



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EXPRESIÓN DE HEMO OXIGENASA Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS
(TNF- α , IL-1 β , IL-6) EN LEUCOCITOS DE *Tursiops truncatus* Y *Homo sapiens* EN RESPUESTA A RETOS PROINFLAMATORIOS

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

Presenta

Carlos Armando Reyes Ramos

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

ACTA LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 27 del Mes de marzo del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

EXPRESIÓN DE HEMO OXIGENASA Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF- α , IL-1 β , IL-6) EN LEUCOCITOS DE *Tursiops truncatus* Y *Homo sapiens* EN RESPUESTA A RETOS PROINFLAMATORIOS.

Presentada por el alumno:

Carlos Armando Reyes Ramos

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina.**

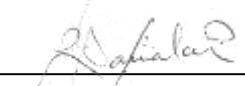
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

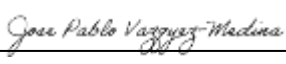
LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Tania Zenteno Savín
Co-Directora de Tesis


Dr. Luis Javier Ramírez Jirano
Co-Director de Tesis


Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero
Co-Tutor de Tesis


Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor de Tesis


Dr. José Pablo Vázquez Medina
Co-Tutor de Tesis


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos


La Paz, Baja California Sur, a 23 de marzo de 2023.

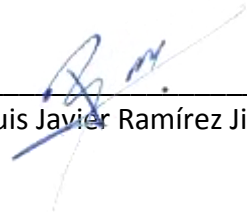
Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante **CARLOS ARMANDO REYES RAMOS** del Programa de **Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales**, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:


- Herramienta antiplagio:
iThenticate
 - Filtros utilizados:
Citas excluidas, Bibliografía excluida
 - Porcentajes de similitud:
19%
- Se muestra captura de pantalla

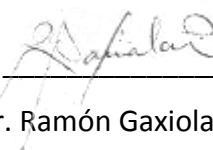


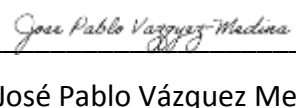
Firmas del comité


Dra. Tania Zenteno Savín


Dr. Luis Javier Ramírez Jirano


Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero


Dr. Ramón Gaxiola Robles


Dr. José Pablo Vázquez Medina

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Luis Javier Ramírez Jirano
Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Co-Director de Tesis

Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero
Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Co-Tutor de Tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles
Instituto Mexicano del Seguro Social
Co-Tutor de Tesis

Dr. José Pablo Vázquez Medina
University of California, Berkeley
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Luis Javier Ramírez Jirano
Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. José Pablo Vázquez Medina

Jurado de Examen

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Luis Javier Ramírez Jirano
Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. José Pablo Vázquez Medina

Suplentes

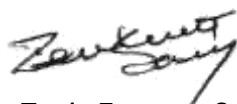
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Resumen

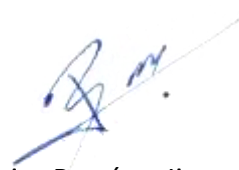
Los cetáceos son un grupo de especies que cuenta con adaptaciones y respuestas fisiológicas a la vida acuática, así como con un robusto sistema de defensa antioxidante que les permite mitigar el daño ocasionado por los ciclos de isquemia/reperfusión asociados con el buceo. Existe una mayor comprensión de las cascadas de señalización que caracterizan la inflamación isquémica en humanos que en cetáceos y, por lo tanto, los mecanismos moleculares y bioquímicos asociados a las adaptaciones fisiológicas de cetáceos para tolerar eventos inflamatorios no son comprendidos en su totalidad. La hemo oxigenasa (HO) es una proteína citoprotectora que participa en la respuesta antiinflamatoria. La HO cataliza el primer paso en la degradación oxidativa del grupo hemo. La isoforma inducible HO-1 es regulada por varios estímulos, incluyendo hipoxia, estrés oxidativo y mediadores inflamatorios. El objetivo de este estudio fue caracterizar la HO-1 del tursión (*Tursiops truncatus*) *in silico* y comparar su estructura con la de mamíferos terrestres, así como evaluar la respuesta de HO-1 y citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) en respuesta a retos proinflamatorios en leucocitos de tursiones en comparación con leucocitos de humanos. La secuencia 'upstream' de HO-1 fue obtenida de las bases de datos NCBI y Ensemble, y la estructura del gen fue determinada con herramientas bioinformáticas. Se identificaron cinco exones y cuatro intrones, y en la región 'upstream' se detectaron elementos reguladores proximales. La 'huella digital' de HO-1 y la His-25 se encontraron altamente conservadas en las especies analizadas. El alineamiento de secuencias aminoacídicas y la evidencia de selección negativa sugieren que HO-1 es una proteína conservada; sin embargo, se encontraron aminoácidos con rotación diferente en el sitio activo de la molécula del tursión. En leucocitos aislados de humanos y tursiones se determinó experimentalmente el efecto del lipopolisacárido (LPS) en la expresión de los genes *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *HMOX1* y *GAPDH*, los niveles de IL-1 β , IL-6, y TNF- α , así como la actividad enzimática de la HO. En los leucocitos de humano se encontró una respuesta clásica proinflamatoria, mientras que en leucocitos del tursión la respuesta fue atenuada. Se observó un aumento significativo de la actividad de HO ($p < 0.05$) en leucocitos de tursiones expuestos a LPS. Lo anterior sugiere una regulación específica de las citocinas inflamatorias en los leucocitos tratados con LPS; ello puede conducir a respuestas diferenciales a un desafío proinflamatorio entre mamíferos marinos y terrestres. Estos resultados podrían indicar una mayor respuesta antiinflamatoria en tursiones.

Palabras clave: inflamación, mamíferos marinos, isquemia, buceo, una salud
<https://orcid.org/0000-0002-6519-4032>

Vo.Bo. Codirectores de Tesis



Dra. Tania Zenteno Savín



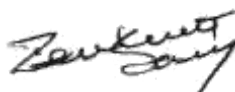
Dr. Luis Javier Ramírez Jirano

Summary

Cetaceans are a group of species that have adaptations and physiological responses to aquatic life, as well as a robust antioxidant defense system that allows them to mitigate the damage caused by ischemia/reperfusion cycles associated with diving. There is a greater understanding of the signaling cascades that characterize ischemic inflammation in humans than in cetaceans, and, in turn, the molecular and biochemical mechanisms associated with the physiological adaptations of cetaceans to tolerate inflammatory events are not fully understood. Heme oxygenase (HO) is a cytoprotective protein and is involved in the anti-inflammatory response. HO catalyzes the first step in the oxidative degradation of the heme group. The inducible isoform HO-1 is regulated by several stimuli, including hypoxia, oxidative stress, and inflammatory mediators. The objective of this study was to characterize the HO-1 of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) *in silico* and compare its structure with that of terrestrial mammals, as well as to evaluate the response of HO-1 and proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in response to proinflammatory challenges in leukocytes of bottlenose dolphins compared to leukocytes of humans. The upstream sequence of HO-1 was obtained from the NCBI and Ensemble databases, and the structure of the gene was determined with bioinformatics tools. Five exons and four introns were identified, and proximal regulatory elements were detected in the upstream region. The 'fingerprint' of HO-1 and His-25 was found to be highly conserved in the species analyzed. Amino acid sequence alignment and evidence of negative selection suggest that HO-1 is a conserved protein. However, amino acids with different rotation were found at the active site of the bottlenose dolphin molecule. In leukocytes isolated from humans and bottlenose dolphins, the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of the *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *HMOX1* and *GAPDH* genes, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , as well as the enzymatic activity of HO, was experimentally determined. In human leukocytes a classic proinflammatory response was found, while in leukocytes of bottlenose dolphins the response was attenuated. A significant increase in HO activity ($p < 0.05$) was observed in leukocytes from bottlenose dolphins exposed to LPS. This suggests a specific regulation of inflammatory cytokines in LPS-treated leukocytes. This can lead to differential responses to a pro-inflammatory challenge between marine and terrestrial mammals. These results could indicate a greater anti-inflammatory response in bottlenose dolphins.

Keywords: inflammation, marine mammals, ischemia, diving., one health
<https://orcid.org/0000-0002-6519-4032>

Vo.Bo. Codirectores de Tesis



Dra. Tania Zenteno Savín



Dr. Luis Javier Ramírez Jirano

Dedicatoria

A mi hermosa mujer Karen García y nuestro hijo Carlitos, que sin ellos este sueño no se habría realizado.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a todo su personal por las facilidades y apoyos para poder realizar este proyecto. En particular al personal del área de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por su disponibilidad para los numerosos trámites durante estos 4 años.

Agradezco a CONACyT por la beca nacional otorgada #695475 y el Proyecto CB-2016-01-283669, y a CIBNOR por su beca tesis doctorado #976.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS: R-2018-785-010, por permitirme el uso de sus espacios para los análisis de citometría en La Paz, B. C. S; así como a su dependencia, Centro de Investigación Biomédica de Occidente en Guadalajara, Jalisco por recibirme y permitirme el uso de sus instalaciones durante mi estancia.

A mi Comité Tutorial por todo su apoyo y por compartir su conocimiento. Ambos Co-Directores son miembros de la RED internacional RIESCOS, Evaluación de los Efectos de los Contaminantes Emergentes en Organismos perteneciente al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED ref. 419RT0578).

Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA).

Comité de Ética en Investigación and Comité Hospitalario de Bioética.

Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A todo el personal del Laboratorio de Estrés Oxidativo (CIBNOR Línea Estratégica II. Estrés Oxidativo) liderado por la Dra. Tania Zenteno, con el apoyo técnico del I. Q. B. Orlando Lugo a quién agradezco enormemente por su ayuda durante toda la realización de este proyecto.

A compañeros y amigos que me apoyaron durante estos poco más de cuatro años, en especial a las Dras. Alexia Omont y Paulina Ortega por toda su ayuda y amistad.

A mi familia por siempre darme ánimos para seguir adelante.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Mamíferos.....	4
2.1.1 Mamíferos marinos.....	4
2.1.2 Tursión	6
2.2 Reconocimiento de un patógeno: respuesta inmune	7
2.2.1 Inmunidad innata.....	9
2.2.2 Inflamación	11
2.2.3 Citocinas.....	12
2.3 Hemo oxigenasa como agente antiinflamatorio	15
2.3.1 Mecanismos antiinflamatorios del monóxido de carbono.....	18
2.4 Inmunología y salud de mamíferos marinos	19
2.4.1 Respuesta inmune de delfines.....	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Caracterización del gen hemo oxigenasa-1 y sus elementos reguladores.....	26
6.2 Predicción de la estructura secundaria y terciaria de hemo oxigenasa-1.....	26
6.3 Alineamiento múltiple de secuencias.....	27
6.4 Detección de selección positiva/negativa	29
6.5 Análisis filogenético de hemo oxigenasa-1.....	29
6.6 Colecta de sangre.....	30
6.7 Aislamiento de leucocitos.....	31
6.8 Concentración letal por exposición a lipopolisacáridos	32
6.9 Bioensayo proinflamatorio	33
6.10 Extracción de ARN y expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria.....	33
6.11 Actividad de hemo oxigenasa	36
6.12 Ensayos ELISA para cuantificación de citocinas.....	37
6.13 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Caracterización <i>in silico</i> del gen hemo oxigenasa-1 de <i>Tursiops truncatus</i>	39

7.2 Modelación proteica y del sitio activo de hemo oxigenasa-1 de <i>Tursiops truncatus</i>	39
7.3 Diferencias conformacionales y sustituciones en la hemo oxigenasa-1 de <i>Tursiops truncatus</i>	41
7.4 Alineamiento de secuencias de hemo oxigenasa-1 de eucariotas	45
7.5 Presión selectiva en el gen de hemo oxigenasa-1 de cetáceos y primates	47
7.6 Análisis filogenético de hemo oxigenasa-1 de mamíferos	47
7.7 Aislamiento leucocitario y concentración letal por exposición a lipopolisacáridos	51
7.8 Expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria	53
7.9 Actividad de hemo oxigenasa en leucocitos	56
7.10 Ensayos ELISA de citocinas utilizando leucocitos aislados estimulados con LPS.....	57
8. DISCUSIÓN	59
8.1 Elementos reguladores en el gen de la hemo oxigenasa-1 del tursión.....	59
8.2 Conservación de las secuencias y estructuras de hemo oxigenasa-1 de mamíferos	59
8.3 Interacciones en el sitio activo	61
8.4 Presión selectiva en la evolución molecular de hemo oxigenasa-1 del <i>Tursiops truncatus</i>	62
8.5 Viabilidad de leucocitos por exposición a lipopolisacárido <i>in vitro</i>	63
8.6 Los leucocitos de <i>Tursiops truncatus</i> muestran una respuesta de citocinas atenuada al exponerse a lipopolisacáridos.....	66
8.7 En leucocitos de <i>Tursiops truncatus</i> la exposición a LPS incrementa la actividad de hemo oxigenasa	69
8.8 La exposición a LPS aumenta los niveles de IL-1 β de manera diferencial en leucocitos humanos y de <i>Tursiops truncatus</i>	70
8.9 Adaptación a la respuesta inflamatoria como consecuencia del buceo	72
9. CONCLUSIONES	74
10. LITERATURA CITADA	76
11. ANEXOS	100
Anexo A. Efecto de la exposición a LPS (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 o 48 h sobre la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en leucocitos humanos y de tursión. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n= 4-5; prueba de comparación múltiple de Tukey). Control = sin exposición a LPS.	100
Anexo B. Resumen de los análisis estadísticos realizados.....	101
Anexo C: <i>In silico</i> Characterization of the Heme Oxigenase 1 From Bottlenose Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>): Evidence of Changes in the Active Site and Purifying Selection	102
Anexo D: Dolphin leukocytes exhibit an attenuated cytokine response and increase heme oxygenase activity upon exposure to lipopolysaccharides	117

Lista de figuras

- Figura 1.** Separación de subpoblaciones celulares sanguíneas. La flecha indica la fracción que contiene los glóbulos blancos. 33
- Figura 2.** Estructura del gen hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) del tursión (*Tursiops truncatus*). Se muestra la región reguladora (1,000 pb) y los exones e intrones. Los límites entre exones e intrones fueron obtenidos a partir de la base de datos Ensembl. Se muestran los elementos reguladores proximales. Factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), factor de unión a CCCTC (CTCF), proteína activadora 2 (AP-2), factor nuclear kappa B (NF-kB), factor de choque térmico 1 (HSF1) y transductores de señal y activadores de transcripción (STAT1:: STAT2). 40
- Figura 3.** Predicción de los sitios de unión para factores de transcripción en la región promotora del gen de hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) del tursión (*Tursiops truncatus*). Proteína activadora 2 (AP-2), factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), factor de unión a CCCTC (CTCF), factor de choque térmico 1 (HSF1) factor nuclear kappa B (NF-kB), y transductores de señal y activadores de transcripción (STAT1 :: STAT2). Se muestran los valores E y p. La hebra sentido y antisentido se muestra con un (+) y (-) respectivamente. 41
- Figura 4.** Modelo por homología de hemo oxigenasa 1 del tursión *Tursiops truncatus*. El dominio transmembranal se muestra en rojo. Las hélices 3_{10} se presentan en café, y las hélices- α se presentan en colores distintos. A) Se muestran los extremos N y C terminal; el grupo hemo se encuentra entre las hélices proximal (azul) y distal (verde claro). B) Modelo de la molécula girada 180° 42
- Figura 5.** Modelación por homología del alineamiento del sitio activo de hemo oxigenasa 1 de tursión (*Tursiops truncatus*) y humano (*Homo sapiens*). Se señalan los residuos más próximos al grupo hemo. Los átomos de carbono se presentan en verde para el tursión y en blanco para el humano (a excepción del grupo hemo, en el que se muestran en púrpura), los átomos de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo. (B) Modelo del sitio activo rotado 180° 43
- Figura 6.** Alineamiento de estructuras tridimensionales de hemo oxigenasa-1 (HO-1) de vertebrados con diferentes adaptaciones fisiológicas. Las estructuras fueron alineadas con la HO-1 de humano. Rata (*Rattus rattus*) (cian), pez fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) (violeta), rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*) (magenta), cachalote (*Physeter catodon*) (verde opaco), tursión (*Tursiops truncatus*) (verde), lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (azul), ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus bairdii*) (amarillo), rana común (*Rana temporaria*) (café claro). Se indican los valores de la desviación de la media cuadrática (RMSD). 44
- Figura 7.** Sitio de interacción del grupo hemo y comparación de la alineación de hemo oxigenasa 1 del tursión (*Tursiops truncatus*) con la del humano (*Homo sapiens*). El ángulo de rotación se muestra en grados. El carbono beta está indicado en negro. Se muestran la hélice distal (A) y proximal (B). Los átomos de carbono se muestran en verde para el tursión y gris para los humanos (excepto para el grupo hemo, en el que los átomos de carbono se muestran en púrpura), los átomos de nitrógeno en azul y el oxígeno en rojo. 45
- Figura 8.** Mapa de calor elaborado a partir de 245 secuencias aminoacídicas de hemo oxigenasa-1 (HO-1) de eucariotas. Se muestran estructuras terciarias de HO-1 de mamíferos, hélices alfa (café), hélices 3_{10} (azul). Se muestra la histidina-25, la huella digital de HO-1, el dominio de glicina, y la región transmembranal. El color en las columnas indica la frecuencia del

- aminoácido a través de todas las especies analizadas, verde para mayor frecuencia, rojo para cero. 46
- Figura 9.** Análisis múltiple de secuencias de hemo oxigenasa 1 de mamíferos. En negritas se encuentra la histidina-25; se señala la 'huella digital de HO-1'; se presenta el motivo de glicina encerrado en un cuadro, y la región transmembranal de anclaje al retículo endoplásmico subrayado. Los sitios con selección positiva y negativa se indican con (+) y (-), respectivamente. * indica los residuos idénticos. 49
- Figura 10.** Tasas de sustitución no-sinónimas/sinónimas (dN/dS) a lo largo de la secuencia de codificación del gen de hemo oxigenasa 1 de mamíferos. La línea continua es la tasa dN/dS de cetáceos. La línea discontinua representa la tasa dN/dS en primates. 50
- Figura 11.** Árbol filogenético consenso de varias secuencias de hemo oxigenasa 1 (HO-1) de mamíferos. El análisis incluyó 24 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Hubo un total de 288 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol fue enraizado a la secuencia de HO-1 del koala (*Phascolarctos cinereus*). 51
- Figura 12.** Porcentaje de letalidad de leucocitos de humanos (*Homo sapiens*) y de tursiones (*Tursiops truncatus*) en probits graficado contra la concentración (expresada en logaritmo base 10 de lipopolisacáridos (LPS)). Valores obtenidos con el análisis de exclusión con azul de tripano (n=9). Se muestra la concentración en la cual muere el 22% de la población celular (CL₂₂) en línea punteada. 52
- Figura 13.** Porcentaje celular determinado por citometría de flujo de leucocitos aislados de muestras de sangre humana (*Homo sapiens*) y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n=5-8). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (*p<0.05, **p<0.01; prueba t no pareada). 53
- Figura 14.** Expresión relativa de interleucina 1 β (*IL-1 β*), Factor de Necrosis Tumoral (*TNF- α*), e interleucina 6 (*IL-6*) en leucocitos de humanos (A, C y E; *Homo sapiens*) y tursiones (B, D y F; *Tursiops truncatus*) en respuesta a la exposición a lipopolisacárido (LPS, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y sin LPS (control) por 24 y 48 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Las barras representan las medias y las líneas la desviación estándar (n = 3-6). Los asteriscos (*) denotan diferencias significativas entre tratamientos (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba de comparación múltiple de Tukey o prueba t de Welch). 55
- Figura 15.** Expresión relativa de hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) en leucocitos de humanos (A; *Homo sapiens*) y tursiones (B; *Tursiops truncatus*) en respuesta a la exposición a lipopolisacárido (LPS, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y sin LPS (control) por 24 y 48 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Las barras representan las medias y las líneas la desviación estándar (n = 4-6). * denota diferencias significativas entre tratamientos (**p<0.01; prueba de comparación múltiple de Tukey). 56
- Figura 16.** Actividad de hemo oxigenasa en leucocitos aislados de humanos y tursiones expuestos a un reto proinflamatorio. Las barras representan la media (n=6-7) y las líneas la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05; prueba de la diferencia mínima de Fisher). LPS, lipopolisacárido. 57

Figura 17. Niveles de citocinas (pg/mL) en leucocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*) estimulados con LPS ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 o 48 h. Las muestras se analizaron en un ensayo ELISA específico para cada especie. Interleucina (IL)-1 β , Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α e IL-6 como se describe en materiales y métodos. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n= 5-7). Los asteriscos (*) denotan diferencias significativas entre tratamientos (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba t no pareada). Control = sin exposición a LPS..... 58

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de hemo oxigenasa 1 incluidas en los análisis de alineamiento múltiple y filogenético.	28
Tabla 2. Oligonucleótidos y sondas diseñadas para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa.	35
Tabla 3. Componentes del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa.	36
Tabla 4. Componentes del ensayo enzimático.	37
Tabla 5. Rango de detección de distintas citocinas proporcionado por el fabricante.	38
Tabla 6. Residuos de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) del tursión (<i>Tursiops truncatus</i>) en los que se encontró diferente ángulo de rotación que en la proteína correspondiente del humano (<i>Homo sapiens</i>).	43
Tabla 7. Viabilidad (% células vivas) de leucocitos de humano (n=9) y tursión (n=9) expuestos a 10 µg mL ⁻¹ de LPS por 24 y 48 horas. Control = células sin tratamiento.	52

Abreviaturas

CD	Células dendríticas
CO	Monóxido de carbono
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GM-CSF	Factor estimulante de colonias macrófago-granulocito
HO	Hemo oxigenasa
I/R	Isquemia/reperfusión
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacáridos
MyD88	Diferenciación mieloide 88
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
PMAD	Patrones moleculares asociados a daño
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral

1. INTRODUCCIÓN

Los mamíferos, entre ellos el ser humano, son un grupo de animales que se pueden encontrar en casi cualquier hábitat (Ceballos y Ehrlich, 2006), con numerosas adaptaciones a diversos ecosistemas, e integran el grupo más estudiado. El estudio comparativo entre mamíferos ha permitido generar avances en el mantenimiento de la salud humana, lo cual se debe en gran medida a los estudios detallados del sistema inmune en ratones (*Mus musculus domesticus*) (Abolins *et al.*, 2017). Sin embargo, el estudio de especies de mamíferos marinos es más complicado debido a su hábitat, por lo que han sido menos estudiados que los mamíferos terrestres (Schipper *et al.*, 2008).

Los cetáceos (ballenas, delfines y marsopas), son un grupo de mamíferos marinos que regresaron al océano hace aproximadamente 53–56 millones de años (Thewissen *et al.*, 2007). Esta transición de un estilo de vida terrestre a uno acuático plantea desafíos que incluyen, entre otros, diferentes patógenos y proteínas de respuesta a patógenos; retos para la administración y almacenamiento de oxígeno (ya que deben bucear para obtener presas o cualquier fuente de alimento), lo que se refleja en adaptaciones fisiológicas como mayores concentraciones de hemoglobina y mioglobina (Ponganis *et al.*, 2011); así como la tolerancia a la isquemia/reperfusión (I/R) (Allen y Vázquez-Medina, 2019) resultante de la respuesta al buceo (bradicardia, vasoconstricción periférica, redistribución del flujo sanguíneo) (Butler y Jones, 1997; Blix, 2018; Ponganis, 2019). La evidencia de presiones selectivas en el receptor tipo toll (TLR) 4, un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), de cetáceos sugiere una evolución adaptativa al estilo de vida acuático (Shen *et al.*, 2012). Por ello, este taxón es un candidato ideal para estudiar los procesos evolutivos del sistema inmune de los mamíferos.

Los mecanismos desarrollados en los animales para hacer frente a infecciones incluyen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta innata o de reconocimiento de patrones se distingue por ser rápida, no específica y con fiebre; en la sangre

se reclutan células y proteínas, como inmunoglobulinas y citocinas, con las cuales se combate y se remueven antígenos vía fagocitosis (Abbas *et al.*, 2012). Esta respuesta innata es iniciada por una reacción inflamatoria aguda; permite destruir el agente infeccioso en un período de tiempo corto en un área localizada e inducir una respuesta inmune a través del reclutamiento leucocitario, migración y muerte celular (Buckley *et al.*, 2001). Las citocinas son un grupo de proteínas con funciones reguladoras de la respuesta inmunitaria e inflamatoria; son producidas por leucocitos y participan en la maduración, respuesta, movilidad y función efectora de éstos (Fair *et al.*, 2017).

Entre las proteínas de respuesta a patógenos, los receptores de reconocimiento de patrones son los que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos (Medzhitov, 2007). Los TLR son los receptores de reconocimiento mejor caracterizados y se expresan comúnmente en células del sistema inmune (Akira *et al.*, 2001; Medzhitov, 2001). Después de estimular a las células del sistema inmune con lipopolisacáridos (LPS, componentes de la pared bacteriana), TLR4 puede activar la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (Jia *et al.*, 2014) que desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias y estimula la translocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Calippe *et al.*, 2008). El NF- κ B es un factor transcripcional que regula la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria, inflamatoria (Siebenlist *et al.*, 2003) y antiviral (Hiscott, 2007).

Cuando las respuestas inmunitarias, como la inflamación y la fiebre, no se controlan o se interrumpen, pueden provocar el desarrollo de varias enfermedades como sepsis, asma, esclerosis múltiple, colitis, artritis reumatoide, arteriosclerosis y cáncer (Ames *et al.*, 1993; Krishnamoorthy y Honn, 2006). La hemo oxigenasa (HO) es una proteína citoprotectora y es considerada el principal agente antiinflamatorio, que cataliza el primer paso de la degradación oxidativa del grupo hemo; este último es una molécula prooxidante con capacidad de desestabilizar ácidos nucleicos, proteínas y estructuras lipídicas (Choi y Alam, 1996; Morse y Choi, 2002). La isoforma inducible HO-1 es regulada por varios estímulos, incluyendo

mediadores de inflamación, factores asociados al estrés oxidativo (Terry *et al.*, 1998; Maines y Panahian, 2001), radiación ultravioleta, hipertermia, I/R, exposición a metales pesados, peróxido de hidrógeno y endotoxinas (Maines, 1992; Choi y Alam, 1996; Abraham *et al.*, 2002). Los mamíferos marinos toleran condiciones proinflamatorias a las que se exponen frecuentemente como la hipoxia y I/R (Allen y Vázquez-Medina, 2019). Dado que los mamíferos marinos como el tursi3n se han adaptado a la transici3n del estilo de vida terrestre al acu3tico, en este estudio se evalúa la actividad de la enzima antiinflamatoria HO y la expresi3n de HO-1 y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en respuesta a retos proinflamatorios en leucocitos de tursiones en comparaci3n con leucocitos de humanos. Para entender las potenciales diferencias en la funci3n de la enzima antiinflamatoria HO-1 entre especies, se caracteriz3 *in silico* la estructura de HO-1 del tursi3n y se compar3 con aquella de otros mamíferos marinos y terrestres, incluyendo humanos. Utilizando ensayos moleculares se analiz3 la participaci3n de HO-1 en procesos inflamatorios en leucocitos de tursiones y se compar3 con aquella en leucocitos de humanos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mamíferos

Los mamíferos son un grupo de animales perteneciente al filo de los cordados que a pesar de ser una clase con un reducido número de especies (~4,600) cuentan con una gran diversidad fenotípica, plasticidad genética y múltiples adaptaciones que les han permitido colonizar casi todos los ambientes; algunas especies incluso tienen la capacidad de volar. Los mamíferos son endotérmicos y tienen pelo que les sirve para aislar su cuerpo y brindar protección. Las hembras poseen glándulas mamarias (rudimentarias en machos) que secretan leche y tienen un cuidado parental extenso, lo que facilita la transición hacia la etapa adulta. Tienen un cerebro desarrollado, especialmente en el neocórtex, lo que les da una buena memoria, capacidad de aprender y resolver problemas (Hickman *et al.*, 2001). Se les puede encontrar en casi cualquier hábitat, habiendo mamíferos terrestres, marinos, y dulceacuícolas. Este es el grupo más estudiado debido al parentesco con los humanos (*Homo sapiens*) y a que diversas especies de mamíferos nos sirven de alimento, ropa, como bestias de carga y mascotas.

2.1.1 Mamíferos marinos

Aunque todos los mamíferos que dependen del ecosistema marino se denominan mamíferos marinos, este es un grupo taxonómico artificial, ya que está compuesto por representantes de distintos órdenes de mamíferos. Incluye tres órdenes existentes, Cetacea (delfines, marsopas y ballenas), Sirenia (manatíes y dugongos) y Carnivora (pinnípedos, nutrias y oso polar). Diversos reportes indican que distintos grupos de mamíferos regresaron al mar en momentos y eventos aislados, dando lugar a orígenes evolutivos separados (Irwin y Árnason, 1994; Uhen, 2007).

Los mamíferos marinos han estado expuestos a presiones selectivas diferentes a las experimentadas por los mamíferos terrestres y esto ha moldeado su fisiología de una manera particular. Los mamíferos marinos deben bucear para alimentarse, presentan adaptaciones para maximizar el almacenamiento y administración de oxígeno (Burns *et al.*, 2007), regular la disipación del calor al agua (Favilla *et al.*, 2022), y tolerar las consecuencias de la respuesta al

buceo, incluyendo eventos de I/R (Allen y Vázquez-Medina, 2019). Al haber un evento de isquemia se activan vías celulares que inician señales proinflamatorias y promueven la oxidación, lo que puede llevar a disfunción y muerte celular (Grace, 1994). La reperfusión consiguiente reestablece el flujo sanguíneo, pero puede llevar metabolitos tóxicos al flujo sanguíneo (Haimovici, 1979) y células inflamatorias a la pared vascular, así como aumentar la producción de moléculas oxidantes; todo ello puede llevar a la muerte celular e inducir daño en tejidos (Parks y Granger, 1986).

Los mamíferos marinos, en comparación con los terrestres, tienen mayor volumen de sangre, concentración de hematocrito, hemoglobina y mioglobina (Lenfant *et al.*, 1970; Kooyman y Ponganis, 1998; Dolar *et al.*, 1999; Castellini *et al.*, 2006), lo que les permite almacenar y conservar el oxígeno de manera eficiente. Estos valores son mayores entre los mamíferos marinos con mayor capacidad de buceo que en los que bucean a menor profundidad (Ridgway y Gordon, 1966; Dolar *et al.*, 1999; Noren y Williams, 2000). Además, cetáceos con menor capacidad de buceo (ej. Phocoenidae, Delphinidae) poseen una mayor masa y volumen pulmonar que mamíferos terrestres de tamaño similar y que cetáceos con capacidad de buceo profundo (ej. *Kogia* spp) (Piscitelli *et al.*, 2010). Las respuestas fisiológicas como bradicardia, vasoconstricción periférica y tolerancia hipoxémica contribuyen a la capacidad de buceo de los mamíferos marinos (Ponganis, 2019). Algunas especies de mamíferos marinos son capaces de bucear hasta 2,000 m de profundidad (~200 atm) y tolerar cambios súbitos en la presión hidrostática (Castellini *et al.*, 2002).

La evidencia sugiere que los mamíferos marinos poseen un sistema de defensa antioxidante más robusto (Zenteno-Savín *et al.*, 2002, 2012; Vázquez-Medina *et al.*, 2007) en comparación con los mamíferos terrestres. Se ha especulado que el estrés oxidativo generado por el buceo sea la causa de una regulación de genes antioxidantes, generando un efecto de precondicionamiento (Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018), quizá incluso como una estrategia antiinflamatoria. Adicionalmente, en la sangre de focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) expuesta a LPS, la respuesta de citocinas (proteínas de respuesta inmune) fue menor

en comparación con la sangre humana en las mismas condiciones; se ha propuesto que este resultado puede explicarse por la existencia de un factor derivado del suero en esta especie (Bagchi *et al.*, 2018).

2.1.2 Tursión

El delfín nariz de botella o tursión (*T. truncatus*) es un mamífero marino perteneciente al orden de los cetáceos que habita en aguas templadas y cálidas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico, así como en los mares Mediterráneo, Negro y Rojo (Mitchell, 1975). Este delfín es polimórfico, de distribución cosmopolita y con hábitos de buceo superficial. Las variaciones en tamaño, coloración y características craneales relacionadas con sus hábitos alimenticios han propiciado la identificación de al menos 20 especies nominales dentro del género *Tursiops* (Hershkovitz, 1966); sin embargo, sólo se han reconocido 3 especies (*T. truncatus*, *T. australis* y *T. aduncus*). Se han detectado diferencias genéticas significativas entre las poblaciones en los distintos océanos (Dowling y Brown, 1993; Curry y Smith, 1997; Natoli *et al.*, 2004). En especies de la familia Delphinidae (a la cual pertenece el género *Tursiops*) se determinaron cuatro cambios adaptativos en aminoácidos en el TLR4 (Shen *et al.*, 2012). La familia Delphinidae, siendo la que contiene mayor número de especies entre los cetáceos (Rice, 1998), se ha diversificado y habita distintos tipos de hábitats, incluyendo aguas oceánicas, costeras y dulceacuícolas, lo que puede explicar una evolución adaptativa en el TLR4, un gen esencial para la respuesta inmune innata.

Se ha descrito a *T. truncatus* como un depredador generalista que se alimenta principalmente de peces pelágicos y calamares (Walker *et al.*, 1999; Díaz López, 2009), aunque la composición de su dieta varía dependiendo del sexo (Hernandez-Milian *et al.*, 2015), con una mayor variedad de presas en los machos. El tursión puede ser presa de depredadores carnívoros, como los tiburones y orcas (*Orcinus orca*), aunque es posible ver a tiburones y delfines en tolerancia mutua. Cerca de la mitad de los tursiones muestran evidencias de mordeduras de tiburón; estas observaciones son más comunes en aguas australianas (Corkeron *et al.*, 1987). Se

han descrito de manera anecdótica ataques defensivos de los delfines contra tiburones, lo cual concuerda con la alta tasa de supervivencia de delfines con cicatrices ocasionadas por mordidas de tiburón, y reportes de ausencia de infección en heridas abiertas en el tursión (Zasloff, 2011). Sin embargo, se desconocen los mecanismos con los cuales el tursión se recupera de estas heridas. El tursión es el mamífero marino más estudiado respecto a la hematología, con estudios desde 1964 (Medway y Geraci, 1964; Hall *et al.*, 2007; Stacy y Nollens, 2020).

2.2 Reconocimiento de un patógeno: respuesta inmune

Los daños ocasionados por las infecciones microbianas están acompañados de una evolución en los mecanismos de defensa. El sistema inmune proporciona protección contra agentes infecciosos como bacterias, virus, parásitos y otros microorganismos, y actúa como un mecanismo de defensa contra cualquier tipo de daño y macromoléculas aberrantes (Abbas *et al.*, 2012). En los mamíferos, el sistema inmune se compone de una red compleja de tejidos, células y moléculas que combaten las infecciones. Aunque el sistema inmune se ha estudiado extensamente sólo en un número limitado de especies de mamíferos (roedores, humanos), se han reportado pocas diferencias entre los sistemas inmunes de mamíferos terrestres y marinos. Tradicionalmente, el sistema inmune se ha separado en dos sistemas funcionales e interconectados; la inmunidad innata o no específica y la inmunidad adaptativa o específica (Desforges *et al.*, 2016). Las respuestas del sistema inmune se basan en la capacidad de reconocer estructuras moleculares únicas en los microorganismos (Janeway, 1989) llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Los PMAP bacterianos son comúnmente componentes de la pared bacteriana, como LPS, peptidoglicanos y el ácido lipoteicoico; la detección de cualquiera de éstos por el sistema inmune indica la presencia de bacterias. Estos PMAP estimulan las respuestas del sistema inmune a través del reconocimiento de patrones codificados en líneas germinales (óvulo, espermatozoide) (Mosaheb *et al.*, 2017).

Existen diversos receptores de reconocimiento de estas estructuras, siendo los TLR los mejor caracterizados. Se han identificado 13 TLR en mamíferos, que son conservados, ampliamente

expresados y pertenecen a las proteínas transmembranales tipo I (Tang *et al.*, 2007). Estos receptores transmembranales reconocen ácidos nucleicos virales y distintos componentes de estructuras bacterianas, como LPS y el ácido lipoteicoico (Akira *et al.*, 2006). Estos TLR están comúnmente expresados en células presentadoras de antígenos (CPA), como las células dendríticas (CD), linfocitos B y macrófagos (Akira *et al.*, 2001; Medzhitov, 2001). Los TLR activan a los macrófagos residentes en tejidos que producen citocinas proinflamatorias, proteínas y péptidos antimicrobianos (Medzhitov, 2007), esta activación puede ser a través de la vía clásica, en la cual un producto microbiano (ej. LPS) puede ser reconocido por receptores (ej. TLR4). Tras la estimulación con LPS, TLR4 puede activar dos vías clásicas de señalización, el factor MyD88 de manera dependiente e independiente (Jia *et al.*, 2014). El LPS induce la formación de un complejo de señalización entre el MyD88 y la fosfatidilinositol 3-cinasa, la cual activa la liberación de citocinas proinflamatorias y estimula la traslocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Calippe *et al.*, 2008).

El NF- κ B es un factor de transcripción dimérico inducible, compuesto por cinco genes con homología en el dominio Rel a nivel proteico, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel y RelB (Karin y Ben-neriah, 2000), que puede expresarse como homodímero y/o heterodímero (Siebenlist *et al.*, 2005). Este factor de transcripción se mantiene inactivo por su interacción con el inhibidor kappa β ($I\kappa\beta$), un grupo de proteínas reguladoras que se unen a NF- κ B en el citosol, impidiendo su traslocación al núcleo (Karin y Ben-neriah, 2000; Gamble *et al.*, 2012). La degradación de este inhibidor puede ser inducida en minutos por TNF- α , IL-1 y LPS (Karin y Ben-neriah, 2000). En ratones knock-out $I\kappa B\alpha$, se observó una mayor presencia de NF- κ B en los recién nacidos, todos los cuales murieron en menos de 10 días, mostrando anomalías fenotípicas (ej. un mayor número de granulocitos, y menor tamaño y peso) (Beg *et al.*, 1995).

Adicionalmente, eventos de hipoxia e inflamación ocurren frecuentemente durante infecciones y/o eventos de I/R, en los que el factor inducible por hipoxia (HIF) interactúa con NF- κ B para coordinar una respuesta, incluyendo la regulación de *HMOX1* (Lee *et al.*, 1997). Esta regulación

se debe a que HIF-1 α es activado por un bajo nivel de oxígeno, ERO y/o factores proinflamatorios (Maxwell *et al.*, 1999; Semenza, 2002).

2.2.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata funciona como la primera línea de defensa del organismo contra patógenos; en ella participan diversos componentes celulares, como los granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), mastocitos, monocitos, macrófagos, CD y células asesinas naturales (Dranoff, 2004). Estas células responden a diversos estímulos, como infecciones por patógenos y daño tisular, los cuales estimulan respuestas inflamatorias (Medzhitov, 2007). Aquí, se abordan los tipos celulares que participan en la respuesta clásica contra patógenos en mamíferos.

Los monocitos se caracterizan por identificar patógenos y “señales de peligro” vía reconocimiento de patrones, que al ser reclutados a tejidos pueden diferenciarse en macrófagos y CD (Chiu y Bharat, 2016). Existen dos tipos de activación de macrófagos; el primero, denominado M1 o activación ‘clásica’, se activa en respuesta a patógenos extra- e intracelulares dando lugar al fenotipo proinflamatorio. Los macrófagos M1 pueden fagocitar patógenos y toxinas, así como secretar citocinas para reclutar otras células inmunes y presentar antígenos vía MHC clase II (Chiu y Bharat, 2016). El segundo tipo de activación es la M2 o ‘alternativa’, es más variada en su fenotipo, ya que puede responder a alergias e infecciones parasitarias liberando histamina; los macrófagos M2 participan en la resolución de la inflamación, fibrosis y en la sanación de tejido (Wynn *et al.*, 2013). Lo anterior, en conjunto, demuestra la notable plasticidad de los macrófagos.

Los neutrófilos son generalmente el leucocito más abundante en la circulación sanguínea y tienen un papel clave en la regeneración del tejido dañado, matando a los microorganismos patógenos y atrayendo monocitos y/o macrófagos al área infectada o dañada (Nathan, 2006). Los neutrófilos pueden activarse debido a estímulos externos, como la endotoxina bacteriana

LPS, e internos, como las citocinas inflamatorias (descrito más adelante). Éstos pueden generar señales quimiotácticas e influenciar la diferenciación entre los macrófagos M1/M2 (Horckmans et al., 2017). Aunque en pacientes con enfermedad cardíaca un alto nivel en el conteo de neutrófilos es considerado un predictor adverso y/o fatal (Chia et al., 2009; Guasti et al., 2011), en casos de inflamación aguda, la presencia de neutrófilos es de vital importancia para la resolución de la inflamación (Ortega-Gómez et al., 2013).

Los efectos antimicrobianos de los neutrófilos incluyen la secreción de gránulos microbicidas (gránulos azurofílicos, específicos y terciarios), la activación de una cascada de destrucción en la membrana plasmática liberando su citosol con grandes cantidades de calprotectina (Nathan, 2006), la liberación de fosfolipasas (Wright et al., 1990) y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (Brinkmann et al., 2004), las cuales degradan factores de virulencia y se unen para matar al patógeno en un microambiente contenido (NETosis) (Brinkmann et al., 2004).

Los eosinófilos son granulocitos que se presentan en reacciones de alergia, infección por helmintos y trastornos poco frecuentes (Stone et al., 2010). Pueden sintetizar y liberar diversos tipos de sustancias, como los leucotrienos y una proteína catiónica (una proteína bactericida, helmintotóxica y antiviral) (Motojima et al., 1989), que en altas concentraciones pueden contribuir al daño tisular y la patogénesis de enfermedades alérgicas (Gleich, 1990; Venge y Byström, 1998). Se han reportado efectos neurotóxicos en el síndrome hipereosinofílico, con una mayor concentración de Ca^{2+} citosólico, iniciado por la unión de la proteína catiónica a la membrana celular, seguida del proceso apoptótico al activar las caspasas 3, 8 y 9 (Mattson et al., 2000; Navarro et al., 2010). Adicionalmente, los eosinófilos pueden contribuir en el proceso inflamatorio al expresar citocinas inflamatorias como la IL-1, IL-6, TNF- α (descritas más adelante), IL-8 y el factor estimulante de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF) (Czech et al., 1993; Horie y Kita, 1994).

Los linfocitos pueden participar en la inmunidad innata y la adaptativa, y éstos se dividen en células NK, linfocitos B y T. Las células NK son linfocitos citotóxicos granulares grandes que participan en la respuesta inmune al eliminar las células no deseadas, como aquellas infectadas por virus o células tumorales (Bonavida, 2014). Aunque las células NK participan en las primeras etapas de la infección viral (activadas en respuesta a los interferones tipo I), desempeñan un papel de enlace regulador entre la inmunidad innata y adaptativa produciendo citocinas y quimiocinas (Cooper *et al.*, 2000; Vivier *et al.*, 2008). Los linfocitos B y T son células producidas a partir de células madre de la médula ósea y modulan la respuesta inmune al reconocer epítomos específicos de antígenos; sin embargo, se diferencian en que los linfocitos B producen anticuerpos en presencia de antígenos, mientras que los linfocitos T están involucrados en la respuesta inmune celular, desarrollando respuestas inmunes ante bacterias, virus, parásitos e implantes quirúrgicos (Fabbri *et al.*, 2003; Cano y Lopera, 2013).

2.2.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta inmune celular innata en la cual se reclutan leucocitos y proteínas plasmáticas de la sangre a los tejidos, donde se acumulan y activan. Esta respuesta puede iniciarse por el daño celular, así como por estímulos o moléculas señalizadoras, y busca restaurar la homeostasis mediante la eliminación de patógenos y células dañadas (Abbas *et al.*, 2012). Durante la respuesta inflamatoria, los vasos capilares se dilatan y se vuelven más permeables, llevando más fagocitos al área infectada, aumentando la fagocitosis. Esto puede desencadenar la muerte celular en células sanas vecinas al sitio de infección y causar efectos nocivos en el tejido sano circundante debido a la liberación de sustancias tóxicas (Beattie *et al.*, 2000; Casha *et al.*, 2001). Durante una infección severa o persistente, la respuesta inflamatoria se vuelve excesiva, lo que puede causar disfunción en órganos y desarrollar inmunosupresión debido a apoptosis de los linfocitos (Hotchkiss *et al.*, 2002; Hotchkiss y Karl, 2003).

La muerte celular tiene un papel importante en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos, y se puede dividir en dos clases; la apoptosis y la necrosis. La apoptosis es también conocida

como la muerte celular programada, este proceso iniciado por la activación de caspasas (familia de cisteína-proteasas que participan en la apoptosis y la activación proteolítica de citocinas (Boatright *et al.*, 2003)) y es caracterizado por la condensación y fragmentación nuclear, rompimiento del ADN cromosómico y la formación de cuerpos apoptóticos que son removidos por fagocitos (Edinger y Thompson, 2004). La necrosis (antes pensada como una forma no regulada de muerte celular) incluye diversas modalidades como la piroptosis (muerte celular inducida por la activación del inflamasoma) (Lamkanfi y Dixit, 2014), la necroptosis, mediada por la proteína cinasa que interactúa con el receptor 3 (RIPK3) y su sustrato dominio cinasa de linaje mixto (MLKL), y las trampas extracelulares de neutrófilos o NETosis (Pasparakis y Vandenabeele, 2015). La necroptosis es un desencadenante de la inflamación debido a que libera gran cantidad de patrones moleculares asociados al daño (PMAD) de la célula desintegrada (Kaczmarek *et al.*, 2013).

A nivel celular, la inflamación es mediada mayormente por los neutrófilos y los macrófagos, leucocitos fagocíticos de la respuesta inmune innata que responden a los estímulos generados por una infección o herida (Abbas *et al.*, 2012). Los leucocitos pueden liberar citocinas proinflamatorias como las interleucinas (IL) y factores de necrosis tumoral (TNF); éstos pueden tener un efecto directo en la zona afectada o activar mediadores secundarios de inflamación que actúan sobre células endoteliales, funciones vasculares, procesos de coagulación y mecanismos cardiovasculares (Ryter *et al.*, 2006).

2.2.3 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas solubles o glicoproteínas involucradas en la comunicación entre diferentes tipos de células, y se reclutan a través de la activación de la respuesta inmune. Las citocinas son producidas diferencialmente por leucocitos y participan en la maduración, respuesta, movilidad y función efectora de éstos (Fair *et al.*, 2017). Debido a que las citocinas son críticas en la comunicación celular, la cuantificación de los niveles de estas proteínas puede servir como un indicador funcional del sistema inmune.

La IL-1 es una citocina proinflamatoria que afecta la mayoría de las células y tejidos, participa en la inmunidad innata y adaptativa (Garlanda *et al.*, 2013), está involucrada en enfermedades autoinmunes, infecciosas y degenerativas (Gabay *et al.*, 2010) y puede activar y prolongar el período de vida de macrófagos y neutrófilos (Mantovani *et al.*, 2011). La IL-1 se compone de dos proteínas con pesos moleculares similares (15-20 kDa), IL-1 α e IL-1 β , las cuales son codificadas por distintos genes, y aunque tienen una identidad del 26% en su secuencia aminoacídica (Filella *et al.*, 2002), se unen al mismo receptor IL-1R1. La actividad proinflamatoria de IL-1 puede ser inhibida por el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) ya que IL-1 e IL-1ra tienen estructuras similares en sus sitios de unión, por lo que compiten para unirse a IL-1R1 (Schreuder *et al.*, 1997; Boraschi y Tagliabue, 2013). La IL-1 α se expresa constitutivamente en células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos, pulmonares y astrocitos (Garlanda *et al.*, 2013; Dinarello y van der Meer, 2013), actúa intracelularmente y no es común encontrarla en la circulación sanguínea, exceptuando en casos de enfermedad grave. A diferencia de la IL-1 α , la IL-1 β es expresada por células hematopoyéticas como monocitos/macrófagos, CD y microglía en su forma inactiva, la cual se puede activar por diversos mecanismos, como la escisión por la caspasa-1 en inflamomas (Martinon *et al.*, 2009) y escisiones por medio de proteasas liberadas por neutrófilos (Netea *et al.*, 2015).

Los inflamomas son complejos multiprotéicos involucrados en la activación de caspasas implicadas en la activación de la IL-1; estos complejos incluyen receptores del dominio de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLR por sus siglas en inglés) (Martinon y Tschopp, 2004). Se han descrito diversos inflamomas que activan la caspasa-1, siendo el NLRP3 el más estudiado. Su activación (la cual es un proceso inflamatorio) debe ser cuidadosamente regulada, generalmente en un proceso de dos pasos (Swanson *et al.*, 2019). Primero, se lleva a cabo una regulación transcripcional que puede ser inducida por la presencia de PMAP o PMAD, o por medio de citocinas como IL-1 β y TNF (Franchi *et al.*, 2009). El segundo paso es promover la asociación de los componentes del inflamoma para madurar la IL-1 β (Bryant y Fitzgerald, 2009). La IL-1 β es principalmente producida por macrófagos y CD, aunque también puede ser producida por linfocitos B y NK (Netea *et al.*, 2015).

Otra citocina proinflamatoria ampliamente estudiada es el TNF- α , producido principalmente por macrófagos, fibroblastos y mastocitos en respuesta a diversas enfermedades y condiciones como trauma, sepsis, infección, artritis reumatoide o bronquitis (Bradley, 2008; Popa *et al.*, 2009). Es sintetizado como un monómero precursor con un peso molecular de 26 kDa, el cual con la acción de la metaloproteasa convertidora de TNF- α , es escindido y se libera una proteína soluble de 17 kDa (Caminero *et al.*, 2011). Para poder realizar sus funciones biológicas, los monómeros deben agregarse formando un homotrímero (Caminero *et al.*, 2011). El TNF- α no se encuentra usualmente en individuos sanos y participa en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias incrementando rápidamente su concentración ante un trauma o infección (Bradley, 2008); sin embargo, una terapia sostenida con anti-TNF- α aumenta el riesgo de infección (Bongartz *et al.*, 2006; Winthrop, 2006), lo que implica un delicado balance entre los niveles de TNF- α y su papel en la inflamación. Adicionalmente, se ha demostrado que el TNF- α participa en la inhibición de la eferocitosis (fagocitosis de las células apoptóticas) lo cual es crucial para la resolución de la inflamación (McPhillips *et al.*, 2007).

Por último, la IL-6 es una citocina pleiotrópica con función proinflamatoria (Hirano, 1998, 2014; Wakefield *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 2003; Giannoudis *et al.*, 2008) y antiinflamatoria (Tilg *et al.*, 1994; Hunter y Jones, 2015). La transeñalización (proinflamatoria) ocurre cuando la forma soluble del receptor de IL-6 (sIL-6R) se une a la IL-6 y activa a células que no tienen el receptor para la IL-6, lo que aumenta el espectro de células en que la IL-6 puede actuar (Scheller *et al.*, 2011; Uciechowski y Dempke, 2020). Adicionalmente, el bloqueo de esta señalización en ratones con sepsis incrementa su supervivencia (Barkhausen *et al.*, 2011). En contraste, la señalización antiinflamatoria de IL-6 se encuentra restringida a células que expresan el receptor transmembranal de IL-6 (mIL-6R), como hepatocitos y leucocitos (Rose-John, 2012).

La IL-6 en condiciones de homeostasis se encuentra en la sangre de humanos en bajas concentraciones (1-5 pg mL⁻¹), las cuales pueden aumentar drásticamente durante condiciones inflamatorias, llegando al rango de $\mu\text{g mL}^{-1}$ en casos de sepsis (Waage *et al.*, 1989). La IL-6 contribuye a la defensa contra infecciones y heridas, pero fallas en la regulación de su síntesis

pueden desencadenar enfermedades crónicas, como artritis inducida por colágeno, colitis murina y encefalomiелitis autoinmune experimental (Alonzi *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2000). Aunque la IL-6 se produce principalmente por los macrófagos, también puede ser producida por células T y B, células gliales, neuronas, adipocitos, osteoblastos y otras, incluyendo células tumorales (Akira *et al.*, 1993).

2.3 Hemo oxigenasa como agente antiinflamatorio

Existen diversos mediadores inflamatorios de distinta naturaleza, como las citocinas, las prostaglandinas, las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical superóxido, el óxido nítrico, y el peroxinitrito (producto de la reacción de los últimos dos) (Salvemini *et al.*, 2003). Si bien, entre las respuestas inmunes inducidas por dichas moléculas se encuentran la fiebre y la inflamación para controlar la infección, cuando estos mediadores se producen en exceso o no son controlados, pueden ocasionar enfermedades como sepsis, artritis reumatoide, arterioesclerosis y cáncer (Ames *et al.*, 1993). La hemo oxigenasa (HO; EC 1.14.99.3) es el principal agente antiinflamatorio y es regulado por la activación del factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), NF- κ B y la proteína activadora AP-1 (Kapturczak *et al.*, 2004; Paine *et al.*, 2010).

La HO cataliza el primer paso de la degradación oxidativa del grupo hemo, resultando en la formación de biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro ferroso (Fe^{2+}) como productos. Esta reacción se inicia con la formación del complejo hemo-férrico, que después se reduce a un estado ferroso por un electrón donado por la NADPH-citocromo P450 reductasa (Yoshida y Kikuchi, 1978). A continuación, el oxígeno molecular se une al complejo para sintetizar una forma metaestable oxigenada (Yoshida *et al.*, 1980). El oxígeno unido al hierro se convierte en un hidroperóxido férrico intermedio ($\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$), al recibir otro electrón de la NADPH-citocromo reductasa y un protón del agua distal. Por último, el oxígeno terminal del $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ interactúa con el α -meso-carbono del anillo de porfirina para formar α -meso-hidroxihemo férrico (Davydov *et al.*, 1999).

La reacción de citoprotección catalizada por la HO aparentemente comenzó temprano en la evolución, pues se presenta en bacterias (Frankenberg-Dinkel, 2004), plantas (Terry *et al.*, 2002), insectos (Zhang *et al.*, 2004) y mamíferos (Wilks, 2002). Algunas bacterias patógenas pueden utilizarla para adquirir hierro a partir de la hemoglobina del huésped (Zhu *et al.*, 2000; Ratliff *et al.*, 2001). Dos isoformas funcionales y genéticamente distintas han sido caracterizadas, la isoforma inducible HO-1, presente en la mayoría de los tipos celulares (Muñoz-Sánchez y Chánez-Cárdenas, 2014), y la isoforma constitutiva HO-2, expresada mayormente en cerebro, testículos y células endoteliales de los vasos cerebrales (Maines, 1988; Zakhary *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2006). Una tercera isoforma (HO-3), similar a HO-2 (90%) en su secuencia aminoacídica, ha sido caracterizada en rata, pero muestra una actividad enzimática de 0.4 nmol de bilirrubina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, mientras que la actividad de HO-1 y HO-2 se registra en valores de 107 y 67 nmol de bilirrubina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente (Trakshel *et al.*, 1986; Mccoubrey Jr *et al.*, 1997). En el gen promotor de HO-1 existe una región consenso con el factor de transcripción NF- κ B (Lavrovsky *et al.*, 1994), influyendo en la regulación de los factores de transcripción en eventos de inflamación y estrés oxidativo (Lavrovsky *et al.*, 1994).

Las HO tienen una región transmembranal en el extremo C-terminal (Kikuchi *et al.*, 2005) que les sirve de anclaje al retículo endoplásmico, aunque en condiciones de hipoxia la enzima puede migrar al núcleo (Lin *et al.*, 2007) al perder esta región. La HO-1 tiene una masa molecular de 32-33 kDa (Keyse y Tyrrell, 1989), y su estructura cristalizada reveló que se compone mayormente de hélices alfa y su asociación con el grupo hemo se da entre dos hélices, distal y proximal (Kikuchi *et al.*, 2005). En HO-1 existen regiones altamente conservadas, como los residuos 125-150 que corresponden a la hélice distal, la cual se encuentra justo arriba del grupo hemo y conforma la 'huella digital' de esta enzima (Maines, 1992). En la hélice proximal se encuentra una histidina (His-25), que ha sido identificada como un ligando para el hierro, y que al ser reemplazada por una alanina resulta en la proteína inactiva (Wilks *et al.*, 1995).

La reacción de HO es controlada principalmente de manera estérica, debido a que su regioselectividad es determinada por la interacción de los residuos básicos que se encuentran cerca de los propionatos del grupo hemo (Kikuchi *et al.*, 2005). En la HO-1 de rata, una mutación de Arg-183 por Glu-183 llevó a la formación de δ -isómeros de biliverdina IX, ocasionada por la rotación del grupo hemo (Zhou *et al.*, 2000). De manera similar, en la HO de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha determinado que el grupo hemo tiene una rotación de $\sim 100^\circ$, y produce una mezcla de β - y δ -isómeros de biliverdina IX (Ratliff *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2004). La sustitución de Lys-132 con Ala en la HO de *P. aeruginosa*, induce la producción de α -biliverdina (Fujii *et al.*, 2004).

La HO-1 es regulada por varios estímulos, incluyendo mediadores de inflamación y factores asociados al estrés oxidativo (Maines y Panahian, 2001), por lo que se le considera dinámica, y contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular, a reducir el daño oxidativo a tejidos y a atenuar la respuesta inflamatoria (Abraham y Kappas, 2008; Paine *et al.*, 2010). La expresión de HO-1 es regulada principalmente a nivel de transcripción (Choi y Alam, 1996) y se ha determinado la presencia de diversas secuencias de unión en la región promotora para AP-1, AP-2, NF- κ B, factor de choque térmico (HSF), y Nrf2 (Lavrovsky *et al.*, 1994; Inamdar *et al.*, 1996).

La función citoprotectora de HO se debe a la degradación del grupo hemo, un potencial prooxidante, y a la liberación de biliverdina (BV) que puede ser transformada en bilirrubina, un pigmento antioxidante y antiinflamatorio (Stocker, 2004; Kapitulnik y Maines, 2009), CO (descrito más adelante) y hierro (al sintetizarse ferritina, una proteína citoprotectora) (Vile *et al.*, 1994). La expresión inducida de HO-1 disminuye la presión sanguínea en modelos de hipertensión en ratas (Jadhav *et al.*, 2008) y tiene efectos protectores contra la arterioesclerosis (Wang *et al.*, 1998), hiperplasia neointima (Nakao *et al.*, 2005) y lesión por I/R cardíaca (Fondevila *et al.*, 2004). En una línea celular de macrófagos de *M. musculus* (RAW264.7) que sobre expresa HO-1, la inducción con 1 ng LPS mL^{-1} disminuye los niveles de TNF- α en comparación con las células bajo condiciones control (sin LPS) (Choi *et al.*, 2000), indicando su

acción antiinflamatoria. Adicionalmente, la deficiencia de HO-1 está relacionada con diversos padecimientos como la anemia y coagulación anormal (Kawashima *et al.*, 2002), trombosis acelerada (True *et al.*, 2007) y aumento en la letalidad por sepsis (Chung *et al.*, 2008). Sin embargo, no existe información sobre la participación de la HO-1 en los mecanismos antiinflamatorios en mamíferos marinos como el tursi3n.

2.3.1 Mecanismos antiinflamatorios del mon3xido de carbono

El CO es una mol3cula diat3mica relativamente estable en sistemas biol3gicos sin electrones no apareados, que puede ligarse a hemoprote3nas y metaloenzimas (Coburn y Forman, 1987; Maines, 1997). Se han propuesto efectos antiinflamatorios a partir de reportes en los que, usando CO derivado de HO-1 y CO ex3geno en cultivos celulares y en modelos animales, se observa supresi3n de la producci3n de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y reducci3n de la mortalidad en ratones con sepsis (Otterbein y Choi, 2000; Morse *et al.*, 2003). Aunque el CO puede ser considerado t3xico debido a que tiene m3s afinidad por la hemoglobina que el ox3geno, disminuyendo as3 el transporte de ox3geno a los tejidos (Hall *et al.*, 2007), tambi3n es generado de manera end3gena en bajas concentraciones, a las cuales participa en funciones de neurotransmisi3n (Mustafa *et al.*, 2009) y de protecci3n de tejidos (Kevin y Laffey, 2008).

El CO es una mol3cula de se3alizacion que ejerce un amplio espectro de funciones biol3gicas en neuronas (Ingi *et al.*, 1996), m3sculo liso (Duckers *et al.*, 2001), plaquetas (Br3ne y Ullrich, 1987), monocitos/macr3fagos (Choi *et al.*, 2000), y c3lulas endoteliales (Brouard *et al.*, 2000). En macr3fagos, el CO es capaz de inhibir la reacci3n proinflamatoria inducida por LPS al atenuar la producci3n de ERO dependiente de la NADPH oxidasa, inhibiendo as3 la se3alizacion de TLR (Nakahira *et al.*, 2006).

El CO puede modular la activaci3n de varias v3as de transducci3n de se3ales, incluida la guanilato ciclasa, guanosina monofosfato c3clico (Morita *et al.*, 1995) y prote3na cinasa activada

por mitógeno p38 (MAPK) (Otterbein *et al.*, 2000), y regula la expresión de moléculas vasoconstrictoras, proinflamatorias y procoagulantes en estas células. Potencialmente, esta gama de acción explica la capacidad del CO de promover la vasodilatación (Sammur *et al.*, 1998), inhibir la inflamación (Otterbein *et al.*, 2000) y suprimir la apoptosis (Petrache *et al.*, 2000). El CO también afecta la expresión de GM-CSF, y la expresión de este factor se eleva en enfermedades inflamatorias crónicas como el asma y sarcoidosis, y promueve la secreción de citocinas y mediadores inflamatorios (Reed y Whitsett, 1998).

Los mamíferos marinos poseen una mayor concentración de carboxihemoglobina (COHb; hemoglobina unida al monóxido de carbono) que los mamíferos terrestres (Tift *et al.*, 2014) y se ha hipotetizado que las altas concentraciones de hemoproteínas, así como la limitante para expulsar CO vía respiración debido a la apnea, son la fuente de los altos niveles de CO en sangre en mamíferos marinos con capacidad de buceo profundo, como el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) (Tift y Ponganis, 2019). En el músculo del elefante marino el nivel de CO aumenta con la edad y su capacidad de buceo (Piotrowski *et al.*, 2021) lo que puede prevenir el daño tisular al suprimir la inflamación (Tift *et al.*, 2020).

2.4 Inmunología y salud de mamíferos marinos

Muchas especies de mamíferos marinos (ej. orcas, cachalotes, algunos pinnípedos) se encuentran en los eslabones superiores de la red trófica marina, tienen largos ciclos de vida y permanecen por períodos prolongados en la zona costera. Los estudios de salud de estas especies pueden servir como indicadores de cambios en los ecosistemas marinos (Aguirre y Tabor, 2004). Existen diversos tipos de estresores (ambientales y antropogénicos) a los que los animales marinos están expuestos, como la exposición a patógenos o contaminantes (Fair y Becker, 2000). Para contribuir a la conservación de los organismos marinos, es necesario conocer los mecanismos de respuesta con que enfrentan perturbaciones ambientales e infecciones por diversos patógenos. El sistema inmune de diversas especies de mamíferos marinos ha sido descrito (Beineke *et al.*, 2010) sugiriendo gran similitud con los mamíferos

terrestres; sin embargo, los estudios que evalúen la respuesta inmune ante patógenos son escasos.

2.4.1 Respuesta inmune de delfines

En dos especies de delfín, el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y el tursión (*T. truncatus*), se reportó un número bajo de linfocitos B en los nódulos linfáticos con hipoplasia al compararlos con nódulos linfáticos normales (Centelleghé *et al.*, 2019). Esto posiblemente fue ocasionado por una infección por morbillivirus, que se ha reportado que suprime la respuesta inmune (Bossart *et al.*, 2011; Duignan *et al.*, 2014; Centelleghé *et al.*, 2019). Diversas respuestas inmunes fueron descritas en *T. truncatus* silvestres con señales de infección por Chlamydiaceae, con un aumento en la concentración de fibrinógeno y amilasa en suero, y una concentración más alta de neutrófilos, linfocitos y basófilos al compararlos con muestras de delfines no infectados (Bossart *et al.*, 2014).

De manera similar, el número de neutrófilos en tursiones silvestres con lobomycosis (infección cutánea crónica) fue mayor, mientras que el número de glóbulos rojos y las concentraciones de hemoglobina y hierro fueron menores que en los tursiones aparentemente sanos y sin señales de la infección (Reif *et al.*, 2009). Se encontró también un decremento en la cantidad de los linfocitos T CD4+, y linfocitos B CD19+ y CD21+, lo que sugiere una disfunción en la respuesta inmune adaptativa (Reif *et al.*, 2009). Estos hallazgos concuerdan con reportes de un número reducido de células T circulantes en humanos con lobomycosis (Pecher y Fuchs, 1988). En sangre periférica estimulada con fitohemaglutinina (lectina utilizada como mitógeno) se reportó un incremento en la expresión de IL-6 e IL-12p40 en tursiones de mayor edad (30-40 años) con enfermedad crónica dental al compararlos con tursiones jóvenes (~11 años) (Hofstetter *et al.*, 2017).

El TNF- α tiene un papel fundamental en la inducción del estallido respiratorio y, en consecuencia, en la función microbicida de los neutrófilos de delfines, al igual que en los

neutrófilos humanos (Itou *et al.*, 2002). Las ERO producidas como resultado de la fagocitosis y del estallido respiratorio pueden matar a los patógenos microbianos e incluso actuar como moléculas de señalización en los leucocitos polimorfonucleares (Fialkow *et al.*, 2007). Esta señalización puede modular la fagocitosis al regular la actividad de la tirosina cinasa, la cual regula el receptor de la fracción cristalizable Fc γ R1a, responsable de la fagocitosis de patógenos (Greenberg *et al.*, 1994). Las ERO también pueden regular la expresión génica por medio de la inducción del factor de transcripción NF- κ B (Schreck y Baeuerle, 1991) y la apoptosis (Melley *et al.*, 2005). En leucocitos de tursión inducidos con *Staphylococcus aureus* se midió la fagocitosis y la explosión respiratoria, siendo mayor en leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que en monocitos (Keogh *et al.*, 2011).

Existen dificultades para llevar a cabo un adecuado monitoreo de la salud de animales silvestres en todos los medios (McAloose y Newton, 2009) y, particularmente, el medio marino presenta retos particulares por su tamaño (71% de la superficie terrestre) y profundidad de hasta ~11 km (con el 72% de su volumen total debajo de los 1,000 m de profundidad) (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2014). Aunque algunos grupos de mamíferos marinos pueden realizar actividades en tierra (ej. pinnípedos), los cetáceos son estrictamente acuáticos. Si bien algunos factores poblacionales se consideran como señal del estado de salud, éstos son a nivel de grupo. Los veterinarios consideran un punto de vista individual y clínico; para ello, se utilizan herramientas de diagnóstico, como la hematología, bioquímica, examen de heces, entre otras (Reidarson, 2008). Debido a que las citocinas son proteínas secretadas por células inmunes en respuesta a diversos estresores, en delfines, el monitoreo de citocinas en sangre periférica puede proveer de información respecto a respuestas inflamatorias, con técnicas como la PCR cuantitativa (qPCR) para determinar los niveles basales de citocinas en estos organismos (Hofstetter *et al.*, 2017).

Se han reportado en cetáceos incidencias de sanado y/o tolerancia a diversos tipos de heridas (Angliss y DeMaster, 1998). Por ejemplo, se han documentado en la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) heridas causadas por redes de pesca y daño en el rostrum al alimentarse del bentos (Forney *et al.*, 2008), curación en los sitios de biopsias de piel de *T.*

truncatus (Bruce-Allen y Geraci, 1985) sin evidencia de infección o inflamación crónica en el sitio de la toma de biopsia, al igual que en la ballena piloto (*Globicephala melas*) (Giménez *et al.*, 2011), y aparente ausencia de infección en heridas abiertas en tursiones (Zasloff, 2011). Ello sugiere que existe una respuesta adaptativa al daño tisular e infecciones asociadas en cetáceos y, debido a que aparentemente su sistema inmune es similar al de mamíferos terrestres (Mancia *et al.*, 2007), la explicación de este fenómeno requiere estudiar con mayor detalle en qué manera los leucocitos de *T. truncatus* hacen frente a una infección.

3. JUSTIFICACIÓN

Las adaptaciones fisiológicas de los tursiones y otros cetáceos se deben a su transición a un estilo de vida acuático, por ejemplo, el tener un sistema antioxidante robusto, les permite tolerar condiciones inflamatorias originadas por el buceo. Por ello, es posible que posean una mayor respuesta antiinflamatoria que en mamíferos terrestres, mitigando la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, lo cual puede suceder a nivel transcrito con la sobreexpresión y/o una mayor actividad enzimática de HO-1. A la fecha, no hay información acerca de la participación de esta proteína en los procesos inflamatorios, ni se ha registrado una caracterización del gen de HO-1 o su secuencia aminoacídica en tursiones. Por ello, la investigación de esta enzima, clave en la respuesta inflamatoria, en conjunto con las citocinas proinflamatorias es necesaria. Los resultados de estos estudios podrían sugerir vías de acción para minimizar procesos inflamatorios y acelerar su resolución en mamíferos marinos y terrestres, incluyendo humanos.

4. HIPÓTESIS

En leucocitos del tursión *Tursiops truncatus*, en comparación con leucocitos de humanos, la expresión y/o actividad de hemo oxigenasa 1 (HO-1) es mayor cuando se exponen a retos proinflamatorios, manteniendo en estados basales los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de hemo oxigenasa 1 (HO-1) y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), así como la actividad de HO-1 y los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6 en respuesta a retos proinflamatorios en leucocitos de tursiones en comparación con leucocitos de humanos.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar y comparar la estructura secundaria y terciaria de hemo oxigenasa 1 (HO-1) de mamíferos marinos y terrestres por métodos bioinformáticos.
- 2) Calcular la concentración letal media por exposición a lipopolisacáridos en leucocitos de tursiones y humanos.
- 3) Cuantificar la expresión de HO-1, IL-1 β , TNF- α e IL-6 en leucocitos de tursiones y humanos en condiciones basales y después de estimularlos con lipopolisacáridos.
- 4) Determinar la actividad de HO-1 y los niveles IL-1 β , TNF- α e IL-6 en leucocitos de tursiones y humanos en condiciones basales y después de estimularlos con lipopolisacáridos.
- 5) Comparar los resultados entre especies y entre tratamientos (condiciones control y estimulación con lipopolisacáridos).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Caracterización del gen hemo oxigenasa-1 y sus elementos reguladores

La secuencia de HO-1 correspondiente a la región promotora del tursión se obtuvo de las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de Ensemble para los límites de exón/intrón (número de acceso ENSTTRG00000007342.1). Se utilizó el programa Motivos de Expresión Múltiple para Elicitación de Motivos (MEME) suite 5.1.1 (Bailey y Elkan, 1995) para buscar motivos representados como matrices de probabilidad de letras dependientes de la posición. Además, los elementos reguladores del gen HO-1 de humano previamente identificados (Lavrovsky *et al.*, 1994) se buscaron en la base de datos JASPAR y se analizaron con Motif Alignment and Search Tool (MAST) (Bailey y Gribskov, 1998) para determinar los sitios de unión de los factores de transcripción en la región promotora de *HMOX1* del tursión. Para determinar la mejor puntuación, MAST determina la mejor coincidencia en la secuencia para cada motivo y éstas se combinan en una puntuación para la coincidencia total entre el conjunto de motivos completos y la secuencia, lo que da como resultado un valor E para cada secuencia. Además, se da un valor p de posición, que se define como la probabilidad de que una subsecuencia aleatoria de la misma longitud contenga alguna coincidencia con la misma puntuación o mejor, y sólo se da una ocurrencia de motivo cuando el valor p es menor que 0.0001. Además, se realizó una búsqueda para elementos candidatos cis-reguladores (cCREs por sus siglas en inglés) de HO-1 en el portal ENCODE utilizando el montaje del genoma humano GRCh38 para verificar si los motivos tienen sitios de unión a los factores de transcripción encontrados en este estudio.

6.2 Predicción de la estructura secundaria y terciaria de hemo oxigenasa-1

La predicción de la estructura secundaria y terciaria de HO-1 de *T. truncatus* se realizó a partir de una secuencia depositada en la plataforma en línea de NCBI (número de acceso GenBank XP_004315933.1) y se analizó con herramientas bioinformáticas. La predicción de estructuras

secundarias fue realizada con la interfase STRIDE (Heinig y Frishman, 2004). La plataforma en línea “Phyre2” (Kelley *et al.*, 2015) en el sitio web <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> fue utilizada para modelar la estructura de las proteínas, mientras que el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>) fue utilizado para modelar las interacciones entre el sitio activo y los sustratos o productos. Para la modelación se utilizó la estructura cristalográfica de HO-1 en complejo con el grupo hemo de *H. sapiens*, número de Protein Data Bank (PDB) 1N45 (Schuller *et al.*, 1999).

El nivel de alineamiento fue calculado con la desviación de la media cuadrática (RMSD por sus siglas en inglés) que es la distancia media cuadrática mínima entre las estructuras básicas de las proteínas superpuestas. El RMSD se utilizó para evaluar numéricamente las diferencias observadas entre las estructuras tridimensionales de las proteínas. El nivel de alineamiento indicado por el RMSD se interpreta de la siguiente manera; <0.3 como buen alineamiento, 0.3–0.8 alineamiento moderado, 0.8-1.0 alineamiento pobre y >1.0 alineamiento muy pobre. Adicionalmente, se realizaron los alineamientos de la estructura terciaria de HO-1 de vertebrados con diferentes adaptaciones fisiológicas (sensible a la hipoxia, tolerante a la hipoxia, adaptado a gran altitud, adaptado al frío, con capacidad de buceo). Las especies seleccionadas para este estudio fueron la rata (*Rattus rattus*), el pez fúndulo (*Fundulus heteroclitus*), la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*), el cachalote (*Physeter catodon*), el tursión (*T. truncatus*), el lobo marino de California (*Zalophus californianus*), el ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus bairdii*) y la rana común (*Rana temporaria*). Todas las estructuras fueron alineadas con la HO-1 de humano.

6.3 Alineamiento múltiple de secuencias

Para el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de HO-1 de diversos eucariotas se utilizó el algoritmo CLUSTALW2 (Thompson *et al.*, 1994), se eliminaron las posiciones con <95% de cobertura y se construyó un mapa de calor. Adicionalmente, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de HO-1 de cetáceos y primates utilizando CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las especies utilizadas para la alineación

fueron tursi3n (*T. truncatus*), rorcual (*Balaenoptera acutorostrata scammoni*), orca (*Orcinus orca*), marsopa (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*), beluga (*Delphinapterus leucas*), cachalote (*Physeter catodon*), humano (*H. sapiens*), gorila (*Gorilla gorilla gorilla*), bonobo (*Pan paniscus*), gib3n plateado (*Hylobates moloch*), colobo rojo de Uganda (*Ptilocolobus tephrosceles*), babuino (*Papio anubis*) y macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*). Todas estas secuencias aminoac3dicas est3n depositadas en NCBI y anotadas como HO-1 (Tabla 1). Los resultados se reportan como porcentajes de identidad, con base en los amino3cidos iguales entre secuencias.

Tabla 1. Secuencias de hemo oxigenasa 1 incluidas en los an3lisis de alineamiento m3ltiple y filogen3tico.

Nombre cient3fico	No. acceso GenBank
<i>Tursiops truncatus</i> *	XP_004315933.1
<i>Orcinus orca</i> *	XP_004286250.1
<i>Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis</i> *	XP_024599272.1
<i>Delphinapterus leucas</i> *	XP_022455673.1
<i>Balaenoptera acutorostrata scammony</i> *	XP_007165768.1
<i>Physeter catodon</i> *	XP_007101964.2
<i>Homo sapiens</i> *	NP_002124.1
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> *	XP_030861390.1
<i>Pan paniscu</i> *	XP_003821555.1
<i>Hylobates moloch</i> *	XP_032003242.1
<i>Ptilocolobus tephrosceles</i> *	XP_023077866.1
<i>Papio anubis</i> *	XP_021777178.1
<i>Macaca fascicularis</i> *	NP_001271612.1
<i>Mus musculus</i>	NP_034572.1
<i>Zalophus californianus</i>	XP_027451406.1
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_026355496.1
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	XP_004416157.2
<i>Callorhinus ursinus</i>	XP_025737813.1
<i>Phoca vitulina</i>	XP_032272596.1
<i>Vulpes vulpes</i>	XP_025866739.1
<i>Trichechus manatus latirostris</i>	XP_004373867.1
<i>Loxodonta africana</i>	XP_023415740.1
<i>Sus scrofa</i>	NP_001004027.1
<i>Phascolarctos cinereus</i>	XP_020838126.1

El asterisco indica las secuencias utilizadas para el alineamiento m3ltiple.

6.4 Detección de selección positiva/negativa

Para determinar las presiones selectivas y cuantificar el impacto de la selección natural en la evolución molecular de HO-1 de cetáceos y primates, se calcularon las relaciones de sustitución no sinónimas y sinónimas ($\omega = dN / dS$) utilizando SWAAP 1.0.2 (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SwaapPage.htm>) y un método de ventana deslizante (tamaño de ventana = 90, tamaño de paso = 9). Si $\omega = 1$, las sustituciones de aminoácidos pueden ser en gran medida neutrales; una $\omega > 1$ es evidencia de selección positiva, y $\omega < 1$ es consistente con selección negativa (purificadora). Se utilizó un método estadístico mejorado en el servidor Datamonkey (Pond y Frost, 2005), que computa sustituciones no sinónimas y sinónimas en cada posición de codón. Se utilizó un método ML con configuraciones predeterminadas aplicadas en dicho servidor, Fixed Effects Likelihood (FEL), que estima directamente dN y dS basado en un modelo de sustitución de codones. Para ello, se utilizan los parámetros α (tasa instantánea de mutaciones sinónimas) y β (tasa instantánea de mutaciones no sinónimas) y se estima la tasa de mutaciones sinónimas y no sinónimas en cada sitio bajo el modelo $\alpha=\beta$. A continuación, se realiza una prueba de razón de verosimilitud con un grado de libertad para inferir si α es diferente de β , y se deriva un valor p con el condicional de que la hipótesis nula es verdadera. Además, la proteína del modelo tridimensional y la interfase STRIDE se utilizaron para evaluar la importancia funcional de los sitios seleccionados ubicados dentro o cerca del dominio funcional de la estructura tridimensional modelada.

6.5 Análisis filogenético de hemo oxigenasa-1

Las secuencias aminoacídicas de HO-1 de distintos órdenes de mamíferos fueron obtenidas a partir de la base de datos de NCBI (Tabla 1) y se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo ClustalW2. El árbol filogenético fue elaborado utilizando MEGA X (Kumar *et al.*, 2019) y el método de máxima verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) basado en el modelo de matriz JTT (Jones *et al.*, 1992). El árbol de consenso bootstrap fue inferido a partir de 1000 réplicas. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se

agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas usando un modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.6641)). El análisis incluyó 24 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Es decir, se permitieron menos de 5% de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición. Hubo un total de 288 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol fue enraizado a una secuencia de HO-1 del koala (*Phascolarctos cinereus*).

El tiempo de divergencia entre los grupos seleccionados de mamíferos se estimó mediante el algoritmo RelTime-ML implementado en MEGA X (Tamura *et al.*, 2012). Brevemente, las estimaciones de tiempo se calculan en función de las longitudes de las ramas optimizadas por ML. La topología del análisis ML se utilizó como árbol de partida, con el taxón externo definido manualmente. El modelo GTR + I + G se implementó con cinco categorías de gamma discretas. El tiempo de divergencia (principalmente a partir de registros fósiles) del tursión con la orca (hace 8.1 – 11.7 millones de años (Ma)), el rorcual (31.1 - 35 Ma) y el humano (91 - 101 Ma) se utilizó para calibrar las edades relativas de los nodos (<http://www.timetree.org/>) (Kumar *et al.*, 2017).

6.6 Colecta de sangre

Las muestras de sangre humana fueron proporcionadas por donantes voluntarios anónimos y colectadas por personal calificado como parte de un programa permanente de donación sanguínea del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), previo consentimiento informado por escrito (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601; número de registro 2018-785-010). Esta sangre total fue procesada con ayuda de un separador de componentes sanguíneos (eritrocitos,

plaquetas, plasma y leucocitos). Se recibe la parte enriquecida de leucocitos (~50 mL) en una solución anticoagulante (citrato-fosfato-dextrosa) mantenida en refrigeración (~4°C).

Las muestras de tursiones fueron proporcionadas por el delfinario Cabo Dolphins en San José del Cabo y Cabo San Lucas, Baja California Sur, colectadas por veterinarios certificados como parte de un programa permanente de evaluación de salud de los tursiones en cautiverio. Las muestras de tursiones se colectaron del plexo arteriovenoso de la aleta caudal con tubos Vacutainer® de 10 mL conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, se guardaron en un contenedor con refrigerante (~4°C) y fueron transportadas inmediatamente a las instalaciones del laboratorio de Estrés Oxidativo de CIBNOR.

6.7 Aislamiento de leucocitos

Para aislar los leucocitos se homogenizaron volúmenes iguales de sangre total con solución salina fisiológica (PBS) y se transfirieron a un tubo que contenía ficoll hypaque (GE Healthcare - Life Sciences) en un volumen equivalente a la mitad de la sangre con PBS, cuidando de no mezclar. Se centrifugaron las muestras a $650 \times g$, 25°C por 25 min, y se tomó el anillo blanquecino que se forma justo bajo el sobrenadante (Fig. 1). Se aforó a 12 mL con PBS y se homogenizó suavemente. Se centrifugaron a $350 \times g$, 25°C por 10 min y se retiró el sobrenadante (se repitió este paso una vez) y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio RPMI (Medio RPMI 1640 Gibco) con 10% suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina. Una vez obtenidos los leucocitos de cada muestra, se tomaron alícuotas para para cuantificar los porcentajes de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos) por medio de citometría de flujo (Beckman Coulter LH 780, Miami, FL, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.8 Concentración letal por exposición a lipopolisacáridos

Para determinar los porcentajes de mortalidad por exposición a LPS, se sembraron los leucocitos aislados (~1,000,000) en cajas para cultivo celular con diferentes dosis (0, 2, 3, 5, 7 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de LPS (*Escherichia coli* O55:B5; List Biologicals, Campbell, CA, USA) en un volumen final de 1 mL, por duplicado, y los leucocitos se incubaron a 37°C, con 5% CO₂ por 24 y 48 horas. Para cuantificar la viabilidad celular y calcular la concentración letal media se utilizó el análisis de exclusión con azul de tripano, el cual permite distinguir entre células viables y no viables al observarlas en un microscopio. Las células viables tienen membranas celulares intactas y no permiten la entrada del colorante; mientras que las células no viables no poseen una membrana funcional permitiendo que el colorante atraviese la membrana tiñendo el interior de la célula de azul (Louis y Siegel, 2011). Se tomaron alícuotas de los leucocitos a las 24 y 48 horas de exposición, se les añadió azul de tripano, y se dejaron reposar por aproximadamente 5 min. Se colocó una alícuota en cada lado de una cámara de Neubauer, y se observó en microscopio óptico (Leica) a 10X. Se contaron las células vivas y muertas de los cuadrantes extremos. El porcentaje de células viables se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Células viables} = \text{Células vivas} / \text{Células totales} \times 100 \quad (1)$$

Esta información fue utilizada para alimentar el modelo probit (Finney y Tattersfield, 1947). Las diferentes concentraciones fueron transformadas a escala logarítmica y el número de células muertas por exposición a LPS se utilizó y corrigió por la mortalidad del tratamiento control.



Figura 1. Separación de subpoblaciones celulares sanguíneas. La flecha indica la fracción que contiene los glóbulos blancos.

6.9 Bioensayo proinflamatorio

Se realizaron bioensayos de exposición a LPS ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en leucocitos aislados de humanos y tursiones a dos tiempos (24 y 48 horas) bajo los mismos parámetros descritos previamente y se analizaron por medio del análisis de exclusión con azul de tripano. Las muestras fueron centrifugadas a $950 \times g$ por 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Se colocaron $150 \mu\text{L}$ en un tubo de criopreservación con $500 \mu\text{L}$ de RNAlater y $50 \mu\text{L}$ en otro tubo de criopreservación para posterior análisis de inmunodetección; todas las alícuotas fueron colocadas en ultracongeladores (-80°C) hasta su análisis.

6.10 Extracción de ARN y expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria

El ácido ribonucleico (ARN) total de los leucocitos aislados fue extraído con el uso de un kit comercial QIAmp Viral RNA (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento requiere realizar una lisis celular, atrapar el ARN en una membrana y realizar una elución con agua libre de ARNasas. Se removió el RNAlater por medio de centrifugación ($5,000 \times g$ por 10 min), retirando el sobrenadante. Se homogenizaron las

muestras de leucocitos con amortiguador AVL y acarreador de ARN. Se colocó etanol puro y se utilizaron membranas para retener el ARN, centrifugando a $6,000 \times g$ por 1 min. Las membranas fueron lavadas con la solución amortiguadora AW1 (QIAGEN) y se centrifugó a $6,000 \times g$ por 1 min. A continuación, se lavaron las membranas con la solución AW2 (QIAGEN) y se centrifugaron a $17,000 \times g$ por 4 min. Finalmente, para obtener el ARN, se colocaron $60 \mu\text{L}$ del amortiguador AVE (QIAGEN) y se incubaron por 1 min, realizando un paso de centrifugación final a $6,000 \times g$ por 2 min. Las muestras se alicuotaron y se congelaron a -20°C hasta su uso. El ARN fue cuantificado usando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000 Thermo Scientific).

La expresión de los genes HO-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Tabla 2) en las muestras de humanos y tursiones fue medida por PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR) con un termociclador CFX 96 (Bio Rad), utilizando el kit TaqMan RNA-to-Ct 1-Step. Se cuantificó la expresión del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, gen comúnmente usado como referencia) (Liu *et al.*, 2015). Se llevaron a cabo dos reacciones de RT-qPCR por cada muestra de ARN para cada gen. Para cada reacción de RT-qPCR, se utilizó TaqMan RT-PCR Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), agua libre de nucleasas, oligonucleótidos ($25 \mu\text{M}$), sonda marcada con fluorescencia FAM[™] ($10 \mu\text{M}$), TaqMan RT Enzyme Mix (40X) y ARN como templado (Tabla 3).

Para todos los genes, las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 48°C por 15 min (transcripción reversa); 95°C por 10 min y 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min, con una medición de fluorescencia en el paso de extensión. La amplificación de cada gen fue realizada con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. Los datos se normalizaron contra GAPDH y fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Los valores de expresión son manejados como valores relativos a la expresión del gen constitutivo y, por lo tanto, no tienen unidad de medición.

Tabla 2. Oligonucleótidos y sondas diseñadas para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa.

Nombre Oligonucleótido/Sonda	Secuencia (5'-3')	No. Acceso GenBank
Homo_GAPDH_Fw	CACTGGCGTCTTCACCACC	NM_001256799.3
Homo_GAPDH_Rv	ATCAGCAGAGGGGGCAGAG	
Homo_GAPDH_P	AAGGCTGGGGCTCATTTCAGGGGGGAG	
Homo_HMOX1_Fw	CTTTGAGGAGTTGCAGGAGC	NM_002133.3
Homo_HMOX1_Rv	AATCTTGCACTTTGTTGCTGGC	
Homo_HMOX1_P	ACCCATGACACCAAGGACCAGAGCCC	
Homo_IL1b_Fw	CAGAAAACATGCCCGTCTTCC	NM_000576.3
Homo_IL1b_Rv	ACTCTCTGGGTACAGCTCTC	
Homo_IL1b_P	ACCAAAGGCGGCCAGGATATAACTGACT	
Homo_IL6_Fw	GATGGCTGAAAAAGATGGATGC	NM_000600.5
Homo_IL6_Rv	ACTCTCAAATCTGTTCTGGAGG	
Homo_IL6_P	TCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCCTGG	
Homo_TNF_Fw	GTGGAGCTGAGAGATAACCAG	NM_000594.4
Homo_TNF_Rv	GGAGCACATGGGTGGAGG	
Homo_TNF_P	AGGACCTGGGAGTAGATGAGGTACAGG	
Turs_GAPDH_Fw	GCAAGGTCATCCCTGAGCTG	XM_019925987.1
Turs_GAPDH_Rv	CAGATCCACGACGGACACG	
Turs_GAPDH_P	AAGCTCACTGGCATGGCTTTCCRCGTC	
Turs_HMOX1_Fw	GCGTCCCTCTGTCTCTGG	XM_004315885.2
Turs_HMOX1_Rv	TAAAGTTCAGGTCATTGGCTGG	
Turs_HMOX1_P	TTTTGGTTGGGGGAGATGCCGCACT	
Turs_IL1b_Fw	TGACCTGTTATTTGAGGCTGAC	AB028216.1
Turs_IL1b_Rv	GATGCTCTCATCTCCCGTGG	
Turs_IL1b_P	AACAGATGAAGTGCTGCGTCCAACACC	
Turs_IL6_Fw	GGGTTCAATCAGGAGACTTGC	XM_004330286.2
Turs_IL6_Rv	ATACTATTCTGGAGGTAGTCC	
Turs_IL6_P	AATCACCACCGGCCTTCTGGAGTATCA	
Turs_TNF_Fw	CATCCATCCTATCCACCTC	AB049358.1
Turs_TNF_Rv	GCCCAGCCCTGAGTCCC	
Turs_TNF_P	TTACTCCTTCAACCCGCTCATCCCT	

Homo, *Homo sapiens*; Turs, *Tursiops truncatus*; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; HMOX1, hemo oxigenasa-1; IL1b, interleucina-1β; IL6, interleucina-6; TNF, factor de necrosis tumoral; FW, sentido; RV, antisentido; P, sonda.

Tabla 3. Componentes del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa.

Componente	Volumen por reacción (μL)
TaqMan RT Enzyme Mix (40 X)	0.25
TaqMan RT-PCR Mix (2X)	5
Primer Fw	0.5
Primer Rv	0.5
Sonda	0.5
Agua libre de RNasas	3.25
Templado ARN	2.5

6.11 Actividad de hemo oxigenasa

Para determinar la actividad enzimática de la hemo oxigenasa (HO) se llevó a cabo un fraccionamiento celular. Para ello, se homogenizó una muestra de leucocitos aislados de humano y tursiones (*Tursiops truncatus*) sometidos a un tratamiento con 10 μg mL⁻¹ de lipopolisacárido (LPS) y controles (sin LPS). A las muestras de leucocitos se les añadió un inhibidor de proteasas (PMSF, 0.2 M, 1 μL) y se homogenizaron con un sonicador ultrasónico QSonica® con punta delgada, utilizando una amplitud del 80% durante 15 segundos manteniendo siempre el homogenizado en hielo. Al homogenizado se le añadió 100 μL de sacarosa (0.75 M) y se centrifugó a 1,000 x g por 10 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, se centrifugó a 13,000 x g por una hora a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, el cual se utilizó para los ensayos enzimáticos.

Los componentes del ensayo enzimático (tabla 4) fueron cargados en una microplaca junto con las muestras (cada una se analizó por duplicado), y ésta se colocó en el espectrofotómetro a 37°C (previamente calentado) durante 1 hora. Para la medición de absorbancia, se tomaron lecturas (464 nm) cada 10 minutos (comenzando con una lectura inicial inmediata).

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo con un ensayo acoplado en donde la biliverdina producida por HO fue utilizada como sustrato por la biliverdina reductasa para producir bilirrubina (Basu *et al.*, 2020). Se determinó la actividad enzimática (ecuación 2) como

la generación de nanomoles de bilirrubina $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$; el $\Delta\text{Abs h}^{-1}$ fue obtenido a partir de la pendiente generada con los valores de absorbancia en función del tiempo (valores de R^2 mayores a 0.9). Además, se analizaron reacciones sin muestra (blanco) y reacciones sin hemina, para verificar los valores de absorbancia de la reacción sin muestra y sin el sustrato.

$$\text{Actividad HO} = \frac{\Delta\text{Abs}/h}{\varepsilon} \times \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen muestra}} \times \text{dilución} \quad (2)$$

Nota: el paso óptico fue corregido con el uso del software y el equipo Multiskan Sky, ajustándose a una cubeta de 1 cm. El equipo hace un ajuste utilizando el búfer de reacción y dos longitudes de onda (975 y 900 nm). Finalmente, se determinó la concentración de proteína total en cada muestra utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) a una longitud de onda de 595 nm, se midió por triplicado a los 10 minutos a 25°C.

Tabla 4. Componentes del ensayo enzimático.

Reactivo	Concentración Final
Glucosa 6 Fosfato	2 mM
Glucosa 6 Fosfato-Deshidrogenasa	1 U
Hemina	0.2 mM
Biliverdina Reductasa	1 U
NADPH	1 mM

Nota: Se añadieron 20 μL de las muestras en 100 μL de la mezcla de reacción.

6.12 Ensayos ELISA para cuantificación de citocinas

Para cuantificar las citocinas presentes en las muestras obtenidas a partir del bioensayo proinflamatorio, se realizaron ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; por su acrónimo en inglés) utilizando kits para detectar IL-1 β , IL-6 y TNF- α específicos para humanos y tursiones de RayBio®, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 100 μL de cada muestra (por duplicado) fueron incubadas por 2.5 h en una placa de 96 pozos para unirse a un anticuerpo específico. Los pozos fueron lavados con búfer de lavado y se añadieron 100 μL del anticuerpo biotinilado y se incubaron por 1 h. El anticuerpo biotinilado no unido fue lavado con

búfer de lavado y se añadieron 100 μL de estreptavidina conjugada con peroxidasa para unirse a la biotina y se incubaron por 45 min. Nuevamente se realizó un lavado con búfer de lavado y se añadieron 100 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se incubaron por 30 min, el TMB es un sustrato que reacciona con la peroxidasa dando como resultado una tonalidad azul. Finalmente, la reacción se detuvo con 50 μL de H_2SO_4 0.2 M. La intensidad del color fue medida inmediatamente a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Multiskan Sky; Thermo Scientific). De acuerdo con el fabricante, los rangos detectables de las citocinas fueron de 0.3 pg mL^{-1} a 500 ng mL^{-1} (Tabla 5). Para realizar los cálculos, cada ensayo específico fue cargado con una curva estándar (por duplicado) con valores predeterminados por el fabricante, y se determinaron los valores de concentración de cada citocina por medio de la 'herramienta de análisis ELISA' de RayBio®. Esta herramienta grafica la curva estándar con los valores de concentración en el eje X y la absorbancia en el eje Y, y calcula los valores de concentración de la citocina respecto a su valor de absorbancia.

Tabla 5. Rango de detección de distintas citocinas proporcionado por el fabricante.

Especie	IL-1 β		IL-6		TNF- α	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.
<i>Homo sapiens</i> (pg/mL)	0.4	100	1.37	1000	25	6000
<i>Tursiops truncatus</i> (ng/mL)	0.6	500	0.32	80	0.1	25

6.13 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad y pruebas de igualdad de varianzas. Los datos de viabilidad celular se analizaron usando una prueba t de Student (pareada; $\alpha=0.05$). Los datos de RT-qPCR y la actividad enzimática se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de comparaciones post hoc (prueba de comparación múltiple de Tukey (Keselman y Rogan, 1977), de comparación múltiple LSD de Fisher (Williams y Abdi, 2010) o prueba t de Welch (Welch, 1947)). En todos los casos se consideró significancia estadística cuando $\alpha<0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Los gráficos se generaron utilizando GraphPad Prism.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización *in silico* del gen hemo oxigenasa-1 de *Tursiops truncatus*

La estructura genética de la HO-1 del tursión se determinó con herramientas bioinformáticas. El marco de lectura abierto es de 864 pb y se determinaron cinco exones y cuatro intrones. Se detectaron elementos reguladores proximales en la región reguladora (hasta -1000 pb) (Fig. 2), incluidos los siguientes factores de transcripción AP-2, NF- κ B, factor de choque térmico 1 (HSF1), transductores de señal y activadores de transcripción (STAT1:: STAT2), el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), y el factor de unión a CCCTC (CTCF), el cual es un factor de transcripción multifuncional. Además, se detectaron sitios de unión para los factores de transcripción mencionados en la región proximal de *HMOX1* (Fig. 3). Se calculó la mejor puntuación de coincidencia para los sitios de unión de AP-2 y NF-E2 con un valor E de 0.053 y 0.69, respectivamente, en comparación con la secuencia del gen descrito para los seres humanos. La mejor coincidencia para NF- κ B, con E = 0.82, fue para el chimpancé; para HSF1, la mejor coincidencia con E = 0.0016 se encontró en las dos secuencias de primates; para STAT1:STAT2, se obtuvo la mejor coincidencia con E = 0.14 para el cerdo, y para CTCF, se calculó la mejor coincidencia con E = 0.23 para la levadura. Para todas las coincidencias en este estudio, los valores E fueron inferiores a 1.5 y todos los valores p de la posición fueron menores de 0.0001. Al buscar cCREs, sólo se usaron los factores de transcripción con experimentos de secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIPseq) para el factor de transcripción dado con picos que cruzan el elemento regulador cis seleccionado para verificar los sitios de unión de los factores de transcripción identificados por MEME.

7.2 Modelación proteica y del sitio activo de hemo oxigenasa-1 de *Tursiops truncatus*

La estructura tridimensional de HO-1 del tursión fue obtenida por modelación a partir de la estructura cristalizada de HO-1 fusionada con citocromo P450 reductasa de *Rattus norvegicus* (Protein Data Bank no. 6J7A) con un 80% de identidad entre ambas moléculas. La composición

de estructuras secundarias por medio de la plataforma web STRIDE reveló la presencia de 10 hélices- α , una de las cuales en el extremo C-terminal pertenece al dominio transmembranal de anclaje al retículo endoplásmico y tres hélices 3_{10} (Fig. 4). Para la modelación del sitio activo se alineó con la HO-1 de *H. sapiens* en complejo con el grupo hemo (Fig. 5); se muestran los residuos más cercanos al grupo hemo. Éste está acomodado entre dos hélices, la proximal y distal. En la hélice proximal se encuentra la histidina-25 (His-25), que sirve de ligando al grupo hemo (2.1 Å). El grupo hemo cuenta con dos propionatos que orientan el grupo hemo y posicionan el carbono- α -meso para su hidroxilación. Dos de los aminoácidos que interactúan con el propionato del hemo tienen distancias al grupo propionato de 4.4 y 3 Å para lisina (Lys)-179, y 6 y 4.4 Å para arginina (Arg)-183 (tursión y humano, respectivamente). Curiosamente, se encontró que Lys-18 del tursión interactúa con ambos propionatos cerca de 1.4 Å, lo que podría indicar una interacción electrostática, mientras que la distancia en Lys-18 del humano es 4.2 Å. En conjunto, estos tres residuos se encuentran próximos a dichos propionatos y sus interacciones determinan la dirección del grupo hemo.

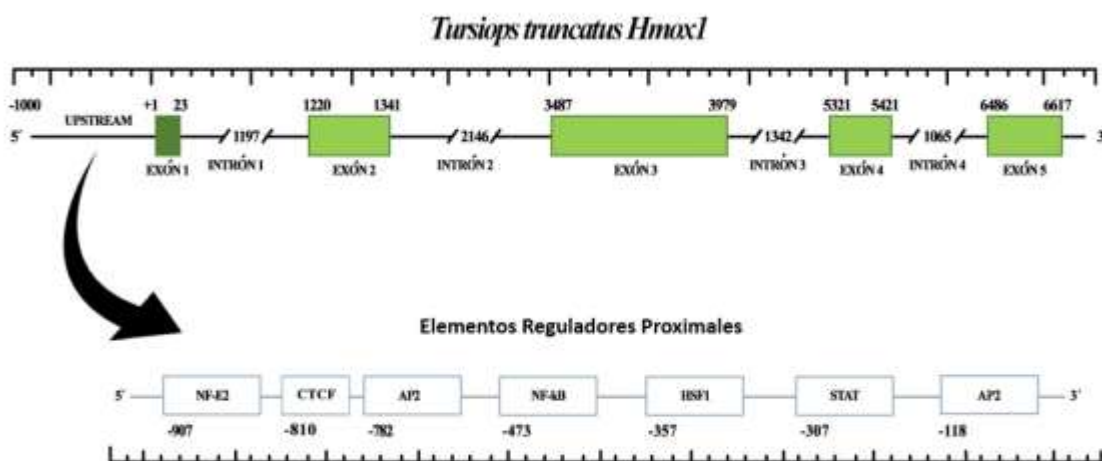


Figura 2. Estructura del gen hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) del tursión (*Tursiops truncatus*). Se muestra la región reguladora (1,000 pb) y los exones e intrones. Los límites entre exones e intrones fueron obtenidos a partir de la base de datos Ensembl. Se muestran los elementos reguladores proximales. Factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), factor de unión a CCCTC (CTCF), proteína activadora 2 (AP-2), factor nuclear kappa B (NF- κ B), factor de choque térmico 1 (HSF1) y transductores de señal y activadores de transcripción (STAT1:: STAT2).

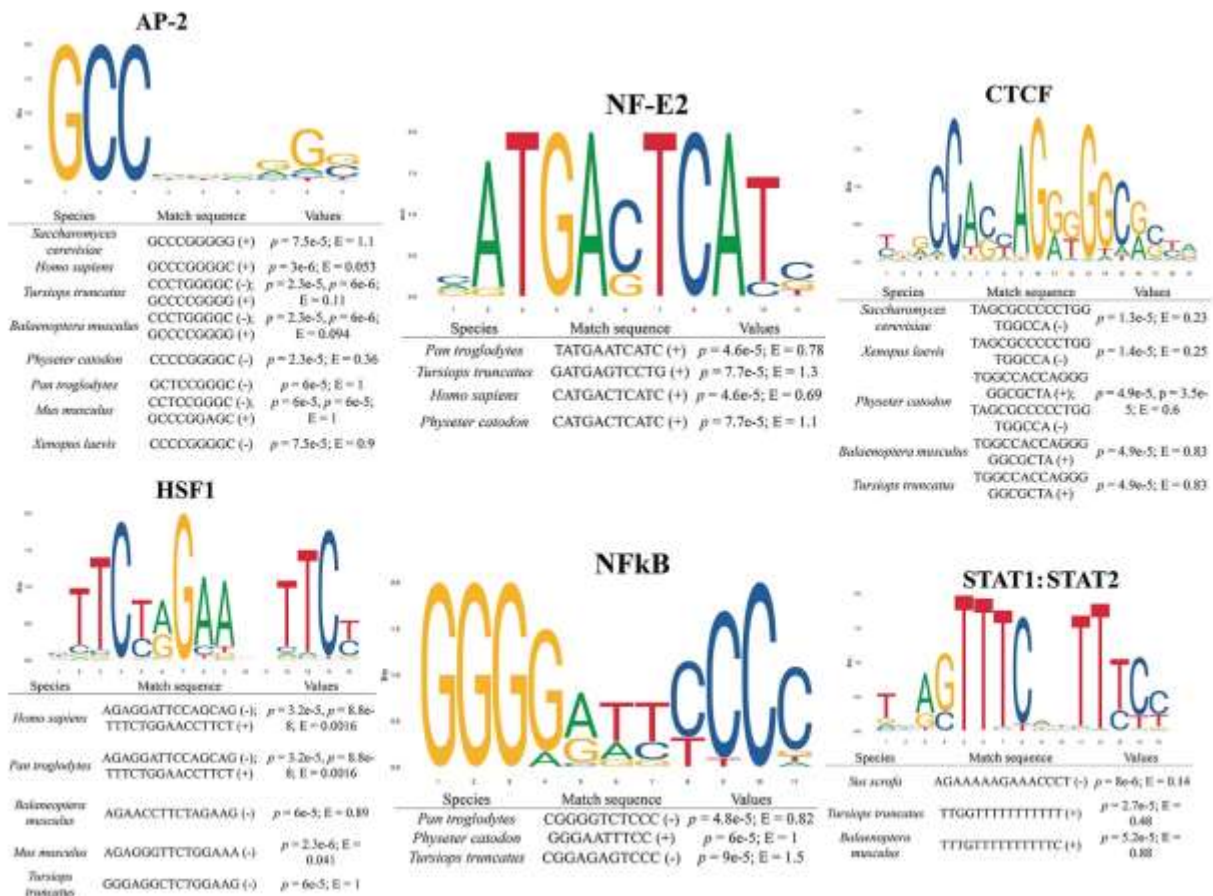


Figura 3. Predicción de los sitios de unión para factores de transcripción en la región promotora del gen de hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) del tursiops (*Tursiops truncatus*). Proteína activadora 2 (AP-2), factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), factor de unión a CCCTC (CTCF), factor de choque térmico 1 (HSF1) factor nuclear kappa B (NF-kB), y transductores de señal y activadores de transcripción (STAT1 :: STAT2). Se muestran los valores E y p. La hebra sentido y antisentido se muestra con un (+) y (-) respectivamente.

7.3 Diferencias conformacionales y sustituciones en la hemo oxigenasa-1 de *Tursiops truncatus*

Se determinaron niveles moderados de alineamiento (RMSD ~ 0.5) al comparar la estructura terciaria de HO-1 de humano contra diversas estructuras terciarias de HO-1 de animales con distintas adaptaciones fisiológicas (Fig. 6). El alineamiento entre la HO-1 del tursiops y del humano reveló numerosas sustituciones aminoacídicas (Fig. 7), en su mayoría conservadas. Se han identificado numerosos sitios y regiones que forman parte de la configuración y regulación de HO-1. Con base en ello, analizamos estos arreglos en la HO-1 de la rata topo (*H. glaber*) y el

pez fúndulo (*F. heteroclitus*) ambos tolerantes a la hipoxia, la rata (*R. norvegicus*) sensible a la hipoxia, el ratón ciervo (*P. maniculatus bairdii*) adaptado a gran altitud, la rana común (*R. temporaria*) adaptada al frío, y mamíferos marinos con diferentes capacidades de buceo como el lobo marino de California (*Z. californianus*), el cachalote (*P. catodon*) y el tursión (*T. truncatus*) comparándolos con la HO-1 de *H. sapiens*. En la región definida como la "huella digital de HO-1", se encontraron cuatro aminoácidos con un plano de rotación diferente al del humano (Tabla 6); seis aminoácidos posicionados en el sitio de interacción con el grupo hemo tienen una rotación sobre el carbono β ($C\beta$) (Fig. 7). La cadena lateral de guanidina de Arg-183 se encuentra invertida 93.8° . Todas las estructuras terciarias analizadas en este estudio tienen aminoácidos con rotación diferente en comparación con la HO-1 de humano; sin embargo, la HO-1 del tursión fue la que presentó un mayor número de cambios.

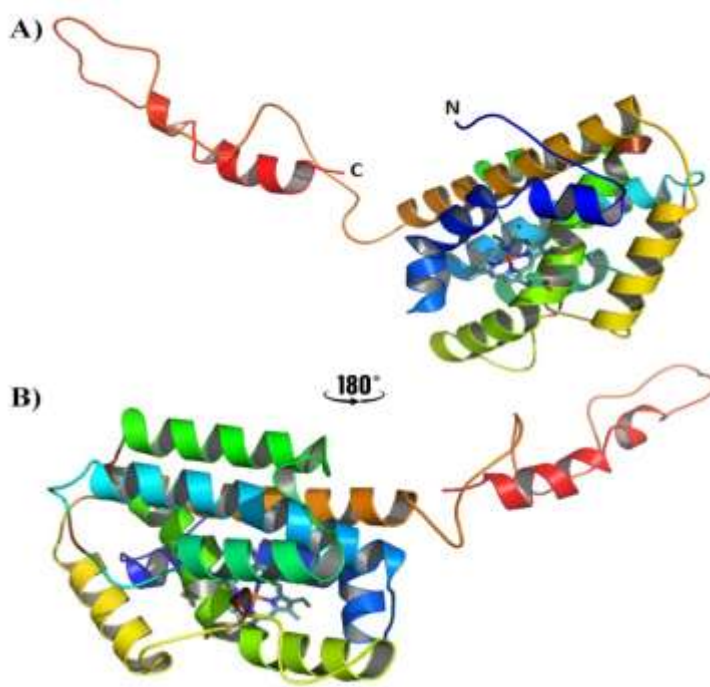


Figura 4. Modelo por homología de hemo oxigenasa 1 del tursión *Tursiops truncatus*. El dominio transmembranal se muestra en rojo. Las hélices 3_{10} se presentan en café, y las hélices- α se presentan en colores distintos. A) Se muestran los extremos N y C terminal; el grupo hemo se encuentra entre las hélices proximal (azul) y distal (verde claro). B) Modelo de la molécula girada 180° .

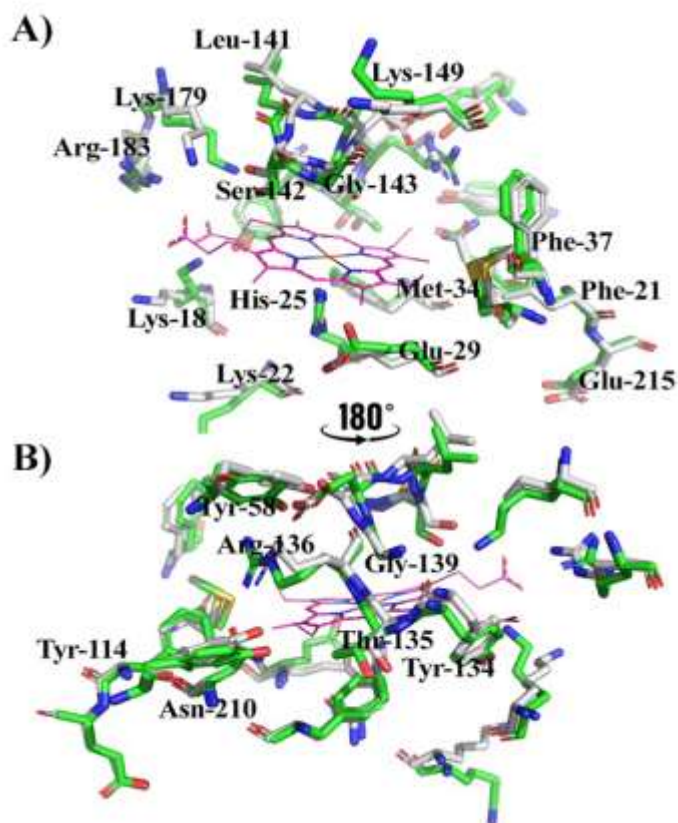


Figura 5. Modelación por nomenclatura del alineamiento del sitio activo de hemo oxigenasa 1 de tursión (*Tursiops truncatus*) y humano (*Homo sapiens*). Se señalan los residuos más próximos al grupo hemo. Los átomos de carbono se presentan en verde para el tursión y en blanco para el humano (a excepción del grupo hemo, en el que se muestran en púrpura), los átomos de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo. (B) Modelo del sitio activo rotado 180°.

Tabla 6. Residuos de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) del tursión (*Tursiops truncatus*) en los que se encontró diferente ángulo de rotación que en la proteína correspondiente del humano (*Homo sapiens*).

Residuo	Ángulo de rotación (°)	Locación/función
Lisina-18*	50.1	Interacción con los propionatos del grupo hemo
Lisina-22*	80.5	Cercanía a los propionatos del grupo hemo
Ácido glutámico-29*	68.8	Residuo de contacto del 'bolsillo' del grupo hemo
Lisina-149*	53.3	Parte de la firma de HO-1
Lisina-179*	49.8	Interacción con los propionatos del grupo hemo
Arginina-183*	19.5	Interacción con los propionatos del grupo hemo
Lisina-153	52.3	Localizado dentro de la 'huella digital' de HO-1
Valina-130	124.2	Localizado dentro de la 'huella digital' de HO-1
Glutamina-145	112.9	Localizado dentro de la 'huella digital' de HO-1
Valina-146	48.5	Localizado dentro de la 'huella digital' de HO-1

*Residuos con mayor interacción en el 'bolsillo' del grupo hemo; se muestran con más detalle en la figura 7.

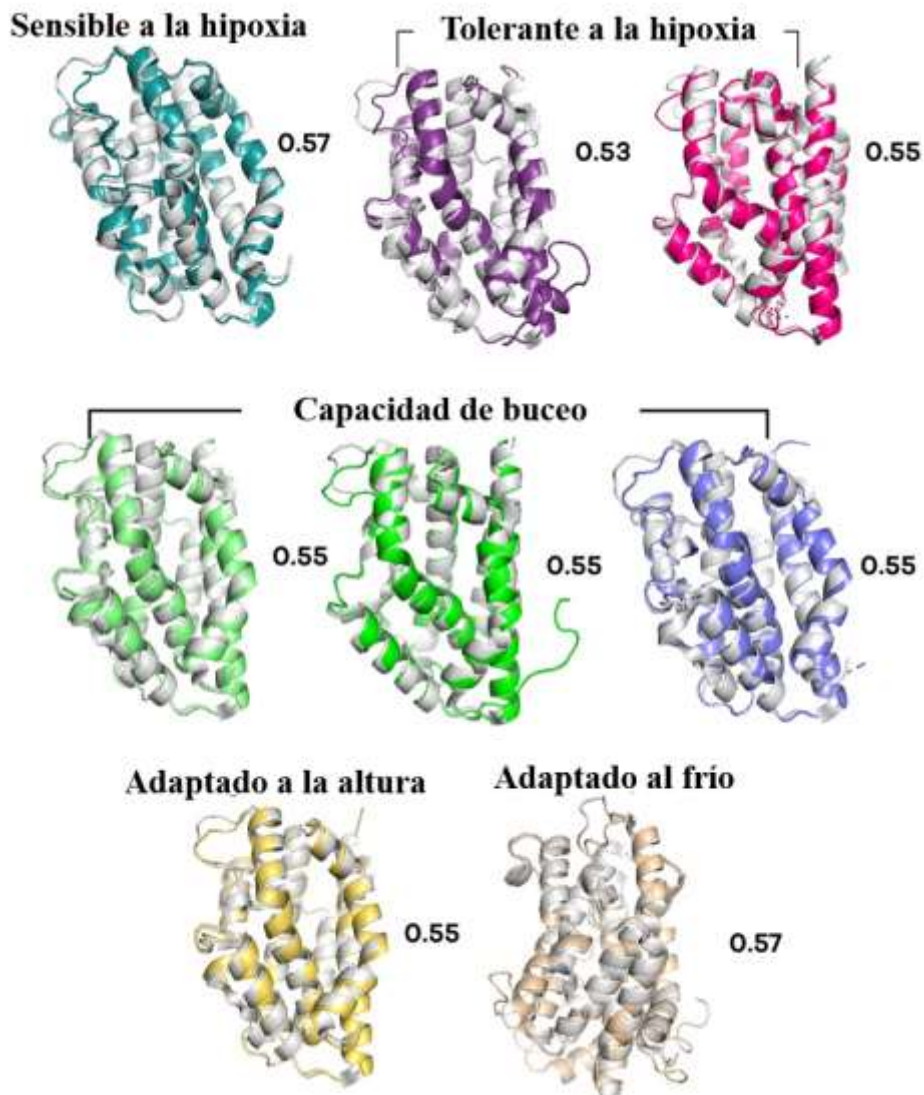


Figura 6. Alineamiento de estructuras tridimensionales de hemo oxigenasa-1 (HO-1) de vertebrados con diferentes adaptaciones fisiológicas. Las estructuras fueron alineadas con la HO-1 de humano. Rata (*Rattus rattus*) (cian), pez fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) (violeta), rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*) (magenta), cachalote (*Physeter catodon*) (verde opaco), tursión (*Tursiops truncatus*) (verde), lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (azul), ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus bairdii*) (amarillo), rana común (*Rana temporaria*) (café claro). Se indican los valores de la desviación de la media cuadrática (RMSD).

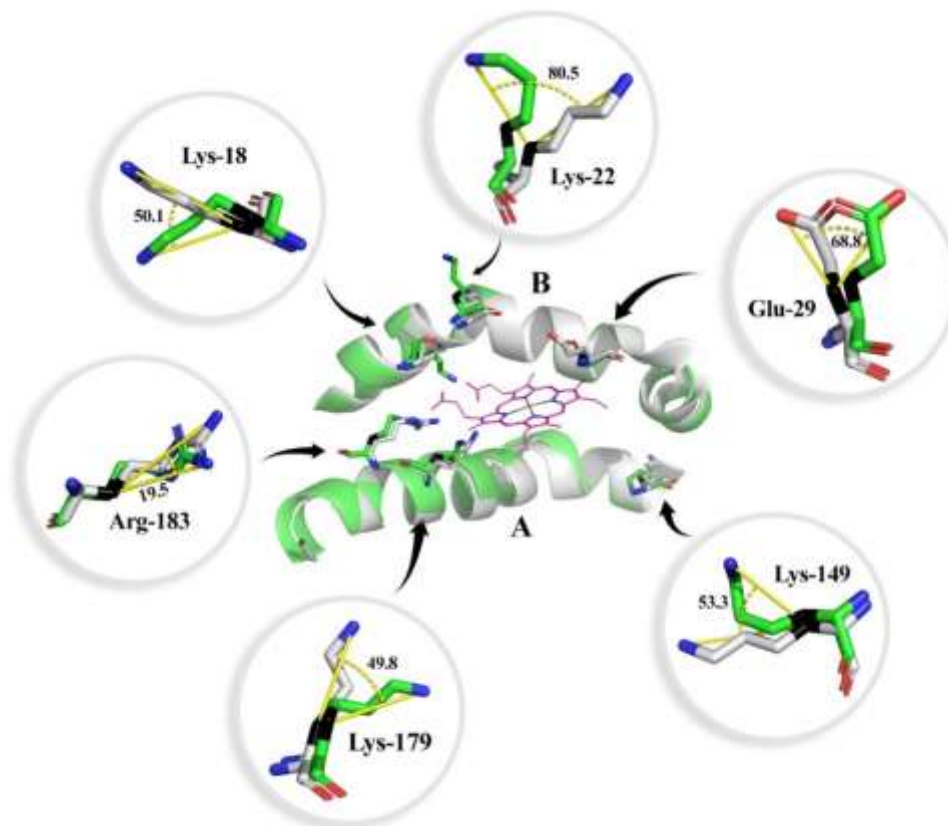


Figura 7. Sitio de interacción del grupo hemo y comparación de la alineación de hemo oxigenasa 1 del tursión (*Tursiops truncatus*) con la del humano (*Homo sapiens*). El ángulo de rotación se muestra en grados. El carbono beta está indicado en negro. Se muestran la hélice distal (A) y proximal (B). Los átomos de carbono se muestran en verde para el tursión y gris para los humanos (excepto para el grupo hemo, en el que los átomos de carbono se muestran en púrpura), los átomos de nitrógeno en azul y el oxígeno en rojo.

7.4 Alineamiento de secuencias de hemo oxigenasa-1 de eucariotas

Se elaboró un mapa de calor con 245 secuencias aminoacídicas de HO-1 de diversos eucariotas para determinar la presencia de áreas conservadas a través de diversos grupos de eucariotas (Fig. 8). En la mayoría de las proteínas de las especies en las que hasta ahora se ha identificado, se encuentra una huella digital de HO-1 y se propone que éste es un sitio indispensable para su función catalítica. Dentro de esta región se encuentra el dominio de glicina (Gly-Asp-Leu-Ser-Gly-Gly), el cual se encuentra sobre el grupo hemo y puede proveer la flexibilidad requerida para la unión del sustrato (hemo) y la liberación del producto (biliverdina) (Wilks, 2002). En el presente estudio, se encontró que sólo tres grupos (plantas, moscas y hongos) carecen del

dominio de glicina. La His-25, identificada como el residuo más próximo al hierro del grupo hemo (2.1 \AA), está totalmente conservada entre las especies analizadas en el presente estudio. Una sustitución de este residuo causa la inactivación de la enzima, aunque su actividad puede ser restaurada con imidazol exógeno (Wilks *et al.*, 1995). Por último, en el extremo C-terminal, se encuentra la región transmembranal de anclaje al retículo endoplásmico.

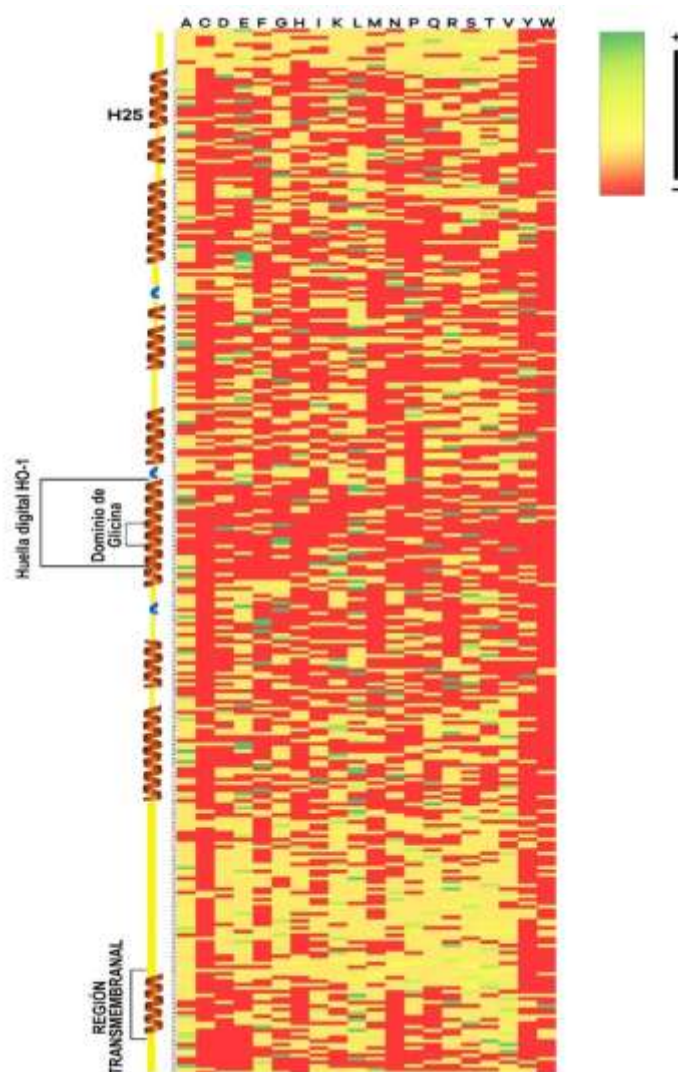


Figura 8. Mapa de calor elaborado a partir de 245 secuencias aminoacídicas de hemo oxigenasa-1 (HO-1) de eucariotas. Se muestran estructuras terciarias de HO-1 de mamíferos, hélices alfa (café), hélices 3_{10} (azul). Se muestra la histidina-25, la huella digital de HO-1, el dominio de glicina, y la región transmembranal. El color en las columnas indica la frecuencia del aminoácido a través de todas las especies analizadas, verde para mayor frecuencia, rojo para cero.

Las secuencias de aminoácidos deducidas de las HO-1 de mamíferos se presentan en la Tabla 1. Se observó un porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos mayor al 70%, con excepción del koala (*P. cinereus*) que tuvo un porcentaje entre 60 y 70% en comparación con los mamíferos placentarios. Los niveles más altos de identidad se observaron entre los órdenes individuales, superando el 90%. Lo anterior sugiere que HO-1 es una proteína con regiones altamente conservadas en mamíferos (Fig. 9). Adicionalmente, se determinó la presencia de cisteína (el residuo menos abundante en las proteínas) en casi todas las secuencias de HO-1 de especies eucariotas aquí analizadas con la excepción de primates y mamíferos marinos.

7.5 Presión selectiva en el gen de hemo oxigenasa-1 de cetáceos y primates

El cálculo de la relación dN/dS se realizó mediante el método de ventana deslizante (Fig. 10) para cetáceos y primates. Sólo se detectaron dos sitios bajo selección positiva entre cetáceos y ninguno para primates, mientras que la mayoría de los sitios parecen estar bajo selección purificadora para ambos grupos. Para identificar los sitios bajo presión selectiva se utilizó un método ML, FEL. Con este método se detectaron dos sitios (50 y 196, $p=0.032$; 0.009 respectivamente) bajo selección positiva y cinco sitios bajo selección purificadora (se proporcionan más detalles en la Fig. 9).

7.6 Análisis filogenético de hemo oxigenasa-1 de mamíferos

El árbol filogenético (Fig. 11) fue construido a partir de 24 secuencias de HO-1 (Tabla 1) utilizando el método de máxima verosimilitud. Se agrupó a las HO de mamíferos marinos de acuerdo con el orden al que pertenecen (cetáceos, sirenios y carnívoros), y con sus parientes terrestres más cercanos. El árbol filogenético fue enraizado con la HO-1 del koala debido a su pertinencia como mamífero y por su lejanía al resto de los mamíferos placentarios por ser marsupial. El orden de los primates fue agrupado con un 99% de valor de bootstrap. Los cetáceos se agruparon con un valor de bootstrap del 99%, y este grupo con el cerdo común (como representante de los artiodáctilos terrestres), con un valor de bootstrap de 83%. El manatí se agrupó con el elefante africano (superorden afroterios) con un valor de 92%, y los

carnívoros con un valor de 98%. Estos resultados sugieren que los mamíferos marinos son un grupo artificial con mayor similitud con sus parientes terrestres dentro de cada orden.

El árbol de tiempo de los mamíferos seleccionados se estimó con RelTime a partir de los datos de la secuencia de ADN de *HMOX1* basándose en el árbol filogenético previamente construido en este estudio con topología ML. Para los artiodáctilos, la fecha estimada de divergencia fue 67.4 Ma, para los carnívoros 79.6 Ma, para los primates 85.8 Ma, y al comparar los mamíferos placentarios con el representante marsupial, se calculó un tiempo de divergencia estimado de 95 Ma. Estos resultados indican que los primates son el orden más antiguo entre las especies de mamíferos analizadas en el presente estudio.

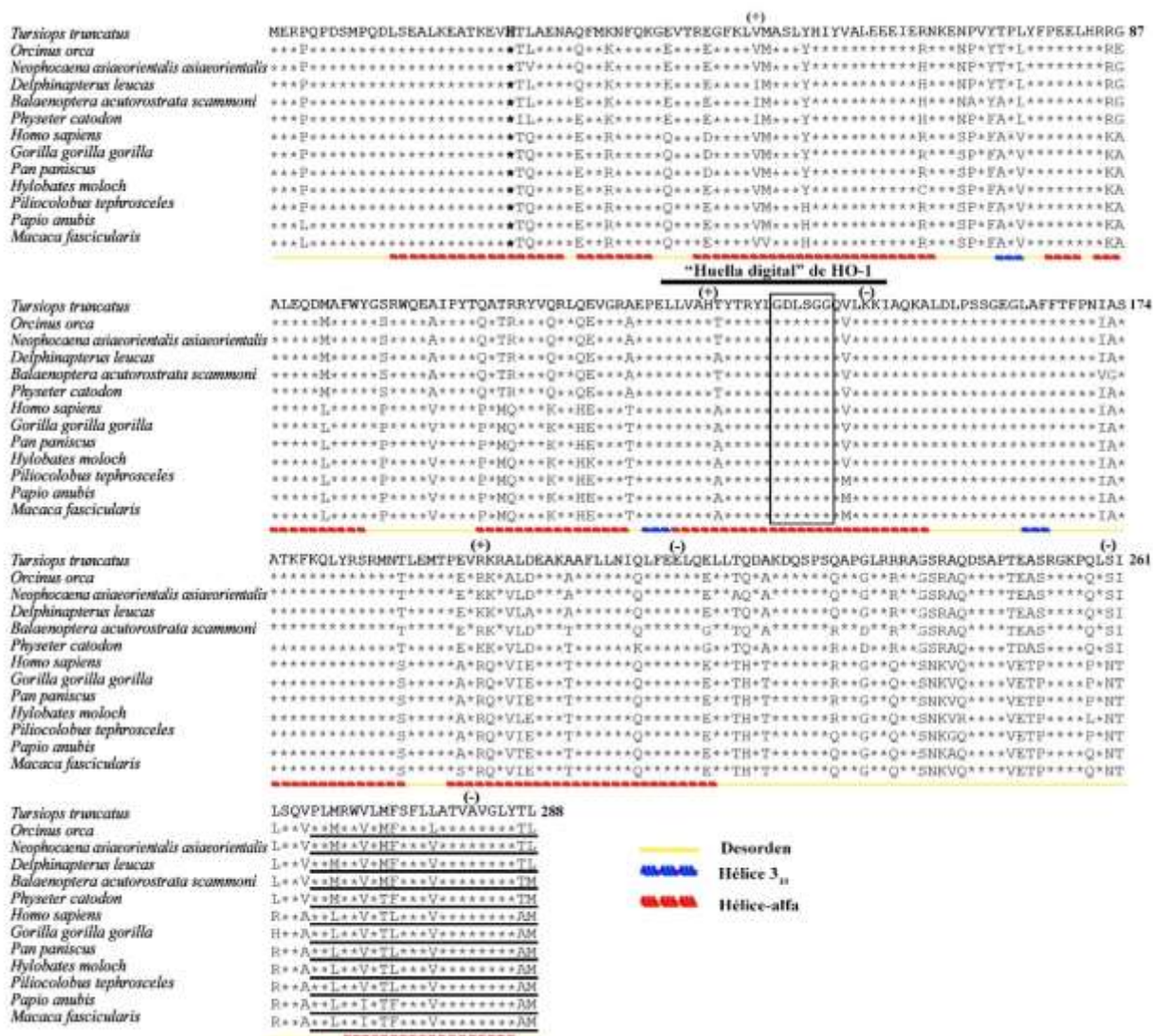


Figura 9. Análisis múltiple de secuencias de hemo oxigenasa 1 de mamíferos. En negritas se encuentra la histidina-25; se señala la ‘huella digital de HO-1’; se presenta el motivo de glicina encerrado en un cuadro, y la región transmembranal de anclaje al retículo endoplásmico subrayado. Los sitios con selección positiva y negativa se indican con (+) y (-), respectivamente. * indica los residuos idénticos.

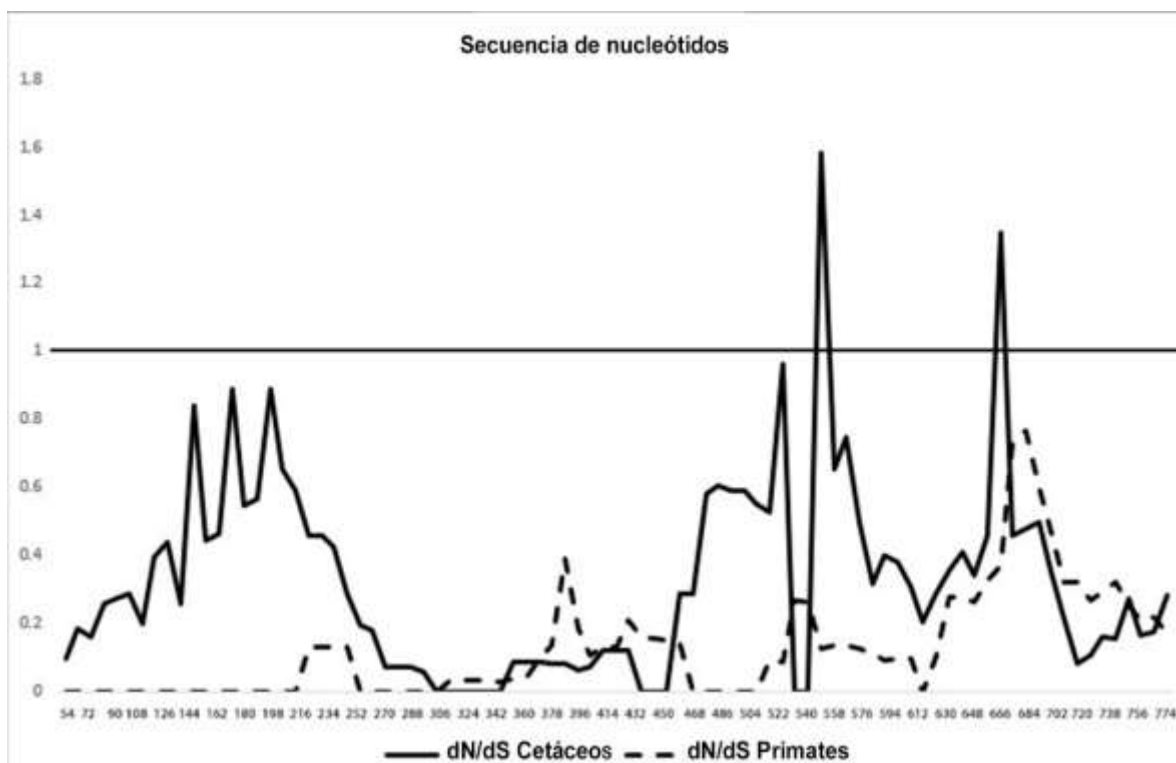


Figura 10. Tasas de sustitución no-sinónimas/sinónimas (dN/dS) a lo largo de la secuencia de codificación del gen de hemo oxigenasa 1 de mamíferos. La línea continua es la tasa dN/dS de cetáceos. La línea discontinua representa la tasa dN/dS en primates.

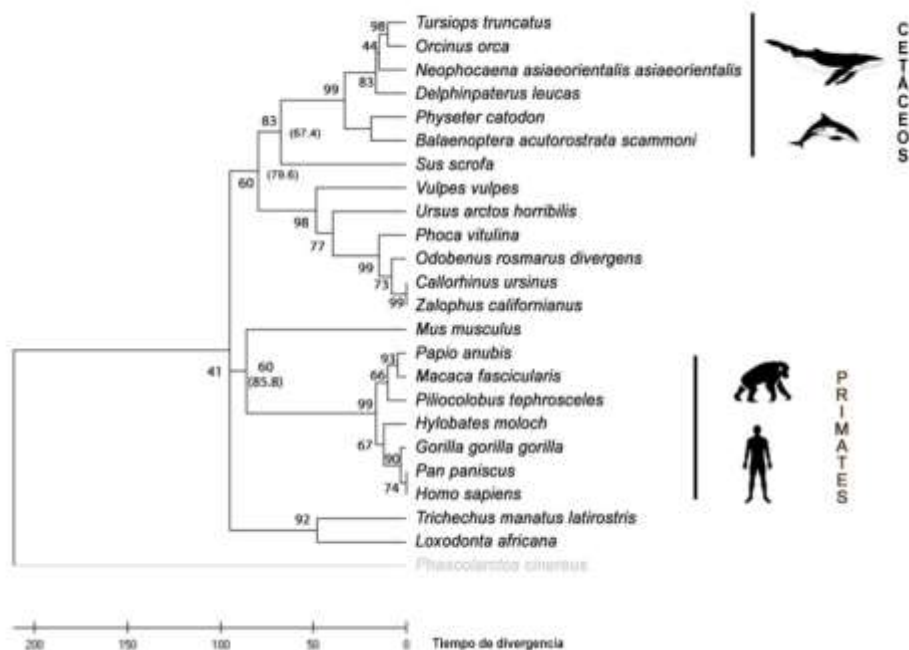


Figura 11. Árbol filogenético consenso de varias secuencias de hemo oxigenasa 1 (HO-1) de mamíferos. El análisis incluyó 24 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Hubo un total de 288 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol fue enraizado a la secuencia de HO-1 del koala (*Phascolarctos cinereus*).

7.7 Aislamiento leucocitario y concentración letal por exposición a lipopolisacáridos

La viabilidad de leucocitos por exposición a LPS en dos tiempos (24 y 48 h) se determinó por medio de la técnica de exclusión con azul de tripano. Los valores de porcentajes de viabilidad y perfil leucocitario se determinaron a partir de $\sim 1,000,000$ de leucocitos aislados. Usando el modelo probit para determinar la concentración letal (Fig. 12), se determinó la concentración de LPS a la que muere el 22% de células (CL_{22}), obteniendo $9.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS como punto de intersección para ambas especies. La exposición a LPS tuvo un impacto significativo en la viabilidad de los leucocitos, ya que se encontró un mayor número de células muertas al compararlas con sus respectivos controles utilizando una prueba t de Student (pareada; $\alpha=0.05$) (Tabla 7). Se determinó el menor porcentaje de viabilidad ($\sim 70\%$) a las 48 horas de exposición a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS en leucocitos de ambas especies.

Tabla 7. Viabilidad (% células vivas) de leucocitos de humano (n=9) y tursión (n=9) expuestos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS por 24 y 48 horas. Control = células sin tratamiento.

Especie	24 horas			48 horas		
	Control	LPS	Valor p	Control	LPS	Valor p
<i>Homo sapiens</i>	89.17 ± 2.3	82.28 ± 4.1	0.005	86.78 ± 4.17	72.56 ± 7.3	0.0018
<i>Tursiops truncatus</i>	91.06 ± 3.01	78.89 ± 5.5	0.0001	90.61 ± 5.23	71.78 ± 4.67	0.0001

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para verificar el aislamiento leucocitario y que no hubiera contaminación por otros componentes celulares sanguíneos (Fig. 13). En las muestras de humanos los neutrófilos se encontraron en mayor concentración (~50%), seguidos de los linfocitos (33%). En comparación, en las muestras de tursiones el patrón se encuentra invertido (18% y 76%, neutrófilos y linfocitos, respectivamente). En ambas especies, el resto de los leucocitos (monocitos, eosinófilos) se encontraron en menor concentración (<15 %), y debido a que no se observaron basófilos en las muestras de tursiones y en las muestras de humanos sólo se encontraron basófilos en algunas muestras, no se incluyeron en el análisis.

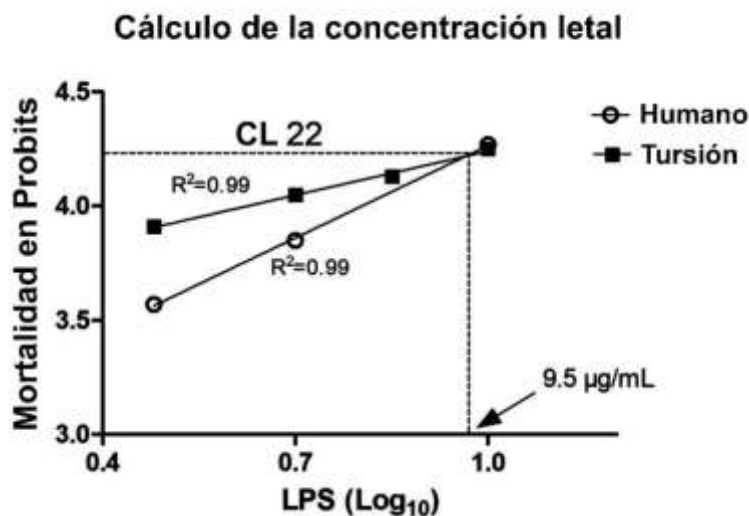


Figura 12. Porcentaje de letalidad de leucocitos de humanos (*Homo sapiens*) y de tursiones (*Tursiops truncatus*) en probits graficado contra la concentración (expresada en logaritmo base 10 de lipopolisacáridos (LPS)). Valores obtenidos con el análisis de exclusión con azul de tripano (n=9). Se muestra la concentración en la cual muere el 22% de la población celular (CL₂₂) en línea punteada.

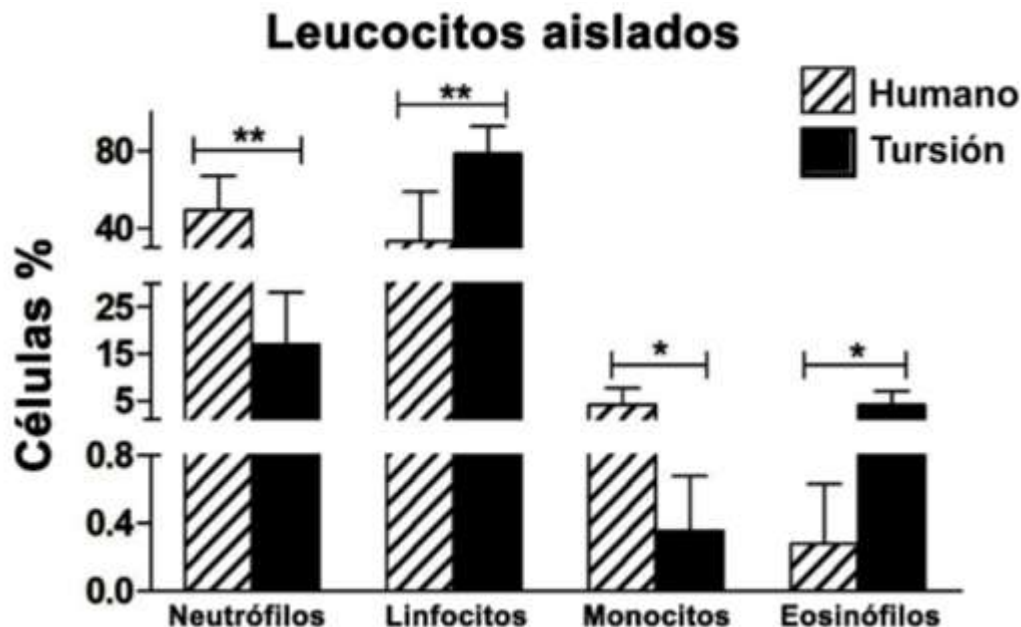


Figura 13. Porcentaje celular determinado por citometría de flujo de leucocitos aislados de muestras de sangre humana (*Homo sapiens*) y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n=5-8). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; prueba t no pareada).

7.8 Expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria

En las figuras 14 y 15 se presentan los resultados de la expresión relativa de los genes que codifican para las citocinas (*IL-1 β* , *TNF- α* e *IL-6*) y *HMOX1* en leucocitos de humano y tursión expuestos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS (tratamiento) y sin LPS (control) por 24 y 48 horas, utilizando la expresión de *GAPDH* como referencia; se indica la media \pm desviación estándar. En leucocitos humanos, la expresión relativa de *IL-1 β* en condiciones control a las 24 h fue de 1 ± 0.65 , mientras que después de la exposición a LPS durante 24 h fue de 97.5 ± 57.2 (aumento significativo de 96 veces; prueba t de Welch, $p=0.0002$), mientras que a las 48 h la media fue de 0.64 ± 0.41 y 43.9 ± 31 para el grupo control y el grupo tratado con LPS, respectivamente (aumento significativo de 61 veces, prueba t de Welch, $p=0.005$). La expresión de *TNF- α* a las 24 h en condiciones control fue de 1 ± 0.54 , mientras que a las 24 h de exposición a LPS fue de 2.85 ± 1.1 (aumento significativo de ~ 2 veces, prueba de comparación de medias de Tukey, $p < 0.001$) y a las 48 h los valores fueron 1 ± 0.62 y 2.45 ± 1.24 para el grupo control y el tratamiento con LPS, respectivamente (aumento significativo de ~ 1 vez, prueba de comparación

de medias de Tukey, $p=0.008$). La expresión de *IL-6* a las 24 h fue de 0.77 ± 0.68 en condiciones control y 0.76 ± 0.12 al tratarlas con LPS; y a las 48 h la media del grupo control fue de 0.78 ± 0.67 mientras que al ser expuesto a LPS fue de 2.21 ± 0.61 (aumento significativo de ~ 3 veces, prueba de comparación de medias de Tukey, $p<0.001$) al ser expuestos a LPS. Finalmente, la expresión de *HMOX1* en condiciones control a las 24 h fue de 0.85 ± 0.54 y al ser expuestos a LPS la media fue de 0.8 ± 0.6 , mientras que a las 48 h fue de 0.8 ± 0.64 y 0.45 ± 0.4 , control y LPS, respectivamente.

En leucocitos de tursión los niveles de *IL-1 β* fueron de 1 ± 0.7 y 2.4 ± 0.43 para el grupo control y LPS respectivamente a las 24 h (aumento significativo de 1.4 veces, prueba de comparación de medias de Tukey, $p=0.0002$); y a las 48 h la expresión en el grupo control fue de 1 ± 0.37 y el grupo expuesto a LPS fue de 1.62 ± 0.14 . La expresión de *IL-6* a las 24 h fue de 1 ± 0.56 y 3.64 ± 2.01 respectivamente para el grupo control y el tratado con LPS (aumento significativo de ~ 1 vez, prueba t de Welch, $p=0.008$); mientras que a las 48 h, la expresión de *IL-6* fue de 0.02 ± 0.03 en el grupo control y 0.13 ± 0.2 para el grupo tratado con LPS. Los niveles de expresión de *TNF- α* a las 24 h en condiciones control fueron 1 ± 0.37 y para el grupo tratado con LPS fueron 1.11 ± 0.38 ; mientras que la expresión a las 48 h fue de 0.86 ± 0.29 y 0.94 ± 0.38 para el grupo control y el tratado con LPS, respectivamente. Por último, la expresión de *HMOX1* a las 24 h fue de 1 ± 0.39 y 0.2 ± 0.08 en el grupo control y el tratado con, LPS respectivamente (disminución de ~ 1 vez, prueba de comparación de Tukey, $p=0.006$); mientras que a las 48 h fue de 0.99 ± 0.9 para el grupo control y 0.43 ± 0.23 para el grupo con LPS. Estos resultados muestran que la exposición al LPS aumenta la expresión de citocinas en los leucocitos humanos, mientras que esta respuesta es atenuada en los leucocitos de tursión.

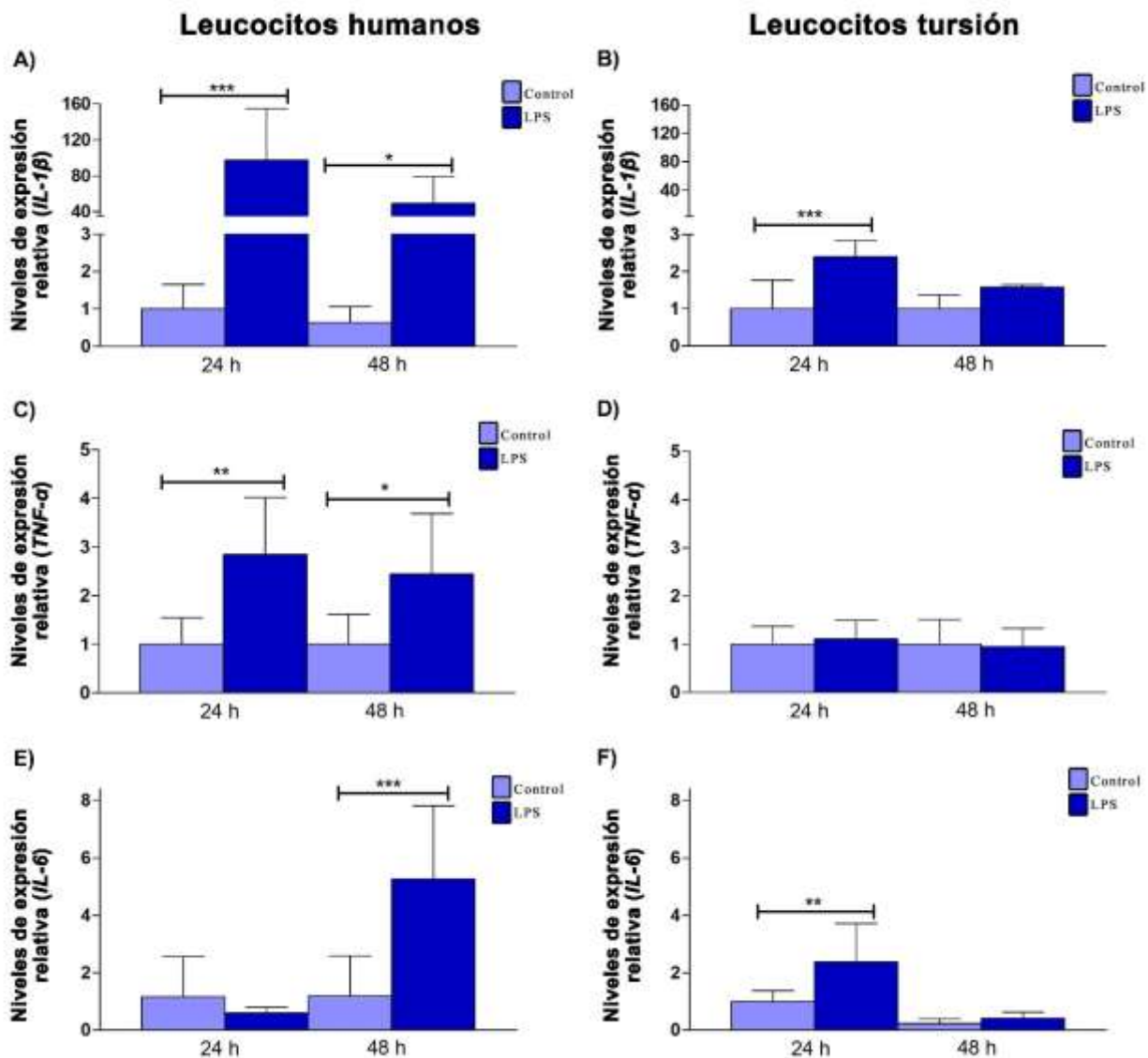


Figura 14. Expresión relativa de interleucina 1 β (*IL-1 β*), Factor de Necrosis Tumoral (*TNF- α*), e interleucina 6 (*IL-6*) en leucocitos de humanos (A, C y E; *Homo sapiens*) y tursiones (B, D y F; *Tursiops truncatus*) en respuesta a la exposición a lipopolisacárido (LPS, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y sin LPS (control) por 24 y 48 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Las barras representan las medias y las líneas la desviación estándar (n = 3-6). Los asteriscos (*) denotan diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba de comparación múltiple de Tukey o prueba t de Welch).

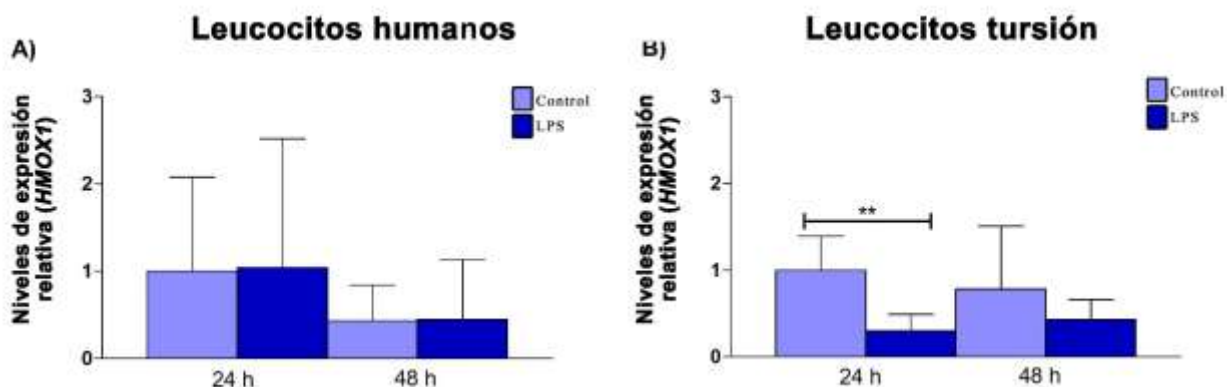


Figura 15. Expresión relativa de hemo oxigenasa 1 (*HMOX1*) en leucocitos de humanos (A; *Homo sapiens*) y tursiones (B; *Tursiops truncatus*) en respuesta a la exposición a lipopolisacárido (LPS, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) y sin LPS (control) por 24 y 48 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Las barras representan las medias y las líneas la desviación estándar ($n = 4-6$). * denota diferencias significativas entre tratamientos (** $p < 0.01$; prueba de comparación múltiple de Tukey).

7.9 Actividad de hemo oxigenasa en leucocitos

Los valores de absorbancia obtenidos a 464 nm fueron graficados en función al tiempo para obtener la pendiente. Los valores de la reacción blanco (sin muestra) fueron sustraídos a los valores de las muestras. Se calcularon los valores de actividad de HO de muestras de leucocitos de humanos y tursiones con LPS y control (sin LPS) a las 24 y 48 horas (Fig. 16). La actividad de HO se detectó en todas las muestras analizadas sin importar tratamiento o especie; la actividad es expresada como nano moles de bilirrubina mg^{-1} de proteína hora^{-1} y se indica la media \pm desviación estándar de la actividad. En leucocitos de humano los valores de actividad a las 24 h fueron 8.02 ± 4.01 y 8.38 ± 3.76 para los grupos control y tratados con LPS, respectivamente; mientras que a las 48 h fueron 6.18 ± 2.81 y 8.05 ± 4.51 , control y LPS, respectivamente. En leucocitos de tursión a las 24 h la actividad fue de 4.7 ± 1.14 para el grupo control y 5.95 ± 2.2 para el grupo tratado con LPS; mientras que a las 48 h el grupo control tuvo valores de actividad de 9.47 ± 3.95 y el grupo tratado con LPS fue de 15.41 ± 9.62 (aumento significativo de ~ 1 vez, comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima de Fisher, $p=0.01$).

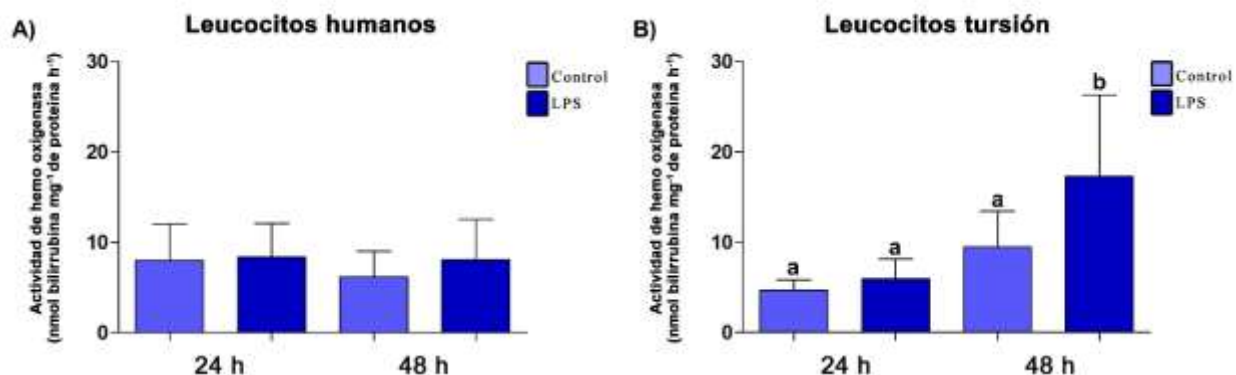


Figura 16. Actividad de hemo oxigenasa en leucocitos aislados de humanos y tursiones expuestos a un reto proinflamatorio. Las barras representan la media (n=6-7) y las líneas la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$; prueba de la diferencia mínima de Fisher). LPS, lipopolisacárido.

7.10 Ensayos ELISA de citocinas utilizando leucocitos aislados estimulados con LPS

Dado que la expresión de citocinas proinflamatorias aumentó de forma diferencial en presencia de LPS en leucocitos humanos y de delfines, se utilizó un ensayo ELISA específico para determinar si la estimulación con LPS también aumentaba las citocinas a nivel de proteína (Fig. 17); se indica la media \pm desviación estándar a partir de la concentración en pg/mL para humanos y ng/mL para tursiones (solo textualmente). En los leucocitos humanos, los niveles de IL-1 β a las 24 h fueron 4.01 ± 1.86 para el grupo control y 38.8 ± 20 para el grupo tratado con LPS (aumento significativo de 9 veces, prueba t de Welch, $p=0.009$) y a las 48 h, los niveles del grupo control fueron de 2.44 ± 0.87 mientras que los del grupo tratado con LPS fueron de 22.36 ± 11.2 (aumento significativo de 8 veces, prueba t de Welch, $p=0.004$). Para TNF- α los niveles a las 24 h control y LPS fueron de 118.4 ± 12.6 y 134.72 ± 22.5 , respectivamente; mientras que a las 48 h fueron de 134.4 ± 19.54 y 143.2 ± 20.95 , control y LPS, respectivamente. Los niveles de IL-6 a las 24 h fueron de 31.1 ± 8.11 y 26.81 ± 6.33 para el grupo control y el grupo tratado con LPS respectivamente; mientras que a las 48 h los niveles fueron de 32.23 ± 6.9 y 32.74 ± 7.75 , control y LPS, respectivamente. En células de tursión, los niveles de IL-1 β a las 24 h fueron 12.89 ± 5.04 y 22.61 ± 10.51 , control y LPS respectivamente (aumento significativo de 1 vez, prueba t de Welch, $p=0.01$). Los niveles de TNF- α a las 24 h en el grupo control fueron de 2.56 ± 0.38 y para el grupo con LPS fueron de 2.61 ± 0.67 ; y a las 48 h, los niveles de TNF- α fueron 2.98

± 0.69 y 2.91 ± 0.71 para el grupo control y el grupo tratado con LPS, respectivamente. Finalmente, los niveles de IL-6 a las 24 h control fueron 6.18 ± 0.91 y de 24 h LPS fueron 5.87 ± 1.02 ; mientras que a las 48 h el grupo control fue de 4.71 ± 0.49 y en el grupo tratado con LPS fue de 5.36 ± 0.96 .

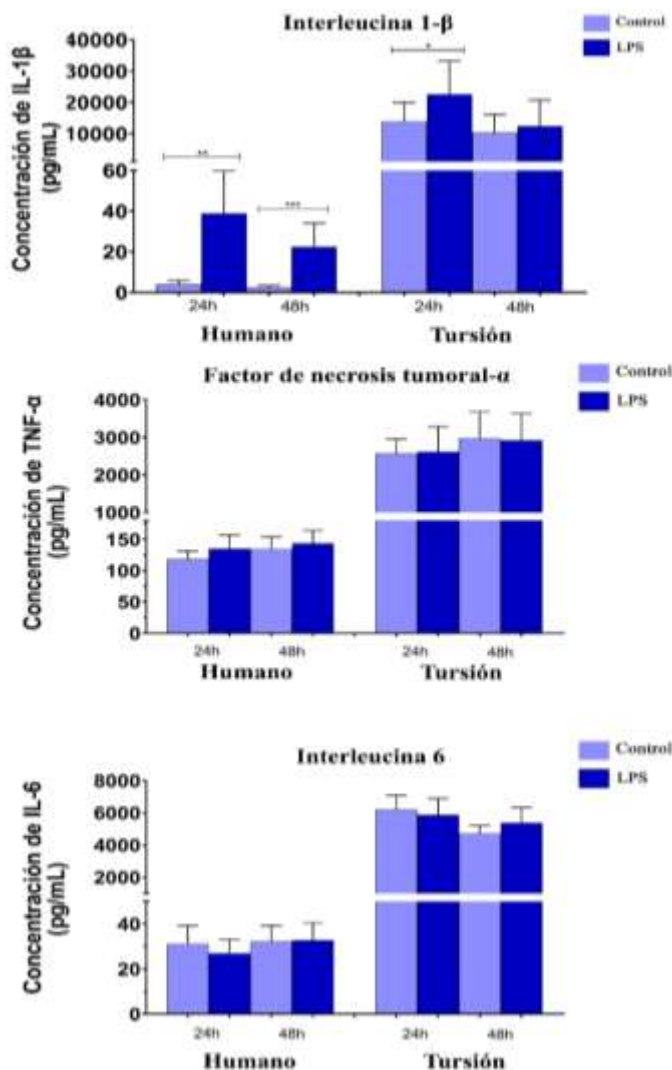


Figura 17. Niveles de citocinas (pg/mL) en leucocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*) estimulados con LPS ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 o 48 h. Las muestras se analizaron en un ensayo ELISA específico para cada especie. Interleucina (IL)-1 β , Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α e IL-6 como se describe en materiales y métodos. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar ($n= 5-7$). Los asteriscos (*) denotan diferencias significativas entre tratamientos (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; prueba t no pareada). Control = sin exposición a LPS.

8. DISCUSIÓN

8.1 Elementos reguladores en el gen de la hemo oxigenasa-1 del tursión

La expresión de HO-1 se controla principalmente a nivel de transcripción (Choi y Alam, 1996). Por ello, se analizaron las secuencias primarias de hemo oxigenasa 1 de diversas especies para determinar la presencia de secuencias de unión a factores de transcripción utilizando herramientas bioinformáticas. Estudios previos reportan secuencias de unión en mamíferos terrestres para AP-1, AP-2, NFκB, HSF y factor-2 relacionado con NF-E2, que regulan positivamente a *HMOX1* (Lavrovsky *et al.*, 1994; Inamdar *et al.*, 1996). Además de esas secuencias, en el presente estudio se encontró una secuencia de unión para STAT1: STAT2 en la *HMOX1* del tursión, similar a la reportada para la *HMOX1* de rata (Lee *et al.*, 2000). El factor de transcripción STAT actúa como un transductor de señales en el citoplasma y como activador de la transcripción en el núcleo cuando las células encuentran citocinas (Kisseleva *et al.*, 2002). La fosforilación de STAT1 y STAT2 da como resultado heterodímeros con el factor regulador de interferón 9 e induce la expresión de genes estimulados por interferón (Stark *et al.*, 1998), como la proteína quimioatrayente de monocitos (Kopydlowski *et al.*, 1999) y la monocina inducida por interferón-γ (Hiroi y Ohmori, 2003). Adicionalmente, se encontró una secuencia de unión para CTCF en la levadura (*S. cerevisiae*), en la rana africana (*Xenopus laevis*) y en los cetáceos analizados en este estudio. El factor de transcripción CTCF controla la activación, represión y silenciamiento de diversos genes (Chernukhin *et al.*, 2007; Ohlsson *et al.*, 2010). En ratones transgénicos, CTCF ha sido asociado con la caja E proximal del gen de HO-1 (Kim *et al.*, 2012).

8.2 Conservación de las secuencias y estructuras de hemo oxigenasa-1 de mamíferos

La HO-1 es una enzima integral del retículo endoplásmico liso, con una región transmembranal en el extremo C-terminal que le permite anclarse en el retículo endoplásmico (Kikuchi *et al.*, 2005). Esta región, compuesta por una secuencia hidrofóbica, está conservada entre todas las

especies de mamíferos analizadas en este estudio. En células expuestas a hipoxia, HO-1 se ha encontrado en la fracción nuclear, con un peso molecular de 28 kDa y truncada, con 52 aminoácidos menos en el extremo C-terminal (Lin *et al.*, 2007); aunque no muestra actividad enzimática, es asociada con la activación de la AP-1 (factor de transcripción involucrado en la proliferación celular) (Lin *et al.*, 2008) y de la protección antioxidante mediante un aumento en la producción de glutatión (Hori *et al.*, 2002). Se ha encontrado una mayor concentración de glutatión en la sangre de mamíferos marinos en comparación con mamíferos terrestres (Vázquez-Medina *et al.*, 2007) y, dado que los mamíferos marinos están más expuestos a eventos hipóxicos desencadenados por la I/R asociada al buceo, es posible que una HO-1 truncada también sirva como factor de transcripción en estos animales.

Las estructuras secundarias, como las hélices α , son esenciales para la función de una proteína y cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos puede alterar su naturaleza. Las estructuras de la HO-1 del tursiÓN y del humano presentan un nivel de identidad del 82.6%, dejando espacio para cambios conformacionales en su estructura, como sugiere el número de sustituciones de aminoácidos. La disposición y las propiedades de los aminoácidos son clave para la función de una proteína (Pál *et al.*, 2006); una sola mutación puede alterar la función y la estructura de la proteína. Por ejemplo, dentro del dominio de glicina de la HO-1, la mutación de Gly-139 o Gly-143 resulta en la pérdida de la actividad oxigenasa (Liu *et al.*, 2000). En el presente estudio, no se encontró el dominio de glicina en la HO-1 de la levadura, moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*) ni *Arabidopsis*; similar a lo reportado en *D. melanogaster* y *A. thaliana*, donde la glicina-139 es reemplazada por alanina (Davis *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004), lo que sugiere que la estructura del 'bolsillo del grupo hemo' en estas especies es diferente.

Se determinó la presencia de cisteína en la mayoría de las secuencias aminoacídicas de HO-1 de eucariotas analizadas en el presente estudio; sin embargo, no se encontró cisteína en las HO-1 de primates y mamíferos marinos. Este aminoácido (cisteína) parece estar bajo una constante presión evolutiva, y es considerado una adición tardía al código genético (Trifonov, 2004). La

cadena lateral (grupo R) de la cisteína reacciona en condiciones de estrés (como en la presencia de patógenos) con un aumento en los niveles de moléculas oxidantes (Shenton y Grant, 2003); por lo tanto, una proteína inducible por estrés, como HO-1, podría beneficiarse de la falta de un aminoácido sensible a los compuestos oxidantes.

8.3 Interacciones en el sitio activo

En el presente estudio, se analizaron las interacciones del grupo hemo con residuos en el sitio activo (Fig. 5). Aunque, en general, la estructura del sitio activo de la HO-1 del tursión no muestra diferencias notables con aquella del humano, en una inspección puntual se encontraron cambios en la rotación de varios aminoácidos. Estos cambios en la rotación del plano podrían estar involucrados en la conformación de los aminoácidos del sitio activo, proveyéndole de una mayor actividad enzimática. Aunque el cambio de Ala a Thr (posición 133) en el tursión es una sustitución conservada, la cadena lateral de alanina no es reactiva, por lo que rara vez participa en la función de la proteína; en contraste, la treonina tiene un grupo hidroxilo bastante reactivo y es un aminoácido común en los centros funcionales de las proteínas (Barnes, 2007).

En el presente estudio, se determinó que los residuos Lys-18, Lys-22, Lys-179 y Arg-183 en la estructura de la HO-1 del tursión tienen una rotación diferente a la del humano (Fig. 7). El grupo hemo tiene tres propionatos que ayudan a orientarlo y posicionar el carbono α -meso para la hidroxilación; su interacción a través de un puente de hidrógeno facilita esta hidroxilación (Schuller *et al.*, 1999). Los propionatos del grupo hemo pueden influir en las propiedades electrónicas de la proteína (Guallar y Olsen, 2006). La regioselectividad de HO-1 se debe a la rotación del grupo hemo, y su configuración está dictada por los residuos básicos cerca del sitio de propionato, Lys-18, Lys-22, Lys-179 y Arg-183 (Kikuchi *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio podrían indicar diferencias en las propiedades electrónicas y en la regioselectividad de la HO-1 del tursión en comparación con la del humano. Aunque la Lys-18 del tursión tiene una interacción más cercana con el propionato que la Lys-18

del humano, esto debe interpretarse con cautela ya que se ha demostrado la flexibilidad del bolsillo del hemo (Schuller *et al.*, 1999; Wilks, 2002) y, hasta la fecha, no hay evidencia de la estructura cristalográfica de la HO-1 en ninguna especie de cetáceos.

8.4 Presión selectiva en la evolución molecular de hemo oxigenasa-1 del *Tursiops truncatus*

La tasa evolutiva de las proteínas no es uniforme, incluso en un grupo como los mamíferos. Los cetáceos son uno de los linajes de mamíferos con adaptaciones más extensas a las condiciones ambientales (Thewissen y Bajpai, 2001). Existe evidencia de una tasa evolutiva acelerada en la mioglobina de los cetáceos (Nery *et al.*, 2013), lo que sugiere un régimen selectivo para adaptarse a las demandas en el medio acuático. Aunque el registro fósil de Cetacea proporciona un claro ejemplo de macroevolución, destacando la transición adaptativa del estilo de vida terrestre al acuático, en los delfines modernos, como en el género *Tursiops*, hay evidencia de una radiación rápida con la mayor parte de su divergencia dentro del Pleistoceno (2.58 Ma – 117 mil años atrás). En el presente estudio, se construyó un árbol filogenético con las secuencias reportadas de la HO-1 de 24 especies de mamíferos; como era de esperar, se dividieron en distintos órdenes o superórdenes. Los nodos internos representan los ancestros comunes más recientes de al menos dos linajes evolutivos. Se estimó un ancestro común de los cetáceos y el cerdo común (67.4 millones de años), aproximadamente 10 millones de años antes de la transición de los cetáceos de la tierra al mar (Thewissen *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la evidencia de selección positiva se detectó mediante dos métodos. Aunque los sitios con selección positiva están dentro de una configuración de hélice- α , parece que no hay cambios notables en la configuración de la proteína entre las especies analizadas. Además, al comparar cetáceos y primates, se determinó una mayor evidencia de selección purificadora para ambos grupos, lo que indica una conservación evolutiva de la estructura de la secuencia codificante. La selección purificante (negativa) favorece un exceso de sustituciones sinónimas *versus* no sinónimas, evitando el cambio de un aminoácido, eliminando así

mutaciones deletéreas (Monteiro *et al.*, 2010). En conjunto, los procesos de selección positiva y negativa son parte de la selección natural.

En los cetáceos, se han identificado genes bajo selección positiva, como la hemoglobina y mioglobina (involucrados en el transporte del oxígeno), así como genes involucrados en la regulación de la vasoconstricción, como la endotelina y la arginina vasopresina; todos ellos, genes relacionados con la tolerancia a la hipoxia (Tian *et al.*, 2016). Además, se han determinado adaptaciones moleculares (en función de los cambios correspondientes en los conjuntos de propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos) en el gen del *citocromo b* de cetáceos (McClellan *et al.*, 2005). En conjunto, parece que el genoma de los cetáceos está bajo una presión selectiva que resulta en una evolución adaptativa a un estilo de vida acuático. Diversos autores sugieren que los mamíferos marinos tienen adaptaciones moleculares al estrés oxidativo y a la inflamación asociados a eventos de hipoxia e I/R (Allen y Vázquez-Medina, 2019; Hindle, 2020). Esta adaptación al estrés oxidativo e inflamación puede deberse a los genes que codifican para HIF-1 (Johnson *et al.*, 2005; Bi *et al.*, 2015), el sistema glutatión (Yim *et al.*, 2014), peroxiredoxinas (Zhou *et al.*, 2018), hemoglobina y mioglobina (Nery *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2016).

8.5 Viabilidad de leucocitos por exposición a lipopolisacárido *in vitro*

En mamíferos, los leucocitos son activados por los componentes de la superficie de patógenos, como bacterias y hongos (Medzhitov y Janeway, 1997). Entre estos componentes se encuentra el lípido A de la membrana celular de bacterias Gram negativas, que activa el TLR4. Este receptor inicia la síntesis de diversos mediadores de inflamación, incluyendo TNF- α e IL-1 β (Dinarello, 1991; Beutler y Cerami, 2003). Este proceso incrementa la producción y liberación de ERO como parte de la acción microbicida de los neutrófilos (Itou *et al.*, 2002; Keogh *et al.*, 2011). La letalidad de leucocitos de humanos expuestos *in vitro* a α -hemolisina (toxina bacteriana con capacidad lítica) fue del 85% en los primeros 15 minutos de exposición, mientras que en condiciones control (sin la toxina) la viabilidad permaneció estable (Cavaliere y Snyder,

1982). Sin embargo, en el presente estudio, la letalidad por exposición a LPS fue menor al 30%, por lo que se puede suponer que, aunque sea una sustancia que desencadena diversas reacciones, su citotoxicidad es baja.

Aunque el LPS regula la supervivencia de los neutrófilos al retrasar la apoptosis (Colotta *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993) y aumentar la migración espontánea (Boribong *et al.*, 2019), que es crucial para encontrar el sitio de infección, también induce la apoptosis de linfocitos (Geatch *et al.*, 1999); además, factores como el tiempo de exposición y la dosis afectan la viabilidad celular (Sabroe *et al.*, 2002). Adicionalmente, TNF- α participa en la inhibición de la eferocitosis de los neutrófilos, lo cual es crucial para la resolución de la inflamación (McPhillips *et al.*, 2007). También, la exposición a LPS, TNF- α o la IL-1 β exógenas pueden prevenir la apoptosis de monocitos, lo que sugiere que la apoptosis está regulada por ciertas citocinas liberadas por los monocitos estimulados con LPS (Mangan *et al.*, 1991). En ausencia de una estimulación adecuada, los monocitos están programados para sufrir una secuencia de eventos moleculares que conducen a la muerte celular.

En el presente estudio, la exposición a LPS disminuyó la viabilidad celular en leucocitos humanos y de tursión en un grado similar, lo que sugiere que las diferencias observadas en la expresión, y los niveles de citocinas y la actividad de HO no resultan de diferencias en la viabilidad celular. Adicionalmente, los resultados obtenidos demuestran una composición celular específica en leucocitos aislados de humanos y tursiones, así como respuestas diferenciales a la estimulación con LPS. Los neutrófilos del delfín nariz de botella comprenden hasta ~70% de los glóbulos blancos circulantes en especímenes adultos, mientras que los linfocitos hasta ~40%, los eosinófilos ~30% y los monocitos solo hasta ~10% (Lahvis *et al.*, 1993; Goldstein *et al.*, 2006; Schwacke *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan en cierta manera con nuestros hallazgos, con la excepción del recuento de linfocitos, siendo el más elevado entre la subpoblación de leucocitos de delfines, seguidos de los neutrófilos y los eosinófilos. A la fecha no se han reportado linfocitos como el leucocito más abundante en muestras de sangre de tursión.

En humanos, los neutrófilos pueden comprender hasta ~70% de los leucocitos en circulación, y una vez activados por patógenos u otros estímulos, aumentan su capacidad para migrar al sitio de infección y su capacidad de fagocitar patógenos (Amulic *et al.*, 2012; Lehman y Segal, 2020). A su vez, los neutrófilos son mediadores de la inflamación produciendo citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α , entre otras, las cuales pueden activar otros tipos de células inmunes y otros neutrófilos (Cassatella, 1999). Adicionalmente, los neutrófilos pueden reclutar monocitos e incrementar su fagocitosis (Soehnlein *et al.*, 2009), los cuales pueden realizar funciones proinflamatorias liberando citocinas en respuesta a LPS (Cros *et al.*, 2010). Por lo tanto, una mayor proporción de neutrófilos y monocitos en las muestras humanas en comparación de tursiones parecen indicar una respuesta inflamatoria clásica en humanos y contribuyen a explicar la respuesta atenuada en delfines.

La neutrofilia es característica en las primeras etapas de la inflamación; sin embargo, para evitar el daño celular debido a la acumulación de ERO y proteasas, los neutrófilos pueden ser reemplazados por monocitos y linfocitos después de 24 a 48 horas (Scheller *et al.*, 2011). La vida media de los neutrófilos puede ser prolongada en presencia de interferón- γ liberado por linfocitos-T (Ellis y Beaman, 2004) e IL-17 (liberada por el subtipo Th17), el cual puede incrementar la granulopoesis y el reclutamiento de neutrófilos (Ouyang *et al.*, 2008). Adicionalmente, los linfocitos-T pueden activarse en respuesta al LPS estando en contacto con monocitos (Mattern *et al.*, 1994, 1999).

La respuesta inflamatoria en un modelo clásico de daño por I/R es mediada principalmente por neutrófilos en una etapa temprana (Linfert *et al.*, 2009) y monocitos y macrófagos infiltrándose después, extendiendo la etapa temprana (Ysebaert *et al.*, 2000). Los linfocitos-B y T pueden participar como mediadores en el daño por I/R (Linfert *et al.*, 2009). Sin embargo, los linfocitos pueden participar en la recuperación del daño ocasionado por I/R. En ratones deficientes de linfocitos-CD4 con isquemia de extremidades, su recuperación fue tardía y acompañada de atrofia muscular y fibrosis en comparación con ratones que expresaban linfocitos-CD4 (Stabile *et al.*, 2003). Adicionalmente, la supresión de linfocitos-T reguladores aumentan los índices

necróticos en un modelo de daño por I/R en riñón de ratones (Midory *et al.*, 2006). Finalmente, una mayor proporción de linfocitos en las muestras de tursiones en comparación con las muestras de humanos determinadas en este estudio, parece indicar una respuesta inflamatoria diferencial; sin embargo, se debe realizar un ensayo de proliferación para determinar qué tipo de linfocito fue detectado y en qué proporción en la sangre de tursiones.

En el presente estudio, el porcentaje de eosinófilos en tursiones fue mayor que en las muestras humanas, y aunque un aumento en el conteo de eosinófilos en sangre se ha relacionado con infecciones helmínticas, también se ha reportado en etiologías bacterianas (Tefferi, 2005). Además, se ha asociado un recuento elevado de eosinófilos con una disminución de la proliferación de linfocitos en tursiones expuestos a toxinas de algas (Schwacke *et al.*, 2010). La respuesta de los eosinófilos a LPS es contradictoria, con expresión de TNF- α , IL-8 y proteína catiónica de eosinófilos (Takanaski *et al.*, 1994; Plötz *et al.*, 2001), pero también falta de respuesta a LPS en eosinófilos de humanos (Sabroe *et al.*, 2002). Por último, dado que los glóbulos blancos se componen de diferentes tipos subcelulares, es importante determinar su perfil de subpoblación, ya que los cambios en la composición de los leucocitos pueden alterar significativamente la expresión génica general (Morey *et al.*, 2016), y debido a que el perfil leucocitario fue significativamente diferente entre especies, esto puede tomarse como una fuente de variación en la respuesta inflamatoria.

8.6 Los leucocitos de *Tursiops truncatus* muestran una respuesta de citocinas atenuada al exponerse a lipopolisacáridos

En el presente estudio, a las 24 horas de exposición a LPS, se determinó un aumento atenuado en la expresión relativa de *IL-1 β* en leucocitos de tursión (cambio de ~ 1 vez) al compararse con la expresión en leucocitos humanos (~ 100 veces). Esto concuerda con un reporte en leucocitos de *T. truncatus* estimulados con $5 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ aislados a partir de dos especies de bacterias (*Salmonella minnesota* y *E. coli*) en el cual se detectó, por medio de RT-PCR, un aumento en la expresión de *IL-1 β* a las 3 horas de exposición (Ohishi *et al.*, 2011). Diversas células inmunes y no inmunes pueden generar y liberar *IL-1 β* como parte de una respuesta rápida a señales

inflamatorias; éste, a su vez, puede actuar como un amplificador de reacciones inmunes (Dinarello, 2014). Entre las señales inflamatorias que inducen la expresión de *IL-1 β* se encuentran los ligandos de TLR, TNF- α , y la *IL-1 β* (en procesos de autoinducción) (Toda *et al.*, 2002). Aunque la *IL-1 β* es requerida para iniciar una respuesta inmune innata y moldear la respuesta inmune adaptativa (Garlanda *et al.*, 2013), una producción excesiva de *IL-1 β* puede contribuir a desarrollar enfermedades autoinmunes (Cordero *et al.*, 2018), promover la inducción y propagación de tumores (Garlanda *et al.*, 2013) e inducir la muerte celular inflamatoria (Kovacs y Miao, 2017).

La expresión relativa de *IL-1 β* a las 48 h de exposición a LPS aumentó significativamente en los leucocitos de humano (61 veces); sin embargo, regresó a niveles basales en los leucocitos de tursión. La actividad inflamatoria de *IL-1 β* puede ser inhibida con la presencia de su receptor antagonista *IL-1ra*, producido por macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Krzesicki *et al.*, 1993; Jenkins y Arend, 1993). En leucocitos de tursión estimulados con LPS, la expresión del *IL-1ra* aumentó en comparación con los leucocitos no estimulados (Ohishi *et al.*, 2011). Además, el *IL-1ra* recombinante de tursión mostró una inhibición significativa de *IL-1 β* (Inoue *et al.*, 2001) mayor que el *IL-1ra* humano (Granowitz *et al.*, 1992); ello respalda la hipótesis de que los leucocitos de tursión poseen mecanismos antiinflamatorios intrínsecos.

Además de *IL-1 β* , LPS induce la secreción de otras citocinas proinflamatorias, incluido TNF- α en leucocitos de mamíferos marinos y terrestres (Eggesbø *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 2014). En el presente estudio, se observó un aumento significativo en la expresión de TNF- α en humanos, pero no en leucocitos de delfines después de la exposición a LPS durante 24 o 48 h. De manera similar, en leucocitos de tursión y del delfín de costados blancos del Pacífico (*Lagenorhynchus obliquidens*) no se detectaron cambios en la expresión de TNF- α al ser estimulados con concavalina A (un mitógeno), mientras que en leucocitos de beluga (*Delphinapterus leucas*), la expresión de TNF- α disminuyó (Sitt *et al.*, 2008). En conjunto, la expresión de TNF- α (iniciada por LPS) parece mantener en mayor medida la respuesta proinflamatoria en humanos que en cetáceos.

En el presente estudio, la expresión de *IL-6* aumentó en leucocitos humanos expuestos a LPS durante 48 horas y en leucocitos de tursión expuestos a LPS durante 24 horas. De manera similar, la expresión de *IL-6* aumentó en leucocitos de tursión expuestos a LPS durante 3 h (Ohishi *et al.*, 2011). Además, se detectó IL-6 en sueros de fase aguda de tursiones y orcas (*Orcinus orca*), pero no en animales sanos (Funke *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren una regulación inflamatoria atípica en los leucocitos de cetáceos. Curiosamente, se observó un aumento en los transcritos de *IL-6* en los leucocitos de delfines adultos con enfermedades crónicas estimulados con un mitógeno en comparación con delfines jóvenes sanos (Hofstetter *et al.*, 2017), lo que implica un papel crucial de la IL-6 en la inflamación crónica. Finalmente, una menor producción de IL-6 en suero de focas de Weddell estimuladas con LPS en comparación con el suero humano (Bagchi *et al.*, 2018) sugiere la presencia de un elemento antiinflamatorio en la sangre de los mamíferos buceadores, lo que respalda los hallazgos del presente estudio. Una elevación en los niveles de IL-6 puede inhibir la liberación de IL-1 β y TNF- α (Akira *et al.*, 1990; Schindler *et al.*, 1990) lo que puede crear un bucle de retroalimentación y terminar con la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, la IL-6 puede regular el cambio de fenotipo de los macrófagos, favoreciendo la producción del fenotipo M2 (antiinflamatorio), involucrado en la reparación de tejidos (Mauer *et al.*, 2015). Por otro lado, la apoptosis de los neutrófilos (debido a su corto tiempo de vida, ya sea *in vivo* o *in vitro*) libera sIL-6R, lo que facilita la cascada de transeñalización. En los leucocitos humanos, el desprendimiento de sIL-6R (debido a la apoptosis de neutrófilos (Scheller *et al.*, 2011)) y el aumento de los niveles de transcripción de IL-6 después de 48 h de exposición a LPS (el presente estudio), podrían tomarse como evidencia de un efecto proinflamatorio a través de la activación de transeñalización.

Las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α son cruciales para el combate de infecciones y el desarrollo de inflamaciones agudas. Sin embargo, en humanos una mala regulación o niveles altos de estas citocinas pueden llevar al desarrollo de tumores y diversas enfermedades al mantener la activación de NF- κ B (Huang *et al.*, 2016) y promover la actividad de la ruta MAPK (Kim y Choi, 2015). Juntos, estos resultados sugieren adaptaciones específicas en la respuesta inflamatoria (a través de la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6) en leucocitos de mamíferos marinos, lo que

apoya la teoría de un mecanismo antiinflamatorio de mamíferos marinos como una estrategia para mitigar el potencial daño causado por la hipoxemia y eventos de I/R asociados al buceo.

8.7 En leucocitos de *Tursiops truncatus* la exposición a LPS incrementa la actividad de hemo oxigenasa

Aunque no se detectó un aumento en la expresión de *HMOX1* inducida por LPS en ninguna de las condiciones analizadas en el presente estudio, la actividad de HO aumentó en los leucocitos de tursión, pero no en los de humanos expuestos a LPS. Hasta donde sabemos, no existen informes previos de actividad de HO en mamíferos marinos. A su vez, las discrepancias entre la expresión génica y la actividad enzimática pueden resultar de modificaciones postraduccionales y estabilidad de la proteína (Glanemann *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2007). Además, un plano diferente de rotación de algunos aminoácidos en el sitio activo de HO-1 de tursión (Reyes-Ramos *et al.*, 2021) puede explicar la diferencia en la actividad de HO entre leucocitos humanos y de tursión sin cambios en los niveles de transcripción. Adicionalmente, se ha reportado en ratones deficientes de HO-1 un aumento en la inflamación y mayor tasa de mortalidad en condiciones de sepsis (Wiesel *et al.*, 2000), mientras que la sobreexpresión de HO-1 provee de protección en eventos de I/R en el hígado de ratón (Poss y Tonegawa, 1997) y disminuye la estabilidad de los transcritos de IL-1 β en macrófagos de ratón (Vitali *et al.*, 2020). Finalmente, la expresión de *HMOX1* se correlacionó positivamente con los niveles de CO y aumentó con la edad y la capacidad de buceo en el músculo esquelético de los elefantes marinos del norte (Piotrowski *et al.*, 2021), lo que sugiere que la HO participa en la citoprotección en mamíferos con capacidad de buceos profundos.

Los enfoques moleculares para dilucidar los mecanismos intrínsecos que confieren tolerancia natural contra el estrés oxidativo y la inflamación en mamíferos marinos incluyen cambios en la secuencia y la actividad transcripcional de HIF-1 (Johnson *et al.*, 2004, 2005; Bi *et al.*, 2015), genes de hemoglobina y mioglobina (Nery *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2016), respuesta de citocinas (Bagchi *et al.*, 2018) y araquidonato 5-lipoxigenasa (Blawas *et al.*, 2021). Aun así, el conocimiento de los mecanismos antiinflamatorios en mamíferos marinos es escaso. En el

presente estudio, reportamos un aumento en la actividad de HO en leucocitos de tursión estimulados con LPS. En mamíferos marinos con capacidad de buceo de profundidad, como el elefante marino (*M. angustirostris*), se han reportado niveles elevados de CO en sangre, lo cual puede provenir de altos niveles de hemoproteínas (Tift y Ponganis, 2019). De esta manera, el nivel elevado de CO (producto de la degradación del grupo hemo) en los mamíferos marinos, puede prevenir el daño tisular causado por ciclos irregulares de I/R (Tift y Ponganis, 2019) y tiene potentes efectos antiinflamatorios (Motterlini y Otterbein, 2010). Por lo tanto, la actividad de HO puede contribuir a la respuesta atenuada de citocinas observada en este estudio. En apoyo de esta idea, la sobreexpresión de HO-1 disminuye la producción de TNF- α en macrófagos de ratón expuestos a LPS (Otterbein *et al.*, 2000; Nakahira *et al.*, 2006), y en esplenocitos de ratones *knock-out* HO-1 se observaron incrementos significativos en los niveles de IL-1, IL-6 y TNF- α al compararlos con esplenocitos que expresaban la HO-1, ambos estimulados con LPS (Kapturczak *et al.*, 2004). Finalmente, se ha reportado que la sobreexpresión de HO-1 y el uso de CO exógeno parecen atenuar la respuesta inflamatoria vascular por inhibición de la expresión de óxido nítrico sintetasa inducible inducida por IL-1 β en células de músculo liso vascular de rata (Yang *et al.*, 2004).

8.8 La exposición a LPS aumenta los niveles de IL-1 β de manera diferencial en leucocitos humanos y de *Tursiops truncatus*

La detección de citocinas (a nivel de proteína) de mamíferos marinos se ha basado, tradicionalmente, en la reactividad cruzada de kits y reactivos disponibles comercialmente entre las especies (Vecchione *et al.*, 2008); sin embargo, estos resultados pueden no mostrar un resultado válido ya que no se ha establecido si la actividad biológica es similar entre las diversas especies de mamíferos marinos y terrestres. Además, independientemente de tener secuencias de aminoácidos similares, la unión de la citocina a su receptor puede verse alterada incluso con pequeñas diferencias en su identidad (Altmann y Kastelein, 1995; Vecchione *et al.*, 2008). Aquí, cuantificamos distintas citocinas con el uso de kits ELISA comerciales específicos.

De manera similar a nuestros resultados obtenidos por RT-qPCR, los niveles de IL-1 β inducidos por LPS en leucocitos de tursión fueron menores en comparación con las células humanas. La IL-1 β juega un papel importante en el inicio de la inflamación y el control de enfermedades infecciosas, y se ha reportado que el LPS es un potente estimulador de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Conti *et al.*, 1991). Además, el IL-1ra recombinante de delfín (drIL-1ra) parece tener una actividad antagonista más alta que el IL-1ra humano, ya que la concentración de IL-1ra requerida para interferir con la actividad del IL-1 es de 10 a 100 veces mayor que la de IL-1 (Granowitz *et al.*, 1992), mientras que una concentración 1:1 del drIL-1ra con IL-1 β inhibe el 50 % de la actividad de IL-1 β en tursión (Inoue *et al.*, 2001). Dado que el LPS aumenta la expresión del IL-1ra en los leucocitos de los tursiones (Ohishi *et al.*, 2011), una respuesta atenuada en los niveles de IL-1 β de los tursiones (este estudio) puede explicarse por una mayor actividad antagonista del IL-1ra de tursión, apoyando aún más la idea de que los leucocitos de tursión poseen mecanismos antiinflamatorios intrínsecos.

La producción de proteína IL-6 parece ser menor en focas en comparación con el plasma humano cuando se estimula con LPS (Bagchi *et al.*, 2018); sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de IL-6 entre tratamientos, aunque IL-6 fue detectado por ensayos ELISA en todas las muestras aquí analizadas. Además, el LPS parece no aumentar los niveles de TNF- α en las dos especies analizadas en este estudio. Curiosamente, en un estudio con PBMC de tres especies de focas estimuladas con LPS, los niveles de IL-6 sólo aumentaron en la foca común (*Phoca vitulina*), por otro lado, los niveles de TNF- α en PBMC de foca común, focas grises (*Halichoerus grypus*) y las focas arpa (*Pagophilus groenlandicus*) no aumentaron (Levin *et al.*, 2014). Se han demostrado discrepancias entre la transcripción y los niveles de citocinas a nivel de proteína (Favre *et al.*, 1997); la expresión de TNF- α parece estar controlada a nivel transcripcional y traduccional, además, TNF- α existe en dos formas bioactivas, la integrada en la membrana y la forma soluble, por lo que, en presencia de TNF soluble, el nivel de expresión de TNF transmembrana se sobrestima cuando se utilizan anticuerpos, ya que el TNF soluble se une a los receptores de TNF dando señales falsas positivas (Gerspach *et al.*, 2000).

En conjunto, parece que la respuesta sostenida de IL-1 β (tanto la transcripción como los niveles de proteína) a LPS en humanos y una mayor actividad de HO en leucocitos de delfines sugieren una respuesta diferencial a un reto proinflamatorio entre mamíferos marinos y terrestres.

8.9 Adaptación a la respuesta inflamatoria como consecuencia del buceo

Los mamíferos marinos experimentan transiciones fisiológicas entre la normoxia y la hipoxia debido al buceo; sin embargo, no presentan efectos dañinos en tejidos expuestos a I/R durante la vasoconstricción periférica que se presenta durante el buceo (Allen y Vázquez-Medina, 2019; Williams y Davis, 2021). Los mamíferos marinos mantienen un metabolismo aeróbico similar al de mamíferos terrestres, aun cuando pasan la mayor parte de su vida con la limitante de la disponibilidad de oxígeno, por lo que sólo pueden respirar periódicamente (Davis, 2019). Entre las adaptaciones de cetáceos, como el tursión, para afrontar las consecuencias de la privación de oxígeno durante el buceo se encuentran la reducción de la tasa metabólica y vasoconstricción selectiva para asegurar la disponibilidad de oxígeno en órganos vitales (Ramirez *et al.*, 2007), así como de una elevada concentración de mioglobina, la cual es una proteína que se une al oxígeno y puede liberarlo en períodos extendidos de hipoxia (Nery *et al.*, 2013). Adicionalmente, los eventos de oscilación en la concentración del oxígeno parecen promover la capacidad antioxidante requerida para contrarrestar el daño oxidativo (Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Zenteno-Savín *et al.*, 2002).

A pesar de las evidencias en las adaptaciones al buceo y al estrés oxidativo en cetáceos como el tursión, la información que se ha generado respecto a la respuesta antiinflamatoria es escasa. Un ejemplo notable es la presencia de compuestos antimicrobianos (p. ej. ácido isovalérico) en la capa de grasa (Koopman *et al.*, 2003), lo cual puede ayudar en la sanación de heridas (Zasloff, 2011). El contacto con microorganismos patógenos, como bacterias, en heridas (p. ej. abrasión, mordidas por depredadores, daño relacionado a la pesca, etc. (Celona *et al.*, 2006; Bossley y Woolfall, 2014)) y la posterior reacción inmune con leucocitos fagocíticos puede contribuir a la

generación de ERO (Robinson, 2009), por lo que la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo se encuentran ligados.

En leucocitos de tursión se ha reportado una mayor concentración del radical superóxido y una mayor actividad de enzimas antioxidantes en presencia de endotoxinas en comparación con leucocitos humanos (Symon *et al.*, 2021), potencialmente como parte de la respuesta inflamatoria para eliminar patógenos y una posterior respuesta antioxidante para mitigar el daño. Por lo que es probable que los leucocitos de tursión tengan una mayor respuesta para eliminar moléculas oxidantes que los leucocitos humanos. Basándonos en estas evidencias y la respuesta atenuada de citocinas proinflamatorias en leucocitos de tursión reportadas en el presente estudio, aunado a una mayor actividad de HO, es probable que la respuesta adaptativa generada tras aproximadamente 50 millones de años de regresar al océano y mantener el metabolismo aeróbico, así como de una resiliencia a la hipoxia, hayan aportado en mejorar la capacidad de terminar con la respuesta inflamatoria, ya sea por medio de una rápida resolución de la inflamación con un mayor metabolismo de O₂, o con una mayor actividad de enzimas antiinflamatorias como la HO.

9. CONCLUSIONES

Se caracterizó la secuencia nucleotídica y aminoacídica de HO-1 del tursión, *T. truncatus*, a partir de secuencias depositadas en GenBank. Se encontraron diversos elementos reguladores en la región proximal de la secuencia nucleotídica. La secuencia aminoacídica se encontró altamente conservada entre diversos órdenes de mamíferos y se modeló su estructura terciaria y su sitio activo. Se determinó evidencia de selección positiva y, con un modelo de predicción, se encontraron aminoácidos pertenecientes al dominio funcional de HO-1 con ángulos de rotación diferentes en comparación con la HO-1 de humano. Aunque la naturaleza inducible de este gen en humanos se ha determinado experimentalmente, no hay evidencia experimental en mamíferos marinos, como el tursión. El uso de las bases de datos públicas del genoma y los programas para el análisis de dichas bases de datos, proporcionan una visión de las estructuras moleculares y la evolución de los genes de los mamíferos marinos, lo que permite generar nuevas hipótesis sobre su naturaleza; con lo cual nos planteamos la hipótesis de que los mamíferos marinos (tursión), poseen una mayor capacidad antiinflamatoria que los mamíferos terrestres (humano).

Se aislaron leucocitos a partir de muestras de sangre de humanos y tursiones, y se determinó su viabilidad a distintas concentraciones de LPS; el tiempo fue un factor determinante para su viabilidad. De igual manera, en leucocitos aislados de humanos y tursiones se determinó el efecto de LPS por medio de ensayos de RT-qPCR para la expresión de los genes *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *HMOX1* y *GAPDH*; se encontró evidencia de una regulación de citocinas inflamatorias en los tursiones. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de las citocinas proinflamatorias *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α* por medio de ensayos de inmunodetección y se determinó que el LPS influye en mayor medida en la producción de *IL-1 β* en leucocitos de humano en comparación con los de tursión.

No hay informes previos de la expresión de *HMOX1* ni de la actividad de HO en mamíferos marinos como el delfín nariz de botella *T. truncatus*. En resumen, una menor respuesta de las

citocinas a un estímulo inflamatorio y un mayor nivel de actividad de HO en los leucocitos de tursión determinados en el presente estudio podrían indicar una mayor respuesta antiinflamatoria. Sin embargo, se necesitan estudios cinéticos que evalúen potenciales cambios en la actividad enzimática de HO-1 de tursiones, y así determinar si la respuesta de resolución inflamatoria ha cambiado con las adaptaciones de esta especie a un estilo de vida acuático.

10. LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular*. 7a ed. Saunders, Barcelona
- Abolins, S., King, E.C., Lazarou, L., Weldon, L., Hughes, L., Drescher, P., Raynes, J.G., Hafalla, J.C.R., Viney, M.E. y Riley, E.M. (2017). The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nature Communications*, 8(1): 14811. doi: 10.1038/ncomms14811
- Abraham, N.G., Alam, J. y Nath, K. (2002). *Heme oxygenase in biology and medicine*. Kluwer Academic, New York. ISBN: 0306472643
- Abraham, N.G. y Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 60(1): 79 LP - 127. doi: 10.1124/pr.107.07104
- Aguirre, A.A. y Tabor, G.M. (2004). Introduction: marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. *EcoHealth*, 1(3): 236-238. doi: 10.1007/s10393-004-0091-9
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T. y Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB*, 4(11): 2860-2867
- Akira, S., Taga, T. y Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. En: *Advances in Immunology*, Academic Press, La Jolla, California, pp 1-78
- Akira, S., Takeda, K. y Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8): 675-680
- Akira, S., Uematsu, S. y Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801
- Allen, K.N. y Vázquez-Medina, J.P. (2019). Natural tolerance to ischemia and hypoxemia in diving mammals: a review. *Frontiers in Physiology*, 10: 1199
- Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V. y Ciliberto, G. (1998). Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 187(4): 461-468. doi: 10.1084/jem.187.4.461
- Altmann, S.W. y Kastelein, R.A. (1995). Rational design of a mouse granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5): 2233-2240. doi: 10.1074/jbc.270.5.2233
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. y Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17): 7915 LP - 7922. doi: 10.1073/pnas.90.17.7915
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. y Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30: 459-489. doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-020711-074942
- Angliss, R.P. y DeMaster, D.P. (1998). Differentiating serious and non-serious injury of marine mammals taken incidental to commercial fishing operations: report of the serious injury workshop, 1-2 April 1997, Silver Spring, Maryland. *US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service*, 13
- Bagchi, A., Batten, A.J., Levin, M., Allen, K.N., Fitzgerald, M.L., Hückstädt, L.A., Costa, D.P., Buys, E.S. y Hindle, A.G. (2018). Intrinsic anti-inflammatory properties in the serum of two species of deep-diving seal. *Journal of Experimental Biology*, 221(13): jeb178491

- Bailey, T.L. y Elkan, C. (1995). The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. *Proceedings - International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 3:21-9. Disponible en: www.aaai.org[consulta:7 de febrero de 2023]
- Bailey, T.L. y Gribskov, M. (1998). Methods and statistics for combining motif match scores. *Journal of Computational Biology*, 5(2): 211-221. doi: 10.1089/cmb.1998.5.211
- Barkhausen, T., Tschernig, T., Rosenstiel, P., van Griensven, M., Vonberg, R-P., Dorsch, M., Mueller-Heine, A., Chalaris, A., Scheller, J. y Rose-John, S. (2011). Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Critical care medicine*, 39(6): 1407-1413
- Barnes, M. (2007). *Bioinformatics for geneticists: A bioinformatics primer for the analysis of genetic data*. Circulation: Cardiovascular Genetics. Wiley, Hoboken, NY.
- Basu, M., Saha, S. y Ukil, A. (2020). Spectrophotometric assessment of heme oxygenase-1 activity in leishmania-infected macrophages. *Bio-protocol*, 10(7): e3578. doi: 10.21769/BioProtoc.3578
- Beattie, M.S., Farooqui, A.A. y Bresnahan, J.C. (2000). Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 17(10): 915-925
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T. y Baltimore, D. (1995). Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes and Development*, 9(22): 2736-2746. doi: 10.1101/gad.9.22.2736
- Beineke, A., Siebert, U., Wohlsein, P. y Baumgärtner, W. (2010). Immunology of whales and dolphins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2-4): 81-94. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.06.019
- Beutler, B. y Cerami, A. (2003). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 505-518 doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57070188002445>.
- Bi, J., Hu, B., Zheng, J., Wang, J., Xiao, W. y Wang, D. (2015). Characterization of the hypoxia-inducible factor 1 alpha gene in the sperm whale, beluga whale, and Yangtze finless porpoise. *Marine Biology*, 162(6): 1201-1213
- Blawas, A.M., Ware, K.E., Schmaltz, E., Zheng, L., Spruance, J., Allen, A.S., West, N., Devos, N., Corcoran, D.L., Nowacek, D.P., Eward, W.C., Fahlman, A. y Somarelli, J.A. (2021). An integrated comparative physiology and molecular approach pinpoints mediators of breath-hold capacity in dolphins. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 9(1): 420-430. doi: 10.1093/emph/eoab036
- Blix, A.S. (2018). Adaptations to deep and prolonged diving in phocid seals. *Journal of Experimental Biology*, 221(12): jeb182972
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R. y Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, 11(2): 529-541. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00051-0
- Bonavida, B. (2014). NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 19(1-2): 21-45. doi: 10.1615/CritRevOncog.2014010804
- Bongartz, T., Sutton, A.J., Sweeting, M.J., Buchan, I., Matteson, E.L. y Montori, V. (2006). Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized

- controlled trials. *Jama*, 295(19): 2275-2285
- Boraschi, D. y Tagliabue, A. (2013). The interleukin-1 receptor family. *Seminars in Immunology*, 25(6): 394-407. doi: 10.1016/J.SMIM.2013.10.023
- Boribong, B.P., Lenzi, M.J., Li, L. y Jones, C.N. (2019). Super-low dose lipopolysaccharide dysregulates neutrophil migratory decision-making. *Frontiers in immunology*, 10: 359
- Bossart, G.D., Romano, T.A., Peden-Adams, M.M., Schaefer, A., McCulloch, S., Goldstein, J.D., Rice, C.D., Fair, P.A., Cray, C. y Reif, J.S. (2014). Clinicoimmunopathologic findings in Atlantic bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* with positive Chlamydiaceae antibody titers. *Diseases of Aquatic Organisms*, 108(1): 71-81. doi: 10.3354/DAO02704
- Bossart, G.D., Romano, T.A., Peden-Adams, M.M., Schaefer, A., McCulloch, S., Goldstein, J.D., Rice, C.D., Saliki, J.T., Fair, P.A. y Reif, J.S. (2011). Clinicoimmunopathologic findings in Atlantic bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* with positive cetacean morbillivirus antibody titers. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(2): 103-112. doi: 10.3354/DAO02410
- Bossley, M.I. y Woolfall, M.A. (2014). Recovery from severe cutaneous injury in two free ranging bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.). *Journal of Marine Animals and Their Ecology*, 7(1): 12-16
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254
- Bradley, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2): 149-160. doi: 10.1002/path.2287
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. y Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663): 1532-1535. doi: 10.1126/SCIENCE.1092385/SUPPL_FILE/BRINKMANN.SOM.PDF
- Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M.K. y Soares, M.P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7): 1015-1026
- Bruce-Allen, L.J. y Geraci, J.R. (1985). Wound healing in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(2): 216-228. doi: 10.1139/f85-029
- Brüne, B. y Ullrich, V. (1987). Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Molecular Pharmacology*, 32(4): 497-504
- Bryant, C. y Fitzgerald, K.A. (2009). Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biology*, 19(9): 455-464. doi: 10.1016/J.TCB.2009.06.002
- Buckley, C.D., Pilling, D., Lord, J.M., Akbar, A.N., Scheel-Toellner, D. y Salmon, M. (2001). Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in Immunology*, 22(4): 199-204. doi: 10.1016/S1471-4906(01)01863-4
- Burns, J.M., Lestyk, K.C., Folkow, L.P., Hammill, M.O. y Blix, A.S. (2007). Size and distribution of oxygen stores in harp and hooded seals from birth to maturity. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 177(6): 687-700. doi: 10.1007/S00360-007-0167-2/METRICS
- Butler, P.J. y Jones, D.R. (1997). Physiology of diving of birds and mammals. *Physiological Reviews*, 77(3): 837-899
- Calippe, B., Douin-Echinard, V., Laffargue, M., Laurell, H., Rana-Poussine, V., Pipy, B., Guéry, J-C., Bayard, F., Arnal, J-F. y Gourdy, P. (2008). Chronic estradiol administration in vivo

- promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology*, 180(12): 7980-7988
- Caminero, A., Comabella, M. y Montalban, X. (2011). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: An ongoing story. *Journal of Neuroimmunology*, 234(1-2): 1-6. doi: 10.1016/J.JNEUROIM.2011.03.004
- Cano, R.L.E. y Lopera, H.D.E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes. En: *Autoimmunity: from bench to bedside* [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>[consulta:6 de febrero de 2023]
- Casha, S., Yu, W.R. y Fehlings, M.G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 103(1): 203-218
- Cassatella, M.A. (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Advances in Immunology*, 73(73): 369-509. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60791-9
- Castellini, M., Elsner, R., Baskurt, O.K., Wenby, R.B. y Meiselman, H.J. (2006). Blood rheology of Weddell seals and bowhead whales. *Biorheology*, 43: 57-69
- Castellini, M.A., Rivera, P.M. y Castellini, J.M. (2002). Biochemical aspects of pressure tolerance in marine mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3): 893-899. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00142-3
- Cavaliere, S.J. y Snyder, I.S. (1982). Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability *in vitro*. *Infection and Immunity*, 36(2): 455-461. doi: 10.1128/IAI.36.2.455-461.1982
- Ceballos, G. y Ehrlich, P.R. (2006). Global mammal distributions, biodiversity hotspots, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51): 19374-19379. doi: 10.1073/PNAS.0609334103
- Celona, A., De Maddalena, A. y Comareto, G. (2006). Evidence of predatory attack on bottlenose dolphin by a great white shark in the mediterranean sea. *Annales: Series Historia Naturalis*, 35: 149-164
- Centelleghé, C., Da Dalt, L., Marsili, L., Zanetti, R., Fernandez, A., Arbelo, M., Sierra, E., Castagnaro, M., Di Guardo, G. y Mazzariol, S. (2019). Insights into dolphins' immunology: Immuno-phenotypic study on mediterranean and atlantic stranded cetaceans. *Frontiers in Immunology*, 10(APR): 888. doi: 10.3389/FIMMU.2019.00888/BIBTEX
- Chernukhin, I., Shamsuddin, S., Kang, S.Y., Bergström, R., Kwon, Y-W., Yu, W., Whitehead, J., Mukhopadhyay, R., Docquier, F., Farrar, D., Morrison, I., Vigneron, M., Wu, S-Y., Chiang, C-M., Loukinov, D., Lobanenkova, V., Ohlsson, R. y Klenova, E. (2007). CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5): 1631-1648. doi: 10.1128/MCB.01993-06/ASSET/BF340787-56FD-4077-A44C-CB786CE7B613/ASSETS/GRAPHIC/ZMB005076574005B.JPEG
- Chia, S., Nagurny, J.T., Brown, D.F.M., Raffel, O.C., Bamberg, F., Senatore, F., Wackers, F.J.T. y Jang, I.K. (2009). Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 103(3): 333-337. doi: 10.1016/J.AMJCARD.2008.09.085

- Chiu, S. y Bharat, A. (2016). Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 21(3): 239. doi: 10.1097/MOT.0000000000000313
- Choi, A.M.K. y Alam, J. (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 15:9-19
- Choi, A.M.K., Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J. y Flavell, R.A. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*, 6(4): 422-428. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/74680%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/74680>
- Chung, S.W., Liu, X., Macias, A.A., Baron, R.M. y Perrella, M.A. (2008). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(1): 239-247
- Coburn, R.F. y Forman, H.J. (1987). The Respiratory System. En: *Handbook of Physiology*, Amer Physiological Society, pp 439-456.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. y Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80 (8): 2012–2020. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V80.8.2012.2012>
- Conti, P., Dempsey, R.A., Reale, M., Barbacane, R.C., Panara, M.R., Bongrazio, M. y Mier, J.W. (1991). Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. *Immunology*, 73(4): 450. Disponible en: [/pmc/articles/PMC1384575/?report=abstract\[consulta:7 de febrero de 2023\]](/pmc/articles/PMC1384575/?report=abstract[consulta:7 de febrero de 2023])
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Carson, W.E. y Caligiuri, M.A. (2000). Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56BRIGHT SUBSET. *Blood*, 96(11 PART II): 3146-3151
- Cordero, M.D., Alcocer-Gómez, E. y Ryffel, B. (2018). Gain of function mutation and inflammasome driven diseases in human and mouse models. *Journal of Autoimmunity*, 91: 13-22
- Corkeron, P.J., Morris, R.J. y Bryden, M.M. (1987). Interactions between bottlenose dolphins and sharks in Moreton Bay, Queensland. *Aquatic Mammals*, 13(3): 109-113
- Craig, P.M., Wood, C.M. y McClelland, G.B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5): R1882-R1892
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.P., D’Cruz, D., Casanova, J.L., Trouillet, C. y Geissmann, F. (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 33(3): 375-386. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2010.08.012
- Curry, B.E. y Smith, J. (1997). Phylogeographic structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): stock identification and implications for management. *Molecular Genetics of Marine mammals Spec Publ*, 3: 247-327
- Czech, W., Krutmann, J., Budnik, A., Schöpf, E. y Kapp, A. (1993). Induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory

- cytokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(4): 417-423. doi: 10.1111/1523-1747.EP12472082
- Davis, R.W. (2019). *Marine mammals: Adaptations for an aquatic life*. 1st ed. Springer Nature, Switzerland. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=J2W-DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR8&ots=2kViQTYNLk&sig=gkQFb4WZ15TsAYKsxCjVBTZBtwU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. [consulta: 7 febrero 2023]
- Davis, S.J., Seong, H.B., Durski, A.M., Walker, J.M. y Vierstra, R.D. (2001). The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiology*, 126(2): 656-669. doi: 10.1104/PP.126.2.656
- Davydov, R.M., Yoshida, T., Ikeda-Saito, M. y Hoffman, B.M. (1999). Hydroperoxy-heme oxygenase generated by cryoreduction catalyzes the formation of α -meso-hydroxyheme as detected by EPR and ENDOR. *Journal of the American Chemical Society*, 121(45): 10656-10657
- Desforges, J-PW., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S. y Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86: 126-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.007>
- Díaz-López, B. (2009). The bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* foraging around a fish farm: effects of prey abundance on dolphins' behavior. *Current Zoology*, 55(4): 243-248
- Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77(8): 1627-1652. doi: 10.1182/BLOOD.V77.8.1627.1627
- Dinarello, C.A. (2014). An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Molecular Medicine*, 20(1): S43-S58
- Dinarello, C.A. y van der Meer, J.W.M. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*, 25(6): 469-484. doi: 10.1016/J.SMIM.2013.10.008
- Dolar, M.L., Suarez, P., Ponganis, P.J. y Kooyman, G.L. (1999). Myoglobin in pelagic small cetaceans. *Journal of Experimental Biology*, 202(3): 227 LP - 236. Disponible en: <http://jeb.biologists.org/content/202/3/227.abstract>
- Dowling, T. y Brown, W. (1993). Population structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) as determined by restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Marine Mammal Science*, 9(2): 138-155
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1): 11-22
- Duckers, H.J., Boehm, M., True, A.L., Yet, S-F., San, H., Park, J.L., Webb, R.C., Lee, M-E., Nabel, G.J. y Nabel, E.G. (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature Medicine*, 7(6): 693-698
- Duignan, P.J., Van Bresse, M-F., Baker, J.D., Barbieri, M., Colegrove, K.M., De Guise, S., De Swart, R.L., Di Guardo, G., Dobson, A. y Duprex, W.P. (2014). Phocine distemper virus: Current knowledge and future directions. *Viruses*, 6(12): 5093-5134
- Edinger, A.L. y Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6): 663-669. doi: 10.1016/J.CEB.2004.09.011
- Eggesbø, J.B., Hjermann, I., Lund, P.K., Joø, G.B., Øvstebø, R. y Kierulf, P. (1994). LPS-induced release of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and sCD14 in whole blood and PBMC from persons with high or low levels of HDL-lipoprotein. *Cytokine*, 6(5): 521-529

- Ellis, T.N. y Beaman, B.L. (2004). Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1): 2-12. doi: 10.1111/J.1365-2567.2004.01849.X
- Fabbri, M., Smart, C. y Pardi, R. (2003). T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(7): 1004-1008. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00037-2
- Fair, P., Schaefer, A., Houser, D., Bossart, G., Romano, T., Champagne, C., Stott, J., Rice, C., White, N. y Reif, J. (2017). The environment as a driver of immune and endocrine responses in dolphins (*Tursiops truncatus*). *PLoS ONE*, 12(5)
- Fair, P.A. y Becker, P.R. (2000). Review of stress in marine mammals. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7(4): 335-354. doi: 10.1023/A:1009968113079
- Favilla, A.B., Horning, M. y Costa, D.P. (2022). Advances in thermal physiology of diving marine mammals: The dual role of peripheral perfusion. *Temperature*, 9(1): 46-66. doi: 10.1080/23328940.2021.1988817/SUPPL_FILE/KTMP_A_1988817_SM5650.PDF
- Favre, N., Bordmann, G. y Rudin, W. (1997). Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods*, 204(1): 57-66. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00033-1
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783-791. doi: 10.1111/J.1558-5646.1985.TB00420.X
- Fialkow, L., Wang, Y. y Downey, G.P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2): 153-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>
- Filella, A., Molina, R. y Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2): 63-71. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
- Finney, D.J. y Tattersfield, F. (1947). Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. *Journal of the Royal Statistical Society*. Disponible en: <https://psycnet.apa.org/record/1948-01467-000>. [consulta: 7 febrero 2023]
- Fondevila, C., Shen, X., Tsuchiyashi, S., Yamashita, K., Csizmadia, E., Lassman, C., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W. y Bach, F.H. (2004). Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*, 40(6): 1333-1341
- Forney, K.A., Cole, T.V.N., Eagle, T., Angliss, R., Long, K., Barre, L., Van, L., Borggaard, A.D., Rowles, T., Norberg, B., Whaley, J. y Engleby, L. (2008). Differentiating serious and non-serious injury of marine mammals report of the Serious Injury Technical Workshop, 10-13 September 2007, Seattle, Washington. doi: 10.25923/JYGT-K217
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R. y Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature Immunology* 2009 10:3, 10(3): 241-247. doi: 10.1038/ni.1703
- Frankenberg-Dinkel, N. (2004). Bacterial heme oxygenases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(5): 825-834
- Friedman, J., Lad, L., Li, H., Wilks, A. y Poulos, T.L. (2004). Structural basis for novel δ -regioselective heme oxygenation in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 43(18): 5239-5245. doi: 10.1021/bi049687g
- Fujii, H., Zhang, X. y Yoshida, T. (2004). Essential amino acid residues controlling the unique regioselectivity of heme oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 126(14): 4466-4467. doi: 10.1021/ja031791i

- Funke, C., King, D.P., McBain, J.F., Adelung, D. y Stott, J.L. (2003). Expression and functional characterization of killer whale (*Orcinus orca*) interleukin-6 (IL-6) and development of a competitive immunoassay. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 93(1-2): 69-79. doi: 10.1016/S0165-2427(03)00055-2
- Gabay, C., Lamacchia, C. y Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 2010 6:4, 6(4): 232-241. doi: 10.1038/nrrheum.2010.4
- Gamble, C., McIntosh, K., Scott, R., Ho, K.H., Plevin, R. y Paul, A. (2012). Inhibitory kappa B kinases as targets for pharmacological regulation. *British Journal of Pharmacology*, 165(4): 802-819. doi: 10.1111/J.1476-5381.2011.01608.X
- Garlanda, C., Dinarello, C.A. y Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6): 1003-1018
- Geatch, D.R., Harris, J.I., Heasman, P.A. y Taylor, J.J. (1999). *In vitro* studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 34(2): 70-78
- Gerspach, J., Götz, A., Zimmermann, G., Kollé, C., Böttinger, H. y Grell, M. (2000). Detection of membrane-bound tumor necrosis factor (TNF): an analysis of tnf-specific reagents. *Microscopic Research and Technique*, 50: 243-250. doi: 10.1002/1097-0029
- Giannoudis, P.V., Harwood, P.J., Loughenbury, P., Van Griensven, M., Krettek, C. y Pape, H-C. (2008). Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 65(3): 646-652
- Giménez, J., De Stephanis, R., Gauffier, P., Esteban, R. y Verborgh, P. (2011). Short communications: Biopsy wound healing in long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). *Veterinary Record*, 168(4). doi: 10.1136/vr.c5284
- Glanemann, C., Loos, A., Gorret, N., Willis, L.B., O'Brien, X.M., Lessard, P.A. y Sinskey, A.J. (2003). Disparity between changes in mRNA abundance and enzyme activity in *Corynebacterium glutamicum*: implications for DNA microarray analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(1): 61-68
- Gleich, G.J. (1990). The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 85(2): 422-436. doi: 10.1016/0091-6749(90)90151-S
- Goldstein, J.D., Reese, E., Reif, J.S., Varela, R.A., McCulloch, S.D., Defran, R.H., Fair, P.A. y Bossart, G.D. (2006). Hematologic, biochemical, and cytologic findings from apparently healthy atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2): 447-454. doi: 10.7589/0090-3558-42.2.447
- Grace, P.A. (1994). Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 81(5): 637-647. doi: 10.1002/BJS.1800810504
- Granowitz, E.V., Clark, B.D., Vannier, E., Callahan, M.V. y Dinarello, C.A. (1992). Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood*, 79(9): 2364-2369. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V79.9.2364.2364>
- Guallar, V. y Olsen, B. (2006). The role of the heme propionates in heme biochemistry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(4): 755-760
- Guasti, L., Dentali, F., Castiglioni, L., Maroni, L., Marino, F., Squizzato, A., Ageno, W., Gianni, M., Gaudio, G., Grandi, A.M., Cosentino, M. y Venco, A. (2011). Neutrophils and clinical

- outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularization: A systematic review on more than 34,000 subjects. *Thrombosis and Haemostasis*, 106(4): 591-599. doi: 10.1160/TH11-02-0096/ID/JR0096-9
- Haimovici, H. (1979). Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: Myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery*, 85(4): 461-468. Disponible en: <http://www.surgjournal.com/article/0039606079900199/fulltext>[consulta:6 de febrero de 2023]
- Hall, A.J., Wells, R.S., Sweeney, J.C., Townsend, F.I., Balmer, B.C., Hohn, A.A. y Rhinehart, H.L. (2007). Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2): 266-277. doi: 10.1016/J.CBPA.2007.04.017
- Heinig, M. y Frishman, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_2): W500-W502. doi: 10.1093/NAR/GKH429
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G. y Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1): 1-20
- Hernandez-Milian, G., Berrow, S., Santos, M.B., Reid, D. y Rogan, E. (2015). Insights into the trophic ecology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Irish waters. *Aquatic Mammals*, 41(2)
- Hershkovitz, P. (1966). Catalog of living whales. *United States National Museum Bulletin*, 246: 1-259
- Hickman, C.P., Roberts, L.S. y Larson, A. (2001). Integrated Principles of Zoology. 11th ed. Mc Graw Hill, New York, USA. doi: 10.1039/b818618a
- Hindle, A.G. (2020). Diving deep: Understanding the genetic components of hypoxia tolerance in marine mammals. *Journal of Applied Physiology*, 128(5): 1439-1446. doi: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.00846.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0052034010002.JPEG
- Hirano, T. (2014). Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. *Frontiers in Immunology*, 5: 456
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International Reviews of Immunology*, 16(3-4): 249-284
- Hiroi, M. y Ohmori, Y. (2003). The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF- κ B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon- γ gene. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1): 651-660. doi: 10.1074/jbc.M204544200
- Hiscott, J. (2007). Convergence of the NF- κ B and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18(5-6): 483-490. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2007.06.002
- Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E.S., Brewer, P.G., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V.J., Jung, S., Skirving, W., Stone, D.A., Burrows, M.T., Bell, J., Cao, L., Donner, S., Eakin, C.M., Eide, A., Halpern, B.S., McClain, C.R., O'Connor, M.I., Parmesan, C., Perry, R.I., Richardson, A.J., Brown, C.J., Schoeman, D., Signorini, S.R., Sydeman, W.J., Zhang, R., van Hooidonk, R. y McKinnell, S.M. (2014). The Ocean. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and*

- Vulnerability Part B: Regional Aspects Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, : 1655-1732. Disponible en: <https://munin.uit.no/handle/10037/6969>[consulta:7 de febrero de 2023]
- Hofstetter, A.R., Eberle, K.C., Venn-Watson, S.K., Jensen, E.D., Porter, T.J., Waters, T.E. y Sacco, R.E. (2017). Monitoring bottlenose dolphin leukocyte cytokine mRNA responsiveness by qPCR. *PLoS one*, 12(12): e0189437-e0189437. doi: 10.1371/journal.pone.0189437
- Hori, R., Kashiba, M., Toma, T., Yachie, A., Goda, N., Makino, N., Soejima, A., Nagasawa, T., Nakabayashi, K. y Suematsu, M. (2002). Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12): 10712-10718. doi: 10.1074/jbc.M107749200
- Horie, S. y Kita, H. (1994). CD11b/CD18 (Mac-1) is required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet-activating factor. *The Journal of Immunology*, 152(11): 5457-5467. doi: 10.4049/JIMMUNOL.152.11.5457
- Hotchkiss, R. y Karl, I. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*, 348(1): 38-50
- Hotchkiss, R., Tinsley, K., Swanson, P., Grayson, M., Osborne, D., Wagner, T., Cobb, J., Coopersmith, C. y Karl, I. (2002). Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *Journal of Immunology*, 168(2): 493-500
- Huang, Y., Chen, R. y Zhou, J. (2016). E2F1 and NF- κ B: Key mediators of Inflammation-associated cancers and potential therapeutic targets. *Current Cancer Drug Targets*, 16(9): 765-772. doi: 10.2174/15680096166666160216130755
- Hunter, C.A. y Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5): 448-457
- Inamdar, N.M., Ahn, Y.I. y Alam, J. (1996). The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(3): 570-576. doi: 10.1006/BBRC.1996.0637
- Ingi, T., Cheng, J. y Ronnett, G.V. (1996). Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron*, 16(4): 835-842
- Inoue, Y., Itou, T., Jimbo, T., Syouji, Y., Ueda, K. y Sakai, T. (2001). Molecular cloning and functional expression of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-1 receptor antagonist. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 78(2): 131-141. doi: 10.1016/S0165-2427(00)00263-4
- Irwin, D.M. y Árnason, Ú. (1994). Cytochrome b gene of marine mammals: Phylogeny and evolution. *Journal of Mammalian Evolution*, 2(1): 37-55. doi: 10.1007/BF01464349/METRICS
- Itou, T., Shoji, Y., Shiraishi, R., Sugisawa, H., Endo, T., Inoue, Y. y Sakai, T. (2002). Priming of dolphin neutrophil respiratory burst by recombinant tumor necrosis factor alpha. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(7): 675-679
- Jadhav, A., Torlakovic, E. y Ndisang, J.F. (2008). Interaction among heme oxygenase, nuclear factor- κ B, and transcription activating factors in cardiac hypertrophy in hypertension. *Hypertension*, 52(5): 910-917
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. En: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,

pp 1-13

- Jenkins, J.K. y Arend, W.P. (1993). Interleukin 1 receptor antagonist production in human monocytes is induced by IL-1 α , IL-3, IL-4 and GM-CSF. *Cytokine*, 5(5): 407-415. doi: 10.1016/1043-4666(93)90030-9
- Jia, S-J., Niu, P-P., Cong, J-Z., Zhang, B-K. y Zhao, M. (2014). TLR4 signaling: A potential therapeutic target in ischemic coronary artery disease. *International Immunopharmacology*, 23(1): 54-59
- Johnson, P., Elsner, R. y Zenteno-Savín, T. (2005). Hypoxia-inducible factor 1 proteomics and diving adaptations in ringed seal. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(2): 205-212
- Johnson, P., Elsner, R. y Zenteno-Savín, T. (2004). Hypoxia-inducible factor in ringed seal (*Phoca hispida*) tissues. *Free Radical Research*, 38(8): 847-854
- Jones, D.T., Taylor, W.R. y Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3): 275-282. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/8.3.275
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. y Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38(2): 209-223. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.02.003
- Kapitulnik, J. y Maines, M.D. (2009). Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(3): 129-137. doi: 10.1016/J.TIPS.2008.12.003
- Kapturczak, M.H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T.M., Atkinson, M.A. y Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American Journal of Pathology*, 165(3): 1045-1053. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63365-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63365-2)
- Karin, M. y Ben-neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination : The control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology*, : 621-663
- Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. y Nakanishi, I. (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: The first autopsy case. *Human Pathology*, 33(1): 125-130
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. y Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 2015 10:6, 10(6): 845-858. doi: 10.1038/nprot.2015.053
- Keogh, M.J., Spoon, T., Ridgway, S.H., Jensen, E., Van Bonn, W. y Romano, T.A. (2011). Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4): 468-475. doi: 10.1016/J.VETIMM.2011.08.017
- Keselman, H.J. y Rogan, J.C. (1977). The Tukey multiple comparison test: 1953-1976. *Psychological Bulletin*, 84(5): 1050-1056. doi: 10.1037/0033-2909.84.5.1050
- Kevin, L.G. y Laffey, J.G. (2008). Carbon monoxide from poison to therapy for cardiopulmonary bypass-induced lung injury? *Anesthesiology*, 108(6): 977-978. doi: 10.1097/ALN.0B013E31817302F6
- Keyse, S.M. y Tyrrell, R.M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1): 99-103
- Kikuchi, G., Yoshida, T. y Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation.

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1): 558-567
- Kim, E.K. y Choi, E.J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*, 89(6): 867-882. doi: 10.1007/S00204-015-1472-2/METRICS
- Kim, J., Zarjou, A., Traylor, A.M., Bolisetty, S., Jaimes, E.A., Hull, T.D., George, J.F., Mikhail, F.M. y Agarwal, A. (2012). *In vivo* regulation of the heme oxygenase-1 gene in humanized transgenic mice. *Kidney International*, 82(3): 278-291. doi: 10.1038/KI.2012.102
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. y Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1-2): 1-24. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00398-0
- Koopman, H.N., Iverson, S.J. y Read, A.J. (2003). High concentrations of isovaleric acid in the fats of odontocetes: Variation and patterns of accumulation in blubber vs. stability in the melon. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173(3): 247-261. doi: 10.1007/S00360-003-0329-9/METRICS
- Kooyman, G.L. y Ponganis, P.J. (1998). The physiological basis of diving to depth: Birds and mammals. *Annual Review of Physiology*, 60(1): 19-32. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.19
- Kopydlowski, K.M., Salkowski, C.A., Cody, M.J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T.A. y Vogel, S.N. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 163(3): 1537-1544. doi: 10.4049/JIMMUNOL.163.3.1537
- Kovacs, S.B. y Miao, E.A. (2017). Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends in Cell Biology*, 27(9): 673-684
- Krishnamoorthy, S. y Honn, K.V. (2006). Inflammation and disease progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3): 481-491. doi: 10.1007/S10555-006-9016-0/METRICS
- Krzesicki, R.F., Hatfield, C.A., Bienkowski, M.J., Mccuire, J.C., Winterrowd, G.E., Chapman, D., Berger, A.E., Mcewan, R.N., Carter, D.B., Chosay, J.C., Tracey, D.E. y Chin, J.E. (1993). Regulation of expression of IL-1 receptor antagonist protein in human synovial and dermal fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 150(9): 4008-4018. doi: 10.4049/JIMMUNOL.150.9.4008
- Kumar, P., Halder, S. y Bansal, M. (2019). Biomolecular structures: Prediction, identification and analyses. Academic Press, Oxford, pp 504-534
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M. y Blair Hedges, S. (2017). TimeTree: A resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 34(7): 1812-1819. doi: 10.1093/MOLBEV/MSX116
- Lahvis, G.P., Wells, R.S., Casper, D. y Via, C.S. (1993). *In-vitro* lymphocyte response of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): Mitogen-induced proliferation. *Marine Environmental Research*, 35(1-2): IN3-119. doi: 10.1016/0141-1136(93)90023-S
- Lamkanfi, M. y Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5): 1013-1022. doi: 10.1016/J.CELL.2014.04.007
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Levere, R.D., Kappas, A. y Abraham, N.G. (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13): 5987-5991
- Lee, A., Whyte, M.K.B. y Haslett, C. (1993). Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology*,

54(4): 283-288

- Lee, P.J., Camhi, S.L., Chin, B.Y., Alam, J. y Choi, A.M.K. (2000). AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(1): 23-31. doi: 10.1152/AJPLUNG.2000.279.1.L175/ASSET/IMAGES/LARGE/H50700012007.JPEG
- Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L. y Choi, A.M.K. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9): 5375-5381. doi: 10.1074/jbc.272.9.5375
- Lehman, H.K. y Segal, B.H. (2020). The role of neutrophils in host defense and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(6): 1535-1544. doi: 10.1016/J.JACI.2020.02.038
- Lenfant, C., Johansen, K. y Torrance, J.D. (1970). Gas transport and oxygen storage capacity in some pinnipeds and the sea otter. *Respiration Physiology*, 9(2): 277-286. doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90076-9](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90076-9)
- Levin, M., Romano, T., Matassa, K. y De Guise, S. (2014). Validation of a commercial canine assay kit to measure pinniped cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(1-2): 90-96
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y-H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T. y Gaunitz, F. (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28): 20621-20633
- Lin, Q.S., Weis, S., Yang, G., Zhuang, T., Abate, A. y Dennery, P.A. (2008). Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5): 847-855. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2007.11.012
- Linfert, D., Chowdhry, T. y Rabb, H. (2009). Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplantation Reviews*, 23(1): 1-10. doi: 10.1016/J.TRRE.2008.08.003
- Louis, K.S. y Siegel, A.C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 740: 7-12. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_2/COVER
- Maines, M.D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal*, 2(10): 2557-2568. doi: 10.1096/FASEBJ.2.10.3290025
- Maines, M.D. (1992). Heme oxygenase: clinical applications and functions. 1st ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-288. ISBN: 0849354080
- Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1): 517-554. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517
- Maines, M.D. y Panahian, N. (2001). The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. *Hypoxia. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 502. Springer, Boston, MA
- Mancia, A., Lundqvist, M.L., Romano, T.A., Peden-Adams, M.M., Fair, P.A., Kindy, M.S., Ellis, B.C., Gattioni-Celli, S., McKillen, D.J., Trent, H.F., Ann Chen, Y., Almeida, J.S., Gross, P.S., Chapman, R.W. y Warr, G.W. (2007). A dolphin peripheral blood leukocyte cDNA microarray for studies of immune function and stress reactions. *Developmental & Comparative*

- Immunology*, 31(5): 520-529. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.011>
- Mangan, D.F., Welch, G.R. y Wahl, S.M. (1991). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *The Journal of Immunology*, 146(5): 1541-1546. doi: 10.4049/JIMMUNOL.146.5.1541
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. y Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011 11:8, 11(8): 519-531. doi: 10.1038/nri3024
- Martinon, F., Mayor, A. y Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, 27: 229-265. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol021908132715>
- Martinon, F. y Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 117(5): 561-574. doi: 10.1016/J.CELL.2004.05.004
- Mattern, T., Girroleit, G., Flad, H.D., Rietschel, E.T. y Ulmer, A.J. (1999). CD34+ hematopoietic stem cells exert accessory function in lipopolysaccharide-induced T cell stimulation and CD80 expression on monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 189(4): 693-700. doi: 10.1084/JEM.189.4.693
- Mattern, T., Thanhäuser, A., Reiling, N., Toellner, K.M., Duchrow, M., Kusumoto, S., Rietschel, E.T., Ernst, M., Brade, H. y Flad, H.D. (1994). Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *The Journal of Immunology*, 153(7): 2996-3004. doi: 10.4049/JIMMUNOL.153.7.2996
- Mattson, M.P., Culmsee, C. y Zai, F.Y. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell and Tissue Research*, 301(1): 173-187. doi: 10.1007/S004419900154/METRICS
- Mauer, J., Denson, J.L. y Brüning, J.C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in Immunology*, 36(2): 92-101. doi: 10.1016/J.IT.2014.12.008
- Maxwell, P.H., Wlesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. y Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733): 271-275. doi: 10.1038/20459
- McAloose, D. y Newton, A.L. (2009). Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Reviews Cancer*, 9(7): 517-526. doi: 10.1038/nrc2665
- McClellan, D.A., Palfreyman, E.J., Smith, M.J., Moss, J.L., Christensen, R.G. y Sailsbery, J.K. (2005). Physicochemical evolution and molecular adaptation of the cetacean and artiodactyl cytochrome b proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3): 437-455. doi: 10.1093/MOLBEV/MSI028
- Mccoubrey Jr, W.K., Huang, T.J. y Maines, M.D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*, 247(2): 725-732. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x
- McPhillips, K., Janssen, W.J., Ghosh, M., Byrne, A., Gardai, S., Remigio, L., Bratton, D.L., Kang, J.L. y Henson, P. (2007). TNF- α inhibits macrophage clearance of apoptotic cells via cytosolic phospholipase A2 and oxidant-dependent mechanisms. *The Journal of Immunology*, 178(12): 8117-8126. doi: 10.4049/JIMMUNOL.178.12.8117
- Medway, W. y Geraci, J. (1964). Hematology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).

- American Journal of Physiology-Legacy Content*, 207(6): 1367-1370. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplegacy.1964.207.6.1367>[consulta:6 de febrero de 2023]
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164): 819-826. doi: 10.1038/nature06246
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2): 135-145
- Medzhitov, R. y Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3): 295-298. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2
- Melley, D.D., Evans, T.W. y Quinlan, G.J. (2005). Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clinical Science*, 108(5): 413-424. doi: 10.1042/CS20040228
- Midory, R., Camara, N., Cenedeze, M., Rodrigues, M. y Pacheco-Silva, A. (2006). Regulatory T cells (CD4+ CD25+) in kidney ischemia reperfusion injury. *Transplantation*, 82(1), 1042-1043
- Mitchell, E. (1975). Porpoise, dolphin and small whale fisheries of the world. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*, (3): 1-129
- Monteiro, F., Marcet, P. y Dorn, P. (2010). Population genetics of triatomines. *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*, : 169-208. doi: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00008-3
- Morey, J.S., Neely, M.G., Lunardi, D., Anderson, P.E., Schwacke, L.H., Campbell, M. y Van Dolah, F.M. (2016). RNA-Seq analysis of seasonal and individual variation in blood transcriptomes of healthy managed bottlenose dolphins. *BMC Genomics*, 17(1): 1-16. doi: 10.1186/s12864-016-3020-8
- Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M-E. y Kourembanas, S. (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5): 1475-1479
- Morse, D. y Choi, A.M.K. (2002). Heme oxygenase-1: the “emerging molecule” has arrived. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(1): 8-16
- Morse, D., Pischke, S.E., Zhou, Z., Davis, R.J., Flavell, R.A., Loop, T. y Choi, A.M. (2003). Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39): 36993-36998
- Mosaheb, M.M., Reiser, M.L. y Wetzler, L.M. (2017). Toll-like receptor ligand-based vaccine adjuvants require intact MyD88 signaling in antigen-presenting cells for germinal center formation and antibody production. *Frontiers in Immunology*, 8: 225
- Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D.A. y Gleich, G.J. (1989). Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *American Review of Respiratory Disease*, 139: 801-805
- Motterlini, R. y Otterbein, L.E. (2010). The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9): 728-743
- Muñoz-Sánchez, J. y Chánez-Cárdenas, M.E. (2014). A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 604981. doi: 10.1155/2014/604981
- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M. y Snyder, S.H. (2009). Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling*, 2(68). doi: 10.1126/SCISIGNAL.268RE2

- Nakahira, K., Hong, P.K., Xue, H.G., Nakao, A., Wang, X., Murase, N., Drain, P.F., Wang, X., Sasidhar, M., Nabel, E.G., Takahashi, T., Lukacs, N.W., Ryter, S.W., Morita, K. y Choi, A.M.K. (2006). Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10): 2377-2389. doi: 10.1084/jem.20060845
- Nakao, A., Murase, N., Ho, C., Toyokawa, H., Billiar, T.R. y Kanno, S. (2005). Biliverdin administration prevents the formation of intimal hyperplasia induced by vascular injury. *Circulation*, 112(4): 587-591
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3): 173-182
- Natoli, A., Peddemors, V.M. y Rus H.A. (2004). Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(2): 363-375
- Navarro, S., Boix, E., Cuchillo, CM. y Nogués, MV. (2010). Eosinophil-induced neurotoxicity: The role of eosinophil cationic protein/RNase 3. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1-2): 60-70. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.06.012
- Nery, M.F., Arroyo, J.I. y Opazo, J.C. (2013). Accelerated evolutionary rate of the myoglobin gene in long-diving whales. *Journal of Molecular Evolution*, 76(6): 380-387
- Netea, M.G., Van De Veerdonk, F.L., Van Der Meer, J.W.M., Dinarello, C.A. y Joosten, L.A.B. (2015). Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annual Review of Immunology*, 33: 49-77. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112306>
- Noren, S.R. y Williams, T.M. (2000). Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(2): 181-191. doi: 10.1016/S1095-6433(00)00182-3
- Ohishi, K., Shishido, R., Iwata, Y., Saitoh, M., Takenaka, R., Ohtsu, D., Okutsu, K. y Maruyama, T. (2011). Lipopolysaccharide-induced innate immune factors in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) detected in expression sequence tag analysis. *Microbiology and Immunology*, 55(11): 790-797. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00377.x
- Ohlsson, R., Lobanenkova, V. y Klenova, E. (2010). Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *BioEssays*, 32(1): 37-50. doi: 10.1002/BIES.200900118
- Ortega-Gómez, A., Perretti, M. y Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine*, 5(5): 661-674. doi: 10.1002/EMMM.201202382
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Lu, H.T., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A. y Choi, A.M.K. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*, 6(4): 422-428
- Otterbein, L.E. y Choi, A.M.K. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6): L1029-L1037. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1029
- Ouyang, W., Kolls, J.K. y Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28(4): 454-467. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2008.03.004
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R. y Immenschuh, S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*, 80(12): 1895-1903. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.014>
- Pál, C., Papp, B. y Lercher, M.J. (2006). An integrated view of protein evolution. *Nature Reviews*

- Genetics* 2006 7:5, 7(5): 337-348. doi: 10.1038/nrg1838
- Parks, D.A. y Granger, D.N. (1986). Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. <https://doi.org/10.1152/ajpgi19862506G749>, 250(6 (13/6)). doi: 10.1152/AJPGI.1986.250.6.G749
- Pasparakis, M. y Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534): 311-320. doi: 10.1038/nature14191
- Pecher, S.A. y Fuchs, J. (1988). Cellular immunity in lobomycosis (keloidal blastomycosis). *Allergologia et Immunopathologia*, 16(6): 413-415. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/3242380>[consulta:7 de febrero de 2023]
- Petrache, I., Otterbein, L.E., Alam, J., Wiegand, G.W. y Choi, A.M.K. (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(2): L312-L319
- Piotrowski, E.R., Tift, M.S., Crocker, D.E., Pearson, A.B., Vázquez-Medina, J.P., Keith, A.D. y Khudyakov, J.I. (2021). Ontogeny of carbon monoxide-related gene expression in a deep-diving marine mammal. *Frontiers in Physiology*, : 1841
- Piscitelli, M.A., McLellan, W.A., Rommel, S.A., Blum, J.E., Barco, S.G. y Pabst, D.A. (2010). Lung size and thoracic morphology in shallow- and deep-diving cetaceans. *Journal of Morphology*, 271(6): 654-673. doi: 10.1002/JMOR.10823
- Plötz, S.G., Lentschat, A., Behrendt, H., Plötz, W., Hamann, L., Ring, J., Rietschel, E.T., Flad, H.D. y Ulmer, A.J. (2001). The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood*, 97(1): 235-241. doi: 10.1182/BLOOD.V97.1.235
- Pond, S.L. y Frost, S.D.W. (2005). Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, 21(10): 2531-2533. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI320
- Ponganis, P.J. (2019). State of the art review: from the seaside to the bedside: insights from comparative diving physiology into respiratory, sleep and critical care. *Thorax*, 74(5): 512-518
- Ponganis, P.J., Meir, J.U. y Williams, C.L. (2011). In pursuit of Irving and Scholander: a review of oxygen store management in seals and penguins. *Journal of Experimental Biology*, 214(20): 3325-3339
- Popa, C., van Tits, L.J.H., Barrera, P., Lemmers, H.L.M., van den Hoogen, F.H.J., van Riel, P.L.C.M., Radstake, T.R.D.J., Netea, M.G., Roest, M. y Stalenhoef, A.F.H. (2009). Anti-inflammatory therapy with tumour necrosis factor alpha inhibitors improves high-density lipoprotein cholesterol antioxidative capacity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(6): 868 LP - 872. doi: 10.1136/ard.2008.092171
- Poss, K.D. y Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20): 10919 LP - 10924. doi: 10.1073/pnas.94.20.10919
- Ramirez, J.M., Folkow, L.P. y Blix, A.S. (2007). Hypoxia tolerance in mammals and birds: From the wilderness to the clinic. *Annual Review of Physiology*, 69: 113-143. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.03.1905163111>
- Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A. y Stojilkovic, I. (2001). Homologues of neisserial heme oxygenase in Gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the pigA

- gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(21): 6394-6403
- Reed, J.A. y Whitsett, J.A. (1998). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and pulmonary surfactant homeostasis. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(4): 321—332. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/MED/9686680>
- Reidarson, T. (2008). Inflammation in marine mammals. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, 6: 308-311
- Reif, J.S., Peden-Adams, M.M., Romano, T.A., Rice, C.D., Fair, P.A. y Bossart, G.D. (2009). Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with lobomycosis. *Medical Mycology*, 47(2): 125-135
- Reyes-Ramos, C.A., Gaxiola-Robles, R., Vázquez-Medina, J.P., Ramírez-Jirano, L.J., Bitzer-Quintero, O.K. y Zenteno-Savín, T. (2021). *In silico* characterization of the heme oxygenase 1 from bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Evidence of changes in the active site and purifying selection. *Frontiers in Physiology*, 12, 711645
- Rice, D.W. (1998). Marine mammals of the world: systematics and distribution. *Society for Marine Mammalogy: Special Publication*, 1-231
- Ridgway, S.H. y Gordon, J.D. (1966). Blood oxygen and ecology of porpoises of three genera. *Science*, 151(3709): 456-458. doi: 10.1126/SCIENCE.151.3709.456
- Robinson, J.M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4): 465-469. doi: 10.1007/S00418-009-0565-5/METRICS
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 Receptor: Importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9): 1237-1247. doi: 10.7150/IJBS.4989
- Ryter, S.W., Alam, J. y Choi, A.M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*, 86(2): 583-650
- Sabroe, I., Jones, E.C., Usher, L.R., Whyte, M.K.B. y Dower, S.K. (2002). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *The Journal of Immunology*, 168(9): 4701-4710. doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.9.4701
- Salvemini, D., Ischiropoulos, H. y Cuzzocrea, S. (2003). Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 225: 291-303. doi: 10.1385/1-59259-374-7:291/COVER
- Sammut, I.A., Foresti, R., Clark, J.E., Exon, D.J., Vesely, M.J.J., Sarathchandra, P., Green, C.J. y Motterlini, R. (1998). Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *British Journal of Pharmacology*, 125(7): 1437-1444
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. y Rose-John, S. (2011). The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5): 878-888
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. y Dinarello, C. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, 75(1): 40-47. doi: 10.1182/BLOOD.V75.1.40.40
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V., Lamoreux, J., Rodrigues, A.S.L., Stuart, S.N., Temple, H.J., Baillie, J., Boitani, L., Lacher, T.E., Mittermeier,

- R.A., Smith, A.T., Absolon, D., Aguiar, J.M., Amori, G., Bakkour, N., Baldi, R., Berridge, R.J., Bielby, J., Black, P.A., Blanc, J.J., Brooks, T.M., Burton, J.A., Butynski, T.M., Catullo, G., Chapman, R., Cokeliss, Z., Collen, B., Conroy, J., Cooke, J.G., da Fonseca, G.A.B., Derocher, A.E., Dublin, H.T., Duckworth, J.W., Emmons, L., Emslie, R.H., Festa-Bianchet, M., Foster, M., Foster, S., Garshelis, D.L., Gates, C., Gimenez-Dixon, M., Gonzalez, S., Gonzalez-Maya, J.F., Good, T.C., Hammerson, G., Hammond, P.S., Happold, D., Happold, M., Hare, J., Harris, R.B., Hawkins, C.E., Haywood, M., Heaney, L.R., Hedges, S., Helgen, K.M., Hilton-Taylor, C., Hussain, S.A., Ishii, N., Jefferson, T.A., Jenkins, R.K.B., Johnston, C.H., Keith, M., Kingdon, J., Knox, D.H., Kovacs, K.M., Langhammer, P., Leus, K., Lewison, R., Lichtenstein, G., Lowry, L.F., Macavoy, Z., Mace, G.M., Mallon, D.P., Masi, M., McKnight, M.W., Medellin, R.A., Medici, P., Mills, G., Moehlman, P.D., Molur, S., Mora, A., Nowell, K., Oates, J.F., Olech, W., Oliver, W.R.L., Oprea, M., Patterson, B.D., Perrin, W.F., Polidoro, B.A., Pollock, C., Powel, A., Protas, Y., Racey, P., Ragle, J., Ramani, P., Rathbun, G., Reeves, R.R., Reilly, S.B., Reynolds, J.E., Rondinini, C., Rosell-Ambal, R.G., Rulli, M., Rylands, A.B., Savini, S., Schank, C.J., Sechrest, W., Self-Sullivan, C., Shoemaker, A., Sillero-Zubiri, C., De Silva, N., Smith, D.E., Srinivasulu, C., Stephenson, P.J., van Strien, N., Talukdar, B.K., Taylor, B.L., Timmins, R., Tirira, D.G., Tognelli, M.F., Tsytsulina, K., Veiga, L.M., Vie, J.-C., Williamson, E.A., Wyatt, S.A., Xie, Y. y Young, B.E. (2008). The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science*, 322(5899): 225-230. doi: 10.1126/science.1165115
- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Schreck, R. y Baeuerle, P.A. (1991). A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cell Biology*, 1(2-3): 39-42. doi: 10.1016/0962-8924(91)90072-H
- Schreuder, H., Tardif, C., Trump-Kallmeyer, S., Soffientini, A., Sarubbi, E., Akesson, A., Bowlin, T., Yanofsky, S. y Barrett, R.W. (1997). A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature*, 386(6621): 194-200. doi: 10.1038/386194a0
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R. y Poulos, T.L. (1999). Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nature Structural Biology*, 6(9): 860-867. doi: 10.1038/12319
- Schwacke, L.H., Hall, A.J., Townsend, F.I., Wells, R.S., Hansen, L.J., Hohn, A.A., Bossart, G.D., Fair, P.A. y Rowles, T.K. (2009). Hematologic and serum biochemical reference intervals for free-ranging common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and variation in the distributions of clinicopathologic values related to geographic sampling site. *American Journal of Veterinary Research*, 70(8): 973-985. doi: 10.2460/AJVR.70.8.973
- Schwacke, L.H., Twiner, M.J., De Guise, S., Balmer, B.C., Wells, R.S., Townsend, F.I., Rotstein, D.C., Varela, R.A., Hansen, L.J., Zolman, E.S., Spradlin, T.R., Levin, M., Leibrecht, H., Wang, Z. y Rowles, T.K. (2010). Eosinophilia and biotoxin exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from a coastal area impacted by repeated mortality events. *Environmental Research*, 110(6): 548-555. doi: 10.1016/J.ENVRES.2010.05.003
- Semenza, G.L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6): 993-998. doi: 10.1016/S0006-2952(02)01168-1
- Shen, T., Xu, S., Wang, X., Yu, W., Zhou, K. y Yang, G. (2012). Adaptive evolution and functional constraint at TLR4 during the secondary aquatic adaptation and diversification of cetaceans. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1): 39. doi: 10.1186/1471-2148-12-39

- Shenton, D. y Grant, C.M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 374(2): 513-519. doi: 10.1042/BJ20030414
- Siebenlist, U., Brown, K. y Claudio, E. (2005). Control of lymphocyte development by nuclear factor- κ B. *Nature Reviews Immunology*, 5(6): 435-445. doi: 10.1038/nri1629
- Siebenlist, U., Franzoso, G. y Brown, K. (2003). Structure, regulation and function of NF-kappaB. *Annual Review of Cell Biology*, 10: 405-455. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb10110194002201>
- Sitt, T., Bowen, L., Blanchard, M.T., Smith, B.R., Gershwin, L.J., Byrne, B.A. y Stott, J.L. (2008). Quantitation of leukocyte gene expression in cetaceans. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(11): 1253-1259. doi: 10.1016/j.dci.2008.05.001
- Soehnlein, O., Zernecke, A. y Weber, C. (2009). Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(2): 198-205. doi: 10.1160/TH08-11-0720/ID/JR0720-10
- Stabile, E., Susan Burnett, M., Watkins, C., Kinnaird, T., Bachis, A., La Sala, A., Miller, J.M., Shou, M., Epstein, SE. y Fuchs, S. (2003). Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*, 108(2): 205-210. doi: 10.1161/01.CIR.0000079225.50817.71
- Stacy, N.I. y Nollens, H.H. (2020). Hematology of marine mammals. *Schalm's Veterinary Hematology*, Wiley, 7th ed., USA. 1104-1113. doi: 10.1002/9781119500537.CH122
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman, R.H. y Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 227-264. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227
- Stocker, R. (2004). Forum Review Antioxidant Activities of Bile Pigments. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(5)
- Stone, K.D., Prussin, C. y Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2): S73-S80. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.017
- Swanson, K.V., Deng, M. y Ting, J.P.Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 2019 19:8, 19(8): 477-489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0
- Symon, T.E., Gaxiola-Robles, R., Hernandez-Camacho, C.J. y Zenteno-Savin, T. (2021). Oxidative stress indicators in human and bottlenose dolphin leukocytes in response to a pro-inflammatory challenge. *Biocell*, 45(6): 1621
- Takanashi, S., Nonaka, R., Xing, Z., O'byrne, P., Dolovich, J. y Jordana, M. (1994). Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *Journal of Experimental Medicine*, 180(2): 711-715. doi: 10.1084/JEM.180.2.711
- Tamura, K., Battistuzzi, F.U., Billings-Ross, P., Murillo, O., Filipowski, A. y Kumar, S. (2012). Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47): 19333-19338. doi: 10.1073/PNAS.1213199109/SUPPL_FILE/PNAS.201213199SI.PDF
- Tang, S-C., Arumugam, T.V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D.A., Chigurupati, S. y Ouyang, X. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic

- brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34): 13798-13803
- Tefferi, A. (2005). Blood eosinophilia: A new paradigm in disease classification, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(1): 75-83. doi: 10.4065/80.1.75
- Terry, C.M., Clikeman, J.A., Hoidal, J.R. y Callahan, K.S. (1998). Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(3): H883-H891. doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H883
- Terry, M.J., Linley, P.J. y Kohchi, T. (2002). Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochemical Society Transactions*, 30(4). PMID:12196146
- Thewissen, J.G.M. y Bajpai, S. (2001). Whale origins as a poster child for macroevolution. *BioScience*, 51(12): 1037-1049. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[1037:WOAAPC]2.0.CO;2
- Thewissen, J.G.M., Cooper, L.N., Clementz, M.T., Bajpai, S. y Tiwari, B.N. (2007). Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature*, 450(7173): 1190-1194. doi: 10.1038/nature06343
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680. doi: 10.1093/NAR/22.22.4673
- Tian, R., Wang, Z., Niu, X., Zhou, K., Xu, S. y Yang, G. (2016). Evolutionary genetics of hypoxia tolerance in cetaceans during diving. *Genome Biology and Evolution*, 8(3): 827-839
- Tift, M.S., Alves de Souza, R.W., Weber, J., Heinrich, E.C., Villafuerte, F.C., Malhotra, A., Otterbein, L.E. y Simonson, T.S. (2020). Adaptive potential of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway during hypoxia. *Frontiers in Physiology*, 11: 886
- Tift, M.S. y Ponganis, P.J. (2019). Time domains of hypoxia adaptation—elephant seals stand out among divers. *Frontiers in Physiology*, 10: 677
- Tift, M.S., Ponganis, P.J. y Crocker, D.E. (2014). Elevated carboxyhemoglobin in a marine mammal, the northern elephant seal. *Journal of Experimental Biology*, 217(10): 1752-1757. doi: 10.1242/jeb.100677
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A. y Mier, J.W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83 (1): 113–118. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V83.1.113.113>
- Toda, Y., Tsukada, J., Misago, M., Kominato, Y., Auron, P.E. y Tanaka, Y. (2002). Autocrine induction of the human Pro-IL-1 β gene promoter by IL-1 β in monocytes. *The Journal of Immunology*, 168(4): 1984-1991. doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.4.1984
- Trakshel, G.M., Kutty, R.K. y Maines, M.D. (1986). Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 261(24): 11131-11137. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67358-2
- Trifonov, E.N. (2004). The triplet code from first principles. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 22(1), 1-11.
- True, A.L., Olive, M., Boehm, M., San, H., Westrick, R.J., Raghavachari, N., Xu, X., Lynn, E.G., Sack, M.N. y Munson, P.J. (2007). Heme oxygenase-1 deficiency accelerates formation of

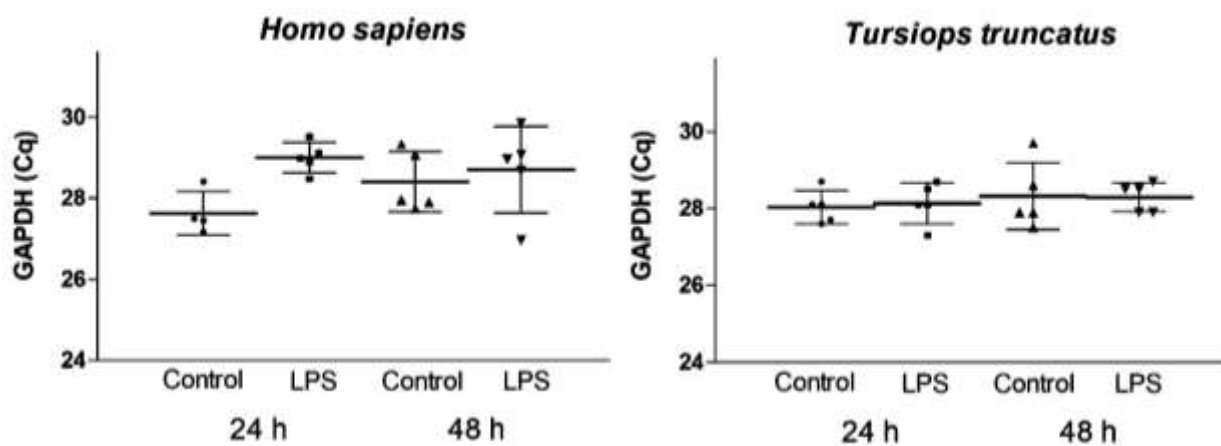
- arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide. *Circulation Research*, 101(9): 893-901
- Uciechowski, P. y Dempke, W.C.M. (2020). Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. *Oncology*, 98(3): 131-137
- Uhen, M.D. (2007). Evolution of marine mammals: Back to the sea after 300 million years. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(6): 514-522. doi: 10.1002/AR.20545
- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T. y Elsner, R. (2007). Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 345(2): 110-118. doi: 10.1016/J.JEMBE.2007.02.003
- Vecchione, A., Peden-Adams, M.M., Romano, T.A. y Fair, P.A. (2008). Recent cytokine findings and implications toward health assessment of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Aquatic Mammals*, 34(1): 93-101. doi: 10.1578/AM.34.1.2008.93
- Venge, P. y Byström, J. (1998). Molecules in focus eosinophil cationic protein (ECP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(4): 433-437. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00127-1
- Vile, G.F., Basu-Modak, S., Waltner, C. y Tyrrell, R.M. (1994). Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7): 2607-2610. doi: 10.1073/PNAS.91.7.2607
- Vitali, S.H., Fernandez-Gonzalez, A., Nadkarni, J., Kwong, A., Rose, C., Alex Mitsialis, S. y Kourembanas, S. (2020). Heme oxygenase-1 dampens the macrophage sterile inflammasome response and regulates its components in the hypoxic lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 318(1): L125-L134. doi: 10.1152/AJPLUNG.00074.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH50121977360007.JPEG
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. y Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5): 503-510. doi: 10.1038/ni1582
- Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. y Espevik, T. (1989). The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *Journal of Experimental Medicine*, 169(1): 333-338. doi: 10.1084/JEM.169.1.333
- Wakefield, C.H., Barclay, G.R., Fearon, K.C.H., Goldie, A.S., Ross, J.A., Grant, I.S., Ramsay, G. y Howie, J.C. (1998). Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. *British Journal of Surgery*, 85(6): 818-825
- Walker, J.L., Potter, C.W. y Macko, S.A. (1999). The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science*, 15(2): 335-350
- Wang, L-J., Lee, T-S., Lee, F-Y., Pai, R-C. y Chau, L-Y. (1998). Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *The American Journal of Pathology*, 152(3): 711
- Wang, Y.N., Gao, L., Wu, S.Y. y Qin, S. (2018). Low-dose 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) reperfusion therapy displays cardioprotective effects in mice after myocardial infarction that are abrogated by genipin. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24: 3702. doi: 10.12659/MSM.910494
- Welch, B.L. (1947). The generalization of Student's problem when several different

- population variances are involved. *Biometrika*, 34(1-2): 28-35.
- Wiesel, P., Patel, A.P., DiFonzo, N., Marria, P.B., Sim, C.U., Pellacani, A., Maemura, K., LeBlanc, B.W., Marino, K., Doerschuk, C.M., Yet, S.F., Lee, M.E. y Perrella, M.A. (2000). Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*, 102(24): 3015-3022. doi: 10.1161/01.CIR.102.24.3015
- Wilhelm-Filho, D., Sell, F., Ribeiro, L., Ghislandi, M., Carrasquedo, F., Fraga, C.G., Wallauer, J.P., Simões-Lopes, P.C. y Uhart, M.M. (2002). Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3): 885-892. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00253-2
- Wilks, A. (2002). Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(4): 603-614
- Wilks, A., Sun, J., Loehr, T.M. y Ortiz de Montellano, P.R. (1995). Heme oxygenase His25Ala mutant: replacement of the proximal histidine iron ligand by exogenous bases restores catalytic activity. *Journal of the American Chemical Society*, 117(10): 2925-2926
- Williams, L.J. y Abdi, H. (2010). Fisher's least significant difference (LSD) test. *Encyclopedia of Research Design*, 218(4), 840-853
- Williams, T.M. y Davis, R.W. (2021). Physiological resiliency in diving mammals: Insights on hypoxia protection using the Krogh principle to understand COVID-19 symptoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 253: 110849. doi: 10.1016/J.CBPA.2020.110849
- Winthrop, K.L. (2006). Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(11): 602-610
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. y Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975): 1431-1433. doi: 10.1126/science.1698311
- Wynn, T.A., Chawla, A. y Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446): 445-455. doi: 10.1038/nature12034
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. y Ito, H. (2000). IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *The Journal of Immunology*, 164(9): 4878 LP - 4882. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4878
- Yang, N.C., Lu, L.H., Kao, Y.H. y Chau, L.Y. (2004). Heme oxygenase-1 attenuates interleukin-1 β -induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomedical Science*, 11(6): 799-809. doi: 10.1159/000081827
- Yim, H.S., Cho, Y.S., Guang, X., Kang, S.G., Jeong, J.Y., Cha, S.S., Oh, H.M., Lee, J.H., Yang, E.C., Kwon, K.K., Kim, Y.J., Kim, T.W., Kim, W., Jeon, J.H., Kim, S.J., Choi, D.H., Jho, S., Kim, H.M., Ko, J., Kim, H., Shin, Y.A., Jung, H.J., Zheng, Y., Wang, Z., Chen, Y., Chen, M., Jiang, A., Li, E., Zhang, S., Hou, H., Kim, T.H., Yu, L., Liu, S., Ahn, K., Cooper, J., Park, S.G., Hong, C.P., Jin, W., Kim, H.S., Park, C., Lee, K., Chun, S., Morin, P.A., O'Brien, S.J., Lee, H., Kimura, J., Moon, D.Y., Manica, A., Edwards, J., Kim, B.C., Kim, S., Wang, J., Bhak, J., Lee, H.S. y Lee, J.H. (2014). Minke whale genome and aquatic adaptation in cetaceans. *Nature Genetics*, 46(1): 88-92. doi: 10.1038/ng.2835
- Yoshida, T. y Kikuchi, G. (1978). Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the

- reconstituted microsomal heme oxygenase system. *Journal of Biological Chemistry*, 253(12): 4230-4236
- Yoshida, T., Noguchi, M. y Kikuchi, G. (1980). Oxygenated form of heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *Journal of Biological Chemistry*, 255(10): 4418-4420
- Ysebaert, D.K., De Greef, K.E., Vercauteren, S.R., Ghielli, M., Verpooten, G.A., Eyskens, E.J. y De Broe, M.E. (2000). Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(10): 1562-1574. doi: 10.1093/NDT/15.10.1562
- Zakhary, R., Gaine, S.P., Dinerman, J.L., Ruat, M., Flavahan, N.A. y Snyder, S.H. (1996). Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2): 795-798. doi: 10.1073/PNAS.93.2.795
- Zasloff, M. (2011). Observations on the remarkable (and mysterious) wound-healing process of the bottlenose dolphin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(12): 2503-2505
- Zenteno-Savín, T., Clayton-Hernández, E. y Elsner, R. (2002). Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4): 527-536. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00075-3
- Zenteno-Savín, T., Vázquez-Medina, J.P., Cantú-Medellín, N., Ponganis, P.J. y Elsner, R. (2012). Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, 178-189
- Zhang, X., Sato, M., Sasahara, M., Migita, C.T. y Yoshida, T. (2004). Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *European Journal of Biochemistry*, 271(9): 1713-1724
- Zhang, Y., Sano, M., Shinmura, K., Tamaki, K., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Morizane, S., Ito, H., Hishiki, T., Endo, J., Zhou, H., Yuasa, S., Kaneda, R., Suematsu, M. y Fukuda, K. (2010). 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(4): 576-586. doi: 10.1016/J.YJMCC.2010.05.011
- Zhao, H., Wong, R.J., Nguyen, X., Kalish, F., Mizobuchi, M., Vreman, H.J., Stevenson, D.K. y Contag, C.H. (2006). Expression and regulation of heme oxygenase isozymes in the developing mouse cortex. *Pediatric Research*, 60:5, 60(5): 518-523. doi: 10.1203/01.pdr.0000242374.21415.f5
- Zhou, H., Migita, C.T., Sato, M., Sun, D., Zhang, X., Ikeda-Saito, M., Fujii, H. y Yoshida, T. (2000). Participation of carboxylate amino acid side chain in regiospecific oxidation of heme by heme oxygenase. *Journal of the American Chemical Society*, 122(34): 8311-8312. doi: 10.1021/ja0002868
- Zhou, X., Sun, D., Guang, X., Ma, S., Fang, X., Mariotti, M., Nielsen, R., Gladyshev, V.N. y Yang, G. (2018). Molecular footprints of aquatic adaptation including bone mass changes in cetaceans. *Genome Biology and Evolution*, 10(3): 967-975. doi: 10.1093/GBE/EVY062
- Zhu, W., Hunt, D.J., Richardson, A.R. y Stojiljkovic, I. (2000). Use of heme compounds as iron sources by pathogenic neisseriae requires the product of the hemO gene. *Journal of Bacteriology*, 182(2): 439-447

11. ANEXOS

Anexo A. Efecto de la exposición a LPS ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 o 48 h sobre la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en leucocitos humanos y de tursión. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar ($n= 4\text{-}5$; prueba de comparación múltiple de Tukey). Control = sin exposición a LPS.



Anexo B. Resumen de los análisis estadísticos realizados.

Especie	Transcrito-proteína	Pruebas de normalidad				Prueba de igualdad de varianzas				Comparación de medias	
		24 horas		48 horas		24 horas		48 horas		24 horas	48 horas
		Control	LPS	Control	LPS	Control	LPS	Control	LPS	Control vs LPS	Control vs LPS
<i>Homo sapiens</i>	<i>IL-1β</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5	4, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5	Rechazar				Welch; p<0.001	Welch; p=0.005
	<i>TNF-α</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5	Brown-Forsythe; Bartlett				Tukey, Fisher LSD; p<0.001	Tukey, Fisher LSD; p=0.008
	<i>IL-6</i> (RT-qPCR)	1, 3, 4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	3, 4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Brown-Forsythe; Conover				N/A	Tukey, Fisher LSD; p<0.001
	<i>Hmax1</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5	1, 3, 4	1, 3	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	<i>IL-1β</i> (ELISA)	6, 7	5, 6, 7	6	6, 7	Rechazar				Welch; p=0.009	Welch; p=0.004
	<i>TNF-α</i> (ELISA)	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	<i>IL-6</i> (ELISA)	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	HO (actividad)	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
<i>Tursiops truncatus</i>	<i>IL-1β</i> (RT-qPCR)	4, 5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 3, 4	1, 2, 3, 4, 5	Brown-Forsythe				Tukey, Fisher LSD; p<0.001	N/A
	<i>TNF-α</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	<i>IL-6</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5	Rechazar	Rechazar	Rechazar				Welch; p=0.008	N/A
	<i>Hmax1</i> (RT-qPCR)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5	6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Brown-Forsythe				Tukey, Fisher LSD; p=0.006	N/A
	<i>IL-1β</i> (ELISA)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	6, 7	6	Brown-Forsythe				Welch; p=0.01	N/A
	<i>TNF-α</i> (ELISA)	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	<i>IL-6</i> (ELISA)	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	Brown-Forsythe; Levene				N/A	N/A
	HO (actividad)	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 3, 4	1, 4	Brown-Forsythe				N/A	Fisher LSD; p=0.01

Notas: ¹Shapiro-Wilk; ²Anderson-Darling; ³Martinez-Iglewicz; ⁴Kolmogorov-Smirnov; ⁵D'Agostino Skewness; ⁶D'Agostino Kurtosis; ⁷D'Agostino Omnibus