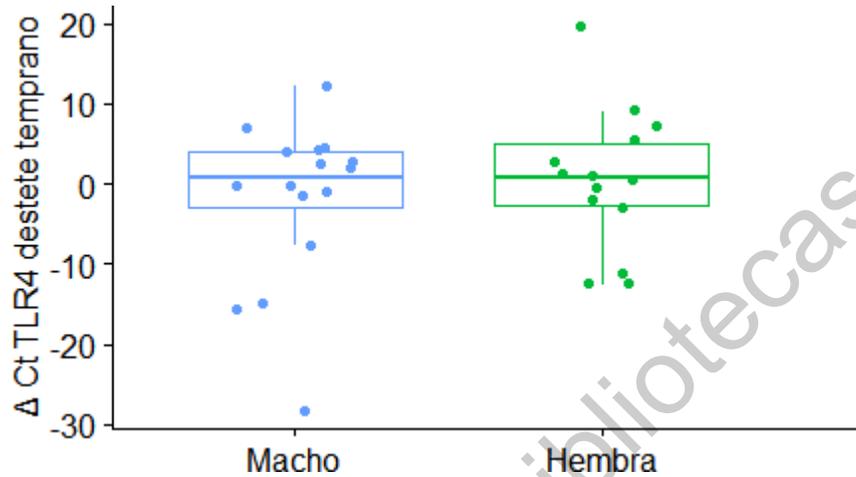


Figura 47.- Valor de ΔCt TLR4 entre crías machos y hembras en el destete temprano.

Durante la etapa del destete tardío se encontró una mayor expresión relativa para el gen TLR4 en hembras (Prueba Wilcoxon, $W = 54$, $p = 0.01679$; Fig 48). La diferencia de la expresión entre los muestreos también reveló una diferencia estadística asociada al sexo de las crías (Prueba Wilcoxon, $W = 59$, $p = 0.02751$; Fig. 49).

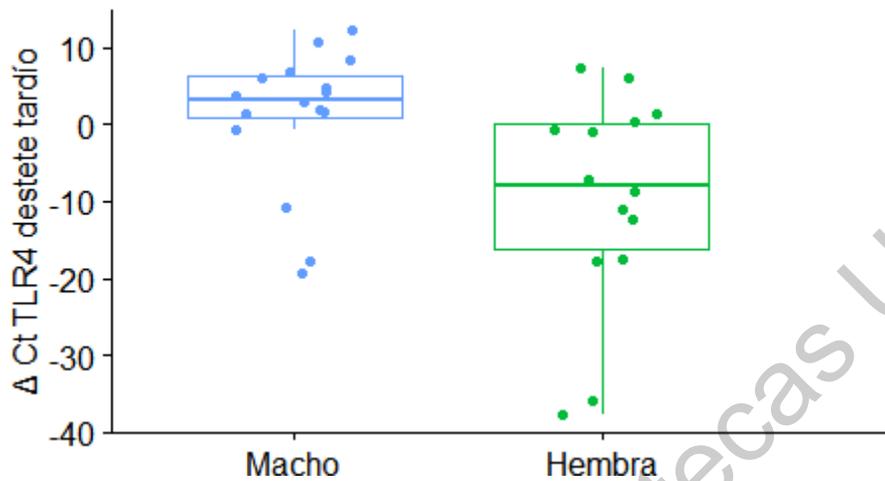


Figura 48.- Valor de ΔCt TLR4 entre crías machos y hembras en el destete tardío.

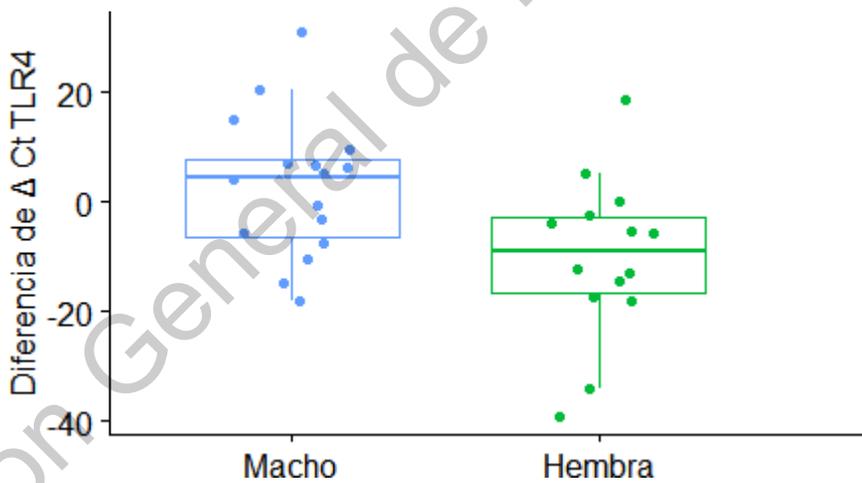


Figura 49.- Diferencia del valor de ΔCt TLR4 entre etapas de muestreo.

Se realizaron correlaciones de Spearman (Anexo III, Fig. 59) y modelos lineales generalizados para ver si las variables morfométricas explicaban la variación en la expresión génica en términos del patrón dimórfico. Únicamente el sexo tuvo significancia como variable de respuesta durante el destete tardío (glm, $F_{1,27} = 5.3613$, $p = 0.0287$, glm, $F_{1,27} = 5.9865$, $p = 0.02149$). Cuadro 8 y 10 respectivamente.

Cuadro 7 . Las variables morfométricas no son variables de respuesta respecto al valor de ΔCt de TLR4 del destete temprano respecto al sexo y grasa destete temprano.

	Df	Residuales desviación	gl	Residuales desviación	F	Pr(>F)
			29	5.9012		
Grasa 1	1	0.00071	28	5.9005	0.0036	0.9529
Sexo	1	0.04342	27	5.8571	0.2164	0.6456
Grasa : Sexo	1	0.41697	26	5.4401	2.0785	0.1613

Cuadro 8 – El sexo funge como variable de respuesta explicativa respecto al valor de ΔCt de TLR4 en el destete tardío respecto a la grasa.

	Df	Residuales desviación	gl	Residuales desviación	F	Pr(>F)
			29	14.634		
Grasa 2	1	0.90281	28	13.731	2.2135	0.14883
Sexo	1	2.18667	27	11.544	5.3613	0.02874*
Grasa : Sexo	1	0.07299	26	11.471	0.1790	0.67575

Cuadro 9 – Las variables morfométricas no son variables de respuesta respecto al valor de ΔCt de TLR4. (sexo y longitud destete temprano)

	Df	Residuales desviación	gl	Residuales desviación	F	Pr(>F)
			29	5.9012		
Longitud 1	1	0.164495	28	5.7367	0.8046	0.3780
Sexo	1	0.075280	27	5.6615	0.3682	0.5492
Longitud 1 : Sexo	1	0.031354	26	5.6301	0.1534	0.6985

Cuadro 10 – El sexo funge como variable de respuesta explicativa respecto al valor de ΔCt de TLR4 en el destete tardío respecto a longitud.

	Df	Residuales desviación	gl	Residuales desviación	F	Pr(>F)
			29	14.634		
Longitud 2	1	0.09332	28	14.540	0.2174	0.64492
Sexo	1	2.56987	27	11.970	5.9865	0.02149*
Longitud 2 : Sexo	1	0.01893	26	11.951	0.0441	0.83532

Modelo matemático de la dinámica celular de TLR4

El modelo matemático reflejó la dinámica espacial observada en monocitos de individuos humanos en transición, dada una interacción moderada con bacterias Gram negativas tanto para el destete temprano como el tardío. Los resultados demostraron que los elefantes se encontraban en un proceso de transformación de su microbiota, al menos en lo que concierne a la vía del receptor TLR4 y su dinámica con el LPS (Fig. 50). El valor de Φ o sobre-regulación para el primer muestreo fue de 0.6176248307 (color azul) para el segundo muestreo fue de 0.7872314022 (color rojo).

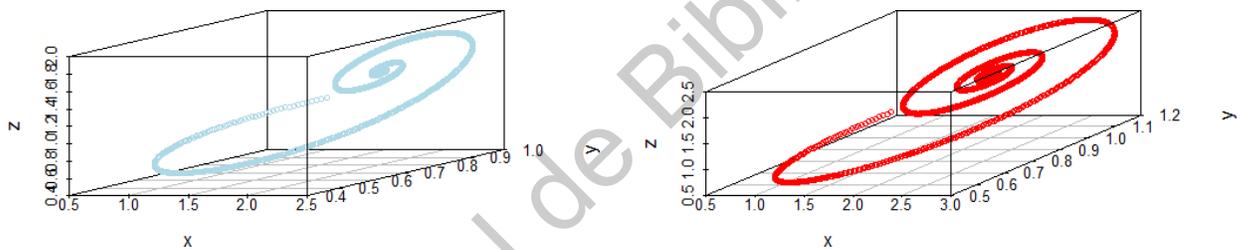


Figura 50.- Representación espacial de datos de expresión obtenidos de la qPCR del TLR4 en mucosas entéricas de crías de elefante marino, $\Phi = 0.61$; $\Phi = 0.78$, respectivamente.

DISCUSIÓN

La presente tesis investigó la expresión relativa de un gen involucrado en la dinámica de reconocimiento de bacterias Gram negativas comensales en el epitelio entérico asociado al sistema de mucosas de crías de elefante marino. A continuación, se discuten los resultados obtenidos y su relación con estudios al respecto.

Mirounga angustirostris es una especie poco estudiada en términos de su sistema inmune de tolerancia y su dinámica comensal con microorganismos. Los estudios para esta especie han sido en mayor medida relacionados a su historia de vida, comportamiento, recursos energéticos, entre otros. Recientemente, se han descrito perspectivas moleculares involucradas con su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano (Morales-Durán et al., 2018) y se ha descrito su repertorio de microbiota entérica (Stoffel et al., 2020). Las hipótesis que se desafiaron en la presente tesis se basaron en preguntas hechas a partir de ambos estudios, y los resultados fueron concordantes.

Hipótesis 1

Los elefantes marinos del Norte en estado neonatal presentan un dimorfismo sexual en la expresión relativa del gen TLR4 asociado a mucosas del epitelio entérico.

Predicción 1

Los machos tienen una menor expresión relativa del gen TLR4 que las hembras.

El dimorfismo sexual inmune en especies silvestres ha sido poco estudiado. Sin embargo, los estudios en humanos, ratas, ratones y otros modelos de laboratorio han demostrado que existe una brecha marcada en la expresión de efectores inmunes tanto del sistema inmune innato como el sistema inmune adaptativo, siendo más robusta y aguda la respuesta innata en las hembras (Klein y Flanagan , 2016, Pennell et al., 2012, Ghazeeri et al., 2011). Múltiples factores contribuyen al dimorfismo sexual, uno de los más estudiados es la expresión de los cromosomas sexuales, la sub o sobre regulación de genes por factores de transcripción o miRNA's aunado a la regulación de la señalización endocrina, factores ambientales y/o causas epigenéticas (Klein y Flanagan , 2016, Pennell et al., 2012). En otras palabras, el dimorfismo sexual inmune es consecuencia de un conjunto de variables genéticas, ambientales, hormonales e, incluso, del microbioma (Klein y Flanagan, 2016, Duneau et al., 2017).

Recientemente se descubrió que existe una variación significativa en términos del sexo y la inhibición sérica de la bacteria *Escherichia coli* en el elefante marino del Norte, ya que las hembras mostraron mayor capacidad de inhibir a *E. coli* que los machos (Morales-Durán 2018). Curiosamente, el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* es el ejemplo más conocido de un potente agonista del receptor TLR4 y ha sido el modelo más utilizado para el estudio de esta vía de señalización (Kurt et al., 2013, O'Neill et al., 2013). Existe evidencia de que las hembras por lo general sobre expresan las vías de señalización TLR en comparación con los machos (Klein y Flanagan , 2016). En esta tesis, se encontró que las crías hembras de elefante marino del Norte expresaron más el gen TLR4 en la etapa de destete tardío comparado con los machos, específicamente en las mucosas entéricas. A partir de los resultados, se sugiere que la diferencia en la expresión dimórfica para este gen se debe a la progresión esteroidea dada la presurosa maduración de esta especie (Sherman-Cooney et al., 2005).

Se ha propuesto que los estrógenos incrementan la expresión de vías asociadas a PRR (Klein y Flanagan , 2016). Estudios realizados en macrófagos peritoneales de ratón

reportan que el estrógeno 17β -estradiol aumenta la expresión tanto del receptor Toll 4 (TLR4) así como del co-receptor CD14 y la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) (Rettew et al., 2009). Acorde a este planteamiento, la testosterona, el andrógeno primario de los machos, se ha visto que disminuye del 8-10% la expresión del receptor TLR4 en la superficie de macrófagos peritoneales de ratón (Rettew et al., 2008). Interesantemente, existe evidencia de que tanto la testosterona como el estradiol, aumentan significativamente a lo largo del destete tardío en sangre de crías de elefante marino del Norte, a pesar del intenso ayuno por el que pasa esta especie (Sherman-Cooney et al., 2005) (Anexo IV, Fig. 58).

Es posible que los resultados obtenidos de expresión génica del TLR4 sean provenientes de macrófagos intestinales de la lámina propia, los cuales son de los principales mediadores de la tolerancia inmune entre el hospedero y los microorganismos comensales. Sin embargo, es importante remarcar que la dinámica de este receptor no es igual en todos los tejidos y varía en función de la etapa de desarrollo e incluso la especie. Por ejemplo, en monocitos de humanos adultos la expresión del TLR4 es mayor en machos que en hembras ante la exposición de LPS (Aomatsu et al., 2013). En contexto al desarrollo dimórfico, se puede argumentar para esta especie (NES), que las hembras presentan un desarrollo más precoz que el de los machos. Por ejemplo, en el proceso de muda de pelaje y el desarrollo de la dentadura (Le Boeuf y Laws, 1994; Briggs, 1974); además, la adquisición de madurez sexual también varía entre sexos, ya que ocurre aproximadamente 3 años más temprana en las hembras que en los machos, en donde ocurre a los 8 años (Le Boeuf y Laws, 1994). Con base en los resultados obtenidos en esta tesis, es posible que exista una correlación entre la expresión dimórfica del receptor TLR4 y la esteroidogénesis durante el desarrollo neonatal tardío (Rettew et al., 2009, Sherman-Cooney et al., 2005).

Como se ha discutido por algunos autores, el elefante marino del Norte tiene mecanismos “compensatorios” los cuales permiten una homeostasis a pesar del estrés provocado por el ayuno dada su historia de vida (Le Boeuf y Laws, 1994, Ortíz et al., 2002,

Sherman-Cooney et al., 2005). La expresión de testosterona y estradiol no presentan inhibición o regulación negativa por la falta de alimento, como ocurre para otras especies (p. ej. mono Rhesus o humanos) (Cameron y Nobish 1991, Cumming et al., 1983); aunque la concentración de cortisol incrementa significativamente (Ortíz et al., 2002). Dada esta evidencia, se sugiere que la subexpresión del receptor TLR4 en las crías macho durante el destete tardío se debe entre varios factores, a la inducción de andrógenos, principalmente la testosterona. Inversamente, proponemos que la sobreexpresión del receptor TLR4 en hembras podría estar explicado por el aumento en estrógenos como el estradiol (Rettew et al. 2008, Sherman-Cooney et al., 2005, Crocker et al., 2014, Ortíz et al., 2002).

Hipótesis 2

Los elefantes marinos del Norte varían la expresión del receptor TLR4 en estado neonatal respecto al destete tardío.

Predicción 2

La expresión del receptor TLR4 del epitelio entérico del elefante marino incrementa a lo largo del destete tardío.

En otros estudios asociados al elefante marino del Norte y otros fócidos, como el elefante marino del sur. los conteos sanguíneos para leucocitos y neutrófilos suelen aumentar en los primeros 15 días después del destete (Hall et al., 2003, Yochem et al., 2008, Morales-Durán 2018), lo que corresponde a lo observado en esta tesis. Al encontrarse en procesos anabólicos durante el destete tardío, los animales deben empezar a gestionar su respuesta inmune por sí solos, la inversión inmune materna en términos de la leche con la que se alimentan las crías se agota temporalmente y la maduración tanto del sistema inmune

adaptativo como el innato debe agudizarse (Kovacs y Lavigne, 1986). En el presente estudio se corroboró que existe un ligero aumento de la expresión del gen TLR4 pero que este es significativo únicamente en las hembras, a lo largo del destete tardío; sin embargo, en conjunto no se observó diferencia significativa a lo largo del destete tardío.

Acorde a la hipótesis, se esperaba encontrar una diferencia significativa entre el primer y tercer muestreo de manera general, ya que recientemente se ha observado que el cambio en la abundancia relativa de bacterias es robusto en la etapa temprana del desarrollo neonatal (Stoffel et al., 2020). Se sabe que la variación ocurre específicamente en filos de bacteria como Clostridia (Hembras: 47%, Machos: 44%), Bacteroides (Hembras: 18%, Machos: 20%) y Fusobacteria (Hembras: 13%, Machos 12%), desde el destete hasta los primeros 15 días de desarrollo (Stoffel et al., 2020.) Para fines de esta discusión, se tomará en cuenta únicamente al filum Bacteroides, ya que se trata de una gran familia de bacilos Gram negativos, la cual se sabe que cuenta con miembros que aumentan su abundancia conforme se acerca la independencia nutricional, como lo es específicamente el género de bacterias *Prevotella* (Weström et al., 2020, Larsen, 2017).

En estudios recientes, se encontró que *Prevotella* incrementa su abundancia relativa en el epitelio entérico en crías de elefante marino del Norte y podría estar relacionada con procesos de tolerancia o inflamación (Stoffel et al., 2020). Hace poco se descubrió que, efectivamente, *Prevotella* regula el ecosistema bacteriano mediante la reducción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), y la modulación de citocinas proinflamatorias como IL-18 (Iljazovic et al 2021). Se ha sugerido que *Prevotella* regula el metabolismo de la glucosa y la degradación de fibras dietéticas de manera benéfica en el intestino (Sandberg et al 2018). Sin embargo, también se ha asociado su presencia con el desarrollo de enfermedades crónicas, como la colitis ulcerativa (Lucke et al 2006), y en mujeres se ha relacionado estrechamente con la artritis reumatoide de origen autoinmune (Wells et al., 2020, Scher et al., 2013). Incluso se ha propuesto como un biomarcador diagnóstico para mujeres con predisposición genética a esta enfermedad (Wells et al., 2020).

En esta tesis se propone que la ausencia de evidencia de diferencias de la de TLR4 entre etapas de muestreo pudo deberse a 1) el número relativamente bajo de animales incluidos en el estudio o 2) el que, de manera global, el microbioma se desarrolla en un contexto ecológico y ambiental bastante semejante. Sin embargo, al menos para este gen, es posible que el cambio de la expresión en las hembras muestreadas durante el destete tardío puede deberse a un aumento relativo de bacterias del género *Prevotella* presentes en la mucosa del epitelio entérico de las crías hembras. Esto sería entonces un patrón normal en el microbioma de esta especie, la cual se regula adecuadamente en sus respectivos rangos homeostáticos gracias a la red de tolerancia inmune.

Hipótesis 3

Los elefantes marinos del Norte mantienen la homeostasis acorde al modelaje matemático.

Predicción 3

El receptor TLR4 de los elefantes marinos fluctúa en puntos estables dinámicos a lo largo del destete temprano y tardío.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demostraron que la expresión del receptor TLR4 está en una transición oscilatoria moderada durante la etapa temprana del desarrollo y también durante el desarrollo tardío. La limitación de estos datos radica en que los animales no pasaron un tratamiento experimental bajo condiciones de laboratorio como es lo habitual, por ende, la sub o sobre regulación no se basó en una comparación entre grupos. Sin embargo, se tomó como comparación la media grupal para cada estado y se eliminaron los outliers con la finalidad de ser lo más veraces en lo que respecta a la interpretación de los datos obtenidos.

Con base en esto, obtuvimos dos osciladores en espiral que variaron únicamente en función del parámetro Φ , es decir, en la producción relativa de mRNA del TLR4. Dicha producción se vio ligeramente en aumento a lo largo del destete tardío y puede observarse como el espiral amplía su espectro, conteniendo la perturbación. Esta representación gráfica probablemente esté relacionada con el hecho de que los elefantes marinos se encuentran bajo un estrés por el ayuno de 20 días aunado a la presión de selección de entrar al agua para adaptarse a su nuevo ambiente acuático (Ortiz et al., 2003). Sin embargo, los procesos homeostáticos contienen el estrés ambiental. Esto se ha corroborado con vías de cortisol, las cuales se saben que para esta especie son inhibidas en su periodo de ayuno (Sherman-Cooney et al. 2005).

Las comunidades bacterianas del intestino probablemente experimentan un alto nivel de variación por el cambio metabólico y la regulación de nutrientes. No obstante, con estos resultados confirmamos que las células extraídas de la mucosa entérica de elefantes marinos del Norte, expresan su receptor TLR4 de manera dinámica principalmente en el interior celular (red trans Golgi, endosomas, retículo endoplásmico) de manera dinámica, y lo suficiente en la membrana plasmática (Stan et al., 2018). La maquinaria celular o sistema inmune de tolerancia amortigua eventos de extinción y/o abundancia relativa de bacterias intestinales con la finalidad de que el sistema evada extremos en la respuesta inmune ya sea pro-inflamatoria (desencadenamiento de enfermedades crónicas o enfermedades autoinmunes) o bien, el otro extremo, la inmunosupresión. De ser alguno de estos últimos casos, el reflejo de la bacteriemia en el sistema matemático se hubiese comportado como un doble atractor con una gran amplitud y probablemente hubiéramos visto morir a los elefantes marinos en el campo de muestreo. Dicho doble atractor es conocido como "atractor de Lorenz" y ha sido ampliamente descrito en sistemas biológicos en los que una ligera perturbación en las condiciones iniciales (respecto al parámetro Φ en la derivada de x), conlleva al caos (también conocido como efecto mariposa) (Pinsky, 2017, Atangana et al., 2019). Se sugiere entonces que la evolución de las bacterias comensales de los elefantes

marinos ya se ha adaptado a los cambios extremos acorde a la historia de vida de esta especie. Aún quedan por descifrar con precisión los mecanismos moleculares por los que esta especie resulta tan resiliente en términos de su microbioma intestinal pero en conclusión, el modelo aquí planteado permitió corroborar las oscilaciones del receptor TLR4 a nivel intra y extracelular con la finalidad de evaluar los datos experimentales y realizar una tenue contribución a la inmunología teórica.

PERSPECTIVAS

Para un mejor entendimiento de la dinámica de tolerancia o inflamación mediada por el receptor TLR4 se sugiere realizar un análisis transcriptómico (RNA-seq) de las mucosas entéricas o bien, añadir genes que estén involucrados con la vía TLR4, tales como MD2, CD14, MyD88, grp78 o IL-10 (Beutler, 2000; Stan et al., 2017). La vía de reconocimiento de bacterias Gram negativas en el epitelio entérico es una red dinámica que cambia en función del tiempo y de los agonistas y/o antagonistas de los múltiples PRR, para ser comprendida de manera integral, se aconseja retomar el modelo planteado añadiendo inductores o represores dentro del sistema de ecuaciones diferenciales (p. ej. NF-kB, grp78, LPS). En conjunto, los datos obtenidos permitirán un mejor entendimiento de cómo se efectúan las perturbaciones ante patógenos y/o estresores ambientales y cómo es que esta especie logra perseverar dentro de sus límites homeostáticos en términos de su sistema entérico.

Por otra parte, una limitación del presente estudio fue el desconocimiento del linaje celular del que se obtuvo el ARN dentro de las muestras de mucosas entéricas, futuros estudios pueden inspeccionar mediante inmunohistoquímica o el uso de marcadores celulares la variabilidad de la expresión de este gen en un tipo celular en específico. Sin embargo, este estudio dio la pauta para conocer una de las vías más importantes en relación al reconocimiento de bacterias comensales en el intestino de una especie silvestre, el

elefante marino del Norte, un grupo de mamíferos marinos auténticos en su tipo, dada su resiliencia, su patrón dimórfico y su genuina historia de vida. Próximos estudios podrán dilucidar si el dimorfismo génico asociado al microbioma es mucho más robusto de lo que aquí se pudo observar o si es mucho más variable en función del tiempo, aspecto que no se pudo corroborar de manera precisa. El alcance de dichos estudios permitirá explorar nuevas formas de regulación en las redes homeostáticas en el intestino acorde al sexo, el estado de desarrollo neonatal y/o las perturbaciones ambientales que puedan acontecer.

Dirección General de Bibliotecas UAO

CONCLUSIÓN

Este estudio tuvo la oportunidad de entender la dinámica de un gen relevante en el reconocimiento de bacterias Gram negativas en el epitelio entérico de un mamífero silvestre. Además, se asoció la actividad de la vía TLR4/LPS en un contexto de historia de vida recabando datos morfológicos y sanguíneos para la trazabilidad de esta especie.

Se discutieron las posibles causas ambientales, hormonales y genéticas que podrían estar implicadas en estos resultados, además de analizar la dinámica del receptor TLR4 desde una perspectiva matemática y datos experimentales. Este trabajo generó conocimiento que permitirá entender mejor los sistemas moleculares de la tolerancia inmune entérica en el desarrollo neonatal de una especie semi-acuática, el elefante marino del Norte, *Mirounga angustirostris*.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Ahern, P. P., & Maloy, K. J. (2020). Understanding immune-microbiota interactions in the intestine. *Immunology*, 159(1), 4–14.

<https://doi.org/10.1111/imm.13150>

Ahmed M, & Kim D. R. (2018). pcr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data. *PeerJ*, 6:e4473

<https://doi.org/10.7717/peerj.4473>

Anderson, K. V., Jürgens, G., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo: Genetic Studies on the Role of the Toll Gene Product. *Cell*, 42(3), 779-89.

Aomatsu, M., Kato T., Kasahara E., Kitagawa S. (2013). Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun*, Nov 8; 441(1), 220-5.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.042>. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24140406.

Arnason, U., Gullberg, A., Janke, A., Kullberg, M., Lehman, N., Petrov, E.A., & Väinölä, R., (2006). Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(2), 345-354.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.022>

Atangana, A., & Qureshi, S. (2019). Modeling attractors of chaotic dynamical systems with fractal-fractional operators. *Chaos Solitons & Fractals*, 123, 320-337.
[10.1016/j.chaos.2019.04.020](https://doi.org/10.1016/j.chaos.2019.04.020).

Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9–25.
<https://doi.org/10.1111/jvim.14875>

Becattini, S., Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 458–478.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003>

Beutler, B. (2000). Tlr4: Central Component of the Sole Mammalian LPS Sensor. *Current Opinion in Immunology*, 12(1), 20-26.

Boessenecker, R., & Churchill, M., (2016). The origin of elephant seals: implications of a fragmentary late Pliocene seal (Phocidae: Miroungini) from New Zealand. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics*, 59, 544–550.

Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* (London, England : 1993), 19(4), 447–459.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>

Briggs K.T. (1974). Dentition of the northern elephant seal. *J Mammal. Feb*;55(1), 158-71.
PMID: 4819589.

Burzyn, D., Rassa, J. C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S. R., & Piazzon, I. (2004). Toll-like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus. *Journal of Virology*, 78(2), 576-84.

Byrd-Leifer, C. A., Block, E. F., Takeda, K., Akira, S., & Ding, A. (2001). The Role of MyD88 and TLR4 in the LPS-Mimetic Activity of Taxol. *European Journal of Immunology*, 31(8), 2448-57.

Cameron, J. L. & Nosbisch, C. (1991). Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology. Mar*; 128(3), 1532-40.

doi: 10.1210/endo-128-3-1532. PMID: 1999171.

Crocker Melissa K., Stern Elizabeth A., Sedaka Nicole M., Shomaker Lauren B., Brady Sheila M., Ali Asem H., Shawker Thomas H., Hubbard Van S., Yanovski Jack A., Sexual Dimorphisms in the Associations of BMI and Body Fat with Indices of Pubertal Development in Girls and Boys, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 99, Issue 8, 1 August 2014, Pages E1519–E1529, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1384>

Cumming, D.C., Quigley M. E., & Yen S. S. (1983). Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *J Clin Endocrinol Metab*, Sep;57(3):671-3. doi: 10.1210/jcem-57-3-671. PMID: 6348068.

D'haene, B. & Hellemans, J. (2010). During qPCR Data Analysis. *International Drug Discovery*.

Dubost, G. (2016). Sexual Dimorphism across 3 Stages of Development in Polygynous Artiodactyls Is Not Affected by Maternal Care. *Current Zoology* 62(6), 513-20. doi: 10.1093/cz/zow061.

Duneau, D. F., Kondolf, H. C., Im, J. H., Ortiz, G. A., Chow, C., Fox, M. A., Eugénio, A. T., Revah, J., Buchon, N., & Lazzaro, B. P. (2017). The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both Gram-negative and Gram-positive bacteria in mated *Drosophila*. *BMC Biology*, 15(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0466-3>

Eftimie, R., Gillard, J. J., & Cantrell, D. A. (2016). Mathematical Models for Immunology: Current State of the Art and Future Research Directions. *Bulletin of Mathematical Biology*, 78(10), 2091–2134. <https://doi.org/10.1007/s11538-016-0214-9>

Espinosa de Aquino, W. B. (2017). *Ontogenia del sistema inmune de mucosas de lobo marino de california (Zalophus californianus)*. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Doctorado en Ciencias Biológicas]. Querétaro, Qro.

Gal-Oz, S. T., Maier, B., Yoshida, H., Seddu, K., Elbaz, N., Czysz, C., Zuk, O., Stranger, B. E., Ner-Gaon, H., & Shay, T. (2019). ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nature Communications*, 10(1), 4295.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12348-6>

García-Aguilar MC, Turrent C, Elorriaga-Verplancken FR, Arias-Del-Razo A, Schramm Y(2018) Climate change and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) population in Baja California, Mexico. *PLoS ONE* 13(2): e0193211.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193211>

Gauglitz, G. G., Callenberg, H., Weindl, G., & Korting, H. C. (2012). Host Defence Against *Candida Albicans* and the Role of Pattern- Recognition Receptors. *Medical Journals Limited*, 92(3), pp. 67-76(10).
<https://doi.org/10.2340/00015555-1250>

Gay, N.J., Gangloff, M., & Weber, A.N. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 693-8.
10.1038/nri1916.

Gay, N. J. & Keith F. J. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 Receptor. *Nature*, 351(6325), 355-56.

Gazzinelli, R. T., Ropert, C., & Campos, M. A. (2004). Role of the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Host Resistance and Pathogenesis during Infection with Protozoan Parasites. *Immunological Reviews*, 201, 9-25.

Gilbert, S. F. (2015) *Developmental Biology*. (6th ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>

Gobert, M., & Lafaille, J. J. (2012). Maternal-fetal immune tolerance, block by block. *Cell*, 150(1), 7–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.020>

Godon, J. J., Arulazhagan, P., Steyer, J. P., & Hamelin, J. (2016). Vertebrate bacterial gut diversity: size also matters. *BMC Ecology*, 16, 12.
<https://doi.org/10.1186/s12898-016-0071-2>

Hall, A. J., Engelhard, G. H., Brasseur, S. M. J. M., Vecchione, A., Burton, H. R., & Reijnders, P. J. H. (2003). The Immunocompetence Handicap Hypothesis in Two Sexually Dimorphic Pinniped Species - There a Sex Difference in Immunity during Early Development? *Developmental and Comparative Immunology*, 27(6-7), 629-37.
DOI: [10.1016/s0145-305x\(03\)00029-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00029-6) PMID 12697319.

Hand, T. W., Vujkovic-Cvijin, I., Ridaura, V. K., & Belkaid, Y. (2016). Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 27(12), 831–843.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.003>

Hebeisen, M., Rufer, N., Oberle, S., Speiser, D. E., y Zehn, D. (2012). Signaling Mechanisms That Balance Anti-Viral, Auto-Reactive, and Antitumor Potential of Low Affinity T Cells. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, 0(0):1-11

Hornef, M. W., & Fulde, M. (2014). Ontogeny of intestinal epithelial innate immune responses *Frontiers in immunology*, 5, 474.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00474>

Iljazovic, A., Roy, U., Gálvez, E., Lesker, T. R., Zhao, B., Gronow, A., Amend, L., Will, S. E., Hofmann, J. D., Pils, M. C., Schmidt-Hohagen, K., Neumann-Schaal, M., & Strowig, T. (2021). Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunology*, 14(1), 113–124.
<https://doi.org/10.1038/s41385-020-0296-4>

Kelsen, J. R., & Wu, G. D. (2012). The gut microbiota, environment and diseases of modern society. *Gut Microbes*, 3(4), 374–382.
<https://doi.org/10.4161/gmic.21333>

Khailaie, S., Bahrami, F., Janahmadi, M., Milanez-Almeida, P., Huehn, J., Meyer-Hermann, M. (2013). A Mathematical Model of Immune Activation with a Unified Self-Nonself Concept. *Front Immunol* 4.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00474>

Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016 Oct;16(10):626-38. doi: 10.1038/nri.2016.90. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546235.

- Kovacs, K., & Lavigne, D. (1986). Maternal Investment and Neonatal Growth in Phocid Seals. *The Journal of Animal Ecology*, 55. 1035.
10.2307/4432.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., & von Boehmer, H. (2006). Making Regulatory T Cells with Defined Antigen Specificity: Role in Autoimmunity and Cancer. *Immunological Reviews*, 212, 163-69.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S., (2009). Pathogen Recognition in the Innate Immune Response. *The Biochemical Journal*, 420(1), 1-16.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., & Finberg, R. W. (2000). Pattern Recognition Receptors TLR4 and CD14 Mediate Response to Respiratory Syncytial Virus. *Nature Immunology*, 1(5), 398-401.
- Larsen J. M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>
- Le Boeuf, Burney J., and Richard M. Laws, editors *Elephant Seals: Population Ecology, Behavior, and Physiology*. Berkeley: University of California Press, c1994 1994.
<http://ark.cdlib.org/ark:/13030/ft7b69p131/>
- Lewis, R., O'Connell, T. C., Lewis, M., Campagna, C., & Hoelzel, A. R. (2006). Sex-specific foraging strategies and resource partitioning in the southern elephant seal (*Mirounga leonina*). *Proceedings. Biological sciences*, 273(1603), 2901–2907.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3642>

Li, B., Selmi, C., Tang, R., Gershwin, M. E., & Ma, X. (2018). The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Cellular & molecular immunology*, 15(6), 595–609.

<https://doi.org/10.1038/cmi.2018.7>

Ligges, U. and Mächler, M. (2003). Scatterplot3d - an R Package for Visualizing Multivariate Data. *Journal of Statistical Software* 8(11), 1-20.

Liu, G., Zhang, H., Zhao, C., & Zhang, H. (2020). Evolutionary History of the Toll-Like Receptor Gene Family across Vertebrates. *Genome Biology and Evolution*, 12(1), 3615–3634.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evz266>

Livak, K. J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Louzoun, Y. (2007). The Evolution of Mathematical Immunology. *Immunological Reviews* 216, 9-20.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008 May;42(2):145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304834.

Lucke, K., Miehle, S., Jacobs, E., & Schuppler, M. (2006). Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol*, 55(Pt 5):617-624.

doi:10.1099/jmm.0.46198-0. PMID: 16585651

Lyon, B. E., & Montgomerie, R. (2012). Sexual selection is a form of social selection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1600), 2266–2273.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0012>

Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>

Margalef, R. (1974). *Ecología*. Barcelona: Omega.

Margulis, L. (2009). Genome acquisition in horizontal gene transfer: symbiogenesis and macromolecular sequence analysis. *Methods Mol Biol*, 532 181-91.

doi: 10.1007/978-1-60327-853-9_10. PMID: 19271185.

Martín, A. M. (2018). Enterotype-like microbiome stratification as emergent structure in complex adaptive systems: A mathematical model.

10.1101/402701.

McCaughy, T. M., & Hogquist, K. A. (2008). Central Tolerance: What Have We Learned from Mice? *Seminars in Immunopathology*, 30(4), 399-409.

Morales-Durán, N. del R. (2018). Respuestas del elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) a desafíos inmunes en un contexto de historia de vida. [Tesis de

Maestría Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales.
Maestría en Ciencias Biológicas]. Querétaro, Qro.

Murdock, J. L., & Núñez, G. (2016). TLR4: The Winding Road to the Discovery of the LPS Receptor. *The Journal of Immunology*, 197(7), 2561-62.

National Academy de Sciences. (2006). *Ending the War Metaphor: The Changing Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship*. Washington, DC:National Academies Press.

Nishida, A. H., & Ochman, H. (2018). Rates of gut microbiome divergence in mammals. *Molecular Ecology*, 27(8), 1884–1897.
<https://doi.org/10.1111/mec.14473>

Oliveira, A. C., Peixoto, J. R., de Arruda, L. B., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., Akira, S., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Nobrega, A., & Bellio, M. (2004). Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to Trypanosoma Cruzi Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with T. Cruzi. *The Journal of Immunology*, 173(9), 5688-96.

O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The History of Toll-like Receptors- Redefining Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 453-60.

Ortiz, R. M., Houser D. S., Wade C. E., & Ortiz C. L. (2003). Hormonal changes associated with the transition between nursing and natural fasting in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Gen Comp Endocrinol*, 130(1), 78-83.
doi: 10.1016/s0016-6480(02)00572-5. PMID: 12535628.

Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2013). *Kuby Immunology 7ed*. New York: W.H. Freeman.

Parag, K., Blacher, E., Elinav, E., & Pettersson, S. (2017). Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*, 171(7), 1481-93.

Pasare, C. & Medzhitov, R. (2004). Toll-like Receptors: Linking Innate and Adaptive Immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1382-87.

Pennell Leesa M., Galligan Carole L., Eleanor N. Fish. Sex affects immunity, *Journal of Autoimmunity*, Volume 38, Issues 2–3, 2012, Pages J282-J291, ISSN 0896-8411, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.013>.

Pinsky Tail, 2017. On the topology of the Lorenz system *Proc. R. Soc. A*. **473**2017037420170374 <http://doi.org/10.1098/rspa.2017.0374>

Qin, J., Li, R., Raes, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature08821>

Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., & Isolauri, E. (2012). Microbial Contact during Pregnancy, Intestinal Colonization and Human Disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 565-76.

Rettew, J. A., Huet, Y. M., & Marriott, I. (2009). Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*, 150(8), 3877-84.

doi: 10.1210/en.2009-0098. Epub 2009 Apr 30. PMID: 19406943.

Rettew, J. A., Huet-Hudson, Y.M., Marriott, I. (2008). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod*, 78(3), 432-7.

doi: 10.1095/biolreprod.107.063545. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18003947.

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050.

<https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>

Sandberg, J., Kovatcheva-Datchary, P., Björck, I., Bäckhed, F., & Nilsson, A. (2019). Abundance of gut *Prevotella* at baseline and metabolic response to barley prebiotics. *Eur J Nutr*, 58(6), 2365-2376.

doi: 10.1007/s00394-018-1788-9. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30046942; PMCID: PMC6689319.

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Karsch-Mizrachi, I. (2019). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D84-86.

Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., & Littman, D. R. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 5, 2:e01202.

doi: 10.7554/eLife.01202. PMID: 24192039; PMCID: PMC3816614.

Schwartz, R. H. (2012). Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4), a006908.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006908>

Sherman-Cooney R. A., Ortiz, R. M., Noren, D. P., Pagarigan, L., Ortiz, C. L., & Talamantes, F. (2005). Estradiol and testosterone concentrations increase with fasting in weaned pups of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Physiol Biochem Zool*, 78(1):55-9.

doi: 10.1086/425193. PMID: 15702463.

Stan, R. C., Soriano, F. G., & de Camargo, M. M. (2018). A mathematical model relates intracellular TLR4 oscillations to sepsis progression. *BMC research notes*, 11(1), 462.

<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3561-9>

Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15451–15455.

<https://doi.org/10.1073/pnas.202604299>

Stoffel, M. A., Acevedo-Whitehouse, K., Morales-Durán, N., Grosser, S., Chakarov, N., Krüger, O., Nichols, H. J., Elorriaga-Varplancken, F. R., & Hoffman, J. I. (2020) Early sexual dimorphism in the developing gut microbiome of northern elephant seals.

Molecular Ecology, 29(11), 2109-2122

<https://doi.org/10.1111/mec.15385>

Soetaert K, Petzoldt T, Setzer RW (2010). "Solving Differential Equations in R: Package deSolve." *Journal of Statistical Software*, **33**(9), 1–25. ISSN 1548-7660, doi: [10.18637/jss.v033.i09](https://doi.org/10.18637/jss.v033.i09), <https://www.jstatsoft.org/v33/i09>.

Swiatczak, B., & Cohen, I. R. (2015). Gut Feelings of Safety: Tolerance to the Microbiota Mediated by Innate Immune Receptors. *Microbiology and Immunology*, **59**(10), 573-85.

Tassia, M. G., Whelan, N. V., & Halanych, K. M. (2017). Toll-like receptor pathway evolution in deuterostomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(27), 7055–7060.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1617722114>

Tobias, J. A., Montgomerie, R., & Lyon, B. E. (2012). The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition.

H. Shaw Warren, Catherine Fitting, Eva Hoff, Minou Adib-Conquy, Laura Beasley-Topliffe, Brenda Tesini, Xueya Liang, Catherine Valentine, Judith Hellman, Douglas Hayden, Jean-Marc Cavaillon, Resilience to Bacterial Infection: Difference between Species Could Be Due to Proteins in Serum, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 201, Issue 2, 15 January 2010, Pages 223–232, <https://doi.org/10.1086/649557>

Tobias Joseph A., Montgomerie Robert Y Lyon Bruce E. 2012The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition *Phil. Trans. R. Soc. B* **367**2274–2293 *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **367**(1600), 2274-2293. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0280>

Wells, P. M., Adebayo, A. S., Bowyer, R., Freidin, M. B., Finckh, A., Strowig, T., Lesker, T. R., Alpizar-Rodriguez, D., Gilbert, B., Kirkham, B., Cope, A. P., Steves, C. J., & Williams, F. (2020). Associations between gut microbiota and genetic risk for rheumatoid arthritis in the absence of disease: a cross-sectional study. *The Lancet. Rheumatology*, 2(7), e418–e427
[https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30064-3](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30064-3)

Weng, M., & Walker, W. A. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(3), 203–214.
<https://doi.org/10.1017/S2040174412000712>.

Weström, B., Arévalo Sureda, E., Pierzynowska, K., Pierzynowski, S. G., & Pérez-Cano, F. J. (2020). The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Frontiers in Immunology*, 11, 1153.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153>

Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C., & Mathis, D. (2015). Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6234), 589–594.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa7017>

Yochem, P. K., Brent, S. S., Mazet, J. A. K., & Boyce, W. M. (2008). Hematologic and serum biochemical profile of the Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*): variation with age, sex, and season. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4), 911-21.
10.7589/0090-3558-44.4.911.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., & Steward Jr., C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7, 85.

<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>

Zhao, Q., & Elson, C. O. (2018). Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology*, 154(1), 28-37

<https://doi.org/10.1111/imm.12896>

ANEXO I

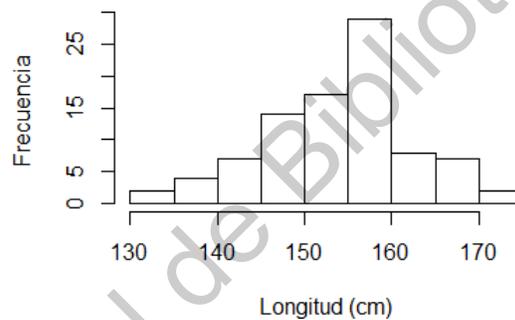


Figura 51.- Histograma de la distribución de los datos asociados a la longitud (cm) de las crías de elefante marino muestreadas en la temporada reproductiva del 2019.

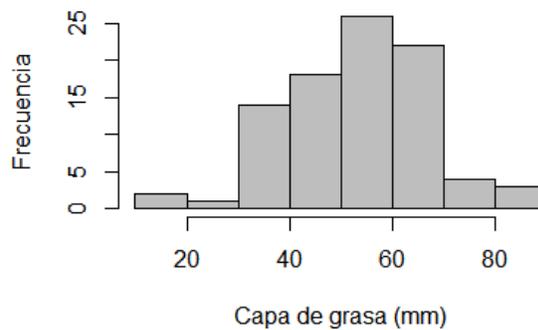


Figura 52.- Distribución de los datos asociados a la capa de grasa (mm) de las crías de elefante marino muestreadas en la temporada reproductiva del 2019.

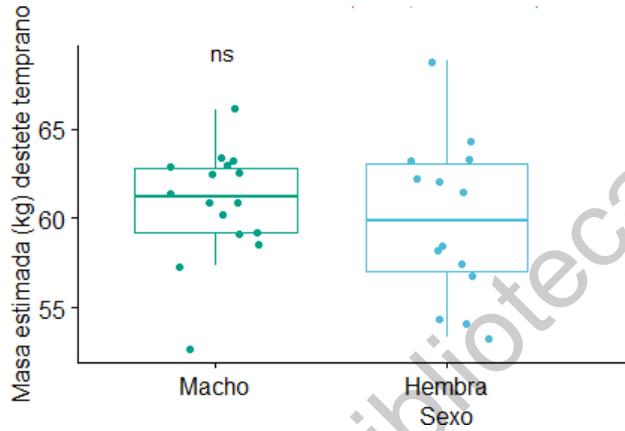


Figura 53.- Estimación de la masa (kg) de las crías de elefante marino en el destete temprano, temporada reproductiva 2019. ns= no significativo

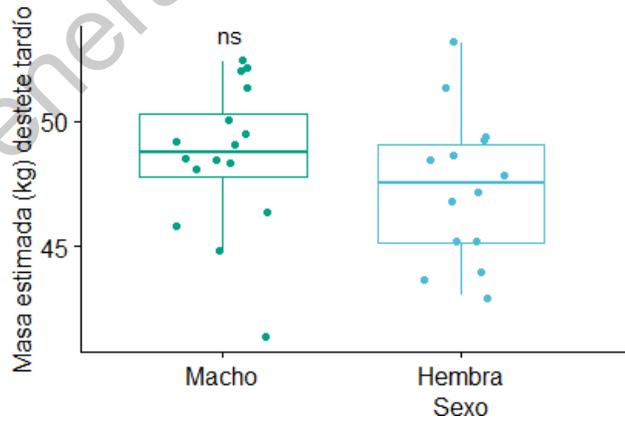


Figura 54.- Estimación de la masa (kg) de las crías de elefante marino en el destete tardío, temporada reproductiva 2019. ns= no significativo

ANEXO II

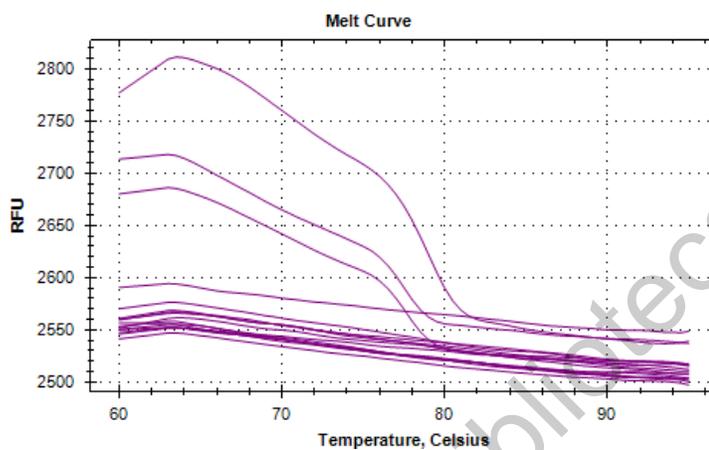


Figura 55.- Pruebas de gradiente de temperatura para determinar la hibridación de los primers en el gen TLR4.

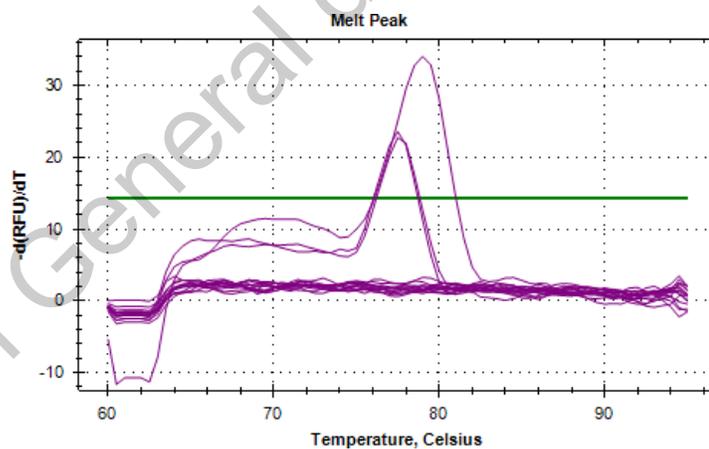


Figura 56.- Pruebas de gradiente para determinar el pico de amplificación del gen TLR4.

ANEXO III

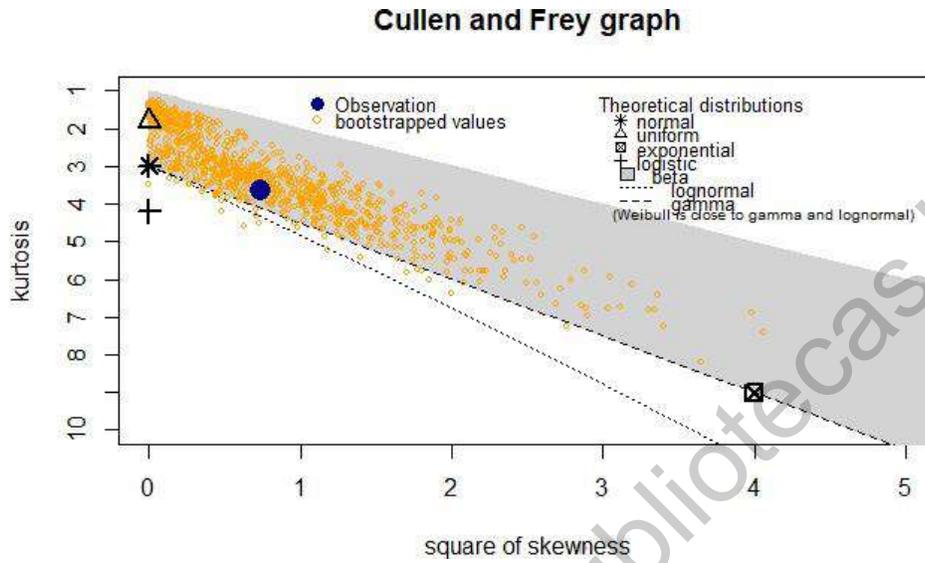


Figura 57.- Distribución beta de los datos de expresión temprana del receptor TLR4, los datos se permutaron 1000 veces para conocer su tipo de distribución.

Cullen and Frey graph

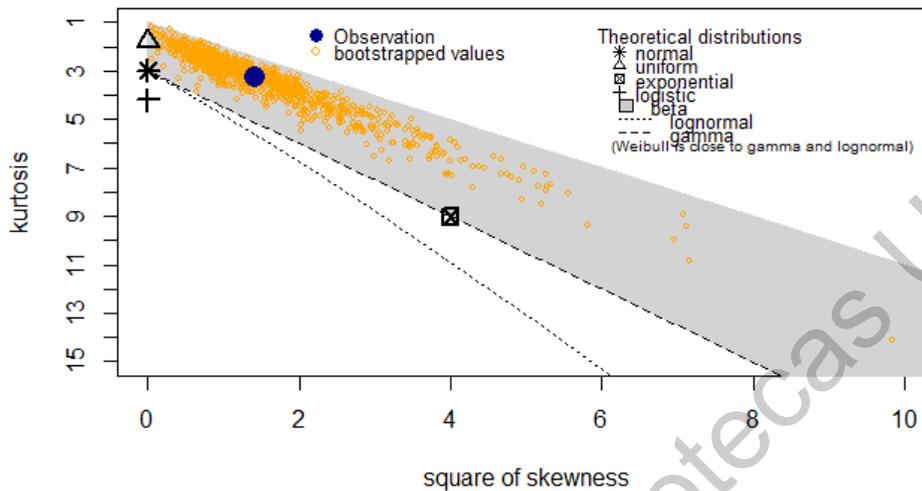


Figura 58.- Distribución beta de los datos de expresión tardía del receptor TLR4, los datos se permutaron 1000 veces para conocer su tipo de distribución.

	ID	LT1	LT2	C_G_1	C_G_2	Masa1	Masa2	X.delta.Cl.1	X.delta.Cl.2	Avg.Cl.GAPDH1	Avg.Cl.GAPDH2	Avg.Cl.TLR4.1	Avg.Cl.TLR4.2
ID	1	0.22	-0.38	0.15	-0.14	-0.22	-0.36	-0.33	0.17	0.15	0.15	-0.31	-0.22
LT1	-0.22	1	0.31	0.15	0.32	1	0.31	0.33		-0.37	0.11	0.17	
LT2	-0.38	0.31	1	0.64	0.7	0.31	1	0.24	-0.15	-0.27	0.18	0.13	0.03
C_G_1	0.15	-0.15	0.64	1	0.64	0.15	0.64	-0.18	-0.41	0.33			-0.41
C_G_2	-0.14	0.32	0.7	0.64	1	0.32	0.7	0.14	-0.22	-0.39	-0.11	0.04	-0.25
Masa1	0.22	1	0.31	0.15	0.32	1	0.31	0.34		-0.37	0.11	0.17	
Masa2	-0.38	0.31	1	0.64	0.7	0.31	1	0.25	-0.15	-0.27	0.18	0.13	0.03
X.delta.Cl.1	-0.33	0.33	0.24	0.19	0.14	0.34	0.25	1	0.01	-0.57	0.11	0.86	
X.delta.Cl.2	0.17		-0.15	-0.41	-0.22		-0.15	0.05	1	0.15	-0.28	0.2	0.92
Avg.Cl.GAPDH1	0.15	-0.37	0.27	0.33	-0.39	0.37	0.27	-0.57	0.15	1	-0.17	0.08	0.08
Avg.Cl.GAPDH2	0.13	0.11	0.18			0.11	0.18	-0.18	-0.26	0.17	1	-0.32	0.14
Avg.Cl.TLR4.1	-0.31	0.17	0.12			0.11	0.17	0.13	0.86	0.2	0.09	1	0.08
Avg.Cl.TLR4.2	-0.22			-0.41	-0.25			0.03	0.92	0.08	0.14	0.08	1

Figura 59.- Matriz de correlación de variables morfométricas y de expresión génica. Se excluyeron los datos sanguíneos por escasez de información en el primer muestreo. (Método Spearman, función cor() en RStudio). LT= Longitud, C_G =Capa de grasa, X.delta.Ct = el valor de delta Ct durante la etapa de destete temprano (1), etapa de destete tardío (2). Avg Ct = Promedio de Ct para cada gen.

ANEXO IV

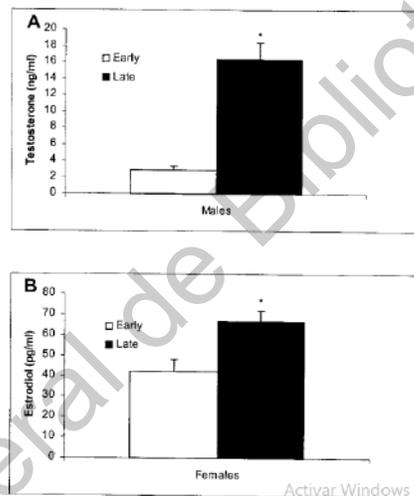


Figura 60.- Concentraciones esteroidales en sangre de crías de NES en ng/ml (Sherman-Cooney et al. 2005).