



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE MODULAN
LA VARIABILIDAD EN LA MAGNITUD DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL
ROEDOR SUBTERRÁNEO *CTENOMYS TALARUM*

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Ciencias,
Área Biología

Lic. Julieta L. Merlo

Directoras de tesis: Dra. Ana Paula Cutrera
Dra. Roxana R. Zenuto



Laboratorio de Ecología Fisiológica y del
Comportamiento

Instituto de Investigaciones Marinas y
Costeras (IIMyC, CONICET-UNMdP)

-2016-

I I M Y C

CONICET
U N M D P

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESÚMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
EL SISTEMA INMUNE	7
VARIACIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE	8
ECOINMUNOLOGÍA	11
SISTEMA DE ESTUDIO	14
OBJETIVOS	17
<u>CAPÍTULO 1: EVALUACIÓN DEL COSTO ENERGÉTICO ASOCIADO A LA RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA: COMPROMISOS FRENTE A LA REPRODUCCIÓN Y AL CRECIMIENTO</u>	<u>21</u>
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	36
<u>CAPÍTULO 2: ASOCIACIONES ENTRE LA CARGA PARASITARIA, LA CONDICIÓN FÍSICA Y LA CAPACIDAD DE RESPUESTA INMUNE</u>	<u>43</u>
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
RESULTADOS	49
DISCUSIÓN	52
<u>CAPÍTULO 3: EFECTOS DEL PARASITISMO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA</u>	<u>57</u>
INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y MÉTODOS	59
RESULTADOS	63
DISCUSIÓN	66
<u>CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA INGESTA DE ALIMENTO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA</u>	<u>73</u>
INTRODUCCIÓN	73
MATERIALES Y MÉTODOS	76
RESULTADOS	79

DISCUSIÓN	85
<u>CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN DE COMPROMISOS FRENTE A DESAFÍOS SIMULTÁNEOS: RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA VS. HUMORAL</u>	<u>93</u>
INTRODUCCIÓN	93
MATERIALES Y MÉTODOS	96
RESULTADOS	99
DISCUSIÓN	104
<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES</u>	<u>111</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>121</u>
<u>APÉNDICE</u>	<u>132</u>

Evaluación de los factores que modulan la variabilidad en la magnitud de la respuesta inmune en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*

RESÚMEN

La presente tesis constituye un estudio ecoinmunológico en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*. La misma se centra en el estudio de factores que pueden afectar la respuesta inflamatoria local inducida por el antígeno no patogénico fitohemaglutinina (PHA). Se analiza el costo energético de la respuesta inflamatoria y sus posibles compromisos con otras actividades energéticamente demandantes, como son el crecimiento y la reproducción. Se estudian las asociaciones entre la inflamación y numerosos indicadores de la condición del individuo y mediante manipulación experimental, se analizan los roles del endoparasitismo y de la nutrición sobre la magnitud de la inflamación, considerando también el efecto de estos factores sobre la condición del individuo. Se explora la interacción de la inducción simultánea de la respuesta inflamatoria local con la humoral, de manera de estudiar la importancia de desafíos múltiples sobre la magnitud de la respuesta a PHA. Los resultados dan cuenta de la ausencia tanto de un costo energético asociado al desarrollo de la respuesta inflamatoria local, como de compromisos con el crecimiento o la reproducción. Sin embargo, la magnitud de la inflamación fue afectada por el parasitismo, de manera tanto positiva como negativa dependiendo del tipo de parásito, y la nutrición del individuo, siendo menor la respuesta inflamatoria ante condiciones sub-óptimas de alimentación. Finalmente, el desafío simultáneo de una respuesta humoral mediada por anticuerpos no comprometió el desarrollo de la inflamación local ensayada. Se discuten los resultados en el marco de las características de historia de vida de *C. talarum* y se comparan con lo reportado para especies con características de vida distintas, de modo de contribuir al entendimiento de la variación en las estrategias inmunes en la naturaleza. Se resalta la importancia del estudio de poblaciones naturales y de la consideración de la condición general del individuo en estudios ecoinmunológicos.

Assessment of factors modulating variability in the magnitude of the immune response in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*

ABSTRACT

The present thesis is an ecoimmunological study of the subterranean rodent *Ctenomys talarum*, which focuses on the study of factors affecting the local inflammatory response induced by the non-pathogenic antigen phytohemagglutinin (PHA). The energetic cost of such response and possible trade-offs with other energetically demanding activities, such as growth and reproduction, are assessed. Associations among inflammation and several indices of the individual condition are evaluated, moving to a deeper evaluation of the effects of endoparasitism and nutrition on the magnitude of the inflammatory response using experimental approaches, considering also the influence of these factors on the general individual condition. The interaction between local inflammatory and humoral responses simultaneously induced is explored; in this manner, the importance of multiple challenges on the magnitude of local inflammation induced by PHA is studied. The results show that the local inflammatory response does not imply an energetic cost and is not involved in trade-offs with growth or reproduction. However, the magnitude of inflammation was affected both positively and negatively by parasitism, depending on the parasite considered. Also, the inflammatory response was negatively affected under suboptimal nutritional condition. Finally, local inflammation was not compromised when PHA- and antibody mediated responses were stimulated simultaneously. Results are discussed in relation to the life history traits of *C. talarum*, and compared with species with different life history traits; thus, it contributes to the understanding of variation in immune strategies seen in nature. Finally, this thesis emphasizes the importance of the study of natural populations and the consideration of individual general condition in ecoimmunological studies.

INTRODUCCIÓN GENERAL



EL SISTEMA INMUNE

Los animales operan como redes de sistemas fisiológicos integrados, que responden a y están limitados por su ambiente circundante. Estos sistemas actúan en una manera altamente coordinada frente a variaciones del entorno, que pueden comprender factores físicos (como temperatura o presión) o biológicos (como enfermedad, predación, etc.; Randall et al., 2001). Dentro de su ambiente, prácticamente todos los organismos están expuestos a potenciales patógenos. En particular en los vertebrados, se desencadenan complejas respuestas fisiológicas ante la interacción con patógenos, las que resultan en la detección y neutralización de éstos y/o de sus productos, en particular de aquellos capaces de dañar al organismo (Adelman, 2015). El conjunto de órganos, células y moléculas involucrado en estas funciones se denomina **sistema inmune**. La primera línea de defensa presente en todos los animales frente a la invasión de microorganismos es la **inmunidad innata** (Tabla I). Ésta consiste en un conjunto de mecanismos de protección y resistencia, que incluye barreras anatómicas (membranas mucosas, piel), flora residente (bacterias no patogénicas), factores humorales (lisozima, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda) y respuestas celulares (células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y macrófagos; mediadores inflamatorios producidos por basófilos, eosinófilos y células asesinas naturales; NK, por sus siglas en inglés; Demas y Nelson, 2012). Estos mecanismos discriminan lo extraño de lo propio y se activan de manera rápida ante el reconocimiento de moléculas no propias (Cutuli de Simón, 2007). Si los agentes patógenos logran evadir los mecanismos de la inmunidad innata, ésta desencadena señales que activan mecanismos inmunes específicos para el patógeno en particular, que conforman la **inmunidad adaptativa** (Cutuli de Simón, 2007; Tabla I). Los mecanismos de inmunidad adaptativa son de origen evolutivo más reciente que los mecanismos innatos, encontrándose presentes en los vertebrados (Thompson, 1995). Las respuestas adaptativas son principalmente coordinadas por el accionar de los linfocitos, y dado que su producción requiere tiempo, las respuestas adaptativas son típicamente más lentas que las innatas. Sin embargo, este tipo de respuesta genera memoria inmunológica, lo que significa que ante futuras exposiciones al mismo antígeno¹, la respuesta desencadenada será más rápida y de mayor intensidad y capacidad defensiva (Janeway et al., 2004). Dentro de la inmunidad adaptativa, a su vez, pueden identificarse dos tipos de respuestas desencadenadas en relación al tipo de patógeno invasor: respuestas mediadas por células y respuestas humorales. La **inmunidad mediada por células** implica el accionar de linfocitos T hacia la

¹Antígeno: molécula extraña reconocida por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos o receptores de linfocitos T o B. Tradicionalmente se aplica a moléculas que desencadenan la respuesta inmune (Gómez-Lucía, 2006b).

Tabla I. Principales efectores y características de las defensas innatas y adaptativas.

Principales efectores	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Células	Macrófagos Neutrófilos Células NK Células dendríticas	Linfocitos T Linfocitos B
Moléculas	Sistema de complemento Citoquinas	Anticuerpos Citoquinas
Características	Primera línea de defensa Rapidez	Especificidad Memoria

eliminación de patógenos intracelulares y de las células infectadas por ellos. La **inmunidad humoral** está mediada por anticuerpos producidos por linfocitos B, que neutralizan e identifican patógenos extracelulares y sus toxinas, facilitando su eliminación (Janeway et al., 2004). Por otra parte, según la dinámica temporal de su uso, las defensas pueden clasificarse en **constitutivas**, si están presentes en un estado activo incluso antes de la infección, o **inducidas**, si para actuar requieren ser activadas durante la infección (Schmid-Hempel y Ebert, 2003). Las defensas constitutivas son costosas de mantener activas, pero responden al momento del ingreso del patógeno, mientras que las defensas inducidas presentan un retraso en su actividad. Ejemplos de inmunidad constitutiva son la fagocitosis llevada a cabo por células de la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos) y las proteínas del complemento. Ejemplos de la inmunidad inducida son la inflamación, las respuestas mediadas por linfocitos y la producción de anticuerpos. De esta manera, los componentes de la defensa pueden ubicarse en un cuadro de dos ejes, de acuerdo a su naturaleza y dinámica temporal (Schmid-Hempel y Ebert, 2003; Fig. I).

VARIACIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE

A pesar del evidente beneficio en cuanto a la evasión de enfermedades y parásitos que la defensa inmune provee, los individuos continúan siendo susceptibles a sufrir infecciones, y se observa que las respuestas inmunes varían ampliamente entre especies, individuos de la misma población, sexos, e incluso en un mismo individuo en diferentes estadios del desarrollo o momentos del año (Schmid-Hempel, 2003). Como cualquier proceso fisiológico, la defensa inmune implica costos, ya sea por la utilización de recursos o por el potencial daño que puede ocasionar a los propios tejidos del organismo (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Råberg y Grahn, 1998; Sheldon y Verhulst, 1996). Así, la magnitud de una respuesta inmune dependerá del balance entre los beneficios (defensa) y los costos asociados al desarrollo de la misma (Frank, 1994; Råberg et al., 2002).

Costos de la defensa inmune

El costo asociado a la activación de la defensa inmune (entendido como la respuesta a un patógeno o antígeno para su eliminación o control) conlleva a un **compromiso** (o *trade-off*) con otras funciones que también contribuyen al fitness (o adecuación biológica) del individuo. Este compromiso entre diferentes componentes del fitness (en este caso, beneficio de la defensa inmune vs. reducción en otras funciones) genera diferencias en la magnitud de la defensa desencadenada (Schmid-Hempel, 2011). Así, el costo de una respuesta inmune puede evidenciarse si ésta se ve reducida ante el desarrollo en simultáneo de otro proceso costoso (ej. reproducción) o si la activación de la respuesta inmune genera la reducción de otro componente del fitness (Schmid-Hempel, 2011). Relaciones negativas entre la magnitud de respuestas inmunes y otras actividades costosas, como las implicadas en la reproducción, el crecimiento o el desarrollo, han sido comúnmente observadas en numerosas especies (ej.: Deerenberg et al., 2007; Klasing et al., 1987; Rivera et al., 1998; revisado por Lochmiller y Deerenberg, 2000; Schmid-Hempel, 2011). Sin embargo, los mecanismos que median estos compromisos no han sido tan

Figura I. Clasificación de las defensas inmunes de acuerdo a su naturaleza y dinámica temporal de uso, con ejemplos para cada cuadrante. Modificado de Schmid-Hempel y Ebert (2003).



extensamente estudiados. Las “monedas” más frecuentemente sugeridas como mediadoras de los costos fisiológicos de la respuesta inmune son 1) energía, 2) nutrientes, 3) riesgo de autoinmunidad y 4) estrés oxidativo (Hasselquist y Nilsson, 2012). Los costos energéticos y nutricionales han sido comprobados mediante numerosos estudios, y representarían los costos inmediatos del uso del sistema inmune. A largo plazo, existirían costos asociados al estrés oxidativo y reacciones autoinmunes, aunque el rol de estos mecanismos como “monedas” mediadoras del costo de la inmunidad aún requiere de un mayor soporte empírico (Hasselquist y Nilsson, 2012).

La condición individual como modulador de la defensa inmune

Los individuos dentro de una misma población pueden mostrar una notable variación en la magnitud y efectividad de sus respuestas inmunes (Schmid-Hempel, 2003; Schulenburg et al., 2009). Además de la variación producto de los compromisos con otras actividades costosas, las defensas inmunes son dependientes de la condición del individuo (ej.: Navarro *et al.*, 2003). La **condición individual** ha sido recientemente definida como el conjunto de genotipo, epigenética y estado somático del individuo (Hill, 2011), entendiéndose por estado somático al fenotipo, estado actual del cuerpo físico y las influencias externas, como el nivel de parasitismo presente (Hill, 2011). En la práctica, la condición individual ha sido tradicionalmente estimada por medio de medidas relativas al peso corporal (Jakob et al., 1996; Peig y Green, 2009), encontrándose, en general, asociaciones positivas entre las mismas y la magnitud de la defensa inmune (Alonso-Alvarez y Tella, 2001). Sin embargo, el estudio de otras medidas asociadas al estado nutricional, de salud y fisiológico de los individuos, en relación a la defensa, es necesario a fin de entender la variación intraespecífica en la susceptibilidad a patógenos. Las situaciones estresantes - situaciones que dificultan el mantenimiento de la homeostasis en el individuo; (Wada, 2015)-, por ejemplo, han sido reportadas como estimulantes o supresoras de las defensas inmunes, dependiendo de la intensidad y duración del *estresor* (estímulo externo o interno que inicia la respuesta al estrés, Wada, 2015; Martin, 2009).

Interacción con parásitos

El parasitismo es generalmente considerado un factor extrínseco al individuo, aunque es claro que influencia tanto la condición corporal como el sistema inmune del mismo (Cox, 2001; Lee, 2006). Los parásitos generan efectos negativos en sus hospedadores a través de la reducción de las reservas de energía y nutrientes (Brown y Brown, 1989; Richner et al., 1993). Por ejemplo, la composición de la sangre cambia durante la infección, disminuyendo el hematocrito (Hurtrez-Boussès et al., 1997), o los recursos son reasignados como consecuencia de infecciones

subletales (Kristan y Hammond, 2000; Kristan y Hammond, 2001). Pero por otra parte, pueden modular, aumentar o suprimir la resistencia del hospedador contra otros patógenos; esto ocurre debido a compromisos en la estimulación de las mismas o de diferentes vías del sistema inmune por los distintos patógenos (Cox, 2001) o por la capacidad inmunoreguladora de algunos de ellos (ej., helmintos: Biard et al., 2015; Goüy De Bellocq et al., 2006). Por esto, el nivel de exposición a patógenos es un factor fundamental a analizar en estudios donde se evalúa la variabilidad en las respuestas inmunes (Cox, 2001).

ECOINMUNOLOGÍA

La descripción y la explicación de la variación natural en la función inmune es el objeto de estudio de la emergente disciplina **Ecoimmunología** o Inmunología ecológica. En particular, esta disciplina se propone entender por qué y cómo distintos factores bióticos y abióticos que afectan a los individuos en su ambiente natural contribuyen a la variación en la inmunidad (Sheldon y Verhulst, 1996). El entendimiento de la variación en estas características de los organismos resulta fundamental para comprender procesos biológicos de mayor escala, como son la transmisión de enfermedades y la co-evolución de parásitos y hospedadores (Adelman, 2015). Así, la investigación dentro de esta área es interdisciplinaria, ya que examina interacciones entre la fisiología del individuo (ej.: estudio de la función inmune) y la ecología de enfermedades (ej.: estudio de variables como la prevalencia parasitaria) en un amplio rango de contextos ecológicamente relevantes (Demas y Nelson, 2012), implicando acercamientos de campo como de laboratorio y un amplio rango de especies. Aunque su desarrollo es reciente, la investigación en este área se ha incrementado considerablemente en los últimos 15 años (Demas y Nelson, 2012). Los primeros estudios presentaron un enfoque funcional, en el sentido de que observaban diferencias en la prevalencia parasitaria ante distintos tratamientos (Festa-Bianchet, 1989; Norris et al., 1994; Richner et al., 1995). Estudios posteriores (König y Schmid-Hempel, 1995; Saino y Møller, 1996; Sorci et al., 1997) comenzaron a utilizar ensayos simples, que daban información sobre la **inmunocompetencia** (habilidad de responder a un antígeno extraño; término actualmente reemplazado por **capacidad de respuesta inmune**; Vinkler y Albrecht, 2011) de los individuos. Estos ensayos consisten en la exposición de los individuos -o muestras tomadas de éstos (sangre, plasma o suero)- a un antígeno extraño, estandarizado, no patogénico (König y Schmid-Hempel, 1995), que estimula principalmente un sólo componente de la defensa inmune, a diferencia de las infecciones por patógenos naturales, donde, además de desconocer si el organismo ya fue expuesto anteriormente a ese patógeno, ocurre replicación patogénica y daño tisular, dependiendo del mecanismo de infección del mismo. Varios antígenos han sido utilizados en estudios ecoinmunológicos (Tabla II). Para el estudio de la respuesta adaptativa humoral, por ejemplo, lo más utilizado ha sido la inyección intraperitoneal de glóbulos rojos de oveja (sheep red blood cells; **SRBC**). Así, la magnitud de la respuesta desencadenada (título de

anticuerpos) contra este antígeno se considera indicativa de la habilidad del organismo de resistir infecciones extracelulares (Martin et al., 2008a). Utilizando SRBC, Deerenberg et al. (2007) mostraron que el esfuerzo reproductivo (estimado como cuidado parental) y la actividad física, afectan negativamente la respuesta humoral, lo que podría explicar los incrementos en los niveles de parasitismo en estadios reproductivos. Por otra parte, la defensa adaptativa mediada por células ha sido tradicionalmente evaluada utilizando la inyección subcutánea de fitohemaglutinina (**PHA**), una lectina extraída de la planta *Phaseolus vulgaris*, la cual desencadena inflamación local que usualmente presenta un pico de desarrollo a las 12-24 hs desde la inyección y cuya magnitud se ha considerado una estimación de la habilidad del organismo de responder a infecciones intracelulares (ej.: virus; Martin et al., 2008). Sin embargo, al ser inyectada subcutáneamente, la fitohemaglutinina desencadena la infiltración de células de la defensa innata (neutrófilos y macrófagos), además de linfocitos, los responsables de la respuesta mediada por células (Goto et al., 1978; Turmelle et al., 2010; Vinkler et al., 2010). Actualmente, se recomienda realizar un análisis histológico en el organismo de interés previo a utilizar este índice, para determinar el tipo celular predominante al momento de tomar la medición de inflamación, y determinar qué componentes de la defensa (innatos, adaptativos o ambos) se están estimulando (Turmelle et al., 2010). La magnitud de la respuesta a PHA se ha visto asociada a la condición corporal (ej.: Roulin et al., 2007; Vinkler et al., 2012), la nutrición (ej.: Lochmiller et al., 1993; Hoi-Leitner et al., 2001), la carga parasitaria (ej.: Gonzalez et al., 1999; Goüy De Bellocq et al., 2006), la estacionalidad (ej.: Roulin et al., 2007; Huyghe et al., 2010), entre otros factores, en algunas especies. Desde la ecoinmunología, se ha sugerido que las defensas inmunes jugarían un rol importante en la evolución de las características de historia de vida de las especies y poblaciones. Se ha propuesto que las especies de “vida lenta” -aquellas con períodos de desarrollo largos, gran inversión en la descendencia y vidas longevas- utilizarían mayormente el componente adaptativo de la defensa inmune, el cual requiere mayor tiempo y recursos para su actividad que la defensa innata, pero es efectivo frente a infecciones repetidas -lo cual es factible a lo largo de su vida-. Como contrapartida, las especies de “vida rápida” -aquellas con tiempos generacionales cortos, usualmente con descendencia numerosa y sin cuidado parental- desarrollarían más la defensa innata, la cual es activada de manera rápida ante una herida o infección (Lee, 2006). Si bien se han realizado estudios ecoinmunológicos en un amplio rango de especies, la mayoría de ellos han involucrado aves, probablemente como consecuencia de su relativamente complejo sistema inmune y la posibilidad de manipular experimentalmente algunas de sus decisiones de historia de vida (ej.: modificación del tamaño y origen de la camada, Norris y Evans, 2000). Así, surge la necesidad de incorporar estudios en especies de otros grupos, con diferentes características de historia de vida, para poder corroborar o modificar las teorías acerca de las fuerzas que dirigen la variación en las defensas y estrategias inmunes (Lee, 2006; Martin et al., 2008a; Previtali et al., 2012).

Tabla II. Ensayos comúnmente utilizados en estudios ecoinmunológicos para estimar distintos componentes de la defensa inmune.

Componente inmune medido	Ensayo	Interpretación	Referencia
Defensa innata constitutiva	Capacidad bactericida del plasma (BKC)	Mide la capacidad bactericida de componentes presentes en el plasma	(Matson et al., 2006b)
	Hemólisis	Mide los niveles de proteínas del complemento mediante su capacidad de hemolizar glóbulos rojos extraños	(Matson et al., 2005)
	Conteos de leucocitos	Estima la cantidad de leucocitos circulantes como estimativo de la actividad inmune celular	(Norris y Evans, 2000; Voigt, 2000)
Defensa innata inducida	LPS (lipopolisacárido)	Medida de la respuesta aguda pro-inflamatoria	(Owen-Ashley et al., 2006)
Defensa adaptativa constitutiva	Inmunoglobulina G (IgG) total	Indicativo de la capacidad de respuesta mediada por anticuerpos específica	(Greives et al., 2006)
	Hemoaglutinación	Medida del nivel de anticuerpos naturales mediante su capacidad de aglutinar glóbulos rojos extraños	(Matson et al., 2005)
Defensa adaptativa inducida	Concavalina A (CoA)	Indicativo del nivel de respuesta mediada por células ante infecciones intracelulares	(Fitzgerald et al., 1992)
	Hemocianina de la lapa californiana (KLH)	Medida de la respuesta adaptativa mediada por anticuerpos, indicativa del nivel de respuesta ante infecciones extracelulares	(Hasselquist et al., 1999)
	Glóbulos rojos de oveja (SRBC)	Medida de la respuesta adaptativa mediada por anticuerpos, indicativa del nivel de respuesta ante infecciones extracelulares	(Deerenberg et al., 1997)
	Virus de Newcastle (NDV)	Medida de la respuesta adaptativa mediada por anticuerpos, indicativa del nivel de respuesta ante infecciones extracelulares	(Fair y Ricklefs, 2002)
	Vacuna de la difteria-tétanos	Medida de la respuesta adaptativa mediada por anticuerpos, indicativa del nivel de respuesta ante infecciones extracelulares	(Svensson et al., 1998)

SISTEMA DE ESTUDIO

Las interacciones de los animales con sus ambientes constituyen aspectos fundamentales de la biología de los mismos. Estas interacciones determinan importantes características de los individuos, desde su morfología, fisiología y reproducción hasta la interacción con coespecíficos (Busch et al., 2000). Los ambientes subterráneos son hábitats muy particulares; su construcción, uso y mantenimiento representa un aspecto central en la vida de sus habitantes (Busch et al., 2000), influyendo significativamente en su ecología. Estos ambientes se caracterizan por ser oscuros, de microclima estable, hipóxicos e hipercápnicos y por la ausencia de pistas sensoriales disponibles en la superficie (Buffenstein, 2000; Francescoli, 2000). Algunos mamíferos, entre ellos numerosas especies de roedores, viven en estos ambientes. Los roedores subterráneos suelen construir madrigueras extensas y complejas, que contienen numerosas cámaras y aberturas (Antinuchi y Busch, 1992; Pearson, 1984). Los suelos que habitan son porosos o de baja capacidad de retención de agua (Antinuchi y Busch, 1992). La vegetación es también un factor determinante de las zonas habitables por estos grupos: dados sus hábitos herbívoros, las áreas deben contar con especies vegetales apropiadas para su alimentación; y la estructura y densidad de la vegetación debe ser tal que se genere el apropiado flujo de calor en el hábitat subterráneo (Comparatore et al., 1991). En particular, los roedores subterráneos de la familia *Ctenomyidae* habitan en la mitad sur de América del Sur, siendo el género *Ctenomys* el único género viviente de esta familia (cuyos representantes son conocidos comúnmente como **tuco-tucos**). Entre más de las 60 especies que lo componen (Lucero et al., 2008), los individuos de la especie *C. talarum* (Imagen I) se distribuyen a lo largo de la costa de la provincia de Buenos Aires, desde Magdalena (35°3'S, 57°32'W), hasta Bahía Blanca (38°40'S, 62°20'W). Numerosos aspectos de la ecología, fisiología y genética de esta especie han sido estudiados (ej.: Cutrera et al., 2003; Fanjul et al., 2006; Mora et al., 2007; Zenuto, 1999). Estos tuco-tucos son sedentarios, territoriales y solitarios (Busch et al., 1989); realizan la mayoría de sus actividades en sus madrigueras individuales, saliendo a la superficie únicamente durante breves excursiones para recolectar pastos cercanos a las bocas de sus cuevas (Busch et al., 2000). Son considerados roedores de "vida lenta", dado que las hembras tienen períodos de gestación largos (95 días; Zenuto et al., 2001), dan a luz crías altriciales sólo dos veces por año (Zenuto et al., 2002b), viven alrededor de dos años y presentan madurez sexual tardía (Busch et al., 1989). Poseen un sistema de apareamiento poligínico (Zenuto, 1999) y la estación reproductiva se extiende durante 9 meses, comenzando al inicio del otoño (Malizia y Busch, 1991). Sus hábitos de alimentación son generalistas y oportunistas: consumen raíces y recolectan la porción aérea de pastos y hierbas en proporción a la disponibilidad que encuentren en la superficie próxima a sus túneles (del Valle et al., 2001). *C. talarum* es hospedador de una fauna parasitaria poco diversa; sin embargo, la prevalencia de dichas infecciones es alta, probablemente como consecuencia de las condiciones del ambiente subterráneo, que facilitan la transmisión (Rossin y Malizia, 2002). Su fauna parasitaria

gastrointestinal está compuesta por los nematodos *Trichuris pampeana*, *Paraspidodera uncinata*, *Strongyloides myopotami*, *Trichostrongylus duretteae* y *Pudica ctenomyidis*, que se encuentran en diferentes secciones del intestino (Rossin y Malizia, 2002; Rossin et al., 2006; Rossin et al., 2010a), *Graphidioides subterraneus*, un parásito hematófago que se aloja en el estómago (Rossin et al., 2005) y *Taenia talicej*, cestode encontrado sólo en su estadio larval en la cavidad peritoneal (Rossin et al., 2010b). También se ha descrito, en alta prevalencia, la presencia de un protozoo intestinal del género *Eimeria* (Cutrera et al., 2011). Por otra parte, los ectoparásitos más frecuentemente encontrados en *C. talarum* son dos especies de piojos (*Eulinognathus americanus* y *Gyropus parvus*; Martino et al., 2014), pulgas (*Poligenis* sp.) y ácaros (Familias Laelapidae y Listrophoridae; Cutrera et al., 2011). En cuanto al sistema inmune de estos individuos, dos técnicas ampliamente utilizadas en Ecoinmunología han sido ensayadas para comenzar a entender sus estrategias inmunes: la inyección intraperitoneal de SRBC (Cutrera et al., 2010) y el test de PHA (Merlo et al., 2014). La exposición a SRBC genera en los tucucos una respuesta humoral (por anticuerpos) que implica un costo energético que es comparable al costo de lactancia para las hembras (Cutrera et al., 2010), proceso que se considera el de mayor demanda energética en la mayoría de las especies de mamíferos (Thompson 1992). La magnitud

Imagen I. Ejemplar adulto de *Ctenomys talarum*. Fotografía: F. Luna.



de esta respuesta (títulos de anticuerpos) no difiere entre sexos ni en relación a la estacionalidad reproductiva (Cutrera et al., 2010). Por otra parte, la inyección subcutánea de PHA genera una respuesta inflamatoria local desde las 6 hasta las 48 hs posteriores a la exposición al antígeno (Merlo et al., 2014; Fig. II). Se caracterizó histológicamente la composición leucocitaria que infiltra a la zona de exposición durante ese período de tiempo, encontrándose componentes celulares adaptativos (linfocitos) pero principalmente innatos (mediadores de inflamación; neutrófilos, eosinófilos y macrófagos; Merlo et al., 2014; Fig. III). Sin embargo, la abundancia de ninguno de estos componentes se encontró asociada a la magnitud de la inflamación medida (Merlo et al., 2014). A nivel circulatorio sistémico, esta respuesta no genera modificaciones en las abundancias leucocitarias circulantes (Merlo et al., 2014). Finalmente, se detectó que tanto la magnitud de la inflamación como la abundancia de componentes celulares presenta una notable variación interindividual (Merlo et al., 2014).

Figura II. Inflamación en respuesta a PHA (línea continua) o PBS (línea punteada) medida a las 6, 12, 24, 48, 72 hs post-inyección. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre patas inyectadas con PHA vs. PBS. Modificado de (Merlo et al., 2014).

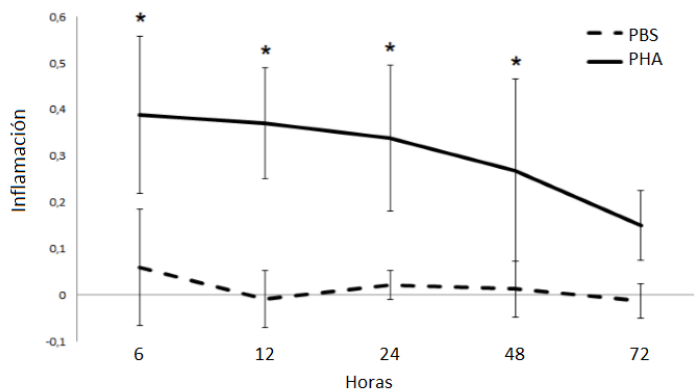
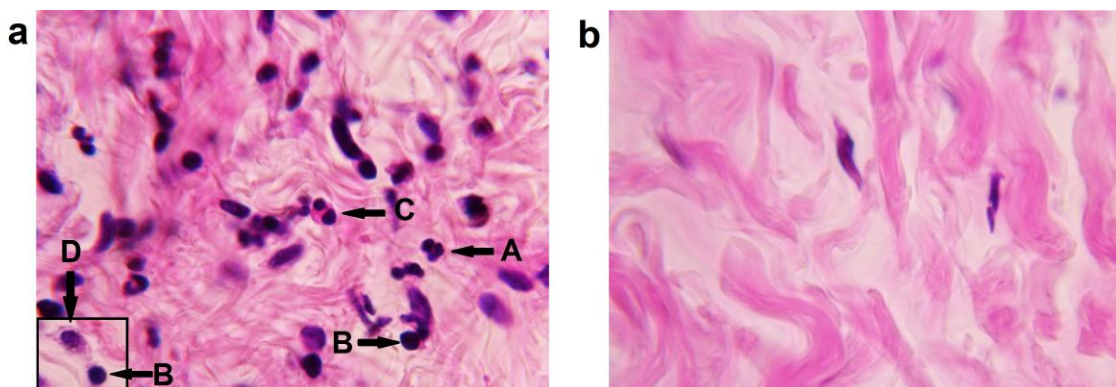


Figura III. Secciones de tejido epidérmico de patas traseras de individuos *C. talarum*, 12 hs después de ser inyectadas con PHA (a) o PBS (control; b), vistas a 1000x. El panel a) muestra infiltración de neutrófilos (A), linfocitos (B), eosinófilos (C) y macrófagos (D), mientras que el panel b) muestra la ausencia de infiltración. Tinción de May–Grunwald–Giemsa.



OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es *evaluar los factores que modulan la variabilidad en la magnitud de la respuesta inmune en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum**. Se focaliza en la respuesta inflamatoria como principal variable de interés, aunque también se consideran componentes inmunes constitutivos, en el marco de la estimación de la condición individual, y respuesta humoral, en el contexto de los compromisos que pueden establecerse entre diferentes vías inmunes. Para alcanzar el mencionado objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

1) *estimar el costo energético de la respuesta a PHA y evaluar el compromiso entre ésta y la reproducción y el crecimiento* (capítulo 1), dos procesos energéticamente demandantes para los individuos,

2) *determinar las asociaciones entre la carga parasitaria, la condición física y la capacidad de respuesta inmune* (capítulo 2), a modo de explorar principalmente si la magnitud de la respuesta inflamatoria se encuentra asociada a alguna de éstas características intrínsecas del organismo y/o sus niveles naturales de parasitismo,

3) *evaluar si las infecciones parasitarias afectan la capacidad de *C. talarum* de responder posteriormente a PHA como un antígeno novedoso* (capítulo 3), para lo que se realizan manipulaciones experimentales de la carga parasitaria,

4) *explorar el efecto de la calidad y cantidad de la ingesta de alimento en la capacidad de los individuos de montar la respuesta inmune inflamatoria frente a PHA* (capítulo 4), y

5) *analizar si frente a la aplicación simultánea de dos antígenos, uno que dispara una respuesta inmune humoral (SRBC) y otro una respuesta inmune inflamatoria y adaptativa celular (PHA), existe algún compromiso que determina el favorecimiento de una respuesta sobre otra* (capítulo 5).

De esta manera, se explora la relación de varios factores intrínsecos del individuo (asociados a la condición física/fisiológica) y extrínsecos (dieta, parasitismo –como modulador directo o indirecto a través del efecto sobre la condición física-) con la respuesta inmune de interés, además de la determinación del costo energético de la misma y de los potenciales compromisos con otras actividades/procesos que atraviesan estos roedores subterráneos (reproducción y crecimiento). Para concluir, en el capítulo 6 se destacan los resultados principales obtenidos en los muestreos y experimentos llevados a cabo, los que se discuten en el marco de los rasgos de historia de vida que caracterizan a *C. talarum* y las condiciones ecológicas particulares del ambiente subterráneo que habitan, bajo una perspectiva ecoinmunológica.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DEL COSTO ENERGÉTICO ASOCIADO A LA RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA: COMPROMISOS FRENTE A LA REPRODUCCIÓN Y AL CRECIMIENTO

El contenido de este capítulo fue publicado en *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* (volumen 175: 90-95) bajo el título: "PHA-induced inflammation is not energetically costly in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos)". Autores: Merlo, J. L.; Cutrera, A.P.; Luna, F. y Zenuto, R.R. Año: 2014; y en el volumen 174: 23-28 bajo el título: "Assessing the energetic costs and trade-offs of a PHA-induced inflammation in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: Immune response in growing tuco-tucos". Autores: Cutrera, A. P., Luna, F., Merlo, J. L., Baldo, M. B. y Zenuto, R. R. Año: 2014.

CAPÍTULO 1: EVALUACIÓN DEL COSTO ENERGÉTICO ASOCIADO A LA RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA: COMPROMISOS FRENTE A LA REPRODUCCIÓN Y AL CRECIMIENTO

INTRODUCCIÓN

El desarrollo, mantenimiento y activación del sistema inmune, así como de otras funciones fisiológicas, puede implicar costos de gran magnitud (Lochmiller y Deerenberg, 2000). El desarrollo de este sistema implica la diferenciación y selección de linfocitos en el timo y la bursa, por ejemplo, así como la proliferación de las distintas poblaciones leucocitarias y su ubicación en epitelios y órganos linfáticos secundarios. El mantenimiento puede entenderse como el estado quiescente del sistema, donde ocurren funciones “de rutina” como es la eliminación de células anormales propias del individuo. El uso del sistema inmune implica la activación del mismo hacia el control o eliminación de moléculas u organismos extraños (Klasing, 2004). Estos distintos estados de la defensa conllevan distintos costos para el organismo, y además, estos varían dependiendo del componente inmune considerado. Por ejemplo, a través de mediciones directas (ej.: consumo de energía) e indirectas (a través de compromisos con otras funciones) de los costos de los distintos estados (desarrollo, mantenimiento, uso) de la defensa en aves, principalmente *Galliformes*, se encontraron notorias diferencias en los costos entre la defensa innata y la adaptativa (Tabla 1.1; Klasing, 2004). En general, se considera que el desarrollo, mantenimiento y uso de las defensas innatas son relativamente bajos (Lee, 2006), pero que el costo asociado a la inmunopatología puede ser muy alto (Råberg y Grahn, 1998). Las defensas adaptativas, por otra parte, se asumen costosas de desarrollar, dado que implican la producción de anticuerpos específicos, pero su uso sería relativamente poco costoso (Lee, 2006; Råberg et al., 2002). Similares análisis a los realizados en *Galliformes* sobre los costos de los distintos componentes de la defensa son requeridos en otras especies de aves y otros grupos, como los mamíferos, ya que el sistema inmune difiere incluso entre especies de aves (por ejemplo en la estructura y función de las inmunoglobulinas; Higgins, 1996; Klasing, 2004). Evaluar el costo de la respuesta inmune y su representación relativa en el presupuesto energético resulta una información clave ya que permitirá comprender el rol de la inmunidad en la evolución de las estrategias de vida (Derting y Compton, 2003). Una de las aproximaciones más frecuentemente utilizadas al analizar el costo de uso la defensa inmune es la que considera el compromiso que ésta genera con el desarrollo de otra actividad o función (reproducción, cuidado parental, crecimiento), la cual incluye el supuesto de que la respuesta inmune es costosa. Si bien la energía

constituye la moneda más frecuentemente propuesta como mediadora de éstos compromisos (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Sheldon y Verhulst, 1996), resultan escasas las estimaciones directas del costo energético asociado a la generación de una respuesta inmune, las cuales han sido realizadas principalmente en aves (revisión de Hasselquist y Nilsson, 2012; Klasing, 2004; aunque también se aportan en roedores, (Cooper et al., 1989; Demas et al., 1997; Derting y Virk, 2005; Råberg et al., 2002). Así, aunque frecuentemente se asume una relación positiva entre la magnitud de una respuesta inmune y su costo energético, la misma necesita ser verificada (Saino et al., 2002). A partir de los pocos estudios disponibles, los cuales involucran mayormente el uso de PHA y SRBC como antígenos, la relación entre la respuesta inmune y el cambio en el metabolismo energético de reposo aún no es claro (ej. Nilsson et al., 2007; Svensson et al., 1998). La respuesta inmune es compleja e involucra varios componentes. La inflamación, que es principalmente disparada ante la entrada de microorganismos o por tejido dañado, se propone asociada a un gran gasto energético, dado que implica la producción de citoquinas (moléculas de señalización celular del sistema inmune; Graham et al., 2007) por parte de los macrófagos activados y el reclutamiento e infiltración de poblaciones leucocitarias (Klasing y Leshchinsky, 1999). En contraste, el costo energético de la producción de linfocitos requeridos para una respuesta adaptativa se considera relativamente bajo (Klasing y Leshchinsky, 1999). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para elucidar los costos relativos de los diferentes componentes de la respuesta inmune (Klasing, 2004) así como el rol del ambiente y de las características de historia de vida en la modulación de los costos de la respuesta y las diferentes estrategias utilizadas que permiten mantener la inmunocompetencia (Sandly y Minchella, 2003).

El compromiso entre la defensa inmune y la reproducción ha sido ampliamente estudiado, siendo considerado uno de los costos de la reproducción (Harshman y Zera, 2007). Estos estudios han sido realizados principalmente en aves, y han demostrado que el incremento en el esfuerzo reproductivo (ej. cuidado parental, preñez, lactancia) se asocia a una mayor susceptibilidad a infecciones (Norris y Evans, 2000) o a una menor respuesta inmune (Duffy et al., 2000; Richner et al., 1993). Por ejemplo, el incremento en el esfuerzo parental disminuye la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra antígenos experimentalmente inyectados en pinzones cebr

Tabla 1.1. Tiempo de desarrollo y distintos costos asociados a la defensa inmune de aves. Modificado de Klasing (2004).

Tipo de defensa	Tiempo de desarrollo	Costo de desarrollo	Costo de mantenimiento	Costo nutricional de uso	Costo inmunopatológico de uso
Innata	Corto	Bajo	Medio	Muy alto*	Muy alto
Adaptativa	Largo	Muy alto	Bajo	Bajo	Variable

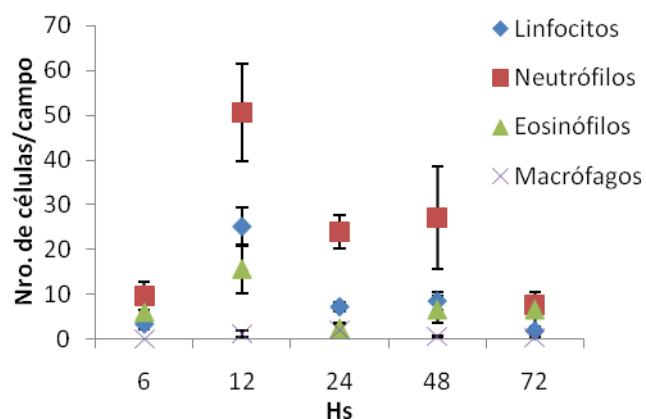
*en referencia principalmente a la respuesta de fase aguda.

(*Taeniopygia guttata*; Deerenberg et al., 1997) y papamoscas (*Ficedula albicollis*; Nordling y Andersson, 1998). Se ha sugerido que este compromiso entre la reproducción y la inmunidad ocurriría por la competencia entre ambos procesos por los recursos disponibles o por los efectos inmunosupresores que pueden generar las hormonas asociadas a la reproducción (ej. testosterona; Harshman y Zera, 2007). A su vez, se ha documentado ampliamente que ocurren diferencias en el desarrollo de respuestas inmunes entre sexos (Schuurs y Verheul, 1990; Zuk y McKean, 1996). Los machos generalmente exhiben menores respuestas inmunes y mayor intensidad y prevalencia de infecciones en comparación con hembras de la misma especie, lo que ha sido atribuido al compromiso entre el nivel de despliegue de caracteres sexuales secundarios por parte de los machos y la resistencia a parásitos (Hamilton y Zuk, 1982).

Por otra parte, también se han investigado los compromisos entre la defensa inmune y el crecimiento, principalmente en estudios asociados a la producción de aves de corral (ej.: van der Most et al., 2011). En cuanto a los mamíferos, se sabe que en la etapa de lactancia pueden optimizar la asignación de energía al crecimiento y la termorregulación en relación a otros procesos costosos, como la inmunidad; lo que resulta de este balance puede variar a través de diferentes etapas del desarrollo, dependiendo de qué procesos se prioricen (crecimiento, madurez sexual, desarrollo de defensas inmunes). Por ejemplo, las crías parasitadas de ratones domésticos -*Mus musculus*- crecen rápido, los órganos implicados en la respuesta a dichos parásitos (bazo e intestino delgado) tienen mayor tamaño y alcanzan la madurez sexual tempranamente en comparación con crías no parasitadas, probablemente modulando así los efectos de los parásitos (Kristan, 2002). Por otro lado, en especies que exhiben dimorfismo sexual, los miembros del sexo de mayor tamaño invierten menos en la defensa inmune dado que deben asignar mayores recursos y energía al crecimiento (Chin et al., 2005; Fargallo et al., 2002). Además de que la distribución de recursos limitados entre la respuesta inmune y el crecimiento puede resultar en correlaciones negativas entre la magnitud de estos dos procesos (Fair y Hansen, 1999), se espera que la respuesta inmune de animales en desarrollo sea relativamente menor a la de los adultos debido a la inmadurez de su sistema inmune (Palacios et al., 2009). En particular, en los mamíferos recién nacidos, el sistema inmune adaptativo es funcionalmente inmaduro y los neonatos dependen solamente de su sistema inmune innato y de los componentes inmunes adquiridos pasivamente a través de fuentes maternas (Cahill et al., 1999). Aunque la mayor parte de la inmunidad en esta fase del desarrollo es innata, este período también se caracteriza por la inmadurez de la función y la producción de neutrófilos (Carr, 2000). Los infantes humanos expuestos a LPS producen una liberación de señales pro inflamatorias por parte de células mononucleares notablemente menor en comparación con adultos (Levy, 2005), lo que suma evidencia al hecho de que la respuesta innata también atraviesa un período de madurez en la vida temprana.

En el presente estudio se propuso determinar el costo energético de la respuesta principalmente inflamatoria inducida por PHA y su posible compromiso con la reproducción y el crecimiento en *C. talarum*. El uso de PHA permitió analizar el costo de la respuesta inflamatoria sin disparar costos adicionales asociados a la replicación patogénica y al daño tisular, característicos de una infección causada por un organismo patógeno. Numerosas razones hacen que *C. talarum* sea un modelo interesante para estudiar el costo de la respuesta inducida por PHA: a) el costo energético de una gran variedad de sus actividades han sido evaluados y puestos en contexto de un presupuesto energético diario y a lo largo de la vida del organismo, lo cual permite obtener no sólo el costo energético efectivo de la respuesta inmune generada sino también el costo relativo en relación a otros procesos o al presupuesto energético en distintos períodos de la vida del organismo (Antinuchi et al., 2007), b) la respuesta humoral ha sido identificada como energéticamente costosa, y ésta varía en relación a la condición reproductiva (Cutrera et al., 2010), y c) la respuesta inflamatoria a PHA es detectable macroscópicamente y los procesos que subyacen a la misma ya han sido descritos (ver Introducción general). Como se mencionó anteriormente, la inflamación es detectable ya a las 6 hs después de su aplicación y perdura por 48 hs, infiltrando en la zona neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y macrófagos. El pico de leucocitos totales infiltrados a la zona afectada se verificó a las 12 hs post-inyección (Fig. 1.1), y su principal componente celular fue el neutrófilo (célula de la defensa innata; Merlo et al., 2014). En base a esta información disponible sobre la dinámica de la respuesta, se propuso analizar el costo energético del desarrollo de la respuesta a PHA a las 6 y 12 hs post-inyección, momento de inicio de la respuesta inflamatoria y pico de leucocitos infiltrados a la zona afectada, respectivamente. Se plantea la hipótesis de que en esta especie el proceso desencadenado por PHA, principalmente inflamatorio, implica un costo energético elevado, que se evidencia en un incremento en la tasa metabólica de reposo (TMR, gasto energético necesario para mantener las funciones vitales durante el reposo) de los animales expuestos al antígeno. Además, se espera que el costo sea

Figura 1.1. Promedio de los conteos leucocitarios (\pm e.e.) en tejidos extraídos de patas traseras a las 6, 12, 24, 48 o 72 hs post-inyección de PHA, en individuos *Ctenomys talarum*. N = 5 individuos/tiempo. Se examinaron 5 campos visuales (aumento: 1000x)/muestra de tejido. Modificado de Merlo et al., 2014.



diferente a las 6 vs. 12 hs, dado que los procesos celulares que ocurren a estos tiempos sean diferentes.

La estación reproductiva implica para las hembras de *C. talarum* el desarrollo de actividades energéticamente demandantes como la preñez y la lactancia, a veces incluso en simultáneo (Zenuto et al., 2002a), dado que en esta especie ocurre estro post-parto (Malizia y Busch, 1991). Las hembras preñadas poseen, en promedio, TMRs; un 128% mayores a las de hembras en etapa no reproductiva, y, las hembras amamantando, un 151% (Zenuto et al., 2002a). Para el caso de los machos, la época reproductiva implica el desarrollo de comportamientos de apareamiento, así como de competencia con otros machos por el acceso a las hembras, que frecuentemente implica daño físico (Zenuto et al., 2002b). Esta especie no presenta variación estacional en el tamaño gonadal de los machos (Malizia y Busch, 1991), pero se han reportado niveles de testosterona muy altos entre los reportados para mamíferos, mostrando un pico al inicio de la época reproductiva (Vera et al., 2013).

Los tuco-tucos machos –el sexo de mayor tamaño-, no realizan cuidado parental (Zenuto et al., 2001; Zenuto et al., 2002a). Las crías comparten la cueva con su madre hasta el destete, que ocurre 45 días después del nacimiento. La temperatura corporal de la adultez se alcanza a los 30 días de edad, aunque se estabiliza cuando las crías tienen 45 días (Zenuto et al., 2002a). Las crías alcanzan la TMR de la adultez aproximadamente a los dos meses de edad, cuando ya están preparadas también para abandonar la cueva materna (Zenuto et al., 2002a); sin embargo, la masa corporal de ambos sexos continúa incrementándose después de esta edad e incluso luego de alcanzada la madurez sexual, llegando las hembras a un valor asintótico de tamaño antes que los machos (Malizia y Busch, 1991).

En este estudio se determinó la magnitud y el costo energético del desafío a PHA no sólo en adultos, sino también en crías de 60 días de edad. Este es un período particularmente interesante del desarrollo dado que, aunque los individuos han alcanzado ciertas características metabólicas de la adultez (temperatura corporal, tasa metabólica de reposo y *máxima*, metabolismo termorregulatorio máximo en reposo, Bozinovic y Rosenmann, 1989; Cutrera et al., 2003; Zenuto et al., 2002a, Luna et al., resultados no publicados), siguen creciendo en tamaño corporal y probablemente se enfrentan a nuevos desafíos inmunes asociados con el proceso de abandono de la cueva materna (ej. dada la mayor agresión con hermanos y la madre y con co-específicos de cuevas vecinas, mayor riesgo de predación y exposición a parásitos aumentan los riesgos de heridas e infecciones; Kittlein et al., 2001; Zenuto et al., 2001).

En este estudio se propone evaluar compromisos frente a la reproducción y el crecimiento ensayando la respuesta a PHA por un lado, en adultos de ambos sexos, en la estación reproductiva y no reproductiva y por otro, en individuos juveniles en comparación con adultos. Se espera que durante la estación reproductiva ocurra un compromiso con el desarrollo de la respuesta inflamatoria, generándose así una inversión diferencial en la respuesta dependiendo de

la estación, pudiendo ésta diferir también entre sexos, dados los distintos procesos reproductivos que afrontan machos y hembras. En cuanto al crecimiento, en términos de compromisos, si la respuesta a PHA es energéticamente costosa para los juveniles, se espera que 1) la magnitud de la respuesta inflamatoria macroscópica a PHA sea menor en los tuco-tucos juveniles en comparación con los adultos, dada la distribución de energía y recursos al crecimiento y, posiblemente, a la inmadurez del sistema inmune; y 2) que la magnitud de la inflamación sea menor en juveniles machos que en hembras, debido a la mayor inversión en crecimiento del sexo de mayor tamaño. En términos de costos asociados a la inmunidad, si la respuesta a PHA es energéticamente costosa para los juveniles, se espera una asociación positiva entre la magnitud de la inflamación desencadenada por PHA y el porcentaje de incremento en la TMR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los animales y mantenimiento en cautiverio

Adultos *C. talarum* de ambos sexos fueron capturados en la localidad de Mar de Cobo, Buenos Aires, Argentina (37° 46' S, 57° 27' O; Imagen 1.1). Para esto, se detectaron montículos de tierra fresca típicos de la actividad excavatoria (Imagen 1.2A), donde se realizaron hoyos para acceder a las cuevas subterráneas de estos roedores. Allí, se colocaron trampas de hierro de captura viva (diámetro: 10 cm; longitud: 35 cm; Imagen 1.2B) a modo de prolongación de uno de los túneles de estas cuevas. Se examinaron las hembras capturadas y aquellas que presentaban señales de amamantamiento -mamas peladas y desarrolladas - fueron devueltas a sus cuevas, para evitar así el abandono de las crías. Para el ensayo con adultos, 11 machos (151 ± 22 g) y 10 hembras (107 ± 9 g) fueron capturados durante la época reproductiva (desde septiembre hasta principios de diciembre de 2010) y 22 machos (156 ± 28 g) y 22 hembras (118 ± 15 g) fueron capturados durante la época no reproductiva (desde abril hasta principios de mayo de 2012 y 2014). El peso corporal de los animales capturados no difirió entre años de captura (ANOVA de dos vías: $F_{(1,62)} = 0,55$; $p = 0,58$). Para el ensayo con crías, 20 hembras preñadas fueron capturadas entre julio y noviembre de 2011 y 2012, de las cuales se obtuvieron las crías a emplear en los ensayos (ver más abajo). Todos los individuos fueron transportados al bioterio del Laboratorio de Ecología Fisiológica y del Comportamiento de la Universidad Nacional de Mar del Plata, donde cada uno de ellos fue colocado en una caja plástica individual (25 cm × 32 cm × 42 cm) con viruta de madera como sustrato, media maceta a modo de refugio y una tapa de alambre tejido. Además, las cajas correspondientes a las hembras preñadas fueron cubiertas por telas negras, dado que las hembras en este estadio suelen permanecer siempre en sus cuevas, privadas de luz. Los animales fueron alimentados con cantidades *ad libitum* de achicoria (*Cichorium intybus*), lechuga (*Lactuca sativa*), batata (*Ipomoea batatae*), choclo (*Zea mays*) y semillas de girasol (*Helianthus*

annuus). No se les proporcionó con agua dado que los individuos de esta especie no beben agua libre, sino que la extraen de los alimentos. La temperatura y el fotoperíodo del bioterio fueron controlados automáticamente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, 14 h luz: 10 h oscuridad). Los animales permanecieron en cautiverio durante el período de los ensayos (aproximadamente 10 días), después del cual fueron liberados en el sitio de captura. Los experimentos se iniciaron luego de 7 días de aclimatación de los animales a la condición de cautiverio, dado que es el lapso reportado para el descenso de los niveles de estrés en esta especie, bajo las condiciones de cautiverio descritas anteriormente (Vera et al., 2008). Los individuos fueron uniformemente distribuidos entre los distintos tratamientos para minimizar los posibles efectos de la estacionalidad dentro de cada época (reproductiva y no reproductiva).

Nota ética

Los individuos utilizados en éste y los siguientes capítulos permanecieron en cautiverio durante los ensayos experimentales, después de los cuales fueron devueltos en óptimas condiciones al sitio de captura. Los procedimientos de campo y laboratorio se realizaron conforme a las guías nacionales e institucionales. Los animales fueron cuidados de acuerdo a la guía de la Sociedad Americana de Mastozoólogos (Gannon y Sikes, 2007), la cual es bibliografía de referencia sugerida por el CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la UNMdP para el uso de mamíferos para investigación. Nuestro proyecto cuenta con la aprobación del CICUAL (2555-3/14). Las capturas se realizaron de acuerdo al permiso de captura número 22500-21222 otorgado por el Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.

Protocolo experimental: adultos

Los individuos de ambos sexos fueron aleatoriamente asignados a dos grupos: control (C; estación reproductiva: $n_{\text{machos}} = 6$, $n_{\text{hembras}} = 5$; estación no reproductiva: $n_{\text{machos}} = 10$, $n_{\text{hembras}} = 10$) e inmunodesafiados (ID; estación reproductiva: $n_{\text{machos}} = 5$, $n_{\text{hembras}} = 5$; estación no reproductiva: $n_{\text{machos}} = 12$, $n_{\text{hembras}} = 12$; Tabla 1.1).

Luego del período de aclimatación a las condiciones de cautiverio, la TMR de los animales de ambos grupos fue determinado (ver abajo "Medición de TMR"). Al día siguiente, se realizó el desafío inmune con PHA en los individuos ID ó PBS para el caso de los individuos C (ver abajo "Desafío inmune con PHA"). Luego de 6 hs del desafío inmune, la TMR de 10 machos (5 C y 5 ID) y 10 hembras (5 C y 5 ID; Tabla 1.1) fue determinado nuevamente. Para el resto de los animales ($n_{\text{machos}} = 23$ y $n_{\text{hembras}} = 22$; Tabla 1.1), la segunda medición de TMR fue realizada 12 hs después del desafío.

Protocolo experimental: crías

De las 20 hembras preñadas capturadas, 19 dieron a luz a un total de 30 crías. Tres camadas nacieron en 2011 y las restantes 9 en 2012, con un promedio de $2,76 \pm 1,09$ crías/camada (rango: 1 a 5). Con la excepción de una camada de una sola cría, se pudo utilizar uno o dos “pares” de crías por camada para el diseño experimental ($n = 14$ pares). Una cría de cada par fue asignada al grupo control (grupo C) y la otra al grupo de los inmunodesafiados (grupo ID). De esta manera, todas las camadas tuvieron al menos una cría inyectada con PBS y otra con PHA.

Para el caso de las camadas de número impar de crías (1, 3 o 5), una cría fue utilizada para determinar el tiempo en que la respuesta inflamatoria a PHA es máxima. Así, nueve crías de 60 días de edad fueron inyectadas subcutáneamente con PBS en la pata trasera izquierda y con PHA en la derecha (mismas dosis y metodología utilizada para el resto de los individuos; ver abajo “Desafío inmune con PHA”). Se determinó la inflamación desencadenada en ambas patas a intervalos de tiempo de 6, 12, 24 y 48 hs (± 30 min) post-inyección.

La TMR de las 28 crías (14 pares) fue medido cuando éstas alcanzaron los 60 días de edad (ver abajo, “Medición de TMR”). Después de esto, se inyectó PBS (grupo C) o PHA (grupo ID) como se describe posteriormente (“Desafío inmune con PHA”). La TMR fue medida por segunda vez a las 12 hs post-inyección.

Desafío inmune con PHA

Los tuco-tucos (adultos y crías de 60 días de edad) fueron inyectados subcutáneamente en el empeine de la pata trasera derecha con solución estéril de buffer salino fosfato (PBS: phosphate-buffered saline; $0,3 \mu\text{l/g}$ de peso corporal; grupos C) o PHA (*Phaseolus vulgaris* PHA- Sigma L-8754, solución disuelta en PBS, 3 mg/ml ; $0,3 \mu\text{l/g}$ de peso corporal; grupos ID) utilizando una aguja 30 G. Los individuos inyectados con PBS sirvieron como control de la respuesta inmune que pudiera desencadenar la aplicación con la aguja, o bien, el PBS utilizado como medio para disolver el PHA. Antes de la inyección, el área del empeine fue tratada con solución antiséptica (Pervinox; Laboratorio Phoenix, Buenos Aires, Argentina) y el grosor de la pata fue medido con un calibre digital (Insize, Sao Paulo, Brazil) de $0,01 \text{ mm}$ de precisión. 24 hs después de la inyección, el grosor de la pata trasera fue medido nuevamente. Las mediciones fueron realizadas siempre por la misma persona a fin de minimizar el error en las mismas. La respuesta inflamatoria frente a PHA/PBS se calculó como la diferencia entre el grosor posterior y previo a la inyección dividido por el grosor previo ((inflamación = $\text{grosor}_{\text{post}} - \text{grosor}_{\text{pre}}$)/ $\text{grosor}_{\text{pre}}$; Xu y Wang, 2010).

Imagen 1.1. Ubicación de la localidad de Mar de Cobo en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (indicada con el punto rojo).

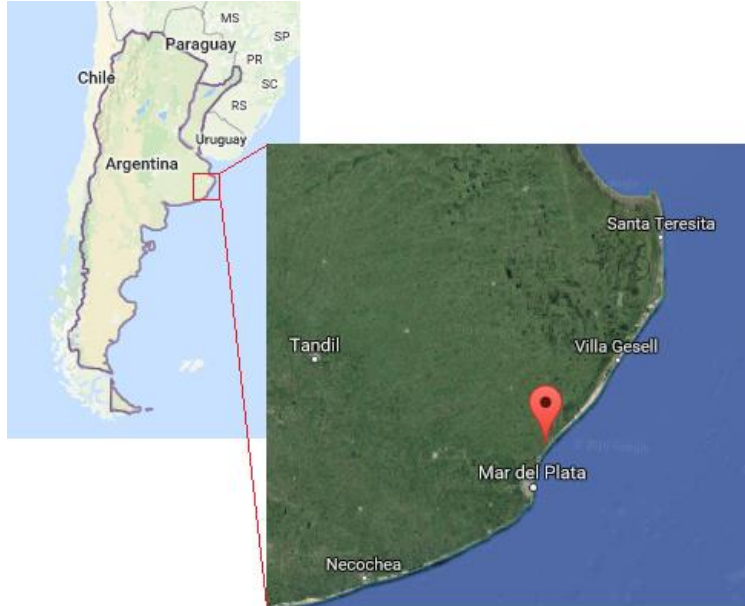
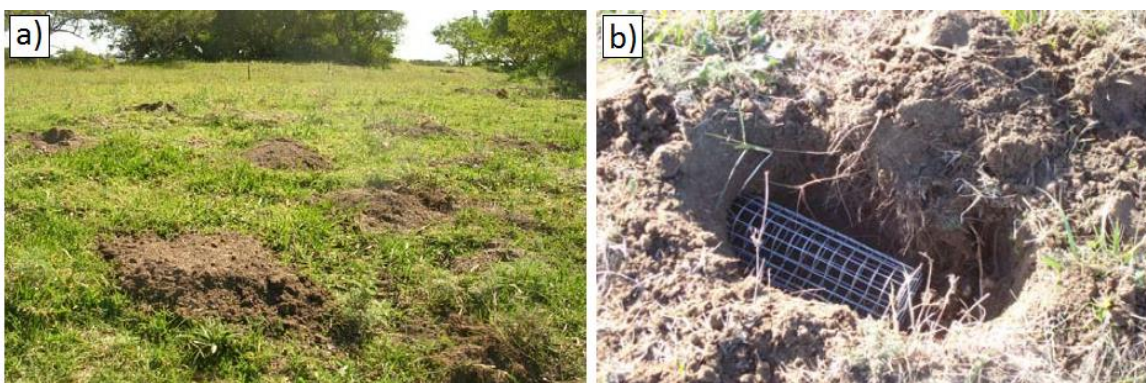


Imagen 1.2. a) Montículos de tierra removida por los tuco-tucos, en el sitio de captura (Fotografía: M. Mora). b) Trampa de alambre ubicada en la entrada de una cueva de *Ctenomys talarum* (Fotografía: S. Fanjul).



Medición de TMR

El consumo de oxígeno de cada individuo fue medido utilizando un respirómetro computarizado de presión positiva y circuito abierto (Sable System, Las Vegas, NE, USA) como se describe en Cutrera et al. (2010) y Luna et al. (2009). Dado que *C. talarum* exhibe un patrón arrítmico de

actividad diaria (Luna et al., 2000), las mediciones fueron realizadas por la mañana o la tarde. La cámara del respirómetro consistió en un cilindro de acrílico transparente de 1,8 l de volumen. La temperatura en la misma se controló automáticamente mediante un sistema computarizado ($25 \pm 1^\circ$ C). Mediante la utilización de un controlador de flujo (Sierra Instruments, Monterey, CA, USA) se aseguró el equilibrio de la cámara, suministrando 1400 ml de aire seco y libre de CO_2 por minuto para las mediciones de adultos, y 1200 ml para las mediciones de crías (Lasiewski et al., 1966). Antes del paso por la cámara, el aire atravesó una columna con absorbente de CO_2 (IQB) y otra con absorbente de agua (sílica gel). Se muestreó 180 ± 10 ml de aire excurrente de la cámara por minuto y el consumo de O_2 mediante un analizador de oxígeno FC-1B a cada segundo y registrado mediante el software ExpeData (Sable System). Los animales fueron aclimatados en la cámara durante 30 min antes de comenzar las mediciones. La línea de base del respirómetro se estableció en 20,95% de oxígeno antes de comenzar cada medición. La tasa de consumo de oxígeno fue calculada utilizando la ecuación 4a de Withers (1977). La TMR fue calculada utilizando un período de 5 min donde se verifique el menor consumo de oxígeno registrado (estado de reposo del animal) en un registro de 60 min (Luna y Antinuchi, 2007) y expresado como ml de O_2 consumidos por hora ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$).

Análisis estadísticos

Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, USA), utilizando un valor $\alpha < 0,05$ para rechazar las hipótesis nulas. La distribución normal de las variables fue testada con análisis de Kolmogorov–Smirnov, mientras que la homogeneidad de la varianza se verificó mediante tests de Levene.

Para el análisis de los datos obtenidos de adultos, se realizó un ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de la estación (reproductiva vs. non-reproductiva), el sexo y el tratamiento (C vs. ID) sobre la respuesta inflamatoria. Un ANCOVA de una vía y medidas repetidas se utilizó para testear el efecto del tratamiento (PHA vs. PBS) en el peso corporal a las 0 y 12 hs. Se realizó un ANCOVA de dos vías y medidas repetidas (covariable: peso corporal) para analizar el efecto del tratamiento (C vs. ID) y el tiempo de la medición de respirometría (6 vs. 12 hs) sobre la TMR de los animales capturados durante la estación no reproductiva. Un ANCOVA de tres vías y medidas repetidas (covariable: peso corporal) se utilizó para testear si la TMR difiere entre estaciones, sexos o tratamientos. Para evaluar si la magnitud de la respuesta inflamatoria estuvo correlacionada con la TMR, primero se removió el efecto del peso corporal sobre la medida de la inflamación y la TMR 12 hs luego de la inyección con PHA obteniendo los residuales de la regresiones lineales entre la medida de inflamación o la TMR 12 hs post inyección y el peso corporal. Los residuales de las medidas inflamatorias fueron correlacionados con los residuales de las mediciones de TMR.

Para el análisis de datos obtenidos de las crías, primeramente se utilizó un ANOVA de dos vías para testear si existieron diferencias en la magnitud de la inflamación de éstas y la de adultos, o entre sexos. Un ANOVA de dos vías también se utilizó para testear si la magnitud de la inflamación en juveniles (crías) difirió entre tratamientos (animales inyectados con PBS vs. PHA) o sexos. Un ANOVA de medidas repetidas fue utilizado para testear la hipótesis de que la inflamación inducida por PHA no varía entre diferentes tiempos post-inyección y entre tratamientos (PBS vs. PHA). Un ANOVA de dos vías fue utilizado para testear si la diferencia en el peso corporal (Δpc) entre las 0 y las 12 hs post-inyección, calculado como $(\text{peso corporal}_{12 \text{ hs}} - \text{peso corporal}_{0 \text{ hs}}) / \text{peso corporal}_{0 \text{ hs}}$, difirió entre tratamientos (PBS vs. PHA) o sexos. Un ANOVA de medidas repetidas y dos vías (con el peso corporal como covariable) fue usado para testear si la TMR difirió entre tratamientos (PBS vs. PHA) o sexos. También se evaluó la asociación entre la magnitud de la inflamación inducida por PHA y la TMR en crías. Para esto, los efectos del peso corporal sobre la medida inflamatoria y la TMR 12 hs post-inyección fueron removidos usando los residuales de una regresión lineal entre la medida inflamatoria 24 hs después de la inyección y el peso corporal, y una regresión lineal entre la TMR 12 hs post inyección de PHA y el peso corporal. Los valores de masa corporal, TMR e inflamación fueron normalizados mediante transformaciones logarítmicas. Los residuales de las medidas de inflamación fueron correlacionados con los residuales de la TMR mediante una correlación de Pearson. A través del texto, los resultados están expresados como la media \pm error estándar.

RESULTADOS

Desafío inmune en adultos

La respuesta inflamatoria fue significativamente mayor en individuos inyectados con PHA ($n_{\text{rep}} = 10$, $n_{\text{norep}} = 24$) en comparación con los inyectados con PBS ($n_{\text{rep}} = 11$, $n_{\text{norep}} = 20$) (ANOVA de tres vías: $F_{1,57} = 69,27$; $p < 0.001$; Fig. 1.2). No se encontraron diferencias en la respuesta inflamatoria entre individuos de distintas estaciones o sexos (ANOVA de tres vías, factor "estación": $F_{1,57} = 0,27$; $p = 0,60$; factor "sexo": $F_{1,57} = 0,002$; $p = 0,97$; Fig. 1.2). El peso corporal a las 0 y 12 hs no difirió entre animales ID y C (ANCOVA de una vía: $F_{1,43} = 0,77$; $p = 0,39$; Tabla 1.1). La TMR no difirió entre las 6 y las 12 hs post-inyección (ANCOVA de dos vías: $F_{1,39} = 0,31$; $p = 0,58$; Fig. 1.2). La TMR de los animales inyectados con PHA no difirió de los inyectados con PBS (ANCOVA de 3 vías y medidas repetidas: $F_{1,35} = 2,83$; $p = 0,10$; Tabla 1.2; Fig. 1.3). Además, el sexo y la estación no tuvieron efectos significativos sobre la TMR (ANCOVA de 3 vías y medidas repetidas, factor "sexo": $F_{1,35} = 0,06$; $p = 0,81$; factor "estación": $F_{1,35} = 3,15$; $p = 0,08$; Tabla 1.2; Fig. 1.3). Los residuales de la regresión entre el peso corporal y la inflamación no se correlacionaron con los

residuales de la regresión entre el peso corporal y el incremento en la TMR 12 hs después de la inyección ($r = 0,20$; $p = 0,36$; $n = 24$).

TABLA 1.1. Promedio del peso corporal (\pm e.e.) de machos y hembras de *Ctenomys talarum* a las 0, 6 y 12 hs post-inyección con fitohemaglutinina (PHA) o buffer fosfato-salino (PBS) durante las épocas reproductiva y no reproductiva. El tamaño muestral de cada grupo se muestra entre paréntesis.

Estación	Tratamiento	Sexo	Tiempo (hs)	Peso corporal (g)
Reproductiva	PHA	Machos	0	146,8 \pm 13,6
		(n = 5)	12	148,3 \pm 12,6
		Hembras	0	105,3 \pm 1,6
		(n = 5)	12	103,2 \pm 2,7
	PBS	Machos	0	154,7 \pm 5,9
		(n = 6)	12	161,6 \pm 3,3
		Hembras	0	109,7 \pm 5,3
		(n = 5)	12	110,3 \pm 5
No reproductiva	PHA	Machos	0	167,3 \pm 8,3
		(n = 7)	12	169,4 \pm 8,4
		Hembras	0	118,3 \pm 3,8
		(n = 7)	12	117,8 \pm 4,6
	PBS	Machos	0	137,1 \pm 11,5
		(n = 5)	12	136,5 \pm 11,5
		Hembras	0	114,0 \pm 7,4
		(n = 5)	12	115,3 \pm 7,7
	PHA	Machos	0	160,1 \pm 14,4
		(n = 5)	6	159,3 \pm 14
		Hembras	0	118,0 \pm 7,3
		(n = 5)	6	121,2 \pm 8,6
PBS	Machos	0	154,8 \pm 13,9	
	(n = 5)	6	153,1 \pm 11,3	
	Hembras	0	121,8 \pm 10,1	
	(n = 5)	6	123,4 \pm 12,4	

TABLA 1.2. Resultados del análisis de covarianza de 3 vías y medidas repetidas (ANCOVA) realizado para evaluar la hipótesis de que no existen diferencias en la tasa metabólica de reposo (TMR) a las 0 y 12 hs post-inyección en individuos *Ctenomys talarum* entre grupos experimentales, sexos y estaciones. Grados de libertad de cada factor: 1; grados de libertad del error: 35. ID: inmunodesafiados; C: controles. Los asteriscos denotan efectos significativos.

Efecto	F	P
Peso 0 hs	3,60	0,07
Peso 12 hs	0,05	0,83
Sexo (machos vs. hembras)	0,06	0,81
Estación (reproductiva vs. no reproductiva)	3,15	0,08
Tratamiento (ID vs. C)	2,83	0,10
Sexo x Estación	0,62	0,44
Sexo x Tratamiento	0,27	0,61
Estación x Tratamiento	1,41	0,24
Sexo x Estación x Tratamiento	2,25	0,14
Tiempo (dentro del efecto)	1,05	0,31
Tiempo x Peso 0 hs	1,01	0,32
Tiempo x Peso 12 hs	2,06	0,16
Tiempo x Sexo	0,04	0,85
Tiempo x Estación	5,35	<0,001*
Tiempo x Tratamiento	0,63	0,43
Tiempo x Sexo x Estación	0,02	0,90
Tiempo x Sexo x Tratamiento	0,25	0,62
Tiempo x Estación x Tratamiento	2,88	0,10
Tiempo x Sexo x Estación x Tratamiento	0,37	0,55

Figura 1.2. Promedio de la inflamación del empeine de la pata trasera derecha (\pm e.e.) de machos (M) y hembras (H) de *Ctenomys talarum* capturados durante la época reproductiva (R) y no reproductiva (NR), a las 24 hs post-inyección con fitohemaglutinina (PHA) o buffer fosfato-salino (PBS). Las letras denotan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (PHA vs. PBS).

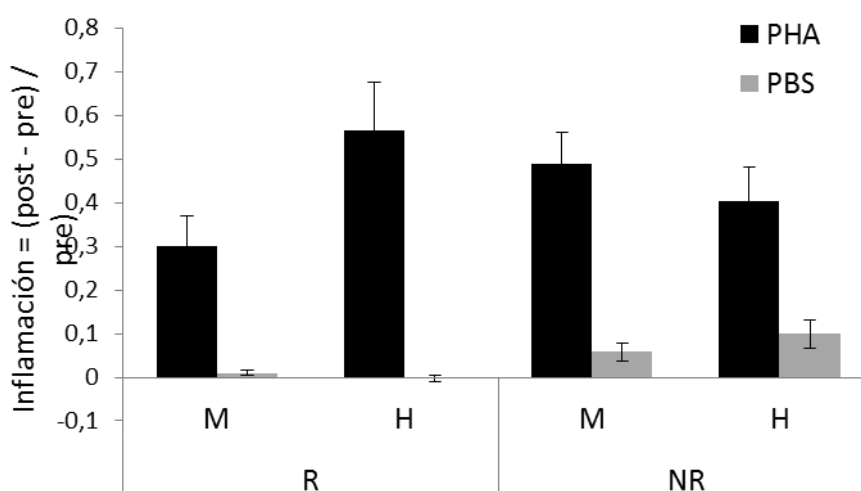
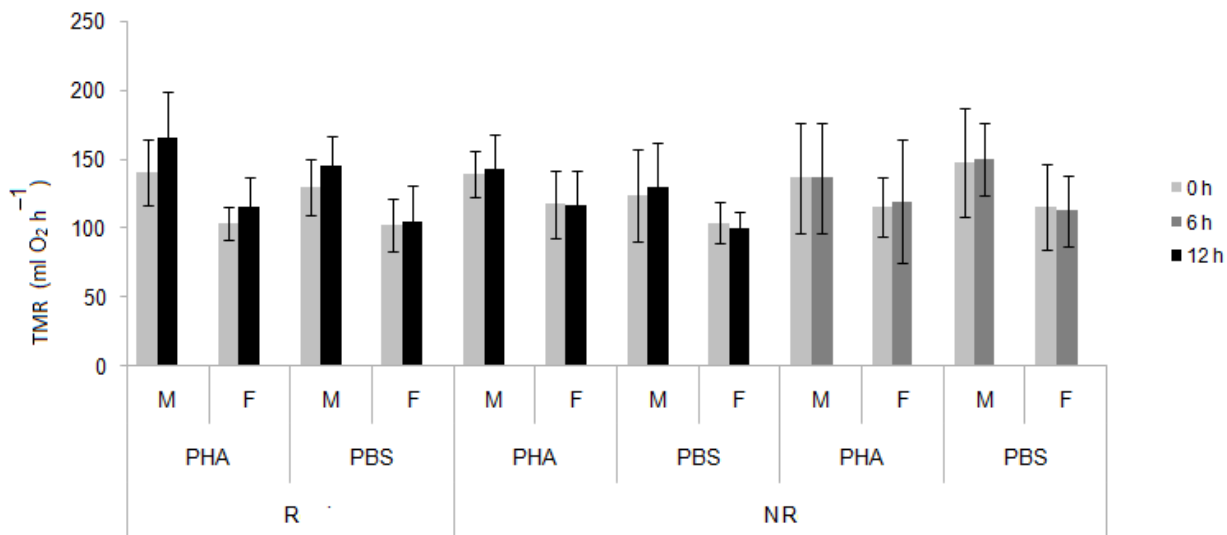


Figura 1.3. Promedio de la tasa metabólica de reposo (TMR) de machos (M) y hembras (F) *Ctenomys talarum* capturados durante la época reproductiva (R) y no reproductiva (NR), a las 0, 6 y 12 hs post-inyección con fitohemaglutinina (PHA) o buffer fosfato-salino (PBS).



Desafío inmune en juveniles

Los tuco-tucos de 60 días de edad desarrollaron una respuesta inflamatoria macroscópica mayor en las patas inyectadas con PHA comparadas con las inyectadas con PBS (ANOVA de medidas repetidas y una vía; $F_{1,16} = 66,11$, $p < 0,001$; Fig. 1.4.). El pico en la magnitud de la respuesta inflamatoria a PHA fue detectado 24 hs después de la inyección del antígeno (inflamación de las patas inyectadas con PHA a las 24 hs = $4,37 \pm 0,58$ mm, inflamación de las patas inyectadas con PBS a las 24 hs = $2,74 \pm 0,24$ mm; ANOVA de medidas repetidas y una vía; $F_{4,16} = 22,39$, $p < 0,001$; test post-hoc de Scheffé, $p < 0,05$, Fig. 1.4.).

Contrariamente a lo esperado, la magnitud de la respuesta inducida por PHA fue mayor en tuco-tucos juveniles (inflamación = $0,61 \pm 0,28$) que en adultos (inflamación = $0,42 \pm 0,19$; ANOVA de dos vías; $F_{1,41} = 5,97$, $p = 0,018$; Fig. 1.5A.), pero no hubo un efecto significativo del sexo (ANOVA de dos vías; $F_{1,41} = 0,059$, $p = 0,809$; Fig. 1.4.) ni una interacción significativa entre estos dos factores (ANOVA de dos vías; $F_{1,41} = 0,403$, $p = 0,529$). Aunque los juveniles inyectados con PHA mostraron una inflamación significativamente mayor (inflamación = $0,61 \pm 0,28$) que la desarrollada por los del grupo control (inflamación = $0,03 \pm 0,08$; ANOVA de dos vías; $F_{1,13} = 45,71$, $p < 0,001$; Fig. 1.5B.), no se detectaron diferencias en la magnitud de la inflamación entre machos y hembras (ANOVA de dos vías; $F_{1,13} = 0,02$, $p = 0,9$; Fig. 1.5B.) y la interacción entre estos factores no fue significativa (ANOVA de dos vías; $F_{1,13} = 0,45$, $p = 0,51$).

Con respecto al efecto de la inyección de PHA en el peso corporal, la Δpc no difirió entre tratamientos (ANOVA de dos vías; $F_{1,13} = 0,03$, $p = 0,869$) o sexos (ANOVA de dos vías; $F_{1,13} = 0,002$, $p = 0,962$). La interacción entre estos factores tampoco fue significativa (ANOVA de dos

vías; $F_{1,13} = 0,09$, $p = 0,765$). En cuanto a los costos de la respuesta a PHA, no hubo diferencias significativas en la TMR entre juveniles inyectados con PHA y aquellos inyectados con PBS (Tablas 1.3 y 1.4). La asociación entre la TMR 12 hs post-inyección de PHA y el peso corporal no fue significativa ($r = 0,09$, $F_{1,9} = 0,0745$, $p = 0,791$), así como lo fue la asociación entre la inflamación 24 hs post-inyección de PHA y el peso corporal ($r = 0,004$, $F_{1,9} = 0,0001$, $p = 0,991$). Finalmente, no hubo una asociación significativa entre la magnitud de la inflamación a las 24 hs post-inyección y la TMR 12 hs post-inyección de este antígeno (correlación de Pearson; $r = 0,393$, $p = 0,236$, $n = 11$).

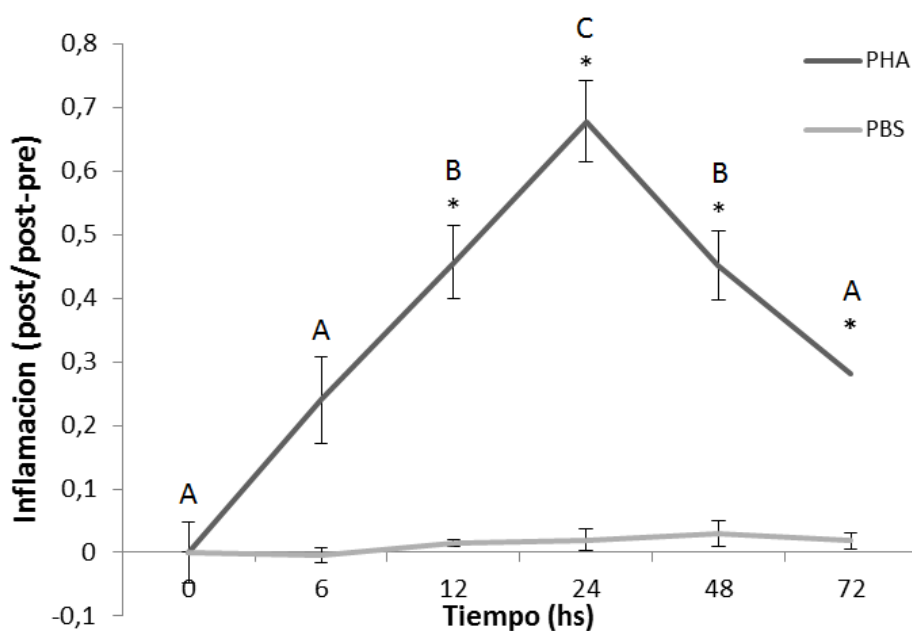
TABLA 1.4. Promedios del peso corporal y tasa metabólica de reposo (TMR; \pm e.e) registrados en juveniles (60 días de edad) de *Ctenomys talarum* de ambos sexos, antes (0 hs) y después (12 hs) de la inyección con PHA o PBS.

Tratamiento	Sexo	Tiempo (h)	Peso corporal (g)	TMR (ml/h)
PHA	Machos	0	61,21 \pm 2,7	77,20 \pm 5,3
		12	62,53 \pm 2,2	99,48 \pm 9
	Hembras	0	55,90 \pm 2,2	72,74 \pm 3,3
		12	57,80 \pm 2,6	82,48 \pm 6,1
PBS	Machos	0	61,20 \pm 3	78,79 \pm 8,2
		12	63,56 \pm 3,6	86,29 \pm 7
	Hembras	0	57,92 \pm 1,5	74,68 \pm 7
		12	59,79 \pm 2,4	93,38 \pm 12,6

TABLA 1.5. Resultados del ANOVA de medidas repetidas de dos vías (con el peso corporal como covariable) que analiza la tasa metabólica de reposo (TMR) entre tratamientos (PHA vs. PBS) y sexos en juveniles (60 días de edad) de *Ctenomys talarum*.

Efecto	g.l.	F	P
Peso 0 hs	1	0,44	0,51
Peso 12 hs	1	2,44	0,13
Tratamiento	1	0	0,99
Sexo	1	0,02	0,89
Tratamiento x sexo	1	0,63	0,44
Tiempo	1	0,14	0,71
Tiempo x peso 0 hs	1	2,12	0,16
Tiempo x peso 12 hs	1	3,56	0,07
Tiempo x tratamiento	1	0,39	0,54
Tiempo x sexo	1	1,08	0,31
Tiempo x tratamiento x sexo	1	1,37	0,26

Figura 1.4. Promedio de la respuesta inflamatoria (\pm e.e.) en tuco-tucos de 60 días de edad inyectados con PHA en la pata trasera derecha (línea oscura) y PBS en la pata trasera izquierda (línea clara) a las 6, 12, 24, 48 y 72 hs post-inyección. Los asteriscos indican diferencias significativas entre patas inyectadas con PHA vs. PBS (ANOVA de medidas repetidas y una vía, Scheffé $p < 0.05$). Las diferentes letras representan diferencias significativas en la magnitud de la respuesta inducida por PHA entre distintos tiempos post-inyección (ANOVA de medidas repetidas y una vía, Scheffé $p < 0.05$).



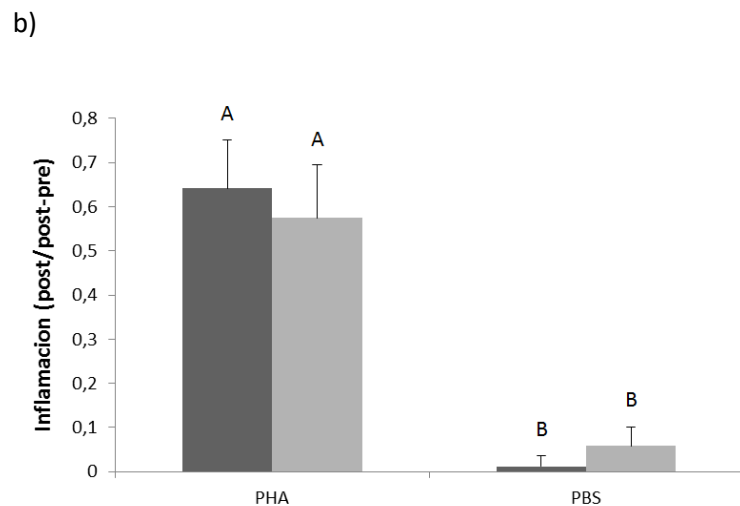
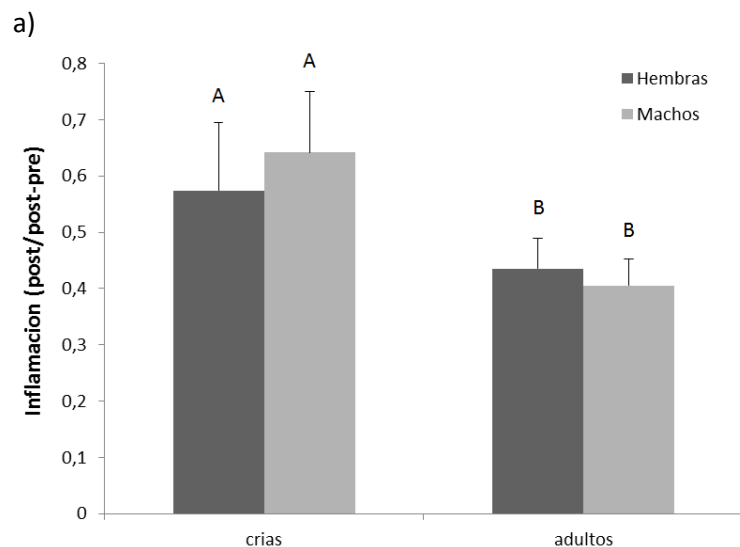
DISCUSIÓN

El desarrollo de una respuesta inmune se espera que requiera recursos que podrían, de otra manera, ser asignados a otras funciones biológicas. En el presente estudio se analizó el costo energético de la respuesta inducida por PHA en el roedor subterráneo *C. talarum*, tanto juveniles como adultos, encontrándose que ésta no estuvo asociada con un incremento en la TMR. A su vez, los individuos (juveniles o adultos) que mostraron mayores respuestas inflamatorias frente a PHA no mostraron mayores TMRs. Nuestros resultados están en línea con los estudios realizados en otras especies de roedores; gerbilidos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) y ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) inyectados con PHA tuvieron similares tasas metabólicas que los inyectados con PBS (Derting y Compton, 2003; Zhiqiang et al., 2011). En aves, en cambio, el

costo energético de la respuesta a PHA parece ser variable entre especies. Gorriones (*Passer domesticus*) inyectados con PHA incrementaron su tasa metabólica en un 29-32% (Martin et al., 2003), mientras que los carboneros (*Parus major*) sólo mostraron un incremento del 5% (Nilsson et al., 2007). Por el contrario, la tasa metabólica de la codorniz Japonesa (*Coturnix coturnix*) no varió en respuesta a este desafío inmune (Boughton et al., 2007), e incluso se reportó una disminución del 20-25% en la tasa metabólica de gorriones molineros (*Passer montanus*) inyectados con PHA (Lee et al., 2005). Aunque algunas de estas diferencias podrían estar asociadas a cuestiones metodológicas (ver Lee et al., 2005; Nilsson et al., 2007), se necesitan más estudios sobre el costo asociado a la respuesta desencadenada por PHA, particularmente en pequeños mamíferos, para elucidar las implicancias de esta respuesta inmune.

Una estrategia común para redistribuir energía y mantener el gasto energético diario normal durante un desafío inmune consiste en reducir la actividad (Hörak et al., 2003). En este estudio, todos los individuos utilizados fueron mantenidos en cautiverio, en cajas donde la excavación no

Figura 1.5. Promedio de la respuesta inflamatoria (\pm e.e.) medida 24 hs post-inyección en **a)** juveniles (crías de 60 días de edad) y adultos de *C. talarum* de ambos sexos, inyectados con PHA y **b)** en tuco-tucos juveniles (60 días de edad) de ambos sexos, 24 hs post-inyección de PHA o PBS. Las diferentes letras representan diferencias estadísticas significativas (ANOVA de dos vías, $p < 0,05$).



era posible. Sin embargo, aunque la excavación no era posible, los individuos podrían haber reducido sus niveles de actividad de manera de destinar parte de la energía disponible a la respuesta inflamatoria frente PHA; lo cual explicaría la ausencia de un incremento en la TMR. Sin embargo, un estudio previo realizado en las mismas condiciones de cautiverio pudo detectar un aumento significativo de la tasa metabólica asociado con la activación de una respuesta humoral inducida por SRBC en tuco-tucos de ambos sexos (Cutrera et al., 2010), sugiriendo que la reducción de los niveles de actividad no explicaría enteramente la ausencia de un incremento en la tasa metabólica de los individuos inyectados con PHA. Por otra parte, la temperatura ambiente del bioterio fue controlada de manera de asegurar condiciones de termoneutralidad para los animales de estudio. Por lo tanto, una de las preguntas que surgen es cómo la respuesta inducida por PHA podría impactar sobre el presupuesto energético de los tuco-tucos en condiciones naturales, donde deben invertir energía en termorregular (Antinuchi et al., 2007; Cutrera et al., 2003). Además, el presente estudio fue realizado bajo alimentación *ad libitum*. Los animales no experimentaron pérdida de peso después del desafío inmune, pero es posible que un incremento en el requerimiento de nutrientes específicos debido a la exposición al antígeno fuera enmascarado ya que los recursos no fueron limitados. En relación a esto, se explorará la influencia de la dieta sobre la magnitud de la respuesta inflamatoria en *C. talarum* en el Capítulo 4 de esta tesis, mediante una aproximación experimental.

El costo energético de una respuesta inmune radica en el requerimiento de energía necesario para la producción y/o movilización de células y moléculas que se disparan ante la activación del sistema inmune. A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que la respuesta inflamatoria en *C. talarum* no implica un incremento significativo en los requerimientos energéticos. Sin embargo, otras “monedas” aún no testeadas podrían mediar el costo de la respuesta a PHA, tales como el requerimiento de micro o macronutrientes (mencionado anteriormente) o los costos asociados a la inmunopatología (riesgo de autoinmunidad y estrés oxidativo). Se ha sugerido que el nivel de activación inmune estaría regulado negativamente durante períodos de actividad física intensa (en los cuales se exponen, principalmente debido a la lisis muscular, antígenos propios no reconocidos como tales por el sistema inmune) o situaciones estresantes (donde las células producen proteínas de gran similitud a las producidas por numerosos patógenos, ej: proteínas de shock térmico) de manera de evitar el riesgo de que se generen respuestas autoinmunes (Råberg y Grahn, 1998). A su vez, el nivel de la actividad del sistema inmune también se vería regulado de manera de evitar el daño por estrés oxidativo, es decir, el daño a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos generado por los metabolitos oxidativos y los radicales libres altamente reactivos que se producen durante las respuestas inmunes (von Schantz et al., 1999). Así, si bien en la presente tesis no se evalúa el costo asociado a la inmunopatología de la respuesta inflamatoria frente a PHA, no pude excluirse la importancia que

este tipo de costo puede tener en el desarrollo de la misma, aún cuando ésta se resuelve en un período corto (48 hs post-inyección en *C. talarum*; Merlo et al., 2014).

Los tuco-tucos adultos, además de mantener su tasa metabólica cuando son inyectados con PHA, no mostraron un compromiso detectable entre inmunidad y reproducción: la inflamación en respuesta a PHA fue similar en animales en la época no reproductiva y reproductiva, y tampoco hubo diferencias entre sexos. Estos resultados difieren de lo reportado para la respuesta humoral para esta especie, donde la respuesta de anticuerpos inducida por SRBC representa un costo energético para *C. talarum* (Cutrera et al., 2010). Por lo tanto, en tuco-tucos, así como en otros vertebrados (ver Lee, 2006), la defensa inflamatoria parece ser menos costosa que la humoral, no estando, así, sujeta a compromisos con otras actividades demandantes, tales como la reproducción. Es importante notar que se incluyeron en el experimento hembras preñadas y no preñadas, pero no hembras amamantando, por lo que aún se desconoce si existe un compromiso entre la lactancia –el período más demandante para las hembras- y la respuesta inflamatoria. Para algunas especies de roedores, por el contrario, se han detectado compromisos entre inmunidad y reproducción. En hámsteres siberianos (*Phodopus sungorus*) expuestos a condiciones de fotoperiodo de días largos, tanto la preñez como la lactancia suprimen la respuesta humoral (Drazen et al., 2003). También, la actividad bactericida del plasma y el tamaño del timo en hembras amamantando de *M. unguiculatus* son menores en comparación con individuos no reproductivos. Sin embargo, la respuesta a PHA no fue afectada por la inversión en la reproducción (período de amamantamiento) de hembras de *M. unguiculatus*, e incluso las respuestas humoral e innata se vieron incrementadas bajo esta condición fisiológica (Yang et al., 2013). Así, no todos los estudios realizados en roedores muestran una relación negativa entre la función reproductiva y la inmunológica, como se asume usualmente. Dada la complejidad del sistema inmune y la diversidad de antígenos, cuyos efectos sobre el hospedador varían en intensidad y duración, resulta difícil hacer generalizaciones sobre los costos de la defensa inmune (Klasing, 2004). Para *C. talarum*, una respuesta inflamatoria poco costosa en términos de energía podría haber resultado adaptativo, dado que los tuco-tucos sufren heridas frecuentemente como producto de peleas por territorialidad o hembras (para el caso de los machos), así como lesiones asociadas a las actividades subterráneas (ej. excavación).

Contrariamente a lo esperado, los juveniles *C. talarum* montaron una respuesta inflamatoria a PHA mayor en comparación con los adultos, a la vez que no se detectaron diferencias en la magnitud de esta respuesta entre sexos, a pesar del marcado dimorfismo sexual en el peso de los tuco-tucos. Estudios previos encontraron que los animales juveniles tienen menor habilidad para responder a desafíos inmunes en comparación con adultos, probablemente debido a la asignación de recursos principalmente al crecimiento, en detrimento de la inmunidad (ej. Lozano y Lank, 2003). Sin embargo, en el presente trabajo encontramos un patrón opuesto para *C. talarum*. Durante esta etapa del desarrollo, los tuco-tucos juveniles aún comparten la cueva materna con

sus hermanos y madre, y la frecuencia de heridas se incrementa a esta edad –donde el momento de abandonar la cueva natal se encuentra próximo- dada la agresión madre-crías, las peleas entre hermanos, e incluso las interacciones con los predadores (Zenuto et al., 2002b). Esto podría haber propiciado que los tuco-tucos desarrollen más tempranamente una respuesta con componentes innatos en comparación con ratas y ratones (revisión de Marshall-Clarke et al., 2000) utilizando una defensa menos costosa y más inmediata, aunque menos específica, como es la inflamación desencadenada por PHA. De hecho, se ha reportado en aves que esta respuesta tiene menores efectos sobre parámetros de crecimiento (ej. asimetría fluctuante) en comparación con la respuesta humoral (Amat et al., 2007; Fair y Hansen, 1999). Por otra parte, los tuco-tucos se encuentran más parasitados durante la adultez que en la juventud (Rossin y Malizia, 2002; Rossin et al., 2010) y tienen que balancear la inmunidad en relación a otras actividades costosas, como la reproducción y la defensa del territorio, durante la época reproductiva (Cutrera et al., 2010), de modo que todo esto puede impactar negativamente en la magnitud de la respuesta inflamatoria contra un antígeno como PHA en los tuco-tucos adultos, no así en los juveniles (Versteegh et al., 2012). Por otra parte, esperábamos que los tuco-tucos machos montaran una respuesta a PHA menor que las hembras, ya que éstas alcanzan un tamaño asintótico antes que los machos (Malizia y Busch, 1991), pero no se detectaron diferencias en la magnitud de la respuesta a PHA entre sexos. En relación a esto, mientras que el peso corporal ha sido reportado como un factor importante para el futuro reclutamiento en varios grupos de vertebrados (Klasing y Leshchinsky, 1999; McElligott et al., 2001; Norris y Evans, 2000), la evidencia no es tan clara para *C. talarum*. Se requieren estudios adicionales para establecer, en primera instancia, el rol del tamaño corporal de los machos en la elección de pareja de las hembras, para luego analizar las consecuencias a largo plazo de la asignación de recursos a la inmunidad durante el desarrollo de tuco-tucos de ambos sexos, contribuyendo así al entendimiento de los costos y beneficios de la función inmune en miembros jóvenes de esta especie.

Para concluir, en este primer capítulo se evidenció la ausencia de un incremento en el gasto energético de individuos desafiados con PHA. Dada la variación interindividual encontrada en la magnitud de la respuesta inducida por PHA, surge la necesidad de conocer cuáles son los factores que modulan el desarrollo de la misma, siendo que la energía no sería el factor limitante. Dentro de los otros posibles mediadores del costo de la respuesta, se explorará la influencia de la variación en la disponibilidad de nutrientes (Capítulo 4) sobre la misma, a la vez que el efecto de factores intrínsecos y extrínsecos al individuo (Capítulos 2, 3 y 5).

CAPÍTULO 2

ASOCIACIONES ENTRE LA CARGA PARASITARIA, LA CONDICIÓN
FÍSICA Y LA CAPACIDAD DE RESPUESTA INMUNE

CAPÍTULO 2: ASOCIACIONES ENTRE LA CARGA PARASITARIA, LA CONDICIÓN FÍSICA Y LA CAPACIDAD DE RESPUESTA INMUNE

INTRODUCCIÓN

La respuesta a una infección puede ser muy variable, pudiendo resultar en la eliminación total del patógeno, la tolerancia a éste, o incluso en la muerte del hospedador debido a una alta susceptibilidad (Bradley, 2015). Dada la importancia que la defensa inmune tiene para la adecuación biológica del individuo, resulta paradójico que exista tal variación en la respuesta a patógenos (Schmid-Hempel, 2011). En el caso de la respuesta inducida por PHA en los tuco-tucos, ésta presenta una notable variación interindividual (Merlo et al., 2014) que no estaría determinada por su costo energético asociado (Capítulo 1). Los avances en ecoinmunología sostienen que la variabilidad en la respuesta a infecciones se mantiene debido a que éstas ocurren siempre en contextos variables, donde existe heterogeneidad ambiental y variabilidad genética en los patógenos (ver revisión de Lazzaro y Little, 2009). Sumado a esto, incluso el ambiente interno en el cual una respuesta inmune se desarrolla está influido por las demandas fisiológicas simultáneas al desafío inmune (Lazzaro y Little, 2009). Es por esto que se valora el estudio de la variabilidad de la función inmune en poblaciones naturales, en condiciones de campo o seminaturales, bajo la concepción del individuo como un fenotipo integrado (Cohen et al., 2012). De esta manera, se comprende que su habilidad para desarrollar una respuesta inmune se encuentra profundamente influenciada por su condición general, la cual a su vez está condicionada por una variedad de factores ambientales y ecológicos (Ardia et al., 2011; Lazzaro y Little, 2009).

Bajo este enfoque del estudio de los organismos como un todo, o “redes fisiológicas integradas” (PNRs, por sus siglas en inglés; Martin y Cohen, 2011), se resalta la importancia del estudio de especies ecológicamente únicas (ej. aquellas que viven en ambientes extremos) y/o contextos únicos (ej. especies nativas vs. invasoras), lo que permitirá dilucidar qué aspectos son conservados y cuáles lábiles dentro de las PRNs (Martin y Cohen, 2011). Tradicionalmente, numerosos estudios han evaluado la influencia de diversos componentes de la condición individual sobre la inmunidad (ej.: factores genéticos, Wakelin, 2009; estrés térmico y social, Powell et al., 2013; nivel de esfuerzo parental, Christie et al., 2011) en diversas especies. Incluso, la influencia de la “condición” individual sobre la función inmune ha sido abordada, pero siempre estimada a partir de medidas relativas al peso corporal (ej: Jakob et al., 1996; Peig y Green, 2009). En relación a esto, Hill (2011) ha definido que los efectos combinados del estado somático

(estado actual del cuerpo e influencias externas, como nivel de parasitismo o nutrientes disponibles), la epigenética y el genotipo determinan la condición del individuo, siendo el estado somático el principal determinante de la *condición* individual. Así, la incorporación de un mayor número de parámetros, relacionados al estado o condición del individuo, en estudios ecoinmunológicos permitirá agilizar el entendimiento de las estrategias inmunes en la naturaleza (Matson et al., 2006; Pedersen y Babayan, 2011).

En el presente estudio, se propuso profundizar el conocimiento sobre la respuesta inflamatoria en el roedor subterráneo *C. talarum* en relación a la condición del organismo, de manera de contribuir al entendimiento de la variación interindividual observada en la misma, y a su vez, de manera más general, de la historia de vida de *C. talarum*. Parámetros indicadores de distintos procesos que ocurren en el individuo (reproducción, infección, estrés) son candidatos particularmente oportunos para este análisis. El presente estudio se plantea como una primera aproximación exploratoria de la asociación entre la condición individual y la respuesta inflamatoria. Una causalidad o direccionalidad en las relaciones que puedan encontrarse no podrán ser determinadas por este único estudio, dado que un sinergismo -o “círculo vicioso”- ocurre entre la condición, el estado inmune y el estado de infección de los individuos (Beldomenico y Begon, 2010). En este sentido, se propone que una pobre condición predispone a la infección, la cual perjudica, a su vez, la condición individual, incluyendo la función inmune, lo que incrementa la susceptibilidad a sufrir nuevas infecciones, que al ocurrir perjudican la condición individual (Beldomenico y Begon, 2010). Por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue determinar asociaciones entre diversos componentes de la condición individual y la respuesta inflamatoria inducida por PHA en *C. talarum*. La condición individual fue analizada como la suma de atributos físicos (peso corporal), fisiológicos (sexo, estacionalidad reproductiva, hematocrito, estrés –estimado mediante la relación neutrófilos: linfocitos; Davis et al., 2008) e inmunológicos/de infección (conteos leucocitarios, carga parasitaria, nivel de inmunidad innata constitutiva –estimada mediante niveles de anticuerpos naturales (NAb) y proteínas del complemento-). Esperamos que factores tales como la carga parasitaria o el estrés tuvieran una fuerte influencia en la variabilidad de esta respuesta. Particularmente, se plantea la hipótesis de que la respuesta inflamatoria a PHA está positivamente asociada con una buena condición en general (altos valores de peso corporal, hematocrito e inmunidad innata) y negativamente asociada con la infección (cargas endoparasitarias y conteos leucocitarios) y el estrés. Para el caso particular de la carga ectoparasitaria, se esperaba que la respuesta inflamatoria se encuentre asociada positivamente con ésta, ya que ambas respuestas (a PHA y a ectoparásitos) involucran componentes de la respuesta adaptativa mediada por células (Jones et al., 1996; Khokhlova et al., 2004), y entonces podría ocurrir sinergismo en la estimulación de esta vía inmune. El abordaje integrativo de la condición de los individuos, por otra parte, proveerá información sobre esta especie con hábitos particulares (subterráneos, solitarios) entre los roedores, lo que contribuirá al entendimiento de la variación en las estrategias inmunes

en los vertebrados. Finalmente, los factores que aparezcan como moduladores de la respuesta inflamatoria a partir de los resultados de este estudio, servirán como punto de partida posteriormente profundizar el entendimiento de la influencia de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los animales y mantenimiento en cautiverio

Se capturaron 10 machos ($162 \pm 8,61$ g) y 10 hembras ($109,16 \pm 4,32$ g) en la localidad de Mar de Cobo, durante la época no reproductiva (abril a principios de mayo de 2012) y 13 machos ($162,10 \pm 4,18$ g) y 15 hembras ($122,26 \pm 3,43$ g) durante la época reproductiva (agosto a noviembre de 2012). Inmediatamente luego de la captura, se colectaron heces, las cuales se conservaron en formalina al 4%, y se realizó un extendido de sangre obtenida de la punta de la cola, para futuras determinaciones (ver abajo). Los animales fueron transportados al laboratorio y ubicados en cajas plásticas individuales, donde se mantuvieron de acuerdo a lo especificado en el Capítulo 1.

Cuantificación de parásitos

Inmediatamente luego del arribo al laboratorio, los animales fueron cepillados de manera estandarizada para obtener los ectoparásitos presentes en el pelaje. Cada animal fue sostenido sobre una pieza de papel blanca mientras se cepillaba, y los ectoparásitos que caían en el papel fueron guardados en un sobre. Posteriormente se identificaron y clasificaron morfológicamente en pulgas (*Poligenis* sp.), piojos (ya sean *Eulinognathus americanus* o *Gyropus parvus*) o ácaros (Familias Laelapidae y Listrophoridae) utilizando una lupa binocular (Olympus SZX7, Tokyo, Japan), como se describe en Cutrera et al. (2011), y se registró el conteo de ectoparásitos para cada individuo.

Una de las técnicas más utilizadas para la estimación de la carga endoparasitaria es el conteo de huevos de parásitos en heces. Esta técnica ha sido validada y, a su vez, resulta particularmente útil para estudios en especies salvajes, debido a que es un procedimiento no invasivo (Harf y Sommer, 2005; Schad et al., 2005). Así, se cuantificó el número de huevos/ooquistes presentes en muestras fecales colectadas inmediatamente luego de la captura. Este procedimiento permite la detección de todos los taxa presentes en el tracto digestivo de los tuco-tucos, con la sola excepción de *Taenia talicei* (Rossin et al., 2004). Los huevos/ooquistes presentes en las heces fueron analizados utilizando la técnica de flotación propuesta por Sheather (1923). Brevemente, 1 g de heces (fijadas en formalina) por individuo fueron molidas y resuspendidas en 15 ml de la solución de flotación de Sheather (1923) y esta suspensión fue homogeneizada. La identificación

morfológica y el conteo de huevos/ooquistes se realizó utilizando una cámara de McMaster, dejando reposar la solución colocada en la misma durante 10 min a T ambiente, procediendo luego a la observación con una magnificación de 400x (Olympus CX 31, Tokyo, Japón). Para cada tipo de huevo/ooquistes, el conteo fecal se estimó por gramo de heces húmedas (hpg) contando todos los huevos/ooquistes de ese tipo presentes. Los huevos de *Pudica ctenomydis*, *Graphidioides subterraneus*, *Strongyloides myopotami* y *Trichostrongylus duretteae* no pudieron ser diferenciados y se agruparon en “estrongílicos”, dada su proximidad filogenética y su relativamente baja abundancia y prevalencia, lo que es consistente con lo reportado para las formas adultas en esta población de *C. talarum* (Rossin et al. 2010).

Muestras de sangre y desafío con PHA

Luego de 7 días de aclimatación al cautiverio, se colectaron ~200 µl de sangre del seno retro-orbital de cada individuo, para futuras determinaciones (ver “Determinaciones en sangre”). Después de esto, el test de PHA fue realizado como se describió en el Capítulo 1, inyectando PHA en la pata trasera derecha de cada individuo y midiendo la inflamación desencadenada a las 24 hs post-inyección.

Determinaciones en sangre

Perfil leucocitario. Los conteos relativos de cada tipo leucocitario en sangre proveen información sobre diferentes procesos que pueden estar ocurriendo en el individuo, alergias y parasitismo (eosinofilia), infección o desórdenes endócrinos (conteo de basófilos elevado), infecciones crónicas o inflamación (conteo de monocitos elevado; Voigt, 2000). Además, durante la respuesta al estrés, los glucocorticoides liberados alteran la redistribución de linfocitos de la sangre hacia otros compartimentos (Bowers et al., 2008), estimulando también el influjo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y disminuyendo su salida hacia otros tejidos (Bishop et al., 1968). Así, estos cambios resultan en un incremento en la proporción neutrófilos: linfocitos (N: L) en la sangre circulante, que puede ser utilizado como un índice de los niveles de hormonas de estrés (Davis et al., 2008; Müller et al., 2011). De esta manera, aunque su interpretación requiere precaución ya que varios procesos pueden hacer fluctuar los conteos leucocitarios (Beldoménico 2008), éstos proveen información sobre diferentes procesos infecciosos y de estrés que están ocurriendo en el individuo (Voigt, 2000). La diversidad y abundancia leucocitaria de los extendidos de sangre realizados luego de la captura fueron determinadas siguiendo protocolos estándares (Voigt, 2000). Luego de la fijación con metanol, los extendidos fueron teñidos con soluciones de May-Grunwald y Giemsa y luego examinados a un aumento del 1000x (inmersión, Olympus CX 31, Tokyo, Japan). La técnica de *guarda griega* (Voigt, 2000) fue utilizada para registrar la

abundancia de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y basófilos (identificaciones basadas en la morfología celular descrita por Voigt (2000) para vertebrados y Vera et al. (2008) para *C. talarum* hasta un total de 200 leucocitos examinados por extendido. La técnica de *guarda griega* permite el conteo de células evitando el recuento de un mismo campo visual; el extendido es examinado desde un borde (superior o inferior), a través de una capa simple de células, hasta el otro borde, luego moviéndose paralelo al borde una distancia aproximada de 3 a 5 campos (sin registrar recuentos), para luego continuar el conteo a través de la monocapa hasta el borde opuesto, repitiendo este procedimiento hasta que se identifique la cantidad necesaria de leucocitos (200 en este caso; Voigt, 2000). Para calcular la abundancia de leucocitos totales, se registró el número total de leucocitos encontrados en 30 campos en los cuales se observara una capa simple de eritrocitos (equivalente a 20.000 eritrocitos/ campo; R.R. Zenuto, resultados no publicados) y luego, a fines comparativos, se estandarizó este conteo a 100.000 eritrocitos.

Hematocrito. El hematocrito es la proporción del volumen de sangre ocupada por los glóbulos rojos y es considerado como un indicador del estado de salud general (Hoi-Leitner et al., 2001). Dado que el hematocrito está directamente relacionado con la captación del oxígeno, es típicamente considerado una medida de rendimiento fisiológico (Potti et al., 1999; Saino et al., 1997). De la sangre extraída, se colectó una proporción en tubos capilares heparinizados, los cuales fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 15 min (centrífuga Cavour VT 1224, Buenos Aires, Argentina). El hematocrito fue registrado como la proporción del tubo capilar ocupado por glóbulos rojos relativo al volumen ocupado por todos los componentes sanguíneos (Abaco CAV 1224, Buenos Aires, Argentina), como se describe en Cutrera et al. (2010).

Ensayo de hemólisis-hemoaglutinación. Los NAbs y las proteínas del sistema de complemento son dos componentes constitutivos de la inmunidad innata, que contribuyen a la primera línea de defensa contra patógenos. Los NAbs reconocen microorganismos invasores, pudiendo estimular el inicio de la actividad del sistema del complemento, la cual concluye con la lisis celular. Este ensayo, propuesto por Matson et al. (2005), permite la cuantificación de la actividad de los NAbs y de su interacción con el sistema de complemento. Luego de la colecta de sangre, las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm por 15 min y el sobrenadante (plasma) se conservó a -20°C hasta su uso. Siguiendo la metodología de Matson et al.(2005), se colocaron 20 µl de la muestra de plasma y 20 µl de PBS en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos (CorningStar # 3798, Corning, Nueva York, USA); esto fue luego diluído serialmente en PBS (1:2 a 1: 65.536) llenando los pocillos remanentes de la fila y 6 de la siguiente. 25 µL de SRBC al 1% se adicionó luego a cada pocillo. La placa se agitó cuidadosamente durante 10 segundos y se incubó a 37°C durante 1 hs. Luego, se analizó visualmente la hemólisis y la aglutinación, como se describe en Matson et al. (2005), y se registró lo visualizado en cada pocillo. Los niveles de hemólisis y aglutinación se expresaron como el \log_2 negativo de la mínima concentración de plasma que produjo hemólisis/aglutinación visible en la muestra. Los niveles de hemólisis reflejan la actividad de los

NAbs en interacción con el sistema de complemento, mientras que los niveles de aglutinación son indicadores de la sola actividad de NAbs (Matson et al., 2005). Para incrementar la consistencia de los datos, el registro de los resultados fue realizado siempre por la misma persona (JLM). Para determinar si la baja actividad del complemento registrada (ver la sección “Resultados”) fue producto de una inapropiada conservación de las muestras, se realizó otro experimento. Diez animales extra, que no fueron parte del diseño propuesto, se utilizaron para obtener muestras de sangre de la misma manera que se describió anteriormente. Cada muestra de plasma fue inmediatamente alicuotada en dos tubos; uno tratado exactamente como se describió anteriormente (conservación a -20°C), y el otro fue puesto inmediatamente en hielo y centrifugado a 4°C (3.000 rpm, 15 min). Luego de que el plasma de ambos tubos fuera separado, los tubos se colocaron en nitrógeno líquido y se transportaron hasta un ultrafreezer (-80°C), donde fueron conservados hasta su análisis. Finalmente, ambos sets de tubos fueron analizados de la misma manera que se describió anteriormente para este ensayo.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software R (Team, 2015); los tests fueron considerados significativos con $\alpha = 0.05$. Además de la magnitud de la respuesta inducida por PHA, un total de 18 variables fueron registradas a partir de los individuos. Los registros se agruparon en aquellos relacionados a la condición física (peso corporal), fisiológica (sexo, estacionalidad reproductiva, hematocrito) e inmunológica (conteos de: *Polygenis* sp., ácaros hematófagos, ácaros no hematófagos, *Eimeria* sp., *P. uncinata*, *T. pampeana*, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, basófilos, leucocitos totales), capacidad inmune innata (capacidad de aglutinación del plasma) y estrés (N: L). Los títulos de hemólisis del plasma del ensayo de hemólisis-hemoaglutinación no fueron incluidos en el análisis debido a los bajos registros obtenidos (0 en la mayoría de los individuos), así como tampoco los conteos de piojos (sólo un piojo fue registrado en un individuo) y estrongílidos (se encontró un ejemplar de estrongílido en 3 de los individuos y 4 ejemplares en otro individuo). Para analizar los efectos de estas variables sobre la respuesta inflamatoria de los tuco-tucos, examinamos todos los modelos lineales posibles utilizando el criterio PRESSp para ranquear su capacidad de predecir la respuesta inmune. Como se describe en Kutner et al. (2004), éste es un criterio de validación cruzada que calcula las sumas de cuadrados del error dejando afuera una observación a la vez, calculando el correspondiente error basado en las restantes $n - 1$ observaciones. Se limitó la complejidad del modelo analizando todas las combinaciones de variables independientes, generando modelos con 30 grados de libertad o más (en nuestros análisis esto corresponde a modelos con hasta 6 variables independientes) y seleccionando para un análisis posterior al modelo con menor valor PRESSp. Se evaluó el modelo seleccionado con métodos clásicos de

testeo de hipótesis (Kutner et al., 2004). La función “dredge” en el paquete R “MuMIn” se utilizó para evaluar todos los posibles modelos lineales (Barton, 2015). ANOVAs y gráficos de respuesta parcial fueron utilizados para analizar los efectos o factores y covariables en la respuesta inflamatoria. Todas las covariables fueron transformadas logarítmicamente antes de los análisis. Utilizamos tests de Shapiro-Wilks y Levene para testear normalidad y homocedasticidad, respectivamente, de los residuales del modelo. Se analizó la colinearidad mediante VIF (por sus siglas en inglés; estadístico del factor de inflación), como se implementa en el paquete “car” de R (Fox y Weisberg, 2011); omitiendo los modelos con $VIF > 5$. A través del texto, se expresan los resultados como la media \pm error estándar.

RESULTADOS

La magnitud de la inflamación en respuesta a PHA y las múltiples medidas de condición individual fueron obtenidas de 48 individuos *C. talarum* capturados durante las épocas reproductiva y no reproductiva de 2012 (Tabla 2.1). La inflamación después de 24 hs de la inyección de PHA varió de 0 a 1,03 ($0,46 \pm 0,03$; calculado como la diferencia entre el grosor pre- y post- dividido por el grosor pre-). Para explicar la variación interindividual de esta medida inmune, se construyeron modelos lineales sobre la base de datos fisiológicos obtenidos de cada individuo. De los modelos con menores valores de PRESSp (Tabla A1, Fig. A1), la mejor alternativa para explicar la variación en la respuesta inflamatoria a PHA en tuco-tucos incluyó la estacionalidad reproductiva, el conteo de eosinófilos y monocitos, la abundancia de pulgas *Polygenis* sp. y huevos de *T. pampeana*. Excepto por la estacionalidad, la cual mostró un efecto moderado sobre la inflamación (tendiendo ésta a ser menor en la época reproductiva; Fig. 2.1A), todas las variables independientes en el modelo seleccionado tuvieron efectos significativos sobre la respuesta a PHA (Tabla 2.2). Mientras que los eosinófilos, monocitos y *T. pampeana* tuvieron efectos parciales negativos, la abundancia de *Polygenis* sp. (pulgas) incrementó la respuesta inflamatoria (Fig. 2.1B-E). El modelo explica la mitad de la variación en la respuesta inflamatoria medida ($F_{obs} = 6,075$; $P < 0,001$; $R^2 = 0,42$, Tabla 2.2). Además de tener el mejor valor PRESSp entre los modelos alternativos, las variables incluidas en este modelo aparecieron consistentemente, solas o combinadas con otras variables, en los 100 primeros modelos con menores valores PRESSp. Los eosinófilos y *T. pampeana* siempre aparecieron juntos en los primeros 100 modelos, mostrando el efecto más consistente con respecto a la respuesta inflamatoria frente a PHA en tuco-tucos. Los monocitos, *Polygenis* sp. (pulgas) y la estacionalidad aparecieron en un 77%, 70% y 50% respectivamente de los 100 mejores modelos de nuestro análisis.

En cuanto a la estimación de la actividad del complemento, esta fue 0 para la mayoría de los individuos ($0,14 \pm 0,03$, $n = 48$). De las 10 muestras tomadas de animales extra ensayo para

poner a prueba el método de conservación de las mismas, sólo una mostró títulos de hemólisis distintos de 0. Para este individuo, el título de hemólisis obtenido de la muestra preservada como se describe en Matson et al. (2005) fue 0,3, mientras que el título obtenido de la muestra conservada a -80°C fue 0,6. El resto de las muestras mostraron ausencia de hemólisis, independientemente del método de conservación.

TABLA2.1. Promedio (\pm e.e.) de los valores de todos los parámetros obtenidos de machos (M) y hembras (H) *Ctenomys talarum* durante la época reproductiva (R) y no reproductiva (NR).

Parámetro	NR		R	
	M (n = 10)	H (n = 10)	M (n = 13)	H (n = 15)
Respuesta a PHA ¹	0,59 \pm 0,08	0,45 \pm 0,09	0,42 \pm 0,05	0,43 \pm 0,06
Peso corporal (g)	162,0 \pm 8,61	109,16 \pm 4,32	162,10 \pm 1,16	122,26 \pm 0,89
Hematocrito (%)	47,5 \pm 1,14	44,0 \pm 1,14	43,70 \pm 1,56	44,73 \pm 0,70
<i>Polygenis</i> sp.	0,80 \pm 0,36	3,10 \pm 2,77	4,92 \pm 1,30	2,93 \pm 0,80
Ácaros hematófagos	12,60 \pm 8,70	10,60 \pm 2,61	10,85 \pm 2,56	10,67 \pm 5,30
Ácaros no hematófagos	8,20 \pm 3,40	9,40 \pm 2,60	3,92 \pm 1,17	8,40 \pm 4,00
<i>Eimeria</i> sp. ²	6.930 \pm (2.403)	12.935 \pm (5.126)	9.393 \pm (5.009)	6.497 \pm (3.092)
<i>P. uncinata</i> ²	620 \pm (167)	800 \pm (193,5)	1.950 \pm (446)	1.657 \pm (399)
<i>T. pampeana</i> ²	245 \pm (204,5)	1.040 \pm (438)	143 \pm (74)	204 \pm (105)
Linfocitos ³	108,90 \pm 10,67	134,4 \pm 8,36	91,54 \pm 5,34	94,47 \pm 6,70
Neutrófilos ³	77,40 \pm 10,09	56,40 \pm 7,87	90,15 \pm 4,44	89,47 \pm 6,52
Eosinófilos ³	9,0 \pm 2,35	5,20 \pm 1,51	12,62 \pm 2,01	10,67 \pm 1,95
Monocitos ³	0,8 \pm 0,33	0,70 \pm 0,30	0,69 \pm 0,26	0,13 \pm 0,09
Basófilos ³	3,90 \pm 1,33	3,30 \pm 0,98	5,23 \pm 1,38	5,33 \pm 2,86
Títulos aglutinación (NAbs)	7,3 \pm 0,37	8,10 \pm 0,31	11,21 \pm 0,35	10,65 \pm 0,41
N: L	0,88 \pm 0,21	0,47 \pm 0,09	1,06 \pm 0,11	1,08 \pm 0,15

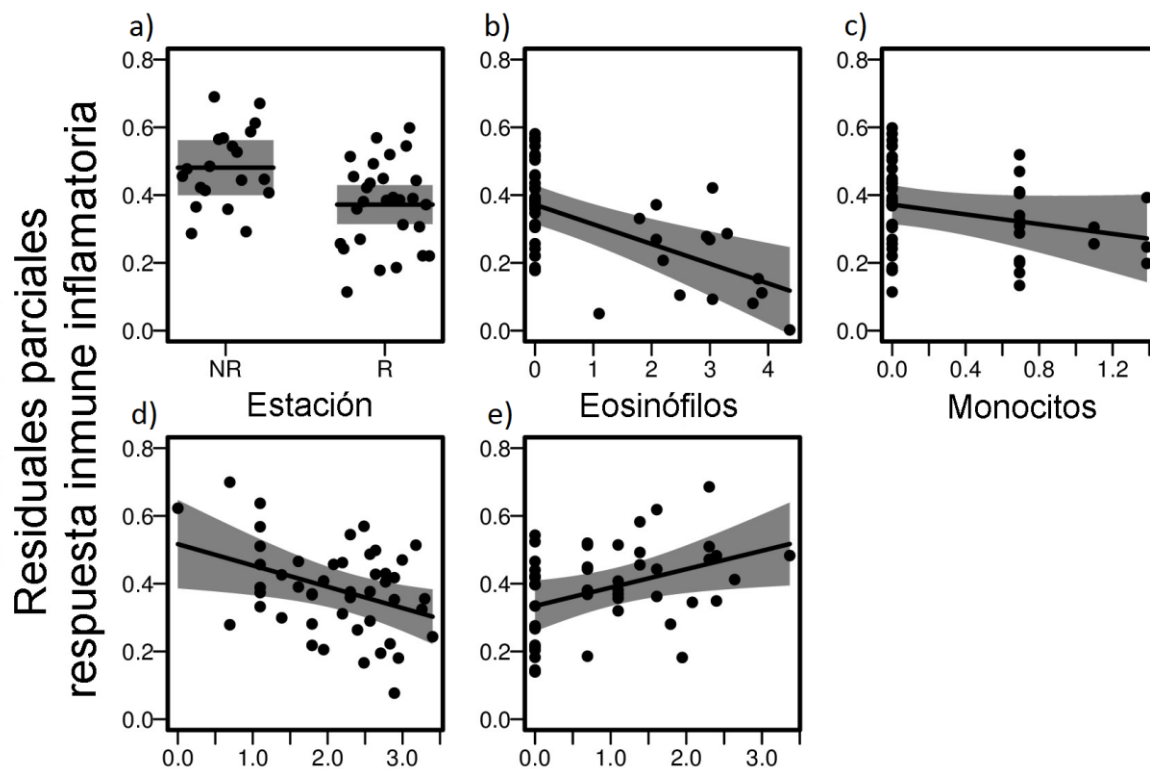
¹calculada como la diferencia entre el grosor pre- y post-inyección dividido por el grosor inicial. ²conteo de huevos en heces, estimado por gramo de heces húmedas (huevos/g). ³abundancias basadas en un total de 200 leucocitos examinados por individuo.

TABLA 2.2. Resultados de la regresión múltiple para el análisis de la respuesta inflamatoria. El modelo fue seleccionado usando el criterio PRESSp (Kutner et al., 2004). $R^2=0,42$.

Parámetro	g.l.	ES	MS	F	P
Regresión	5	0,4936	0,09872	6,075	<0,001
Error	42	0,6825	0,01625		
Total	47	1,1761	0,07672		

Parámetro	B	EE	EE Tipo II	F	P
Intersección	0,580				
Estación	-0,109	0,046	0,035	2,161	0,149
Eosinófilos	-0,063	0,025	0,071	4,382	0,042
Monocitos	-0,072	0,046	0,077	4,721	0,035
<i>T. pampeana</i>	-0,058	0,014	0,225	13,832	0,001
<i>Polygenis</i> sp.	0,054	0,024	0,086	5,277	0,027

Figura 2.1. Residuales parciales de la respuesta inflamatoria a fitohemaglutinina en adultos de *Ctenomys talarum* en relación a la estacionalidad reproductiva (estación no reproductiva: NR; estación reproductiva: R; a), los conteos de eosinófilos (b) y monocitos (c) en sangre periférica, huevos de *Trichuris pampeana* en heces (d) y *Polygenis* sp. (pulggas; e).



DISCUSIÓN

En el presente estudio, se analizaron 18 parámetros relacionados a distintos aspectos de la condición individual medidos en individuos de ambos sexos de *C. talarum*, con el fin de avanzar en la comprensión de los factores que podrían explicar la gran variación previamente reportada para la respuesta inflamatoria desencadenada por PHA en esta especie (Merlo et al., 2014). Como se esperaba, los atributos asociados a la infección aparecieron como importantes moduladores de la magnitud de la inflamación inducida por PHA: el modelo que mejor explicó esta variación involucró la abundancia de dos de los seis tipos parasitarios encontrados (pulgas y nematodos *T. pampeana*) y dos de las siete medidas inmunológicas analizadas (conteos de eosinófilos y monocitos). De todas las variables medidas, los eosinófilos y *T. pampeana* mostraron los efectos más consistentes sobre la respuesta a PHA, apareciendo en los mejores 100 modelos con menor valor PRESSp. Contrariamente a nuestras predicciones, ninguno de los componentes de la condición individual asociados al estado físico (peso corporal) o fisiológico (sexo, hematocrito, indicador de estrés -N: L-) tuvo efectos significativos en la respuesta inflamatoria a PHA. Además, la actividad de NAbs (medida de inmunidad innata constitutiva) tampoco mostró relación con esta respuesta.

La intensidad de infección por *T. pampeana*, estimada mediante los conteos de sus huevos, estuvo negativamente relacionada con la respuesta inflamatoria a PHA en tuco-tucos. La respuesta inmune contra este parásito, el cual en *C. talarum* coloniza el intestino ciego después de la ingestión oral (Rossin et al., 2010a), es típicamente Th2 (mediada por linfocitos T colaboradores de tipo 2; Finkelman et al., 1997), y a su vez dispara la distribución de eosinófilos (Allen y Maizels, 2011; Hayward, 2013; Weil et al., 2006). En general, los conteos leucocitarios en sangre reflejan un estado de relativamente largo plazo (meses) en la condición individual (Matson et al., 2006a), y así, serían informativos de las últimas infecciones transcurridas. En línea con esto, nuestros resultados muestran que los conteos relativos de eosinófilos, así como de monocitos, - los cuales cumplen un rol fagocítico, participando en respuestas innatas contra hongos, protozoos, patógenos intracelulares y algunas bacterias que no logran ser controladas por los neutrófilos (Voigt, 2000)-, en la sangre circulante de los tuco-tucos estuvieron negativamente correlacionados con la respuesta inflamatoria frente a PHA. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que, en los tuco-tucos, el parasitismo es en general un factor clave en la modulación de la respuesta inmune frente a nuevos desafíos. La infección por *T. pampeana* podría generar un efecto negativo sobre la respuesta frente a un nuevo desafío (ej. PHA) como consecuencia de la reducción de los recursos del hospedador por parte del parásito, limitando así el desarrollo de otras respuestas inmunes, o directamente por la interacción de los componentes inmunes involucrados en ambos desafíos. En

relación con lo último, la respuesta a PHA de musarañas *Crocidura russula* se encontró relacionada negativamente con la intensidad de infección por parte de cestodes y positivamente relacionada con la intensidad de infección por nematodos, sugiriendo una asociación antagonista entre estos grupos de helmintos, posiblemente mediada por los componentes inmunes del hospedador (Goüy de Bellocq et al., 2007). Además, Behnke et al. (1983) mostraron que en *Mus musculus*, los parásitos adultos de *Nematospiroides dubius* son capaces de modular la actividad inmune a un nivel intestinal, probablemente evitando de esta forma que el hospedador elimine los gusanos durante la infección crónica. Alternativamente, la relación negativa entre la infección por *T. pampeana* y la respuesta a PHA observada en *C. talarum* podría ser consecuencia de que los individuos menos inmunocompetentes son más fácilmente parasitados que los individuos con defensas inmunes más fuertes. Este aspecto será abordado mediante el diseño de manipulaciones experimentales de la carga parasitaria y su efecto sobre la respuesta inflamatoria inducida por PHA en el siguiente capítulo de esta tesis. Por otra parte, y como se esperaba, se encontró una relación significativamente positiva entre la respuesta inflamatoria y la abundancia de pulgas en el modelo. Estudios en polluelos europeos (*Sturnus vulgaris*) y murciélagos *Myotis myotis* también revelaron relaciones positivas entre la carga de ectoparásitos y esta respuesta inmune (Gwinner et al., 2000; Christe et al., 2000, respectivamente). Se presume que estas infecciones parasitarias incrementan la respuesta a PHA dado que ambos desafíos inmunes estimulan las mismas vías (inflamación y respuesta mediada por células T).

De acuerdo con el modelo obtenido, la estacionalidad reproductiva, aunque en menor importancia que los restantes factores, también contribuiría a explicar la variación en la respuesta inmune frente a PHA, donde los individuos tenderían a montar mayores respuestas inflamatorias durante la época no reproductiva. Esto podría ser interpretado como una consecuencia del compromiso en la distribución de energía entre el esfuerzo reproductivo y la inmunidad (“hipótesis de inmunosupresión”, ver Ardía, 2005; Deerenberg et al., 1997; Greenman et al., 2005). Como ya fue mencionado en el capítulo anterior, para las hembras de *C. talarum*, la estación reproductiva implica actividades demandantes de energía como la preñez y la lactancia, incluso a veces en simultáneo (Zenuto et al., 2002a). Por otra parte, para los machos, la estación reproductiva implica la inversión en comportamientos de cortejo así como en la competencia con otros machos por el acceso a las hembras, la que frecuentemente implica daño físico (Zenuto et al., 2002b). A su vez, se han reportado efectos moduladores de las hormonas reproductivas (ej. testosterona) sobre la función inmune para diferentes grupos de vertebrados (ej. mamíferos: Bradley, 1987; Derting y Virk, 2005; aves: Duffy et al., 2000; osteíctios: Pickering, 1986). Los niveles de testosterona de los machos *C. talarum* son elevados respecto al rango reportado para mamíferos, mostrando un pico en el comienzo de la época reproductiva (Vera et al., 2013). Sin embargo, se desconocen los efectos de esta hormona sobre la inmunidad en esta especie, por lo que se requieren estudios

adicionales para elucidar qué factores específicos asociados a los períodos reproductivos afectan la respuesta a PHA en *C. talarum*.

En cuanto a la estimación del nivel de inmunidad innata constitutiva de *C. talarum*, puede decirse que los bajos niveles de actividad del complemento en interacción con NAbs no se debió a la incorrecta conservación de las muestras. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que los tuco-tucos tendrían baja actividad del sistema de complemento, como fue descrito para petreles (*Oceanodroma leucorhoa*; Mauck et al., 2005), palomas (*Zenaida macroura*), pinzones cebrá (*Taeniopygia guttata*) y albatros (*Phoebastria immutabilis*; Matson et al., 2005). En relación a esto, Matson et al. (2005) proponen que las especies pueden ser clasificadas según su nivel de actividad del complemento en interacción con NAbs en relación a la actividad de sólo los NAbs; así, pueden encontrarse especies con niveles de actividad “bajos” (menos del 5% en relación a la actividad de NAbs), “medios” (entre 40-65%) y “altos” (95% o más). Este porcentaje representaría el balance entre estos componentes, el cual variaría en relación a la robustez de las distintas vías inmunes, y representaría una característica de la estrategia inmune de las distintas especies, la cual puede reflejar diferencias en la historia de vida y ecología de las mismas. Los resultados obtenidos, entonces, suman evidencia para estudios comparativos, donde los tuco-tucos serían parte del primer grupo, presentando bajos niveles de actividad del complemento en relación a la de anticuerpos naturales.

Cualquier situación natural es compleja, y las características que son altamente variables son indicativas de efectos fenotípicos más importantes, normas de reacción más amplias y variabilidad temporal individual (Matson et al., 2006a). En el presente estudio, utilizando un enfoque multivariado, obtuvimos un amplio panorama de la condición individual y su asociación con la respuesta inflamatoria inducida por PHA, en una especie solitaria y subterránea de roedores. Se destacó la relación del parasitismo con esta función del sistema inmune; así, se obtuvo un punto de partida para explorar en mayor profundidad la influencia de este factor, por ejemplo mediante la manipulación experimental de la carga parasitaria (ej. variación en el nivel de infección por un parásito particular –ver Capítulo 3- o experimentos de co-infección). Asimismo, a raíz de los resultados de este trabajo, se plantea el estudio de factores adicionales, como la influencia de la nutrición o desafíos inmunes simultáneos, como potenciales factores influyentes en la variación en la respuesta inflamatoria a PHA que permanece aún sin explicación, cuyos efectos serán evaluados en los capítulos 4 y 5 de esta tesis.

CAPÍTULO 3

EFECTOS DEL PARASITISMO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

El contenido de este capítulo fue publicado en *Journal of Experimental Zoology* (325: 132-141) bajo el título: "Parasite infection negatively affects PHA-triggered inflammation in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*". Autores: Merlo, J. L.; Cutrera, A.P. y Zenuto, R.R. Año: 2016.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos generan efectos negativos en sus hospedadores, ya sea mediante la utilización de sus recursos o por las respuestas inmunes que generan, e inclusive, se ha reportado que patógenos que afectan moderadamente la supervivencia de sus hospedadores, pueden también contribuir significativamente en la generación de ciclos de densidad poblacional (Burthe et al., 2008). Este detrimento en la condición del individuo conlleva a una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones, las que debilitan aún más su condición y lo predisponen a infecciones más severas; se genera así un círculo vicioso en el cual la infección es causa y consecuencia de la condición del individuo (Beldomenico et al., 2008), como se mencionó en el capítulo anterior.

Las infecciones parasitarias actuales pueden aumentar o suprimir la respuesta inmune contra otro desafío posterior (Page et al., 2006) mediante la interacción entre los componentes inmunes de ambas (o de las múltiples) respuestas; esto ocurre tanto debido a *compromisos* dentro del sistema inmune como por la inmunosupresión que algunos parásitos pueden generar (Ezenwa y Jolles, 2011). Por ejemplo, se ha visto que parásitos nematodos (estrongídeos) generan la inmunosupresión de las vías de tipo Th1 en los búfalos africanos *Syncerus caffer*, lo que conlleva a una mayor incidencia de tuberculosis, dada la reducida capacidad de los búfalos parasitados de controlar infecciones intracelulares (como es el caso del agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium bovis*; Ezenwa et al., 2010). Sin embargo, en general, la supresión inmune también puede ocurrir como consecuencia de la pobre condición del hospedador debido a la infección, es decir, de una manera indirecta (Jolles et al., 2008). En general, la interacción entre diferentes patógenos y los efectos de ésta sobre el hospedador aún son difíciles de comprender y, a su vez, muy pocos estudios parasitológicos y ecológicos se focalizan en más de un patógeno (Cox, 2001). Sin embargo, dado que las infecciones simultáneas –situación en la cual dos o más agentes infecciosos coexisten en el mismo hospedador- son comunes en la naturaleza, es necesario hacer un esfuerzo por entender estas interacciones (Cox, 2001). Una primera aproximación para ello consiste en evaluar el efecto de una infección sobre la habilidad del hospedador de inducir una respuesta hacia otro antígeno que ocurre en simultáneo. Por ejemplo, algunos estudios han explorado el efecto de los parásitos sobre la respuesta desencadenada por PHA. Goüy De Bellocq et al. (2006) mostró que las ratas de Sundevall (*Meriones crassus*) experimentalmente infectadas por un ectoparásito común *Xenopsys llaramesis* montaban menores respuestas a PHA que los animales no parasitados. De manera similar, Christie et al. (2000)

encontró una relación negativa entre la carga parasitaria (ácaros hematófagos *Spinturnix myoti*) de los murciélagos *Myotis myotis* y su respuesta a PHA durante la lactancia. En *C. talarum*, se ha encontrado una asociación negativa entre la presencia de infección por parte de *Trichuris pampeana* y la magnitud de la respuesta inflamatoria contra PHA (Capítulo 2). Este patrón fue también observado en aves: los gorriones que desarrollaron mayores respuestas a PHA fueron aquellos con menor intensidad de infección por parte del parásito *Haemoproteus* sp. (Navarro et al., 2003). Sin embargo, también se han reportado asociaciones positivas entre la carga parasitaria y la respuesta a PHA. En estorninos (*Sturnus vulgaris*) provenientes de nidos con altas cargas de ácaros se detectaron fuertes respuestas inflamatorias frente a PHA (Gwinner et al., 2000), así como también en verderones (*Carduelis chloris*), donde incrementos en la susceptibilidad a la infección por el coccidio *Isoospora lacazei* se correlacionaron positivamente con la magnitud de la respuesta inflamatoria (Saks et al., 2006). Para *C. talarum*, estudios previos reportaron la ausencia de una asociación entre la magnitud de la respuesta humoral frente a SRBC y la carga parasitaria (Cutrera et al., 2011). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo 2, existiría una asociación positiva entre la carga de pulgas *Polygenis* sp. y la respuesta inflamatoria inducida por PHA. Estas evidencias conducen a la hipótesis de que ciertas infecciones podrían aumentar la respuesta a otros antígenos que estimulan las mismas vías inmunes (Saks et al., 2006). Sin embargo, dados los diversos resultados encontrados en este tipo de estudios, resulta fundamental que se genere información adicional para determinar con mayor precisión las distintas estrategias inmunes y el rol del contexto ecológico y evolutivo en las mismas (Lee, 2006).

El presente estudio se diseñó con el fin de explorar el efecto de las infecciones endoparasitarias sobre la respuesta a otros antígenos que desencadenan una respuesta inflamatoria. Así, se profundizan los resultados obtenidos previamente en el capítulo 2 de esta tesis, donde se observó que la inflamación inducida por PHA estuvo asociada negativamente con el nivel de huevos del endoparásito *T. pampeana* eliminados en heces. Para esto, se indujo la respuesta a PHA en animales 1) con su carga parasitaria natural, 2) con un nivel conocido (manipulado experimentalmente) de infección por parte de un sólo endoparásito (*Eimeria* sp.) y 3) tratados con drogas antiparasitarias, con el fin de eliminar infecciones naturales. A la vez, se midieron parámetros indicadores de la condición general, como son el peso corporal y los niveles de hematocrito, el estado de nutrición (niveles de glucosa y triglicéridos en sangre), niveles de estrés (N: L, cortisol en sangre) e inmunidad (NABs, conteos leucocitarios, capacidad bactericida del plasma –CBP; medida de inmunidad innata-) con el fin de determinar la manera en que éstas afectan la respuesta inmune (ej. a través de un efecto indirecto sobre la condición individual o por medio de componentes inmunes). El parásito coccideo *Eimeria* sp. fue elegido para los ensayos de manipulación de la carga parasitaria de los tuco-tucos debido a varias razones: 1) los tuco-tucos de la localidad de Mar del Cobo presentan una alta prevalencia de infección por *Eimeria* sp.

(Cutrera et al., 2011); 2) grandes cantidades de ooquistes no infectivos son esparcidos por individuos infectados (Cutrera et al., 2011), lo que facilita su cultivo; 3) las infecciones por *Eimeria* sp. son de corta duración –aproximadamente 20 días- (Long, 1982); 4) éstas inducen un daño marcado e inflamación en el epitelio intestinal en un período corto de tiempo, como fue descrito para pollos y conejos (Allen y Jenkins, 2010; Baker, 1998; Parker y Duszynski, 1986; Yun et al., 2000); y 5) los ooquistes cultivados en condiciones de laboratorio son inmunogénicos (Rose, 1987).

Dado el impacto negativo que los parásitos ejercen en sus hospedadores y los resultados previos obtenidos en *C. talarum*, se plantea la hipótesis de que tanto la carga endoparasitaria natural como la generada experimentalmente tendrá un efecto negativo en la magnitud de la respuesta inducida por PHA. De acuerdo a lo planteado anteriormente, se espera que el endoparasitismo impacte negativamente sobre la condición general del individuo, estimada a través de diversos parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los animales y mantenimiento en cautiverio

Se capturaron 76 individuos, 39 machos ($163,05 \pm 25,37$ g) y 37 hembras ($126,87 \pm 19,92$ g) en Mar de Cobo, durante las estaciones reproductivas (agosto a diciembre) de 2013 y 2015. Inmediatamente luego de la captura, se colectaron heces de cada animal, las cuales se conservaron en formalina al 4% para futuros procedimientos (ver “Cultivo de ooquistes de *Eimeria* sp.”). Los animales capturados fueron transportados al laboratorio y ubicados en cajas plásticas individuales. Las condiciones del bioterio y la dieta utilizada fueron iguales a lo detallado en el Capítulo 1.

Grupos experimentales y protocolo

Los individuos de cada sexo fueron aleatoriamente asignados a 3 grupos: naturalmente parasitados (Natural, $n = 28; n_{\text{machos}} = 15, n_{\text{hembras}} = 13$), desparasitados (Desparasitados, $n = 24; n_{\text{machos}} = 12, n_{\text{hembras}} = 12$) o desparasitados e inoculados con ooquistes infectivos de *Eimeria* sp. (Inoculados, $n = 24; n_{\text{machos}} = 12, n_{\text{hembras}} = 12$). Los animales fueron asignados a los distintos grupos de manera equitativa a lo largo del período experimental de manera de evitar efectos de la estacionalidad sobre los parámetros analizados. Inmediatamente luego de la llegada al laboratorio (día 1), los animales de los grupos Desparasitados e Inoculados recibieron una dosis oral de ivermectina (Iverplus, Laboratorios Aviar S.A., Buenos Aires, Argentina; suspensión al 1%, 0,25

ml/g peso corporal) y toltrazuril (Toltrazol, laboratorio Mayors, Buenos Aires, Argentina; suspensión al 5%, 0,4 ml/g peso corporal). La ivermectina es un antihelmíntico que actúa primariamente eliminando nematodos gastrointestinales, mientras que el toltrazol es un anticoccídico de amplio espectro. Siete días después de la administración de ambas drogas, su efecto antiparasitario fue testeado en ambos grupos mediante la cuantificación de los huevos/ooquistes presentes en las muestras de heces (ver “Cuantificación de parásitos”). En ese momento (día 7), los individuos del grupo Inoculados recibieron una dosis oral de 500 ooquistes infectivos de *Eimeria* sp. (200-1000 μ l de ooquistes en solución de sacarosa, dependiendo de la concentración de ooquistes obtenida, ver “Cultivo de ooquistes de *Eimeria* sp.”), mientras que los animales de los otros dos grupos recibieron 500 μ l de agua azucarada como control. También, se registró el peso de todos los animales. Al día 14, los individuos de los 3 grupos fueron pesados y una muestra de sangre (~400 μ l) se les tomó del seno retro-orbital para futuras determinaciones (ver “determinaciones en sangre”). Al día siguiente (día 15), todos los animales fueron desafiados con PHA en la pata trasera derecha y con PBS en la pata trasera izquierda, y la inflamación fue medida 24 hs después (día 16), como se describió en el Capítulo 1.

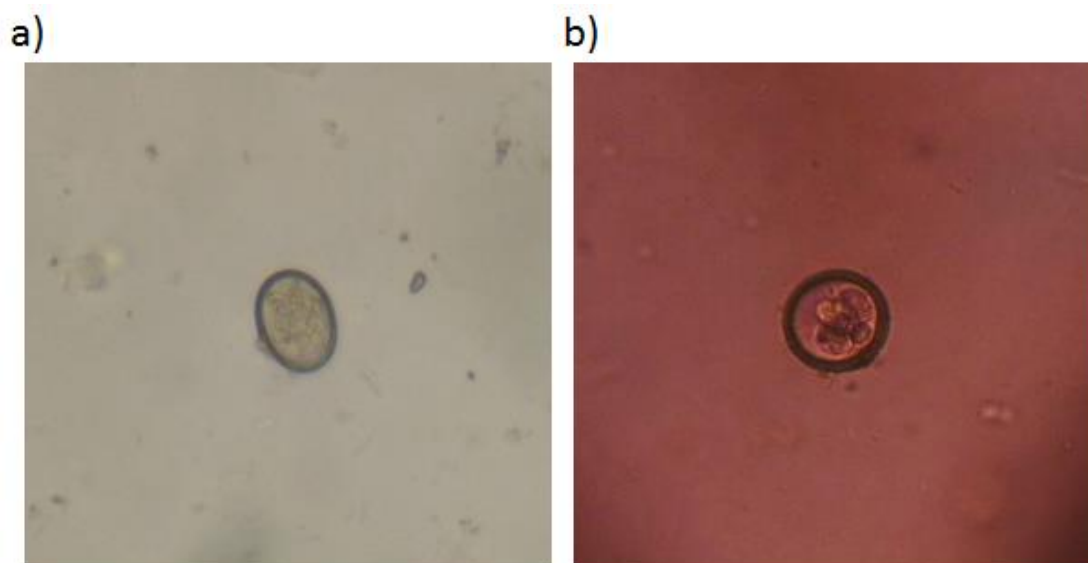
Cuantificación de parásitos

Para determinar las cargas endoparasitarias, el número de huevos/ooquistes presentes en muestras fecales colectadas inmediatamente luego de la captura y al día 7 fue cuantificada por individuo. Se siguió la metodología descrita para el Capítulo 2. La prevalencia de cada tipo de huevo/ooquiste fue calculado como el porcentaje de hospedadores que eliminaban estos huevos/ooquistes sobre el total de hospedadores examinados. La intensidad de infección de cada parásito se calculó como la mediana de los huevos por gramo de heces (hpg) obtenidos (Cutrera et al., 2011; Harf y Sommer, 2005).

Cultivo de ooquistes de Eimeria sp.

Los ooquistes de *Eimeria* sp. fueron obtenidos a partir de heces colectadas de 3 animales con altas intensidades de infección de este protozoo, provenientes del grupo Natural, entre los días 1 y 7. Las heces (15-65 g) fueron mantenidas en dicromato de potasio con burbujeo de aire durante 48 hs. Después de esto, la preparación de ooquistes fue lavada con agua dos veces para remover el dicromato, mediante centrifugación (2500 rpm, 15 min). La cuantificación de la concentración de ooquistes esporulados (infectivos; Fig. 3.1) en la fracción precipitada se realizó por la técnica de flotación de Sheather (1923) descrita anteriormente. Se añadió solución de sacarosa para que la misma sea palatable y en una concentración adecuada para la administración oral.

Figura 3.1. a) Ooquiste no esporulado de *Eimeria* sp. obtenido de heces de *Ctenomys talarum*. b) Ooquiste esporulado (infectivo) de *Eimeria* sp. obtenido mediante cultivo (incubación en dicromato de potasio y burbujeo de aire) de heces de *C. talarum* conteniendo ooquistes no esporulados.



Determinaciones en sangre

Perfil leucocitario. Se determinó como se describió en el Capítulo 2.

Tasa de eritrosedimentación (TES). La TES es la proporción de sangre sedimentada por hora; es una medida inespecífica de la presencia e intensidad de procesos infecciosos en el organismo, ya que se ve incrementada durante infecciones debido al aumento de las proteínas séricas, principalmente fibrinógeno, ante el desarrollo de inflamación o daño tisular (Blaxhall y Daisley, 1973). De acuerdo a Saino y Møller (1996), tubos capilares heparinizados conteniendo sangre se posicionaron verticalmente durante 4 hs a 4°C. La TES se calculó como el volumen del capilar no ocupado por glóbulos rojos x el volumen de sangre en el capilar⁽⁻¹⁾ x 0,25.

Hematocrito. Después de la determinación de la TES (ver arriba), se registró el hematocrito de cada individuo como se describió en el Capítulo 2.

Capacidad bactericida del plasma (CBP). El ensayo de CBP cuantifica la capacidad de los componentes del plasma para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, constituyendo una medida funcional de la respuesta inmune innata. Siguiendo la metodología descrita por Liebl y Martin (2009), con algunas modificaciones, se inocularon 2 ml de medio LB con una cepa no patogénica de *Escherichia coli* donada por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Mar del Plata (stock conservado en glicerol a -80°C) y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación constante (200 rpm). Luego, se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec1100 pro, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) y se diluyó el cultivo para obtener una OD = 0,1. Este nuevo cultivo fue incubado durante 1 hs a 37°C con agitación (200 rpm). Para determinar la duración óptima de la incubación antes de medir la

capacidad antimicrobiana, el tiempo hasta alcanzar la fase logarítmica del crecimiento en ausencia de plasma fue primero cuantificada como se describe en Liebl y Martin (2009), la cual en este caso fue de 120 min (Cutrera et al., 2013). Para testear la CBP para cada individuo, 7,5 µl de plasma (sobrenadante obtenido de la centrifugación de la sangre entera a 3.000 rpm durante 15 min) fue adicionado a 62,5 µl de cultivo de *E. coli* en un tubo Eppendorf. Se agregó PBS estéril hasta alcanzar un volumen de 242,5 µl. Esto se realizó por triplicado. Otro tubo (control) fue preparado de la misma manera pero sin la adición de *E. coli* (agregando, en cambio, 235 µl de PBS). Otro tubo, el “blanco”, contenía PBS (180 µl) y *E. coli* (62,5 µl). Todos los procedimientos se realizaron bajo flujo laminar. Después de esto, 1.250 µl de medio LB fueron agregados a todos los tubos, los cuales se incubaron por 120 min a 37°C con agitación. Luego de la segunda incubación se determinaron las concentraciones microbianas midiendo la absorbancia de cada muestra a 600 nm. La CBP del plasma se calculó como $1 - (\text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia del control})$, o la proporción de bacterias eliminadas en las muestras relativo a los controles positivos.

Albúmina. En respuesta a la inflamación, las concentraciones de albúmina sérica disminuyen notablemente (Gitlin y Colten, 1987; González Naranjo y Molina Restrepo, 2010), de manera que se analizó este parámetro de manera de detectar si los individuos parasitados presentaron mayores niveles de inflamación en relación a los desparasitados. Una fracción (≈ 60 µl) de la sangre colectada de cada individuo fue conservada 1 h a 4°C, centrifugada a 3.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante (suero) fue colectado. Los niveles de albúmina sérica fueron determinados usando un kit colorimétrico (Albúmina AA®, laboratorio Wiener, Santa Fe, Argentina), leídos a 625 nm.

Glucosa. El nivel de glucosa en una gota de sangre entera de cada individuo fue determinado usando un glucómetro (Accu-Chek,Active®, Basilea, Suiza), como un indicador de la condición nutricional.

Ensayo de hemólisis-hemoaglutinación. Se realizó este ensayo de acuerdo a lo descrito anteriormente (Capítulo 2), con el objeto de estimar los niveles de NAbs (medida de inmunidad innata constitutiva).

Cortisol. Esta hormona es responsable de la respuesta a estrés en *C. talarum* (Vera et al., 2011). Una fracción del plasma (20 µl) obtenido como se describió para la determinación de la CBP, se utilizó para determinar los niveles de cortisol de cada individuo, utilizando un kit de inmunoensayo (EIA 1887 DRG1 Instruments GmbH, Marburg, Alemania).

Triglicéridos. La concentración de triglicéridos en plasma es un indicador del estado nutricional y de síndromes metabólicos (Lee et al., 2003). Los triglicéridos en las muestras de plasma (obtenido como se describe en “Capacidad bactericida del plasma (CBP)”) fueron determinadas utilizando un kit colorimétrico (TG color®, laboratorio Wiener, Santa Fe, Argentina).

Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, USA), utilizando un valor $\alpha < 0,05$ para rechazar las hipótesis nulas. La distribución normal de las variables fue puesta a prueba con el análisis de Kolmogorov–Smirnov, mientras que la homogeneidad de la varianza se verificó mediante tests de Levene. Se realizaron ANOVAs de dos vías para analizar el efecto del tratamiento y el sexo en cada parámetro estudiado. Los valores de N: L, conteo de leucocitos totales, cortisol y glucosa fueron transformados logarítmicamente, los valores de triglicéridos fueron transformados mediante raíz cuadrada y los valores de TES, transformados con Box-Cox ($\theta = 0,4$), para normalizarlos. Los conteos de eosinófilos, basófilos, monocitos y conteos parasitarios no pudieron ser normalizados; las diferencias entre tratamientos fueron analizadas con pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Wilcoxon. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (e.e.).

RESULTADOS

El suministro de drogas antihelmínticas y anticoccidiales disminuyeron significativamente los conteos de huevos/ooquistes en heces 7 días después de su administración oral a individuos de los grupos Desparasitados e Inoculados (test de Wilcoxon; conteo *Eimeria* sp.: $Z = 3,97$, $p < 0,0001$; conteo *Paraspidodera uncinata*: $Z = 5,39$, $p < 0,0001$; conteo *T. pampeana*: $Z = 2,71$, $p = 0,007$). Los conteos de estrogilidos no se incluyeron en el análisis dado que la mayoría de los animales no presentaron huevos de este grupo en heces (intensidad de infección_{captura}: $13,2 \pm 4,8$ hpg; intensidad de infección_{día 7}: $6,5 \pm 2,5$ hpg; $n = 48$).

La respuesta inflamatoria fue significativamente mayor en las patas traseras inyectadas con PHA en comparación con aquellas inyectadas con PBS (test de T apareado; $t = 11,52$, $n = 74$, g.l. = 73, $p < 0,0001$; inflamación_{PHA} = $0,35 \pm 0,008$, inflamación_{PBS} = $0,02 \pm 0,03$). La respuesta inflamatoria fue significativamente mayor en individuos del grupo Desparasitados en comparación con los otros dos grupos (ANOVA de dos vías; $F_{(1,70)} = 6,08$, $p = 0,0037$; Tukey, $p < 0,05$; Fig. 3.2). La carga parasitaria del grupo Natural estuvo compuesta por *Eimeria* sp., *P. uncinata*, *T. pampeana* y estrogilidos (Tabla 3.1). La TES no difirió entre tratamientos (ANOVA de dos vías; $F_{(1,70)} = 2,24$, $p = 0,11$; Fig. 3.3a). Los niveles de albúmina sérica difirieron entre tratamientos (ANOVA de dos vías; $F_{(1,70)} = 4,10$; $p = 0,02$), siendo éstos significativamente mayores en el grupo Desparasitados que en el grupo Inoculados (Tukey, $p < 0,05$; Fig. 3.3b).

Las medidas de condición, estrés, nutrición y otros parámetros inmunes no difirieron entre tratamientos (ver Tabla 3.2). Los niveles de lisis de eritrocitos del ensayo de hemólisis-

hemoaglutinación fueron 0 en 59 de 62 muestras ($0 \pm 0,008$), por lo cual los títulos de lisis obtenidos de este ensayo no fueron incluidos en los análisis estadísticos.

TABLA 3.1. Listado de las especies de parásitos y sus parámetros de infección en los tuco-tucos del grupo Natural, obtenidos a través del conteo de huevos/ooquistes en heces colectadas al día 7.

Parámetro	Prevalencia (%)	Intensidad de Infección	Rango de infección (25vo-75vo cuartiles)
<i>Eimeria</i> sp,	94,9	1.550	250-11.350
<i>P. uncinata</i>	71,4	850	0-2.500
<i>T. pampeana</i>	32,1	0	0-100
Estrongílicos	21,4	0	0-0

TABLA 3.2. Promedios (\pm e.e.) de los distintos parámetros indicadores de la condición general de los individuos en cada grupo (Desparasitados, Natural e Inoculados) y los resultados de los ANOVAs de dos vías y pruebas de Kruskal Wallis empleados para evaluar las diferencias en estos parámetros entre grupos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

Parámetros	Desparasitados	Natural	Inoculados	F/H	P
Peso (g)	148,29 \pm 4,78	151,05 \pm 6,34	143,18 \pm 4,97	F=0,75	0,48
Hematocrito (%)	47,63 \pm 0,80	47,54 \pm 1,14	47,15 \pm 1,27	F=0,08	0,93
<i>Inmunológicos</i>					
CBP (%)	4,62 \pm 0,86	5,95 \pm 0,83	4,59 \pm 0,60	F=0,98	0,39
NAbs	12,47 \pm 0,73	11 \pm 0,66	10,16 \pm 0,83	F=0,58	0,56
Leucocitos totales /100.000 GR	15,92 \pm 1,66	15,61 \pm 2,43	13,83 \pm 2,10	F=0,61	0,55
Neutrófilos ¹	105,60 \pm 7,49	102,00 \pm 5,90	94,09 \pm 6,79	F=0,69	0,50
Linfocitos ¹	88,84 \pm 7,39	90 \pm 5,71	99,17 \pm 6,86	F=0,64	0,53
Eosinófilos ¹	2,48 \pm 0,42	4,64 \pm 1,34	2,78 \pm 0,81	H=0,83	0,66
Basófilos ¹	2,20 \pm 1,44	2,43 \pm 0,65	2,26 \pm 1,10	H=2,59	0,27
Monocitos ¹	1,52 \pm 0,44	1,21 \pm 0,27	1,70 \pm 0,37	H=0,93	0,63
<i>Estrés</i>					
Cortisol (ng/ml)	26,93 \pm 6,84	28,56 \pm 9,25	27,79 \pm 6,89	F=0,96	0,39
N: L	1,75 \pm 0,31	1,46 \pm 0,22	1,21 \pm 0,19	F=0,68	0,51

Nutricionales

Glucosa (mg/dl)	78,44 ± 6,87	76,46 ± 7,10	80,70 ± 8,18	F=0,17	0,84
Triglicéridos (g/l)	4,76 ± 4,01	0,70 ± 0,20	0,30 ± 0,18	F=1,55	0,22

GR: glóbulos rojos; ¹abundancias basadas en un total de 200 leucocitos examinados por individuo.

Figura 3.2. Promedio (± e.e.) de la respuesta inflamatoria inducida por fitohemaglutinina (PHA) a las 24 hs post-inyección, de individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos Desparasitados, Natural e Inoculados. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

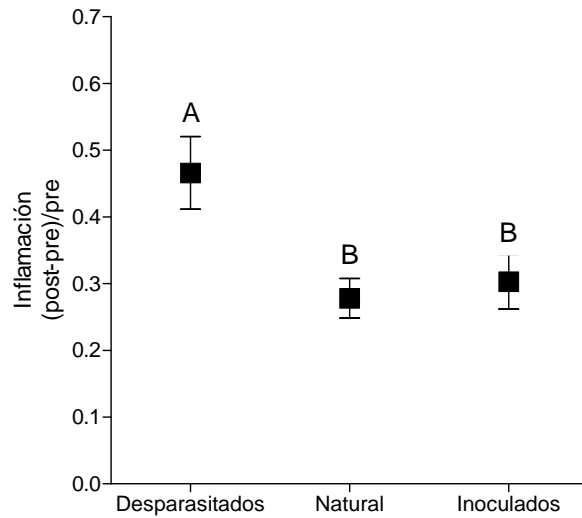
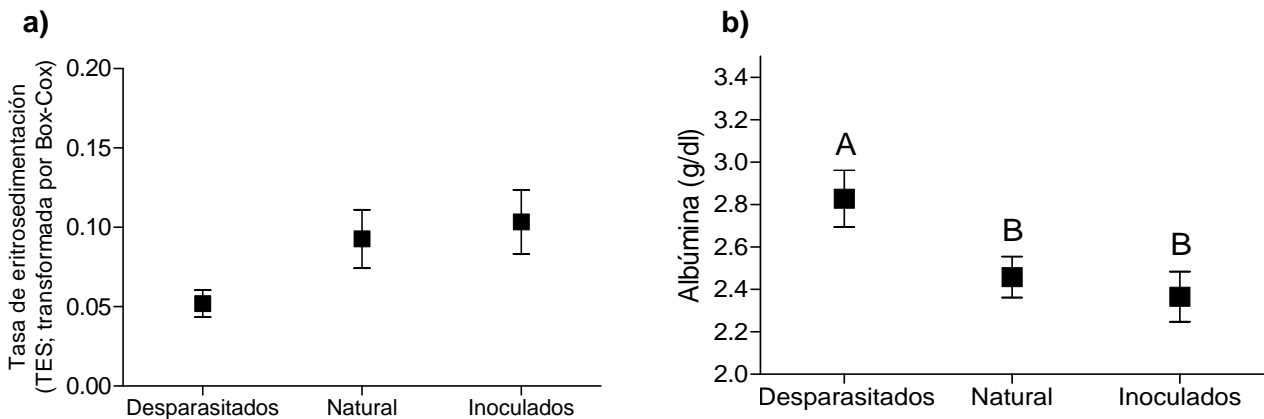


Figura 3.3. Promedios (± e.e.) de los valores transformados por Box-Cox de la TES (tasa de eritrosedimentación; panel a) y de los niveles de albúmina (panel b) de los individuos en los diferentes grupos (Desparasitados, Natural e Inoculados). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos.



DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que las infecciones pre-existentes influyen sobre la magnitud de la respuesta inmune frente a un nuevo desafío. Además, la magnitud del impacto negativo del parasitismo sobre la respuesta inflamatoria verificada en este estudio fue comparable entre el grupo artificialmente inoculado con ooquistes de *Eimeria* sp. y el grupo infectado naturalmente, en el cual *Eimeria* sp. coexiste con otros nematodos gastrointestinales.

En los animales naturalmente infectados, los ooquistes de *Eimeria* sp. fueron los más prevalentes y mostraron los mayores niveles de infección comparados con los huevos liberados por otras especies. Si bien se ha reportado que la técnica de conteo de huevos debe ser empleada considerando que cada especie de parásito presenta ciclos de vida particulares, caracterizados por diferentes pulsos de liberación de huevos/ooquistes (Poulin, 1996), se ha verificado que es particularmente útil en especies de vida salvaje (por ejemplo, Harf y Sommer, 2005; Schad et al., 2005), incluyendo estudios previos en *C. talarum* (Cutrera et al., 2011; Cutrera et al., 2014). Además de las diferencias en la composición de la carga parasitaria, los grupos natural y artificialmente infectados diferían en los estados de infección por *Eimeria* sp. Los animales del grupo artificialmente infectado, antes de la inoculación de ooquistes de *Eimeria* sp., fueron tratados con drogas antihelmínticas y anticoccidiales para eliminar así sus infecciones parasitarias en curso. Este procedimiento asegura la interrupción de la potencial inmunidad protectora desarrollada por infecciones crónicas o de baja intensidad, y vuelve a los individuos susceptibles nuevamente (Gómez-Lucía, 2006a). Así, luego de 7 días de la inoculación con ooquistes infectivos, los animales de este grupo estaban en un estadio temprano de infección, mientras que los animales del grupo Natural podrían haber estado transitando diferentes estadios de infección de *Eimeria* sp., dependiendo del particular momento de contacto entre *Eimeria* sp. y cada individuo. Esto es importante dada la diferente inmunogenicidad de los estadios intracelular, extracelular, asexual y sexual (Yun et al., 2000) del ciclo de vida de *Eimeria* sp. En conclusión, aun cuando los dos grupos diferían en varias características de la infección, la disminución en la respuesta inflamatoria frente a un nuevo desafío fue similar en ambos casos, indicando que en tuco-tucos, el endoparasitismo es un factor que afecta negativamente el nivel de respuesta inmune hacia otros antígenos.

Otros autores ya han explorado la influencia de diferentes tipos de parásitos en la respuesta a PHA en mamíferos. Por ejemplo, mediante la manipulación de la carga parasitaria, Goüy De Bellocq et al. (2006) encontró que las ratas de Sundevall (*Meriones crassus*) parasitadas por pulgas desarrollaban menores respuestas a PHA comparadas con aquellas sin pulgas; mientras que Christe et al. (2000) observó una correlación negativa entre la respuesta a PHA y la carga de

ácaros hematófagos en hembras de murciélagos (*Myotis myotis*) en período de amamantamiento. Además del presente estudio, el efecto de los coccidios sobre la respuesta inmune frente a PHA fue previamente reportada sólo para una especie de aves: los pinzones verdes (*Carduelis chloris*) mostraron una asociación positiva entre la intensidad de infección por *Isospora lacazei* y la capacidad de montar una respuesta inmune contra PHA (Saks et al., 2006). Más allá de algunas diferencias de protocolo (tipo de tratamiento anticoccidial, cantidad de ooquistes inoculados, especie de coccidio utilizada, momento del desafío inmune) entre ese estudio y el presente, los diferentes resultados en cuanto a la respuesta inmune de los pinzones verdes y los tuco-tucos en relación a la infección puede ser producto de las diferentes características de historia de vida y estrategias inmunes de ambas especies. Nuestros resultados contribuyen a entender la ecología de la defensa inmune de *C. talarum*, una especie con hábito subterráneo, y mamíferos en general, pero sobre todo del amplio rango de hospedadores que pueden ser afectados por especies del género *Eimeria*, incluyendo ganado, aves de corral y fauna salvaje (Allen y Jenkins, 2010; Pérez et al., 2010; Yun et al., 2000). En este sentido, además de las enfermedades conocidas (coccidiosis) que las especies de *Eimeria* puede causar (Pérez et al., 2010), nuestros resultados demuestran que los coccidios pueden modular el nivel de respuesta del sistema inmune del hospedador.

Cuando se considera más de una infección parasitaria, la compleja interacción entre las diferentes especies parasitarias y el sistema inmune del hospedador se vuelve más complicada de entender. Por ejemplo, la magnitud de la respuesta a PHA de los mirlos (*Turdus merula*) fue explicada en gran parte por la interacción de dos especies parasitarias diferentes (*Hymenolepis* sp. y *Plasmodium* sp.; Biard et al., 2015). A su vez, los resultados reportados por Goüy de Bellocq et al. (2007) en cuanto a la respuesta a PHA de la musaraña de dientes blancos (*Crocidura russula*) mostraron que ésta se verifica positivamente relacionada con la intensidad de infección por nematodos, pero negativamente relacionada con la de cestodes. Los diferentes efectos moduladores de la inmunidad han sido atribuidos a compromisos que surgen de la estimulación de diferentes vías del sistema inmune (principalmente mediante compromisos entre vías Th1 vs. Th2), o a la capacidad inmunoreguladora de los helmintos (Biard et al., 2015; Goüy De Bellocq et al., 2006).

Los individuos de *C. talarum* parasitados por *Eimeria* sp. o por varias especies de endoparásitos mostraron menores respuestas inflamatorias comparadas con la de individuos desparasitados. Además del efecto de *Eimeria* sp., se requieren estudios adicionales para explicar la influencia particular de las otras especies de parásitos en la respuesta inmune. Aunque nuestros resultados están en línea con los reportados para otros mamíferos (Christe et al., 2000; Goüy De Bellocq et al., 2006), se necesitan estudios adicionales para explicar los mecanismos que subyacen al efecto negativo del parasitismo sobre otros desafíos inmunes. El hecho de que el parasitismo natural y el ocasionado por *Eimeria* sp., perjudicara la respuesta a PHA pero no la condición

general de los tuco-tucos podría evidenciar un compromiso entre los dos desafíos inmunes a través de componentes de este sistema y no en relación al consumo de los recursos del hospedador. Mediciones de componentes inmunes (por ejemplo, citoquinas) liberados en la sangre y en las zonas afectadas durante los diferentes tratamientos ensayados podría revelar más información para dilucidar los mecanismos subyacentes a la relación entre los dos desafíos inmunes vía el sistema inmune. Por ejemplo, la inmunodepresión del hospedador puede ser inducida a través de la producción de moléculas capaces de afectar directa o, indirectamente, las células inmunes (Cox, 2001). Aunque se desconoce si *Eimeria* sp. u otros endoparásitos de *C. talarum* son capaces de generar este tipo de mecanismos, esta posibilidad no puede ser excluida de nuestros resultados.

Entre las proteínas de fase aguda, la albúmina es una de fase negativa, lo que significa que sus niveles séricos disminuyen durante procesos inflamatorios (Gitlin y Colten, 1987), pudiendo analizarse como un indicador de estos. El nivel de albúmina sérica fue afectado por el tratamiento realizado en el presente estudio; los tuco-tucos parasitados artificialmente mostraron menores niveles séricos de albúmina que aquellos del grupo Desparasitados, demostrando que los parásitos inducen procesos inflamatorios en el hospedador. Además, estos resultados también sugieren que la inoculación fue efectiva, ya que los ooquistes inoculados probablemente produjeron daño físico e inflamación en el intestino debido a la penetración de las células epiteliales de la mucosa intestinal (Allen y Jenkins, 2010; Baker, 1998; Parker y Duszynski, 1986; Yun et al., 2000), lo cual explicaría la disminución de los valores de albúmina. Los individuos del grupo Natural mostraron niveles de albúmina intermedios entre los Desparasitados y los Inoculados. Además del hecho de que los grupos Natural e Inoculados diferían en su composición parasitaria, las diferencias observadas en los niveles de albúmina entre los dos grupos (Fig. 3.3b) pueden también ser atribuidas a los diferentes estadios de infección de *Eimeria* sp. Una infección temprana, tal como la inducida en el grupo Inoculados, puede resultar altamente perjudicial para el hospedador dado que los estadios endógenos tempranos del parásito son considerados más inmunogénicos que los estadios sexuales tardíos (Yun et al., 2000). Llamativamente, la TES –una medida que se incrementa como consecuencia de procesos inflamatorios y/o infecciosos- no difirió entre tratamientos. Sin embargo, los individuos del grupo Desparasitados tendieron a presentar menores TES que los natural o artificialmente parasitados, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Notablemente, los parámetros asociados a la condición general de los individuos –excepto por la respuesta a PHA- estudiados aquí no fueron afectados por el parasitismo. Para el caso particular de las infecciones por parte de *Eimeria* sp., los efectos más dañinos generalmente involucran diarrea, deshidratación, pérdida de peso y, en ocasiones, mortalidad (Yun et al., 2000). En el presente estudio, se detectó diarrea sólo en dos individuos naturalmente parasitados (Merlo, observación personal), y no se encontraron diferencias en el peso corporal entre los individuos

parasitados (natural o artificialmente) y los desparasitados. Así, es posible que los niveles de infección en los grupos Natural e Inoculados hayan sido suficientes para inducir una respuesta inmune (como evidencian los niveles de albúmina sérica) pero no tan altos como para causar síntomas serios de enfermedad e impactar sobre los otros parámetros fisiológicos estudiados. Otra posibilidad es que los efectos perjudiciales del parasitismo sobre la condición fisiológica fueran compensados por la alta disponibilidad de nutrientes y energía provista por la dieta *ad libitum* y la restricción de actividades costosas (por ejemplo, termorregulación o excavación) durante el cautiverio. En este sentido, en el siguiente capítulo, se plantea analizar el efecto de la condición nutricional sobre la capacidad de los tuco-tucos de montar una respuesta inflamatoria frente a PHA.

En general, los resultados del presente estudio son de gran importancia para el entendimiento de la defensa inmune en esta especie. En la situación natural, los tuco-tucos pueden evadir o resistir infecciones parasitarias mediante una serie de estrategias. Por ejemplo, pueden recurrir a comportamientos como la evitación de zonas o dietas infectadas o a defensas inmunes, como barreras físicas (piel), o activación de diferentes vías inmunes (Schmid-Hempel, 2003). Esto conlleva un beneficio asociado no sólo a la evitación de la infección por parásitos, sino también a una mayor capacidad de responder a posteriores desafíos que impliquen inflamación local, producto de diferentes actividades cotidianas, como las peleas intraespecíficas y la excavación.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA INGESTA DE ALIMENTO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA INGESTA DE ALIMENTO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

INTRODUCCIÓN

Las variaciones en la disponibilidad de alimento en el ambiente implican para los individuos la necesidad de modificar sus respuestas fisiológicas, de manera de priorizar aquellos procesos que incrementen su supervivencia (Graham et al., 2015). El funcionamiento del sistema inmune, en particular, incrementa las demanda de macro- y micro-nutrientes durante la síntesis y proliferación de leucocitos y moléculas de las respuestas inmunes (Hasselquist y Nilsson, 2012). Por ejemplo, la fase aguda de una respuesta inmune (conjunto de mecanismos que incluyen la producción de fiebre y numerosos cambios fisiológicos en respuesta al daño tisular y procesos inflamatorios; Guillén et al., 2001) se considera la de mayor demanda nutricional (Klasing, 1998). Además, se ha reportado que la activación del sistema inmune conduce a la pérdida de peso corporal (Lochmiller y Deerenberg, 2000), dado que la demanda de recursos para la síntesis de proteínas necesarias para la defensa no llega a ser cubierta por las reservas del cuerpo (Schmid-Hempel, 2011). Por otra parte, el requerimiento de micro-nutrientes esenciales es crítico también para el funcionamiento de este sistema; la disponibilidad de carotenoides, selenio y vitamina E, por ejemplo, puede afectar la magnitud en la que se desarrolla una respuesta inmune, dado que éstos se requieren de manera incrementada durante el accionar de los mecanismos de defensa (Klasing, 1998; Surai, 2002).

De esta manera, la ingesta insuficiente de alimento así como de raciones suficientes pero desbalanceadas, típicamente tienen un impacto negativo en el desarrollo de respuestas inmunes (Scrimshaw y SanGiovanni, 1997; Fekete y Kellems, 2007). Por ejemplo, se ha visto que los ratones *Peromyscus maniculatus* con restricción alimentaria producen notablemente menos Ig G contra un antígeno extraño (KLH) que sus contrapartes alimentadas *ad libitum* (Martin et al., 2007a); a su vez, los faisanes *Phasianus colchicus* machos bajo dietas con alto contenido proteico producen respuestas secundarias de anticuerpos más fuertes contra difteria y tétanos que machos con dietas con bajo contenido proteico (Smith et al., 2007). Sin embargo, también se han reportado incrementos en la inmunidad así como también efectos nulos sobre ciertos componentes inmunes (producción de anticuerpos, capacidad bactericida) ante restricción alimenticia (Hangalapura et al., 2005; Poston et al., 2005; Zysling et al., 2009). La interpretación

de estos resultados, en general, podría verse afectada por la influencia de la restricción alimentaria sobre la condición general del individuo, dado que el efecto de la manipulación del alimento sobre la inmunidad podría depender, en última instancia, del efecto general sobre la condición individual (Hasselquist y Nilsson, 2012). Finalmente, estudios destinados a mejorar la producción aviar han reportado que la adición de ciertos aminoácidos (ej. arginina, metionina) a la dieta mejora la respuesta inmune (Abdukalykova y Ruiz-Feria, 2006; Soler et al., 2002; Swain y Johri, 2000). Esto también ha sido estudiado en especies silvestres; la alimentación suplementada con metionina induce a los pichones *Parus caeruleus* a invertir más recursos en el desarrollo de la inmunidad mediada por células, pero a la vez, reduce el crecimiento de los mismos (Brommer, 2004). Resultados de otro estudio en otra población de la misma especie, revelaron también que la suplementación con metionina incrementó la respuesta a PHA en pichones, pero sólo en aquellos que pertenecían a nidos parasitados (Pitala et al., 2010). Llamativamente, en este caso el crecimiento de los individuos suplementados con metionina fue mayor que los individuos control, y mostraron un incrementado riesgo de mortalidad y menores niveles de inmunoglobulinas circulantes (lo que podría revelar un compromiso en el desarrollo de la respuesta mediada por células vs. humoral; Pitala et al., 2010). En base a esto, es claro que se requieren estudios adicionales para elucidar el efecto de la suplementación de la dieta sobre la inmunocompetencia, en especial en individuos adultos que ya poseen su sistema inmune desarrollado (Hasselquist y Nilsson, 2012).

El detrimento de la inmunocompetencia por la malnutrición conduce a una menor resistencia frente a nuevas infecciones (Fekete y Kellems, 2007). Por ejemplo, en roedores, se ha visto que los individuos infectados acumulan parásitos en proporción a la intensidad de exposición cuando son alimentados con dietas bajas en proteínas, mientras que la acumulación disminuye cuando se alimentan con dietas con mayores contenidos proteicos (Slater y Keymer, 1986). Al mismo tiempo, bajo cierto nivel de parasitismo el estado nutricional del hospedador puede verse alterado por un menor consumo de alimento inducido por los parásitos y, en algunos casos, también por el uso de recursos de alimento por parte de los mismos (Fekete y Kellems, 2007). Por lo tanto, la interacción entre nutrición, inmunidad e infección es tal que los cambios que ocurren en una de estas condiciones afectarán a las otras dos (Chandra y Newberne, 1977; Beldomenico y Begon, 2010).

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la dieta en la inmunidad de *C. talarum*. De esta manera, se pretende examinar si la variación interindividual de la respuesta inflamatoria contra PHA, la cual no se encontró asociada a un costo energético significativo (Capítulo 1), está influenciada por el estado nutricional del individuo, o de otra manera, si su desarrollo implica un costo nutricional. Como se mencionó anteriormente, esta especie de roedor herbívoro presenta hábitos generalistas; los tuco-tucos consumen raíces y tallos subterráneos pertenecientes a un amplio espectro de especies vegetales, pero principalmente colectan la porción aérea de los pastos disponibles en la zona cercana a sus cuevas durante breves excursiones a la superficie

(Busch et al., 2000). Aunque su fuente de alimento es abundante, los cambios en la composición vegetal son importantes para esta especie oportunista, ya que responden cambiando su dieta en relación a la disponibilidad vegetal (del Valle et al., 2001). Estudios previos evaluaron el impacto de la restricción alimenticia sobre la respuesta de anticuerpos contra SRBC producidos por tuco-tucos adultos, encontrando que no hubo diferencias en la magnitud de esta respuesta (títulos de anticuerpos) entre una restricción leve o severa en el alimento (Schleich et al., 2015). Sin embargo, el sistema inmune es complejo; involucra diversos componentes que en conjunto determinan la inmunocompetencia del individuo. Así, se requiere de información adicional sobre cómo la nutrición afecta otros componentes inmunes de los tuco-tucos, para comprender la manera en que la defensa contra patógenos se regula en esta especie, en relación a otras funciones fisiológicas y a la variación en la disponibilidad de recursos alimenticios. En el presente estudio se evaluó el efecto de 1) la restricción y 2) la suplementación con metionina de la dieta sobre la inducción de la respuesta a PHA y otros parámetros inmunes (CBP, NABs y perfil leucocitario). Se monitorearon parámetros nutricionales (glucosa y triglicéridos en plasma) para evaluar si el estado nutricional de los animales fue efectivamente afectado por los tratamientos. Además, otros componentes de la condición general de los individuos -hematocrito e indicadores de estrés (N: L, cortisol)- fueron analizados para evidenciar posibles efectos indirectos (es decir, a través de la influencia sobre la condición general) de los tratamientos sobre el estado inmune. Los niveles de proteínas totales, albúmina y globulinas en plasma, así como la relación albúmina: globulinas (A/G), fue estudiada en relación con la magnitud de la respuesta a PHA, dado que estos parámetros varían cuando ocurren procesos inflamatorios en el cuerpo (Gitlin y Colten, 1987; Kaneko et al., 2008; González Naranjo y Molina Restrepo, 2010), y también son afectados por la nutrición (Kaneko et al., 2008). Albúmina y globulinas son los componentes mayoritarios del plasma (Kaneko et al., 2008); en respuesta a la inflamación, la concentración de albúmina sérica disminuye notablemente (Gitlin y Colten, 1987; González Naranjo y Molina Restrepo, 2010); pero ésta también decrece si su síntesis es afectada por una pobre nutrición (Kaneko et al., 2008). Las globulinas en plasma (α , β y γ) son una familia heterogénea de proteínas que participan en la respuesta inflamatoria, el transporte de varios componentes lipofílicos, la homeostasis y la producción de anticuerpos (Abdou et al., 2014). Normalmente, los niveles en sangre de albúmina son ligeramente superiores a los de globulinas, dando como resultado una relación albúmina: globulinas (A/G) levemente mayor a 1. Dado que los estados de enfermedad afectan los conteos relativos de albúmina y globulinas, la A/G puede dar pistas sobre la causa del cambio en los niveles de proteínas en sangre (Kaneko et al., 2008). Por último, dado que los estados de nutrición e infección interactúan, y que, particularmente, las cargas parasitarias influyen la magnitud de la respuesta a PHA en esta especie (Capítulo 3), las cargas endoparasitarias individuales fueron también cuantificadas en el presente estudio.

En base a lo expuesto, se hipotetizó que 1) la restricción alimenticia afecta directamente el desarrollo de la respuesta inflamatoria debido a una reducción en la disponibilidad de energía y recursos para el desarrollo de esta función; 2) que este tratamiento afecta negativamente la condición general de *C. talarum*, la cual, contribuye al deterioro de la función inmune; y 3) que la restricción alimenticia incrementa las cargas parasitarias, las que también podrían empeorar la condición general de los individuos. Por otra parte, se planteó la hipótesis de que la suplementación con metionina contribuye a incrementar la magnitud de la respuesta inflamatoria frente a PHA y cambia los perfiles leucocitarios, dado el incremento en los conteos de linfocitos, producto de la mayor disponibilidad de aminoácidos de sulfuro (Grimble, 1992); mientras que no se esperan mayores efectos de la suplementación sobre la condición general o las cargas endoparasitarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los animales y mantenimiento en cautiverio

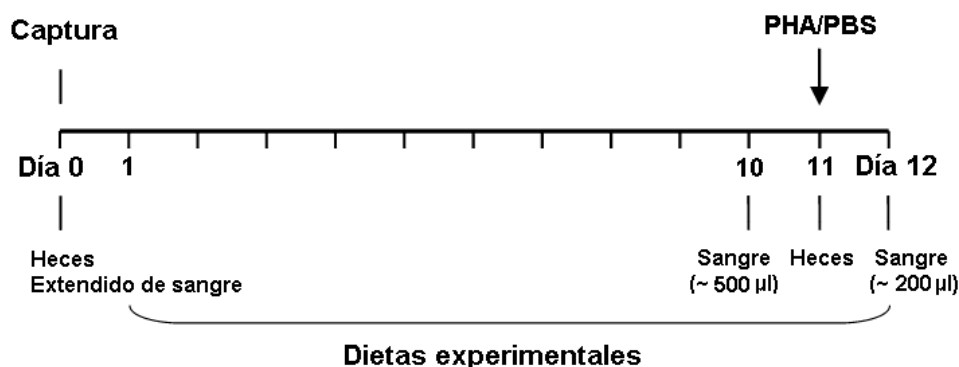
Se capturaron 43 individuos, 29 machos ($163,44 \pm 23,15$ g) y 14 hembras ($126,89 \pm 21,07$ g) en Mar de Cobo, durante la estación reproductiva (julio a diciembre) de 2014. Inmediatamente luego de la captura, se colectaron heces de cada animal, las cuales se conservaron en formalina al 4% para futuros procedimientos (ver “Cuantificación de endoparásitos” abajo), y se realizó un extendido de sangre obtenida de cada individuo realizando una pequeña incisión en la punta de la cola (Vera et al., 2008); los extendidos fueron fijados con metanol al 70% durante 10 min, y se conservaron hasta futuros análisis (ver sección “perfil leucocitario”). Los animales capturados fueron transportados al laboratorio y ubicados en cajas plásticas individuales. Las condiciones del bioterio utilizadas fueron iguales a lo detallado en el Capítulo 1.

Grupos experimentales y desafío con PHA

Inmediatamente luego del arribo al laboratorio (día 1), los individuos de cada sexo fueron aleatoriamente asignados entre las siguientes dietas: **ad libitum** (n = 14), compuesta por 70 g de achicoria, 50 g de batata y 20 semillas de girasol por día; **restringida** (n = 14), que incluyó 50 g de lechuga y 7-15 g de batata diarios, de manera de disminuir el peso corporal inicial en un 10%; o **suplementada** (n = 15), compuesta de la misma manera que la dieta *ad libitum*, más 5 dosis intramusculares (espaciadas en el tiempo: días 1, 3, 5, 7 y 9) de metionina (Hepatone®; 1 μ l / g peso corporal), de manera de incrementar el contenido de aminoácidos de la dieta. Los animales permanecieron 12 días en tratamiento (dietas) y fueron pesados diariamente. Al día 10 se tomó una muestra de sangre (~ 500 μ l) del seno retro-orbital para posteriores determinaciones (ver “Determinaciones en sangre” abajo). El día siguiente (día 11), se colectaron heces frescas de cada caja para la cuantificación de parásitos (ver abajo) y todos los animales fueron inmunodesafiados

con PHA en la pata trasera derecha y con PBS en la pata trasera izquierda, calculando la inflamación a las 24 hs post-inyección, como se describió en el Capítulo 1. Luego de esto, se tomó una muestra de sangre (~ 200 µl) nuevamente, para posteriores determinaciones (ver “Proteínas totales, albúmina y globulinas”). En la Figura 4.1, se muestra una línea de tiempo con los tratamientos y tiempos de obtención de las muestras.

Figura 4.1. Línea de tiempo mostrando los tiempos de colecta de las muestras y desafío inmune durante los 13 días de experimentación.



Determinaciones en sangre

A partir de las muestras colectadas el día 10 (~500 µl) se analizaron los siguientes parámetros, que constituyen la caracterización de la respuesta al tratamiento de dieta y representan la condición de base para afrontar el desafío con PHA:

1. Parámetros inmunológicos

Perfil leucocitario. Se determinó como se describe en el Capítulo 2. Los extendidos realizados el día de la captura (día 1) fueron teñidos y analizados de la misma manera.

Tasa de eritrosedimentación (TES). Se siguió la metodología descrita en el Capítulo 3.

Capacidad bactericida del plasma (CBP). Se determinó como se describe en el Capítulo 3.

Ensayo de hemólisis-hemoaglutinación. Se realizó este ensayo de acuerdo a lo descrito anteriormente (Capítulo 2). Se utilizaron para el análisis sólo los valores de anticuerpos naturales, dados los bajos o nulos registros en la actividad lítica reportados anteriormente (Capítulo 3).

2. Parámetros nutricionales

Glucosa. El nivel de glucosa en sangre entera colectada de cada individuo fue determinado como se describió en el Capítulo 3.

Triglicéridos. Fueron determinados según lo descrito en el Capítulo 3.

3. Condición general

Hematocrito. Después de la determinación de la TES, se determinó el hematocrito para cada individuo, como se describe en el Capítulo 2, como un indicador del estado general de salud.

4. Estrés

Cortisol. Se determinó la concentración en sangre de esta hormona, que responde al estrés agudo en *C. talarum* (Vera et al. 2011), como se describe en el capítulo 3.

Relación N: L. A partir de los conteos de neutrófilos y linfocitos del perfil leucocitario realizado para cada individuo (ver “Perfil leucocitario” arriba), se determinó la razón N: L, informativa del estado de estrés de los individuos.

5. Proteínas totales, albúmina y globulinas

Una fracción (~ 30 µl) de la sangre colectada de cada individuo fue conservada a 4°C durante una hora para que coagule, centrifugada a 3000 rpm durante 15 min y el sobrenadante (suero) fue colectado. Los niveles de albúmina en el suero se determinaron mediante un kit colorimétrico (Albúmina AA®, laboratorio Wiener, Santa Fe, Argentina), como se escribe en el Capítulo 3. Los niveles de proteínas totales se obtuvieron con otro kit colorimétrico (Proteínas Totales AA®, laboratorio Wiener, Santa Fe, Argentina; respectivamente), leído a 540 nm. Los niveles de globulinas se calcularon como la cantidad total de proteínas que no eran albúmina (globulinas = proteínas totales - albumina; Gornall et al., 1949).

A partir de las muestras colectadas el día 12 (~200 µl) se analizaron los siguientes parámetros, que proveen información sobre la respuesta a PHA:

Proteínas totales, albúmina y globulinas: se determinaron como se describe arriba. La comparación de los valores obtenidos al día 10 y día 12 permitieron analizar el efecto de la inyección de PHA sobre éstos niveles, en relación a las dietas.

Cuantificación de endoparásitos

El número de huevos/ooquistes de parásitos presentes en las muestras de heces colectadas inmediatamente luego de la captura y al día 11 fue obtenido por individuo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 2, mediante la técnica de flotación propuesta por Sheather (1923).

Análisis estadísticos

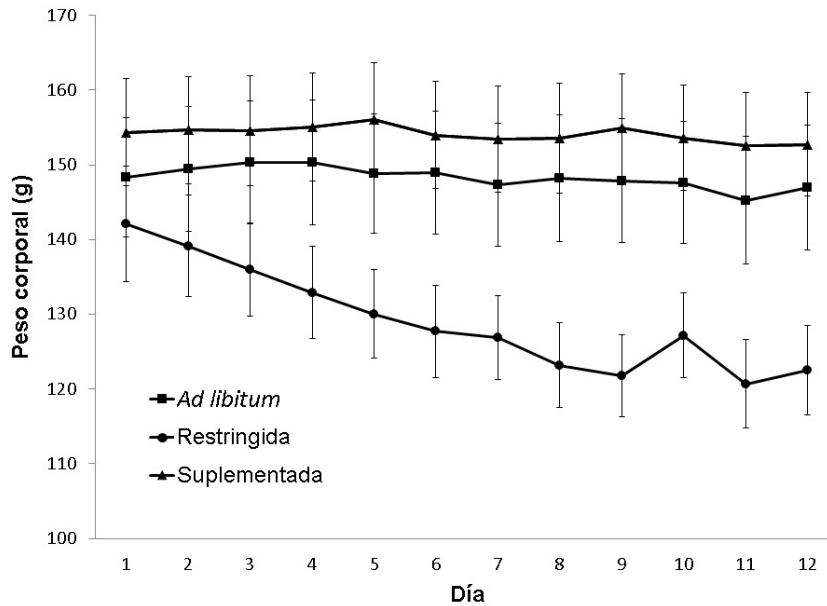
Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, USA), utilizando un valor $\alpha < 0,05$ para rechazar las hipótesis nulas. La distribución normal de las variables fue analizada por medio del test de Kolmogorov–Smirnov, mientras que la homogeneidad de la varianza se verificó mediante tests de Levene. Se realizó un test de T de medidas repetidas para comparar la respuesta a PHA vs. PBS. Un ANOVA de dos vías se utilizó para poner a prueba el efecto del tratamiento (dietas) y el sexo sobre cada parámetro analizado. Se realizaron ANOVAs de medidas repetidas para analizar el efecto del tratamiento y el sexo sobre los parámetros medidos a dos diferentes tiempos (ej. día 0 y 10, día 10 y 12). Se usaron tests de Tukey para analizar las diferencias post hoc entre grupos. Se emplearon correlaciones de Pearson para poner a prueba asociaciones entre la magnitud de la respuesta inflamatoria y el peso corporal y entre la albúmina $_{\text{día } 12}$ y A/G $_{\text{día } 12}$. Los valores de triglicéridos, glucosa, cortisol y N:L (al día 0 y 10) fueron transformados logarítmicamente y los valores de CBP se transformaron mediante Box-Cox ($\theta = 0.4$) para normalizarlos. Los conteos de eosinófilos, basófilos y de huevos/ooquistes de parásitos no pudieron ser normalizados; por lo tanto, se calculó el cambio (Δ ; valor de la segunda medición – valor de la primera medición) para cada parámetro y se analizaron las diferencias entre los tratamientos mediante tests de Kruskal-Wallis, y las diferencias entre sexos mediante tests de Mann-Whitney. Los conteos de monocitos no fueron incluidos en los análisis dados los bajos conteos registrados (0 en 54 de 86 muestras; $0,73 \pm 1,16$), como así tampoco los conteos de huevos de estrongílidos (0 en 73 de 86 muestras; $0,2 \pm 0,94$). A través del texto, los resultados están expresados como media \pm error estándar (e.e.).

NOTA ÉTICA: una vez finalizados los ensayos, los individuos de la dieta restringida permanecieron en cautiverio con alimentación *ad libitum* hasta recuperar su peso inicial (peso al día 0), para posteriormente ser devueltos al sitio de captura, al igual que los individuos de los otros dos grupos. La recuperación del peso requirió como máximo una semana.

RESULTADOS

Los animales pertenecientes al grupo de dieta restringida perdieron un $12,8 \pm 4,7$ % de su peso corporal inicial hacia el día 10 (pérdida de peso significativa: ANOVA de medidas repetidas de dos vías; factor “tiempo*sexo”: $F_{(2,40)} = 10,89$; $p < 0,001$; test de Tukey, $p < 0,001$; Fig. 4.2), mientras que el peso de los individuos bajo las dietas *ad libitum* o suplementada no difirió entre los días 0 y 10 (*ad libitum*: test de Tukey, $p = 0,50$; suplementada: $p = 0,99$; Fig. 4.2).

Figura 4.2. Promedio del peso corporal de los tuco-tucos por grupo (dietas *ad libitum*, restringida y suplementada; \pm e.e.) durante el período experimental.



Parámetros inmunes

La TES, la CBP y los títulos de NAbS no difirieron entre tratamientos (Tabla 4.1). Los machos presentaron menores CBPs que las hembras ($CBP_{machos} = 2,55 \pm 3,49 \%$; $CBP_{hembras} = 4,07 \pm 3,64 \%$; Tabla 4.1). Los conteos de leucocitos totales no variaron entre tratamientos o sexos (ANOVA de medidas repetidas; factor “dieta”: $F_{(4,72)} = 0,44$; $p = 0,78$, factor “sexo”: $F_{(2,36)} = 1,28$; $p = 0,29$). Los conteos de Δ eosinófilos y Δ basófilos no difirieron entre tratamientos o sexos (Tabla 4.1).

Parámetros nutricionales

Los niveles de glucosa en sangre de los animales en la dieta restringida fueron menores que los de aquellos animales en las otras dos dietas (Tabla 4.1), y las hembras presentaron mayores niveles que los machos ($glucosa_{machos} = 78,79 \pm 4,46$ mg/dl, $glucosa_{hembras} = 123,71 \pm 19,29$ mg/dl; Tabla 4.1). Los niveles de triglicéridos en sangre difirieron entre tratamientos (Tabla 4.1), siendo significativamente menores en la dieta restringida que en la *ad libitum* (Tabla 4.1; Fig. 4.4B). Además, las hembras mostraron mayores niveles de triglicéridos en sangre que los machos ($triglicéridos_{machos} = 0,86 \pm 0,12$ g/l; $triglicéridos_{hembras} = 1,4 \pm 0,24$ g/l; Tabla 4.1).

Condición general y estrés

El hematocrito no difirió entre tratamientos (Tabla 4.1). Los machos presentaron mayores hematocritos que las hembras ($hematocrito_{machos} = 47,72 \pm 0,99$; $hematocrito_{hembras} = 44,11 \pm 0,92$; Tabla 4.1).

La relación N: L se incrementó hacia el final del periodo experimental bajo la dieta restringida (ANOVA de medidas repetidas de dos vías; $F_{(4,37)} = 4,81$; $p = 0,01$; test de Tukey, $p < 0,001$; Tabla 4.1). Los niveles de cortisol no difirieron entre dietas (Tabla 4.1). Las hembras mostraron niveles

de cortisol significativamente mayores que los machos ($\text{cortisol}_{\text{machos}} = 10,71 \pm 6,88 \text{ ng/ml}$; $\text{cortisol}_{\text{hembras}} = 19,3 \pm 2,58 \text{ ng/ml}$; Tabla 4.1).

Cargas parasitarias

Los cambios en la liberación de huevos/ooquistes (número de huevos u ooquistes liberados después del tratamiento – número de huevos u ooquistes liberados al momento de la captura) no difirieron entre tratamientos o sexos (Tabla 4.1.).

Respuesta inflamatoria frente a PHA

La respuesta inflamatoria fue significativamente mayor en las patas inyectadas con PHA en comparación con las control, inyectadas con PBS (test de T de medidas repetidas; $t = 12,86$; $n = 43$, g.l. = 42; $p < 0,001$; inflamación_{PHA} = $0,46 \pm 0,22$; inflamación_{PBS} = $0,02 \pm 0,09$). La respuesta inflamatoria de los animales bajo la dieta restringida fue significativamente menor que la de aquellos individuos en las otras dos dietas (inflamación_{ad libitum} = $0,51 \pm 0,09$; inflamación_{restringida} = $0,28 \pm 0,05$; inflamación_{suplementada} = $0,59 \pm 0,04$; $F_{(2,37)} = 9,6$; $p < 0,001$; test de Tukey, los dos $p < 0,001$; Fig. 4.1). La magnitud de la inflamación no se correlacionó con el peso corporal al día 11 en ninguno de los 3 grupos (*ad libitum*: $r = -0,22$; $p = 0,45$; restringida: $r = -0,23$; $p = 0,44$; suplementada: $r = 0,11$; $p = 0,71$).

Proteínas totales, albúmina y globulinas

- Efecto de la dieta

Los niveles de albúmina y proteínas totales fueron significativamente menores en animales bajo la dieta reducida en comparación con los alimentados *ad libitum* (albúmina: ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “dieta”, $F_{(2,37)} = 4,06$; $p = 0,03$, test de Tukey, $p < 0,01$; proteínas totales: $F_{(2,37)} = 3,32$; $p = 0,047$; test de Tukey, $p < 0,01$). Las globulinas y la relación A/G no fueron afectadas por el tratamiento (globulinas: ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “dieta”, $F_{(2,37)} = 0,37$; $p = 0,70$; A/G: $F_{(2,37)} = 0,84$; $p = 0,44$). Las hembras mostraron menores A/G_{día 10} que los machos ($A/G_{10 \text{ machos}} = 1,19 \pm 0,05$; $A/G_{10 \text{ hembras}} = 1,50 \pm 0,12$; ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo*sexo”, $F_{(2,37)} = 6,45$, $p = 0,02$; Tukey test, $p = 0,03$).

- Efectos post- inyección de PHA

Los niveles de albúmina y A/G disminuyeron después del desafío con PHA (albúmina: ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo”, $F_{(1,37)} = 14,58$; $p < 0,001$, Fig. 4.4A; A/G: $F_{(1,37)} = 7,93$; $p < 0,01$, Fig. 4.4B), pero los niveles de proteínas totales y globulinas no se vieron afectados (proteínas totales: ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo”, $F_{(1,37)} = 3,71$, $p = 0,06$, Fig. 4.4C; globulinas: $F_{(1,37)} = 0,92$, $p = 0,34$, Fig. 4.4D). La albúmina y la relación A/G no correlacionaron con la magnitud de la respuesta inflamatoria a PHA (albúmina: $r = 0,28$, $p = 0,065$;

A/G: -0,10, $p = 0,54$). Además, se observaron diferencias en estos parámetros entre sexos: las proteínas totales decrecieron significativamente en machos luego del desafío (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo*sexo”, $F_{(1,37)} = 5,30$, $p = 0,03$; test de Tukey, $p < 0,01$), mientras que los niveles de globulinas se incrementaron en hembras y disminuyeron en machos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo*sexo”, $F_{(1,37)} = 7,62$, $p < 0,01$) y la relación A/G disminuyó en hembras hasta valores similares a los machos al día 12 (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “tiempo*sexo”, $F_{(1,37)} = 6,45$, $p = 0,02$; test de Tukey, $p = 0,01$).

Figure 4.3. Promedio de la inflamación local (\pm e.e.) de los tuco-tucos bajo las diferentes dietas (*ad libitum*, restringida y suplementada), 24 hs después de la inyección de PHA. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas.

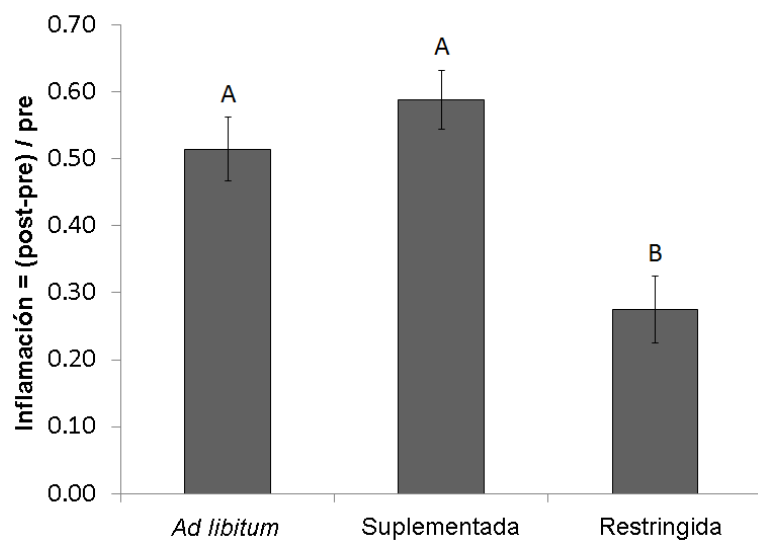


TABLA 4.1. Media o mediana (\pm e.e.) de los valores de parámetros inmunes, nutricionales, de condición general y estrés de los tuco-tucos bajo las distintas dietas (*ad libitum*, restringida, suplementada) y resultados de los tests de ANOVA, Kruskal-Wallis y Mann-Whitney utilizados para analizar las diferencias en estos parámetros entre grupos y sexos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, y las letras reportan valores estadísticamente distintos entre dietas según análisis post-hoc.

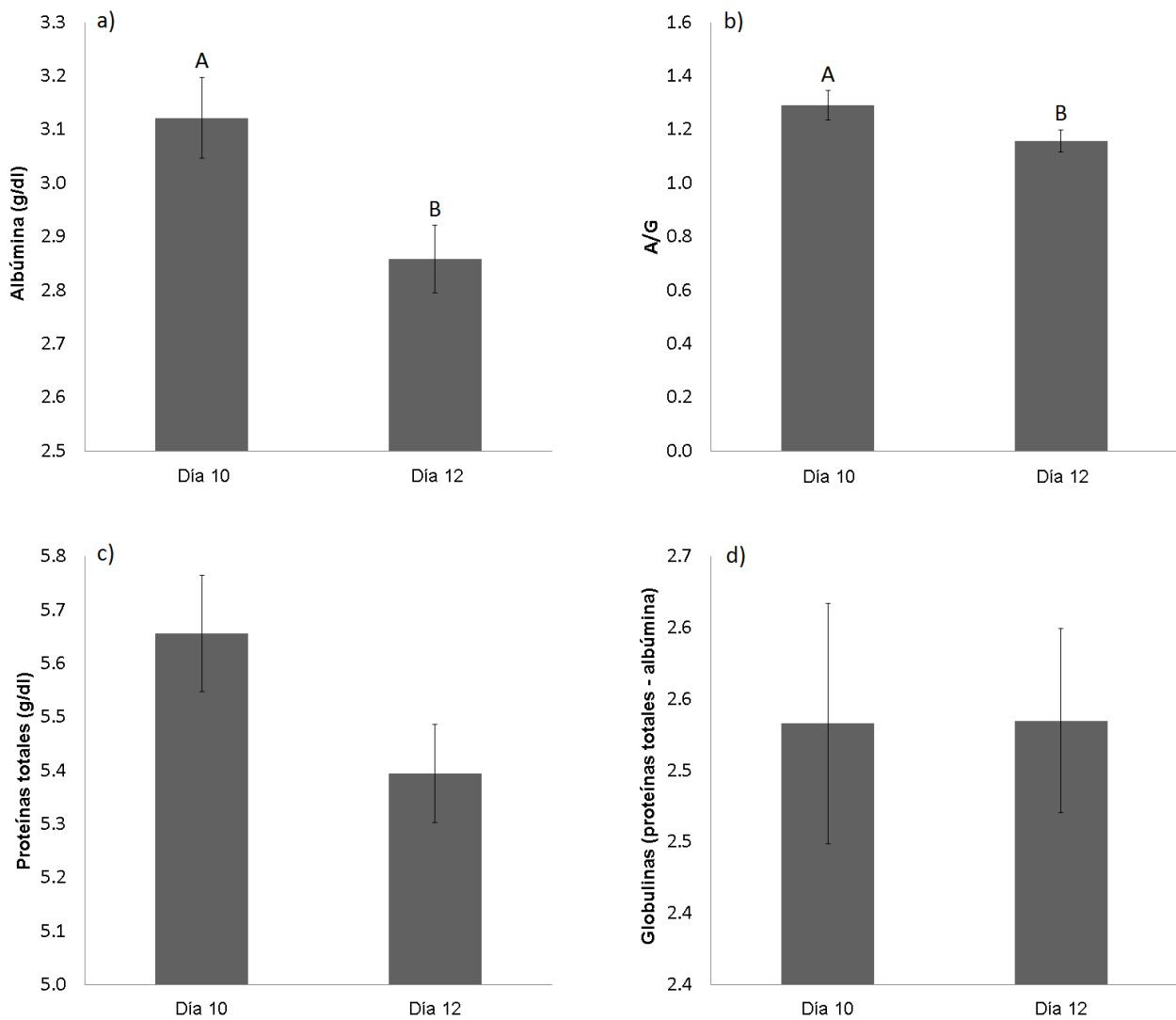
Parámetro	<i>Ad libitum</i>	Restringida	Suplementada	Factor “dieta”		Factor “sexo”	
				Estadístico	P	Estadístico	P
<i>Parámetros inmunes</i>							
TES	0,03 (\pm 0,004)	0,03 (\pm 0,006)	0,03 (\pm 0,008)	F=0,26	0,77	F=0,12	0,73
CBP (%)	1 (\pm 1)	2 (\pm 1)	3 (\pm 1)	F=0,48	0,63	F=4,5	0,04*
NAbs	10,25 (\pm 1,05)	12,07 (\pm 0,72)	11 (\pm 0,53)	F=0,38	0,69	F=0	1
Leucocitos totales /100.000 GR	34 (\pm 5,07)	37,71 (\pm 4,3)	35,6 (\pm 4,21)	F=0,03	0,98	F=2,3	0,13
Δ Eosinófilos ¹	-5 (\pm 2,08)	-11 (\pm 2,9)	-7 (\pm 2,30)	$\chi^2=4,36$	0,11	U=184,5	0,63
Δ Basófilos ¹	0 (\pm 2,33)	-1,5 (\pm 1,5)	-1 (\pm 2,85)	$\chi^2=0,62$	0,74	U=158	0,24
<i>Parámetros nutricionales</i>							
Glucosa (mg/dl)	92 (\pm 16,55) ^A	63,5 (\pm 2,78) ^B	101 (\pm 12,23) ^A	F=10,6	< 0,001*	F=11,18	0,002*
Triglicéridos (g/l)	1,02 (\pm 0,27) ^A	0,55 (\pm 0,12) ^B	0,93 (\pm 0,13) ^{AB}	F=4,38	0,02*	F=6,11	0,02*
<i>Condición general</i>							
Hematocrito	45,07 (\pm 1,17)	49,00 (\pm 1,39)	45,63 (\pm 1,27)	F=0,89	0,05	F=6,5	0,02*
<i>Estrés</i>							
Cortisol (ng/ml)	9,38 (\pm 2,57)	13,7 (\pm 2,29)	8,23 (\pm 2,01)	F=1,78	0,18	F=14,19	< 0,001*
N: L día 0	1,23 (\pm 0,23) ^A	0,76 (\pm 0,12) ^A	1,2 (\pm 0,22) ^A				
N: L día 10	1,48 (\pm 0,28) ^A	3,4 (\pm 0,99) ^B	1,46 (\pm 0,3) ^A	F=0,27 ^x	0,76	F=2,72 ^x	0,11

Parásitos

$\Delta Eimeria$ sp. ²	-27 (\pm 86,94)	24 (\pm 227,76)	-17 (\pm 36,95)	$\chi^2 = 5,04$	0,08	U=135	0,92
$\Delta P. uncinata$ sp. ²	-2 (\pm 9,21)	0 (\pm 6,26)	0 (\pm 6,5)	$\chi^2 = 0,24$	0,89	U=102	0,21
$\Delta T. pampeana$ sp. ²	0 (\pm 19,84)	0 (\pm 6,06)	0 (\pm 1,44)	$\chi^2 = 0,11$	0,95	U=110,5	0,34

TES: tasa de eritrosedimentación; CBP: capacidad bactericida del plasma; NAbs: Anticuerpos naturales; GR: glóbulos rojos. ¹ abundancias basadas en un total de 200 leucocitos examinados por individuo. Valores correspondientes a conteos al día 10 – conteos al día 0. ² Estadísticos correspondientes a un ANOVA de medidas repetidas (para valores de los días 0 y 10).

Figura 4.4. Promedios de niveles de albúmina (a), A/G (b), proteínas totales (c) y globulinas (d; d.e.) en muestras de sangre de tuco-tucos bajo las diferentes dietas (*ad libitum*, restringida y suplementada), al día 10 y día 12 de tratamiento. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los días de tratamiento.



DISCUSIÓN

Los individuos bajo restricción alimentaria presentaron menores niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas totales y albúmina en sangre, así como incrementados niveles de estrés (evidenciado por altos valores de N: L) que los individuos alimentados *ad libitum*. Esto indica que la restricción alimenticia, incluso durante un período corto de tiempo, tuvo un efecto significativo sobre los parámetros nutricionales y sobre la homeostasis general de los tuco-tucos. Por otra parte, la suplementación con metionina no produjo efectos significativos sobre los parámetros nutricionales.

Una marcada disminución en la magnitud de la respuesta inflamatoria contra PHA (~54 %) fue registrada en los animales bajo restricción alimenticia en comparación con aquellos alimentados *ad libitum*, lo que respalda nuestra hipótesis sobre el detrimento en la capacidad de desarrollar una respuesta inmune ante restricciones en la ingesta. Como resultado de esta restricción -la cual no sólo implicó una disminución en la ingesta energética total de los animales, sino también una menor incorporación de componentes particulares (como proteínas), macronutrientes (carbohidratos, lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) en comparación con los tuco-tucos alimentados *ad libitum*- los individuos mostraron una reducción de más del 10% en su peso corporal. Por lo tanto, el impacto negativo sobre la respuesta inflamatoria pudo haber sido producto de la restricción calórica, de una menor ingesta de componentes nutricionales particulares, o de ambos. Estudios previos también han mostrado un impacto negativo de la restricción alimenticia sobre la inmunidad: por ejemplo, gerbilidos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) ayunados por tres días montaron menores respuestas contra PHA que aquellos no ayunados (Xu y Wang, 2010), y una restricción en la ingesta diaria de proteínas (pero sin restricción calórica) tuvo un efecto negativo en la magnitud de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés) en ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*; Thomason et al., 2013). Además, se ha evidenciado que la deficiencia en micronutrientes influencia varios componentes de la inmunidad innata (Erickson et al., 2000). Por ejemplo, la síntesis o actividad de varias de las enzimas y reacciones que son esenciales para la función de los neutrófilos (un componente clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria contra PHA en *C. talarum*; Merlo et al., 2014) puede verse alterada por la deficiencia o la suplementación de micronutrientes, como vitaminas (Kaplan y Basford, 1976; Twining et al., 1997). La disminución en los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre verificada en los tuco-tucos bajo restricción alimentaria demuestra que éstos tuvieron menor disponibilidad y reserva de energía para enfrentar un desafío inmune que los animales alimentados *ad libitum*. Se sabe que, por ejemplo, una parte importante de la respuesta de células T a señales mitogénicas (como es el PHA) es el requerimiento de glucosa, y que los ácidos grasos son requeridos para la síntesis de la membrana de células T proliferativas (Fox et al., 2005). Así, parte del deterioro en la magnitud de la inflamación de los animales bajo dieta restringida podría ser consecuencia de la disminución en la disponibilidad de estas moléculas, además de la menor ingesta de calorías y micronutrientes.

Excepto por la respuesta inflamatoria a PHA, los parámetros inmunes estudiados aquí no variaron en respuesta a la restricción alimenticia, a pesar del amplio espectro de componentes inmunes analizados, incluyendo actividades del complemento (CBP), anticuerpos naturales y perfiles leucocitarios. Aunque la producción y mantenimiento de estos componentes requiere recursos (Fox et al., 2005), el desempeño de estos procesos no varió en relación a las deficiencias nutricionales, lo que podría demostrar que estos componentes del sistema inmune son menos sensibles a las variaciones en el estado nutricional en comparación con aquellos requeridos para un desafío inmune inducido, como es el test de PHA. Resultados similares fueron encontrados por Zysling et al. (2009) en hámsteres de Siberia (*Phodopus*

sungorus) en días de fotoperíodo corto; los animales bajo restricción alimenticia presentaron mayores niveles de actividad humoral contra la inyección subcutánea de KLH en comparación con sus contrapartes alimentadas *ad libitum*, pero no hubo diferencias en la CBP entre los dos grupos. En general, nuestros resultados contribuyen a la hipótesis de que los costos del mantenimiento de las defensas innatas constitutivas (ej. células fagocíticas, proteínas del complemento y antimicrobianas) y humorales (anticuerpos naturales) son bajos, mientras que la inducción de una respuesta inflamatoria local se asocia con un alto costo de uso (Lee, 2006). Aunque no se ha detectado que el desarrollo de la respuesta inflamatoria frente PHA esté asociado a un costo energético significativo para *C. talarum* (Capítulo 1), los resultados del presente estudio muestran que éste sí depende de recursos nutricionales, los que han sido propuestos como otra “moneda” que media los costos de la activación inmune (Hasselquist y Nilsson, 2012).

Los glucocorticoides son considerados marcadores de estrés, aumentando incluso bajo leves perturbaciones. El estrés asociado a la restricción alimenticia puede incrementar los niveles de glucocorticoides en los mamíferos (Murphy y Wideman, 1992). Se ha demostrado que los glucocorticoides, por otro lado, pueden alterar la función inmune, exacerbando o disminuyéndola en relación a la intensidad y duración del estresor (Martin, 2009; Schneiderman et al., 2005). Los niveles de cortisol, aunque levemente mayores en los tuco-tucos sometidos a restricción alimenticia, no difirieron estadísticamente entre las dietas experimentales. Sin embargo, individuos *C. talarum* bajo restricción alimenticia exhibieron mayores relaciones N: L que los individuos bajo las otras dos dietas, indicando que este tratamiento induce un estrés crónico sobre los animales, lo que es consistente con resultados previos obtenidos en esta especie (Schleich et al., 2015). Por otro lado, se han reportado incrementos en los glucocorticoides durante períodos cortos de restricción alimentaria (Zysling et al., 2009), por lo que no podemos asegurar si la ausencia de efecto del tratamiento sobre los niveles de cortisol se deba a que efectivamente la restricción de la dieta no impacta sobre los niveles de dicha molécula o si estos cambios se verifican en una ventana temporal diferente. Sin embargo, se detectó un mayor estrés en los individuos bajo la dieta reducida mediante los incrementos en los valores de N: L, el cual puede haber generado un efecto inmunosupresor sobre la respuesta inflamatoria contra PHA en este grupo.

Se esperaba que bajo restricción alimenticia la supervivencia o reproducción de parásitos intestinales fuera positivamente afectada, dado el detrimento en el estado nutricional del hospedador. Nuestros resultados no apoyan dicha predicción, dado que los cambios en la liberación de huevos/ooquistes entre el principio del experimento y el final no difirieron entre dietas. Se ha observado que la malnutrición en varias especies domésticas disminuye la resistencia contra nuevas infecciones parasitarias, pero no tiene influencia sobre los parásitos actuales, incluyendo su producción de huevos (Fekete y Kellems, 2007). Además, ha sido probado que la restricción alimenticia incrementa la infección por parte de coccidios en carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*), pero reduce la intensidad de infección de helmintos (Eberhardt et al., 2013), indicando que la relación entre nutrición e infección varía dependiendo

del tipo de parásito considerado. Por lo tanto, la hipótesis de un efecto negativo adicional sobre la condición de *C. talarum* bajo restricción alimenticia debido al incremento de las cargas endoparasitarias no se confirma según nuestros resultados, indicando que el detrimento en la condición general y la función inmune (deficiencias nutricionales, mayor estrés y reducida respuesta inflamatoria) fue consecuencia directa de la limitación en la alimentación.

Por otro lado, la suplementación con metionina no mejoró la respuesta inmune a PHA en *C. talarum*, lo que contradice lo reportado por estudios realizados en aves de cría (Abdukalykova y Ruiz-Feria, 2006; Soler et al., 2002; Swain y Johri, 2000). Sin embargo, es importante notar que estos estudios previos fueron realizados en pollos en etapa de crecimiento (Abdukalykova y Ruiz-Feria, 2006; Soler et al., 2002; Tsiagbe et al., 1987), y así, el suministro extra de aminoácidos durante este período –donde el sistema inmune se está desarrollando- podría haber tenido mayores efectos sobre la capacidad de respuesta inmune de los animales que si el estudio fuera realizado en individuos adultos. Así, estudios adicionales en animales adultos serán importantes para la determinación del efecto de aminoácidos particulares en la promoción de las respuestas inmunes. En particular para *C. talarum*, mayores períodos de experimentación y suplementos con diferentes aminoácidos podrían proveer una valiosa información adicional respecto a esto. Por otra parte, los otros parámetros inmunes, nutricionales y de condición analizados no fueron afectados por la dieta suplementada. Aunque se ha reportado para otras especies el incremento de proteínas totales, albúmina o globulinas con el incremento del contenido proteico de la dieta (vacas: Hoffman et al., 2001; avestruces: Polat et al., 2004), aquí, la suplementación con metionina no produjo efectos significativos sobre estos parámetros. Con respecto a esto, es importante notar que las vacas y avestruces fueron sometidas a dietas experimentales por mayores períodos de tiempo – meses- que los utilizados aquí. Además, fue reportado que los cambios en las proteínas plasmáticas debido a influencias nutricionales son sutiles y difíciles de detectar (Kaneko et al., 2008). También es importante considerar que los tuco-tucos realizan coprofagia (Martino et al., 2007), de manera que este comportamiento particular, que permite obtener proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas extra y favorecer la digestión mediante fermentación en el ciego (Barnes, 2009; Takahashi y Sakaguchi, 1998), puede enmascarar los efectos de los tratamientos con dietas suplementadas, dado que ellos mismos tienen la capacidad de regular la obtención de determinados micronutrientes a través de este mecanismo. Una alternativa para continuar con esta evaluación comprendería restringir el comportamiento de coprofagia a la vez de proveer una suplementación proteica.

Los niveles de albúmina y A/G de los tuco-tucos disminuyeron del día 10 al 12, teniendo en cuenta los animales en los tres grupos juntos. Entre los días 10 y 12 dos principales eventos les ocurrieron a los individuos: una extracción de ~500 μ l y el desafío inmune con PHA (Fig. 4.1). Si la extracción de sangre en sí misma contribuyera a disminuir los niveles de albúmina y A/G, sería de esperarse una variación similar en todos los componentes sanguíneos; pero no se detectaron cambios significativos en las

globulinas o las proteínas totales. Por lo tanto, la reducción en los niveles de albúmina y la consecuente disminución en la relación A/G podría considerarse consecuencia de la respuesta inflamatoria inducida por PHA.

En general, nuestros resultados apoyan la idea de que la calidad y cantidad de alimento pueden modular la capacidad individual de responder a un nuevo desafío inmune. Esta modulación puede ocurrir por un efecto directo de los nutrientes esenciales requeridos para la actividad de los componentes inmunes (ej. células T) y/o por la pérdida de energía y reservas energéticas, o por los efectos indirectos del estrés producido por la limitante de nutrientes. Sin embargo, el sistema inmune está compuesto por una amplia variedad de células, órganos y compuestos humorales, por lo que la modulación de un compartimento no necesariamente afectará los otros. El presente estudio suma información sobre la estrategia inmune de *C. talarum*. La respuesta desencadenada por PHA no es energéticamente costosa para esta especie (Capítulo 1), pero involucraría un costo nutricional que comprometería el desarrollo de la misma bajo condiciones sub-óptimas de disponibilidad de alimento. Por otra parte, la respuesta de anticuerpos contra SRBC, energéticamente costosa (Cutrera et al., 2010), no muestra variación en su magnitud entre tratamientos de restricción leve vs. severa (Schleich et al., 2015). Esto podría sugerir que los procesos altamente demandantes de energía no necesariamente están más comprometidos durante períodos de deficiencias nutricionales que los procesos asociados con costos energéticos menores. En *C. talarum*, la respuesta a PHA, cuyo costo energético no es significativo (Capítulo 1), además de ser afectada por la condición nutricional, esta también comprometida por el parasitismo, siendo ésta de mayor magnitud en animales libres de parásitos que en aquellos natural o artificialmente infectados (Capítulo 3). Por lo tanto, esta respuesta inflamatoria parece ser flexible en relación a factores intrínsecos (ej. infecciones simultáneas) o extrínsecos (ej. disponibilidad de alimento) en los tuco-tucos, posiblemente como una estrategia que permitiría disminuir alguna de las demandas de recursos durante tiempos estresantes. La modulación de esta respuesta podría ser posible dado el amplio espectro de células y cambios fisiológicos involucrados en el proceso inflamatorio, en comparación con las vías más específicas activadas durante el inicio de una respuesta de anticuerpos. Posteriores estudios (Capítulo 5) sobre los compromisos durante la activación simultánea de la respuesta a PHA (inflamación) y SRBC (anticuerpos) proveerá información adicional sobre este tema.

Los resultados del presente estudio resaltan que los cambios en la composición y disponibilidad vegetal pueden comprometer la adquisición de nutrientes requeridos para cumplir con todas las funciones fisiológicas, resultando en la alteración de la capacidad de respuesta inmune de los individuos. Esto es particularmente importante para una especie como *C. talarum*, que habita un ambiente que varía estacionalmente en cuanto a la disponibilidad y calidad de la vegetación (Fanjul et al., 2006), la que constituye su recurso alimentario. Además, el ambiente donde habita la población estudiada aquí se encuentra altamente impactado por la creciente actividad del hombre, que también compromete la disponibilidad de los recursos alimentarios de esta especie. Si bien los tuco-tucos son generalistas y

oportunistas, lo que representa una ventaja de ajuste a los cambios en la composición vegetal, si estos ajustes no fueran suficientes en relación a los cambios en la vegetación, la defensa inmune de esta especie podría verse comprometida.

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DE COMPROMISOS FRENTE A DESAFÍOS SIMULTÁNEOS:
RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA VS. HUMORAL

CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN DE COMPROMISOS FRENTE A DESAFÍOS SIMULTÁNEOS: RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA VS. HUMORAL

INTRODUCCIÓN

Los compromisos entre el desarrollo de una respuesta inmune y otros procesos fisiológicos costosos para el individuo, como son la reproducción o el crecimiento, han sido estudiados en numerosas especies. Sin embargo, la modulación de una respuesta inmune debida a compromisos dentro del mismo sistema inmune ha recibido, notablemente, menor atención. Esta observación cobra importancia al considerar que la situación donde dos o más agentes infecciosos coexisten en el mismo hospedador es la regla, más que la excepción, en la naturaleza (Cox, 2001). Las interacciones entre múltiples patógenos entre sí y con el hospedador son complejas y difíciles de abordar, por lo que el esfuerzo invertido en el estudio de los compromisos y factores involucrados durante el desarrollo de múltiples respuestas inmunes resulta clave para el entendimiento de las defensas inmunes en su contexto natural, el cual implica la multiplicidad de desafíos, y así, de la resistencia a patógenos y transmisión de enfermedades.

A partir de los –pocos- estudios disponibles donde se abordan las interacciones entre diversos parásitos y el hospedador, se sabe que el riesgo de contraer una infección puede verse incrementado o disminuido por la presencia de un patógeno previo (Kamal y Khalifa, 2006; Telfer et al., 2010). Los mecanismos que mediarían este antagonismo o sinergismo en la co-infección serían la interacción entre componentes inmunes que intervienen en la respuesta a los patógenos involucrados (ej.: polarización del perfil inmunológico hacia Th1 o Th2, reactividad cruzada del sistema inmune; Behnke, 2008) o la competencia por recursos comunes (ej.: helmintos que generan anemia reducen la infección por parte de hemoparásitos, lo que se considera producto de la reducción en la disponibilidad de eritrocitos; Telfer et al., 2010). Por otra parte, se considera que la magnitud del desarrollo de los distintos tipos de defensa (defensa innata vs. adaptativa, principalmente) está asociado también a las características de historia de vida de la especie o población. Lee (2006) ha propuesto que las especies de “vida lenta” -aquellas con períodos de desarrollo largos, gran inversión en la descendencia y vidas longevas- presentan mayor desarrollo del componente adaptativo de la defensa inmune, el cual requiere mayor tiempo y recursos para su actividad que la defensa innata, pero es efectivo frente a infecciones repetidas -lo cual es más probable que ocurra a lo largo de su vida. Como contrapartida, las especies de “vida rápida” -aquellas

con tiempos generacionales cortos, usualmente con descendencia numerosa y sin cuidado parental-invierten más en la defensa innata, la cual es activada de manera rápida ante una herida o infección. Existen datos empíricos que apoyan esta teoría, como es el caso de los gorriones *Passer domesticus*: los individuos de una población de “vida lenta” desarrollan una respuesta secundaria de anticuerpos más rápidamente e invierten más energía en ella que los individuos de una población de “vida rápida” (Martin et al., 2006a). Similarmente, se ha comparado la magnitud de la respuesta innata (CBP) y adaptativa (respuesta de anticuerpos contra LPS) de ratones *Peromyscus leucopus* (de característica vida “rápida”), tamiás *Tamias striatus* (con un “ritmo de vida” intermedio) y ardillas *Sciurus carolinensis* (vida “lenta”), encontrándose que los ratones presentaron los mayores niveles de inmunidad innata, *T. striatus* valores intermedios y *S. carolinensis*, los niveles más bajos, y que la inmunidad adaptativa presentó el patrón inverso (Previtali et al., 2012). Sin embargo, otras evidencias no pueden ser explicadas tan claramente de acuerdo a los patrones propuestos por Lee (2006). Por ejemplo, en el estudio mencionado anteriormente en *P. domesticus*, se encontró también que otras medidas inmunes (anticuerpos naturales, actividad del complemento) no varían entre poblaciones, e incluso que otro componente de la inmunidad adaptativa, la respuesta mediada por células ante una segunda exposición a DNFB (respuesta de “hipersensibilidad”; Martin et al., 2006b), fue de mayor magnitud en la población de “vida rápida”. Otro estudio, realizado con 6 especies de ratones *Peromyscus* con diferentes ritmos de vida, también reveló que las magnitudes de la defensa innata (CBP y cicatrización) y humoral (respuesta de anticuerpos contra KLH y mediada por células contra DNFB) no se correspondieron a lo esperado según la teoría de las historias de vida (Martin et al., 2007b). A su vez, estudios realizados en aves (que representan la mayoría en este tema) no muestran patrones claros en la interacción entre distintos componentes de la defensa: por ejemplo, la correlación entre una respuesta humoral y una mediada por células se ha reportado que puede ser tanto negativa (Buchanan et al., 2003), como positiva (Møller et al., 2001). En cuanto al compromiso entre desafíos inmunes simultáneos en roedores, Martin et al. (2006b) encontraron que una herida superficial afecta negativamente el desarrollo de una respuesta mediada por células, y, a su vez, que la inducción de la respuesta mediada por células empeora la cicatrización de una herida en hembras de *Peromyscus leucopus*. Sin embargo, la falta de información sobre otros desafíos inmunes dificulta el entendimiento de los compromisos entre los propios componentes del sistema inmune en roedores, y mamíferos en general. Además, se requieren estudios adicionales, sobre todo en mamíferos de “vida lenta”, a fin de verificar la propuesta de Lee en otras especies.

El presente estudio fue diseñado para evaluar el compromiso entre la respuesta principalmente inflamatoria desencadenada por PHA y el desarrollo de una respuesta humoral, estimulada en este caso por SRBC, en individuos adultos de ambos sexos de la especie *C. talarum*. SRBC es un antígeno no patogénico, que desencadena la producción de anticuerpos específicos por los linfocitos B, involucrando también el accionar de linfocitos T y células presentadoras de antígenos, además de productos celulares

(ej.: citoquinas). En *C. talarum*, se ha reportado que el desafío con SRBC induce una respuesta de anticuerpos detectable, pero que no afecta los niveles de estrés o leucocitos circulantes a nivel sistémico (Cutrera et al., 2010; Schleich et al., 2015). Además de determinar la magnitud del desarrollo de cada respuesta inducida individualmente o en simultáneo con la otra, se calcularon las tasas metabólicas de reposo (TMR) en estas condiciones, para determinar si la asignación energética a cada respuesta varía en comparación con el desafío simultáneo. A su vez, se determinaron los valores de varios parámetros indicadores de la condición de los individuos (peso, hematocrito, glucosa en sangre, indicadores de estrés e infección y parámetros inmunológicos), antes y después de los desafíos inmunes, para detectar potenciales efectos indirectos o adicionales del tratamiento sobre la fisiología de los mismos.

Como se explicó anteriormente, *C. talarum* es considerado un roedor de “vida lenta” dado que las hembras tienen períodos de gestación largos (95 días; Zenuto et al., 2001), dan a luz crías altriciales sólo dos veces por año (Zenuto et al., 2002b), viven alrededor de dos años y presentan madurez sexual tardía (Busch et al., 1989). A su vez, los tuco-tucos están expuestos a una alta prevalencia de infecciones parasitarias (Rossin y Malizia, 2002), entre las que se han descrito ocasionadas por nematodos, cestodes, protozoos (Cutrera et al., 2011; Rossin et al., 2006a; Rossin et al., 2006b; Rossin et al., 2010a; Rossin et al., 2010b) y ectoparásitos que involucran piojos, pulgas y ácaros (Cutrera et al., 2011; Martino et al., 2014). En base a la teoría de historia de vida (Lee, 2006) y a éstas características de la exposición a patógenos que presentan, se espera que los tuco-tucos desarrollen en mayor medida el componente adaptativo de su sistema inmune en relación a la respuesta inflamatoria. Si bien la defensa adaptativa conlleva un mayor costo de desarrollo, les confiere memoria inmunológica, la cual resulta útil debido a la alta probabilidad que presentan de encontrarse con el mismo patógeno repetidas veces durante sus –relativamente largas- vidas. Así, según esta teoría, en el presente estudio la magnitud de la respuesta adaptativa humoral (estimada mediante la titulación de anticuerpos) contra SRBC no se debería ver afectada por la respuesta inflamatoria a PHA, que en esta especie se caracteriza por estar mediada principalmente por componentes innatos (neutrófilos; Merlo et al., 2014), pero sí la magnitud de ésta última se vería negativamente afectada por el desafío con SRBC. Sin embargo, dado que la respuesta a PHA no es energéticamente costosa (Capítulo 1), se plantea la hipótesis de que ésta no se verá afectada por el desarrollo de la respuesta humoral (y viceversa). Además, por el mismo motivo tampoco se esperan diferencias en la inversión energética de las respuestas inducidas individualmente en relación a la inducción simultánea. Se espera que la condición general de los individuos (estimada mediante diversos parámetros) no sean afectados por el tratamiento, dado que los dos antígenos utilizados son no-patogénicos y que la condición de alimentación es *ad libitum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

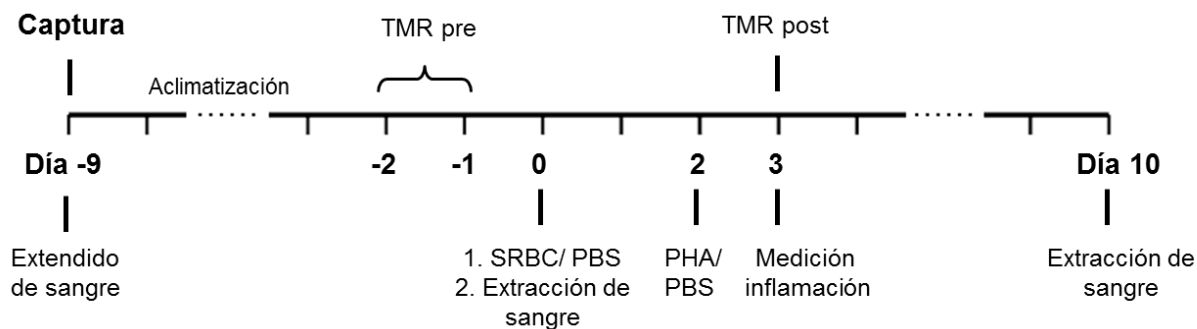
Captura de los animales y mantenimiento en cautiverio

Se capturaron 49 individuos, 27 machos ($159 \pm 31,01$ g) y 22 hembras ($124,9 \pm 23,62$ g) cerca de la localidad de Mar Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina ($37^{\circ}27'52''\text{S}$ $57^{\circ}06'51''\text{O}$) en la estaciones reproductivas (septiembre a diciembre) de 2015 y 2016. Inmediatamente luego de la captura se realizó un extendido de sangre obtenida de cada individuo realizando una pequeña incisión en la punta de la cola (Vera et al., 2008); los extendidos fueron fijados con metanol al 70% durante 10 min, y se conservaron hasta futuros análisis (ver sección “Perfil leucocitario”). Los animales capturados fueron transportados al laboratorio, pesados y ubicados en cajas plásticas individuales. Las condiciones del bioterio y dieta utilizadas fueron iguales a lo detallado en el Capítulo 1.

Grupos experimentales y desafío con PHA

Luego de una semana de aclimatación a las condiciones de cautiverio (días -9 a -2; Fig. 5.1), los individuos de cada sexo fueron aleatoriamente asignados entre los siguientes grupos: *Control* (desafío 1 = PBS, desafío 2 = PBS; n = 12), *PHA* (desafío 1 = PBS, desafío 2 = PHA; n = 11), *SRBC* (desafío 1 = SRBC, desafío 2 = PBS; n = 12), *Doble* (desafío 1 = SRBC, desafío 2 = PHA; n = 14). Al día -2 o -1 se midió la TMR utilizando la misma metodología descrita anteriormente (Capítulo 1), para obtener los valores de metabolismo previos al desafío inmune. Al día 0 se tomó una muestra de sangre (~ 500 μl) del seno retro-orbital para posteriores determinaciones (ver “Determinaciones en sangre” abajo). Luego de esto, se inyectó SRBC intraperitonealmente (solución 15% disuelta en PBS, 1,5 $\mu\text{l/g}$ peso corporal; grupos *SRBC* y *Doble*) o PBS (1,5 $\mu\text{l/g}$ peso corporal; grupos *Control* y *PHA*). Se esperó 2 días y se inyectó subcutáneamente PHA (grupos *PHA* y *Doble*) o PBS (grupos *Control* y *SRBC*), de manera de que éste segundo desafío ocurriera en simultáneo con el primero, cuyo desarrollo requiere varios días (Cutrera et al., 2010). Al día siguiente (24 hs post-inyección) se determinó la inflamación desencadenada (ver Fig. 5.1) siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1. Antes de esto último, a las 12 hs post-inyección, se midió nuevamente la TMR de todos los individuos (día 3). La respuesta de anticuerpos contra SRBC es detectable ya a los 7 días, y a los 4 y 10 días se ha verificado que genera un incremento en la TMR (Cutrera et al., 2010), de manera que la respuesta a PHA inducida en el grupo *Doble* se desarrollaría en simultáneo con ésta. Finalmente, al día 10 se tomó nuevamente una muestra de sangre (~ 500 μl) del seno retro-orbital para posteriores determinaciones (ver “Determinaciones en sangre”), entre las que se encontró la determinación del título de anticuerpos contra SRBC, se los pesó y se realizó un extendido de sangre para la determinación del perfil leucocitario en este punto del ensayo (ver abajo).

Fig. 5.1. Esquema del protocolo experimental.



Perfil leucocitario

Los extendidos realizados el día de la captura (día -9) y al día 10 fueron teñidos y analizados de la misma manera descrita en el Capítulo 2.

Determinaciones en sangre

A partir de las muestras colectadas el día 0 y el día 10 se analizaron los siguientes parámetros:

1. Tasa de eritrosedimentación (TES). Para obtener esta medida indicadora del nivel de infección, se siguió la metodología descrita en el Capítulo 3.
2. Hematocrito. Después de la determinación de la TES, se analizó el hematocrito para cada individuo, como se describe en el Capítulo 2, como un indicador del estado general de salud.
3. Capacidad bactericida del plasma (CBP). Se determinó como se describe en el Capítulo 3, sólo para las muestras del día 10.
4. Ensayo de hemólisis-hemoaglutinación. Se realizó este ensayo de acuerdo a lo descrito anteriormente (Capítulo 2), sólo para muestras del día 10. Se utilizaron para el análisis sólo los valores de anticuerpos naturales, dados los bajos o nulos registros en la actividad lítica reportados anteriormente (Capítulo 3).
5. Glucosa. El nivel de glucosa en sangre entera colectada de cada individuo fue determinado usando un glucómetro (Accu-Chek, Active®, Basilea, Suiza).
6. Cortisol. Se determinó la concentración en sangre de esta hormona, que responde al estrés en *C. talarum* (Vera et al., 2011), como se describe en el capítulo 3.
7. Relación N: L. A partir de los conteos de neutrófilos y linfocitos del perfil leucocitario realizado para cada individuo (ver "Perfil leucocitario"), se determinó la razón N: L, informativa del estado de estrés de los individuos.
8. Albúmina. En respuesta a la inflamación, la concentración de albúmina sérica disminuye notablemente (Gitlin y Colten, 1987; González Naranjo y Molina Restrepo, 2010). Los niveles de esta proteína en sangre se determinaron según lo descrito en el Capítulo 4, para

evidenciar posibles compromisos entre ambas respuestas mediados por componentes inflamatorios.

9. Títulos de anticuerpos contra SRBC. Con las muestras obtenidas al día 0 se corroboró que los animales efectivamente no presentaran anticuerpos previos contra SRBC. Con las muestras obtenidas al día 10 se determinó el nivel de anticuerpos contra SRBC desencadenado por el tratamiento. Así, la producción de anticuerpos se analizó mediante un ensayo de hemoaglutinación en placas de 96 pocillos (Corning Star, Corning, NY, USA). Luego de la colecta de sangre, la fracción del plasma (obtenida por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min) destinada a este ensayo se conservó a -20°C hasta ser utilizada. El plasma se calentó a 56°C durante 30 min para desnaturalizar las proteínas del complemento. 20 μl del plasma se adicionaron a 20 μl de PBS en el primer pocillo del plato; se realizaron diluciones seriales en PBS (1:2–1:256), siguiendo con la adición de 20 μl de una suspensión al 1% de SRBC a cada pocillo. Las placas fueron suavemente agitadas durante 1 minuto e incubadas a 37°C durante 1 hs. Después de esto, las placas se mantuvieron a 4°C durante 2 hs y luego se realizó la observación macroscópica de la aglutinación. Con propósitos comparativos, los títulos de anticuerpos fueron expresados como el logaritmo negativo ($-\log_2$) de la concentración de plasma más baja que contuvo suficientes anticuerpos como para aglutinar el antígeno SRBC.

Análisis estadísticos

Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, USA), utilizando un valor $\alpha < 0,05$ para rechazar las hipótesis nulas. La distribución normal de las variables fue puesta a prueba con análisis de Kolmogorov–Smirnov, mientras que la homogeneidad de la varianza se verificó mediante tests de Levene. Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tratamiento (diferentes desafíos inmunes) y el sexo sobre la respuesta inflamatoria. Se realizaron ANOVAs de dos vías de medidas repetidas para analizar el efecto del tratamiento (en interacción con el tiempo) y el sexo sobre los parámetros medidos a dos diferentes tiempos (campo y 10 ó día 0 y día 10). Se usaron tests de Tukey para analizar las diferencias post hoc entre grupos. Los valores de inflamación, TES, cortisol y glucosa (al día 0 y 10) fueron transformados logarítmicamente para normalizarlos. Los valores de NAbs se transformaron con la función box-cox ($\theta = 0,99$). Los conteos de eosinófilos, basófilos y monocitos no pudieron ser normalizados; así, se calculó el cambio (Δ ; valor del conteo al día 10 – valor del conteo al día 0) para cada parámetro y se analizaron las diferencias entre los tratamientos mediante tests de Kruskal-Wallis, y las diferencias entre sexos mediante tests de Mann-Whitney. La CBP y los títulos de anticuerpos anti-SRBC tampoco pudieron ser normalizados; el efecto del

tratamiento se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y el efecto del sexo mediante un test de Mann-Whitney. Se usaron comparaciones múltiples para evaluar las diferencias post hoc en estos parámetros. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la TMR (tomada antes y después de los desafíos inmunes y sus controles), se utilizó un ANCOVA de medidas repetidas, con el peso corporal de cada día de medición como covariable. Se utilizó una correlación de Pearson para evaluar la relación entre la TMR al día 3 y la magnitud de la inflamación en los individuos inyectados con PHA, y una correlación de Spearman para evaluar la relación de la TMR con el título de anticuerpos anti-SRBC en individuos inyectados con SRBC. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (e.e.), excepto para las variables no normalizadas, cuyos resultados se expresan como mediana (25vo. percentil; 75vo. percentil).

RESULTADOS

Respuestas a PHA y SRBC

La respuesta inflamatoria de los animales inyectados con PHA (grupos PHA y Doble) fue significativamente mayor que la de aquellos inyectados con PBS (grupos Control y SRBC; Inflamación_{PHA} = 0,61 \pm 0,11, Inflamación_{Doble} = 0,76 \pm 0,12, Inflamación_{Control} = 0,06 \pm 0,03, Inflamación_{SRBC} = 0,1 \pm 0,09; ANOVA de dos vías, factor "tratamiento", $F_{(3,45)} = 18,11$; $p < 0,0001$; test de Tukey, $p < 0,001$; Fig. 5.2A). Sin embargo, no hubo diferencias en la magnitud de la respuesta inflamatoria entre los individuos desafiados con PHA y los inyectados con ambos desafíos inmunes (SRBC + PHA; test de Tukey, $p = 0,8$; Fig. 5.2A). No hubo efecto del sexo sobre esta respuesta (ANOVA de dos vías, $F_{(1,45)} = 0,52$; $p = 0,47$).

Los títulos de anticuerpos contra SRBC difirieron entre tratamientos ($\chi^2 = 21,88$; $p < 0,001$; Fig. 5.2B), siendo mayores en los grupos inmunodesafiados con SRBC (Mediana_{SRBC} = 2 (0; 3), Mediana_{Doble} = 2 (0; 3)) que en los inyectados con PBS (Mediana_{Control} = 0 (0;0); Mediana_{PHA} = 0 (0;0); test de múltiples comparaciones: $p < 0,05$), pero no hubo diferencias entre los títulos encontrados en el grupo SRBC vs. Doble (test de múltiples comparaciones; $p = 1,59$; Fig. 5.2B).

No hubo una correlación significativa entre las magnitudes de ambas respuestas (inflamación y títulos de anticuerpos) en los individuos del grupo Doble (correlación de Spearman: $R = 0,26$; $p > 0,05$).

TMR

Si bien la TMR en individuos de los grupos SRBC y Doble tendió a ser mayor que el de los pertenecientes a los grupos Control y PHA (Tabla 5.1), estas diferencias no fueron

estadísticamente significativas (ANCOVA de medidas repetidas, factor “tiempo*tratamiento”, $F_{(3,34)} = 0,47$, $p = 0,71$).

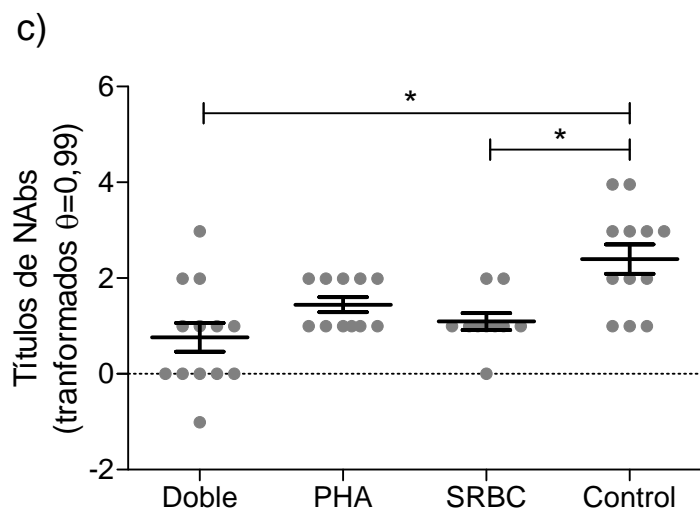
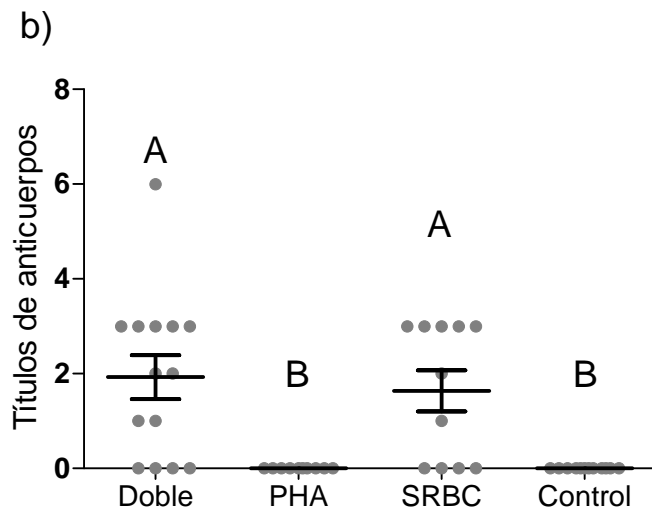
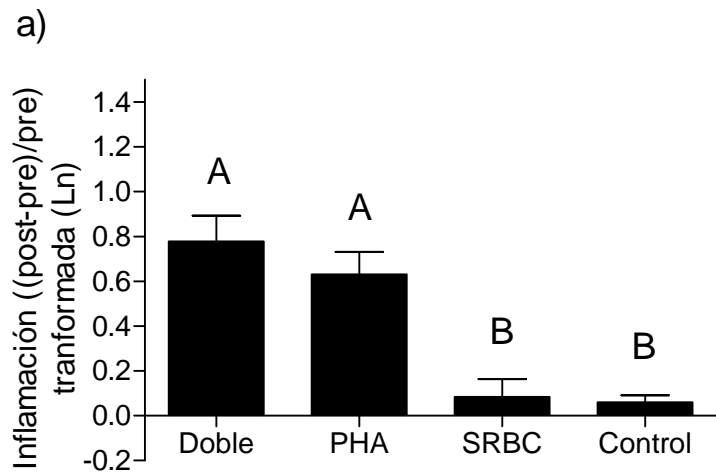
Parámetros fisiológicos

El conteo de neutrófilos, linfocitos y N: L difirieron entre tratamientos (Tabla 5.2): los individuos que recibieron el desafío doble y los pertenecientes al grupo control incrementaron significativamente sus niveles de neutrófilos hacia el día 10 (tests de Tukey, factor “tiempo*tratamiento”: $p = 0,002$, $p = 0,03$, respectivamente) y los individuos control incrementaron la razón N: L (test de Tukey, factor “tiempo*tratamiento”: $p = 0,01$), mientras que no hubo diferencias significativas entre grupos en el test post-hoc para los conteos de linfocitos (test de Tukey, todos los $p > 0,05$). Los conteos de eosinófilos fueron mayores en el grupo *Doble* en comparación con *PHA* (Tabla 5.3; test de múltiples comparaciones; $p < 0,05$). El hematocrito en machos fue significativamente mayor que en hembras ($\text{Hematocrito}_{\text{machos-0}} = 45,06 \pm 0,68$, $\text{Hematocrito}_{\text{hembras-0}} = 42,12 \pm 1,05$, $\text{Hematocrito}_{\text{machos-10}} = 46,46 \pm 0,91$; $\text{Hematocrito}_{\text{hembras-10}} = 43,38 \pm 0,75$; ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “sexo”, $F_{(1,45)} = 12,3$; $p = 0,001$), pero no hubo efecto del tratamiento (Tabla 5.2). Los niveles de cortisol en hembras fueron mayores que en machos ($\text{Cortisol}_{\text{machos-0}} = 14,32 \pm 1,84$, $\text{Cortisol}_{\text{hembras-0}} = 41,41 \pm 6,9$, $\text{Cortisol}_{\text{machos-10}} = 14,63 \pm 2,95$; $\text{Cortisol}_{\text{hembras-10}} = 47,32 \pm 10,03$; ANOVA de dos vías de medidas repetidas, factor “sexo”, $F_{(1,45)} = 14,3$; $p < 0,001$). Los niveles de NAbS (medidos sólo al día 10) se vieron afectados por el tratamiento (ANOVA de dos vías, $F_{(1,39)} = 7,39$; $p < 0,001$), siendo mayores en el grupo Control ($\text{NAbS}_{\text{Control}} = 3,42 \pm 0,31$) que en el desafiado con SRBC ($\text{NAbS}_{\text{SRBC}} = 2,7 \pm 0,62$; test de Tukey, $p < 0,001$) o Doble ($\text{NAbS}_{\text{Doble}} = 1,67 \pm 0,31$; ; test de Tukey, $p < 0,01$), mientras que los valores del grupo PHA no difirieron de los otros 3 grupos ($\text{NAbS}_{\text{PHA}} = 2,4 \pm 0,16$; test de Tukey, todos los $p > 0,05$; Fig. 5.2C). El resto de los parámetros medidos no se vió afectado por el tratamiento (Tablas 5.2 y 5.3).

TABLA 5.1. Promedio (\pm e.e.) de la TMR ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1}$) de los tuco-tucos de los diferentes grupos, medida al día -2 o -1 y al día 3.

Día	Control	PHA	SRBC	Doble
-2 o -1	0,98 (0,08)	1 (0,03)	0,97 (0,04)	0,94 (0,04)
3	1,02 (0,03)	1,03 (0,05)	1,13 (0,05)	1,10 (0,06)

Fig. 5.2. Promedio (\pm e.e.) de la inflamación local 24 hs después de la inyección de PHA/PBS (a), de los títulos de anticuerpos 10 días después de la inyección con SRBC/PBS (b) y de títulos de NAbs al día 10 (c) de los tuco-tucos de los diferentes grupos. Las letras y asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



Doble: PHA + SRBC; Control: PBS + PBS.

TABLA 5.2. Promedio (\pm e.e.) de los valores de los parámetros fisiológicos de los tuco-tucos bajo distintos desafíos inmunes (control SRBC, PHA y doble desafío), al momento de la captura y día 10, ó día 0 y día 10 (según corresponda; ver texto), y resultados de los tests de ANOVA de dos vías de medidas repetidas utilizados para analizar las diferencias en estos parámetros en el tiempo, entre grupos y sexos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Control		SRBC		PHA		Doble		F (Factor "tiempo*trat")	P
	Campo/día 0	Día 10	Campo/día 0	Día 10	Campo/día 0	Día 10	Campo/día 0	Día 10		
Peso (g)	136,1 (9,7)	139,4 (9,8)	133,3 (6,2)	142,2 (7,6)	144,1 (7,7)	150,2 (6,2)	147,6 (10,1)	150,9 (9,5)	0,28	0,84
Hematocrito (%)	42,2 (1,6)	46,4 (1,2)	46,2 (1)	45,6 (1,1)	44,5 (1,4)	45 (1,7)	42,5 (0,7)	43,7 (0,9)	2,77	0,05
Glucosa (mg/dl)	103,6 (25,5)	75,3 (8,7)	89,3 (15,8)	108,2 (24,6)	76,7 (7,4)	96,5 (25,6)	97,9 (14,1)	76 (8)	1,35	0,27
Cortisol	21,02 (4,71)	26 (9,6)	18,87 (5,64)	10,70 (2,18)	43,70 (10,05)	57,03 (15,92)	26,25 (8,36)	29,34 (9,73)	0,47	0,71
N: L ⁵	1,1 (0,3)	2,5 (0,8)	1 (0,2)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	1,5 (0,3)	0,8 (0,1)	1,7 (0,3)	3,29	0,03*
TES ³	0,03 (0,007)	0,05 (0,01)	0,01 (0,003)	0,05 (0,001)	0,02 (0,007)	0,03 (0,007)	0,02 (0,007)	0,04 (0,007)	0,63	0,6
Albúmina (g/dl)	2,5 (0,2)	2,9 (0,3)	2,3 (0,1)	2,3 (0,1)	2,3 (0,1)	2,2 (0,2)	2,4 (0,1)	2,3 (0,1)	1	0,4
Leucocitos totales ¹	41,1 (3,9)	9,8 (1,4)	29,5 (3,1)	12,3 (1,7)	38,6 (4,4)	13,3 (2)	30,1 (4)	15,7 (1,9)	2,49	0,07
Neutrófilos ²	84 (9,5)	117 (12,4)	79,8 (7,4)	77,2 (7,4)	66,8 (3,3)	98,5 (13,1)	71,8 (5,4)	113,4 (6,8)	3,44	0,03*
Linfocitos ²	101,3 (10)	78,4 (11,7)	99,3 (9,2)	118,3 (7,6)	107,3 (5,6)	95,5 (13,5)	105,3 (7,3)	78,4 (6,3)	3,29	0,03*

¹Abundancia cada 100.000 glóbulos rojos. ²abundancias basadas en un total de 200 leucocitos examinados por individuo. ³Tasa de eritrosedimentación.

⁴Anticuerpos naturales. ⁵relación neutrófilos: linfocitos.* Diferencias estadísticamente significativas (ver texto para resultados de tests post hoc).

TABLA 5.3. Mediana (25^{vo} percentil; 75^{vo} percentil) de los valores de eosinófilos, basófilos y monocitos correspondientes a los conteos al día 10 – conteos al día 0 (Δ) y la CBP (capacidad bactericida del plasma) de los tuco-tucos bajo distintos desafíos inmunes (control SRBC, PHA y doble desafío) y resultados de los tests de Kruskal-Wallis, utilizados para analizar las diferencias en estos parámetros entre grupos, y de Mann-Withney, usados para testear el efecto del sexo sobre los mismos. N = 49. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Control	SRBC	PHA	Doble	Efecto del tratamiento		Efecto del sexo	
					χ^2	<i>p</i>	U	<i>p</i>
Δ Eosinófilos ¹	-6,5 (-11,5; 0)	-12 (-16; -8,5)	-11 (-26; -10)	-9 (-22; -4)	4,5	0,22	271	0,6
Δ Basófilos ¹	0 (-1,5; 1,5)	0,5 (-1; 1)	-3 (-7; 0)	0,5 (-1; 1)	10	0,02*	267	0,55
Δ Monocitos ¹	-0,5 (-6,5; 0)	0,5 (-1; 1)	0 (-1; 2)	0 (0; 2)	4,22	0,24	252,5	0,37
CBP	0 (0; 0,5)	1,53 (0; 2,9)	0,67 (0; 2,6)	0,8(0; 3,5)	3,30	0,35	236,5	0,22

Control: PBS + PBS, Doble: SRBC + PHA. ¹abundancias basadas en un total de 200 leucocitos examinados por individuo, correspondientes al conteo al día 10 – conteo al día 0. * Test Post hoc (comparaciones múltiples) evidenció diferencias significativas entre grupos *PHA* y *Doble*.

DISCUSIÓN

Dadas las características de vida “lenta” que presenta *C. talarum*, podría esperarse que ante un doble desafío que implica la estimulación de las defensas innata y adaptativa, el desarrollo de la respuesta adaptativa (SRBC) fuera en detrimento de la defensa principalmente innata (PHA). Estos resultados estarían en línea con la propuesta de Lee (2006), donde las especies de “vida lenta” favorecen respuestas adaptativas ya que estas confieren memoria inmunológica, siendo útiles ante repetidas infecciones, y son más específicas que las defensas innatas. En tuco-tucos, sin embargo, dado el bajo costo energético del desarrollo de la respuesta a PHA, era esperable que ésta no fuera afectada por el desafío simultáneo. Los datos obtenidos apoyaron esta hipótesis: la inducción de una respuesta principalmente inflamatoria (local) parece no estar comprometida por el desarrollo en simultáneo de anticuerpos específicos para otro antígeno, a pesar de que dicho desarrollo es energéticamente costoso (Cutrera et al., 2010). A su vez y como se esperaba, los títulos de anticuerpos contra SRBC fueron similares en individuos inyectados únicamente con SRBC o con este antígeno y PHA. En esta línea, tampoco se verificó una asociación negativa entre las magnitudes de ambas respuestas (inflamación y títulos de anticuerpos). De esta manera, para el caso de estos antígenos en particular y esta especie de roedor, se aporta evidencia de que no existiría un compromiso en cuanto a la activación y uso de estas distintas vías (en las magnitudes inducidas) dentro del sistema inmune, o de que, al menos, las magnitudes finales de estas respuestas (inflamación y títulos de anticuerpos) no se ven afectadas por la simultaneidad de desafíos. Dado que esto podría ser consecuencia del bajo costo energético que implica el desarrollo de la respuesta frente a PHA, sería interesante analizar qué ocurre ante la estimulación de estas vías, pero cuando ambos desafíos son energéticamente costosos. Por ejemplo, la inyección de LPS genera una respuesta inflamatoria sistémica, que sería más costosa que la inflamación localizada en el sitio de inyección inducida por PHA. Por otra parte, utilizando los mismos antígenos (PHA y SRBC) pero realizando el ensayo a campo, Ardia (2007) encontró que el compromiso en la magnitud de ambas respuestas en golondrinas *Tachycineta bicolor* era variable según la geografía de la población, lo que se atribuye a distintas presiones de selección sobre el sistema inmune entre sitios (ej.: diferencias en la duración de la estación reproductiva, que generaría diferencias en la exposición a patógenos). Así, en Nueva York y en Alaska, las golondrinas que montaban mayores respuestas inflamatorias tuvieron los menores títulos de anticuerpos, mientras que en Tennessee existía una correlación positiva entre la magnitud de ambas respuestas. Además de algunas diferencias de protocolo entre el estudio de Ardia (2007) y el presente, hay que resaltar que, en primer lugar, se desconocen los costos de desarrollo de cada una de estas respuestas en *T. bicolor*, por lo que comparaciones sobre las

estrategias inmunes entre esta especie y *C. talarum* son difíciles de realizar. Por otra parte, para *C. talarum* el ensayo fue realizado en cautiverio. Así, si bien el cautiverio permite descartar efectos del ambiente (condición meteorológica, interacciones con coespecíficos y predadores, disponibilidad de alimento, exposición a otras heridas o infecciones, etc.) sobre las variables a medir, las condiciones de alimento *ad libitum*, termoneutralidad y actividad restringida podrían haber enmascarado los compromisos mediados por la disponibilidad de recursos entre ambos desafíos.

Otro de los factores que puede favorecer un tipo de respuesta inmune sobre otro es la presencia previa a la aparición del antígeno de señales (principalmente citoquinas) estimuladoras de un determinado perfil inmunológico en la circulación (ej: perfil inflamatorio o anti inflamatorio). En este caso, el perfil inmunológico inducido por SRBC (inyectado al día 0), típicamente Th 2, no pareciera afectar el desarrollo de una respuesta principalmente inflamatoria inducida 2 días después. Sin embargo, el efecto modulador de otros desafíos inmunes mediado por este mecanismo sobre la respuesta a PHA en *C. talarum* no puede descartarse, dado que existe la posibilidad de que la respuesta –primaria- humoral desencadenada por SRBC no fuera de la suficiente magnitud como para generar compromisos con la respuesta inflamatoria local, además de la no-patogenicidad de este antígeno en comparación con patógenos reales, que pueden generar un efecto de mayor complejidad o magnitud sobre el sistema inmune. La respuesta de anticuerpos secundaria, por otra parte, que en este caso se generaría ante una nueva exposición a SRBC, se caracteriza por ser más rápida y de mayor magnitud que la primaria, ya que el organismo cuenta con la memoria inmunológica generada ante el primer ingreso del antígeno. De esta manera, resultaría interesante evaluar el impacto de la respuesta secundaria a SRBC sobre la inflamación desencadenada por PHA, especialmente porque esa sería una situación más cercana a la realidad de los tuco-tucos en su ambiente natural, donde la diversidad de macroparásitos es baja pero la prevalencia de infecciones es alta (Rossin y Malizia, 2002), por lo que los tucos se encuentran continuamente expuestos al mismo conjunto de especies parasitarias y, por lo tanto, los desafíos inmunes se repiten. A la vez, los tuco-tucos sufren heridas producto de la interacción con co-específicos o por la actividad de excavación, que involucran una respuesta inflamatoria. En este contexto, y dado que hemos observado que las infecciones parasitarias afectan negativamente el nivel de inflamación desencadenada contra PHA (Capítulo 3), el estudio del impacto de respuestas humorales reiteradas (en principio utilizando antígenos no patogénicos, para excluir otros efectos de los parásitos sobre el hospedador) sobre la inflamación inducida por PHA resulta importante para contribuir a determinar la posible interacción entre componentes inmunes de la respuesta antiparasitaria e inflamatoria local en esta especie.

En cuanto a los costos energéticos de las respuestas ensayadas en el presente estudio, ninguna de las dos generó incrementos significativos en el metabolismo de los individuos

inmunodesafiados, ya sea individualmente o en simultáneo. Para el caso de la respuesta inflamatoria, los resultados eran los esperados dado que estudios previos (Capítulo 1) ya habían determinado que esta respuesta no implica un costo energético. Para el caso de la respuesta primaria contra SRBC, los resultados difieren de lo encontrado por Cutrera et al. (2010), donde la respuesta primaria frente a la inyección de SRBC generó un incremento significativo del metabolismo, hacia el cuarto día post-inyección, en aproximadamente un 19%. En el presente estudio, si bien no fue estadísticamente significativo, el incremento en la tasa metabólica de los individuos inyectados sólo con SRBC fue de 16,1% al tercer día post-inyección, durante la época reproductiva, y no hubo diferencias entre sexos. Los títulos de anticuerpos generados fueron similares a los reportados previamente (Cutrera et al., 2010; Schleich et al., 2015). Así, la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa en el presente estudio podría ser consecuencia de la mayor varianza encontrada en las TMRs. Finalmente, de acuerdo a lo esperado, el desafío doble tampoco generó un incremento significativo en el metabolismo de los tuco-tucos. El incremento en el metabolismo de individuos doblemente desafiados fue del 16,3%, de manera que coincide con el incremento encontrado en el grupo desafiado sólo con SRBC. Si bien no fue estadísticamente significativo, el incremento en la tasa metabólica debido al desafío con SRBC implicaría para individuos en su ambiente natural -donde deben termorregular, mantener/construir la cueva, y movilizarse entre la superficie y bajo ella- una demanda de energía que puede ser crítica. El gasto energético diario de un individuo de *C. talarum* es de 117 KJ aproximadamente; el desafío con SRBC, entonces, representaría un gasto de 19 KJ diarios. Este gasto en la función inmune puede cobrar notable importancia durante aquellos días donde los individuos no logren obtener la suficiente energía de la dieta, que se estima en 160 KJ por día (Antinuchi et al., 2007), afectando negativamente su peso corporal o incrementando el estrés (Cutrera et al., 2010). En el presente estudio, no se observó pérdida en el peso corporal ni incrementos en el nivel de estrés en los individuos desafiados con SRBC, pero es necesario destacar que las condiciones de cautiverio imponen restricciones en la actividad excavatoria y locomotora, y las condiciones de alimentación son ilimitadas. En relación a los desafíos simultáneos, dado que la respuesta a PHA no es energéticamente costosa para esta especie (Capítulo 1) –aunque podría implicar costos nutricionales (Capítulo 4)-, la inversión de recursos para el desarrollo de esta respuesta inflamatoria local no sería tan elevada como para generar un compromiso con otro proceso inmune. En relación a esto, la correlación negativa entre dos desafíos inmunes (cicatrización y respuesta mediada por células contra DNFB; 2,4-dinitro-1-fluorobenceno) encontrada en *Peromyscus leucopus* por Martin et al. (2006b) es atribuida principalmente al elevado costo energético de cada una de estas respuestas inmunes: la producción y el movimiento de células inmunes para ambos desafíos serían lo suficientemente costosos como para disminuir la respuesta de uno de ellos si ya se está desarrollando la

respuesta contra el otro. De esta manera, se requieren estudios adicionales que exploren el compromiso entre dos respuestas inmunes energéticamente costosas, como la desencadenada por SRBC (Cutrera et al., 2010) y otra similarmente costosa, como podría ser la desencadenada por LPS, que proveerán información valiosa para dilucidar si los compromisos dentro del sistema inmune se encuentran en parte mediados por el costo energético de los procesos subyacentes.

La coexistencia de múltiples patógenos en un mismo hospedador es una situación normal en la naturaleza, y estudios como el presente contribuyen al entendimiento de las interacciones entre éstos y la fisiología del hospedador. En tuco-tucos, el desarrollo de una respuesta de anticuerpos primaria (Cutrera et al., 2010) no pareciera influir en la magnitud de una respuesta inflamatoria local que se desencadena en simultáneo. La respuesta de anticuerpos ensayada, si bien es un estimador de la respuesta desencadenada por patógenos extracelulares (ej.: bacterias, macroparásitos; Deerenberg et al., 1997), fue inducida con un antígeno no patogénico. De esta manera, hay que resaltar que la respuesta inducida “artificialmente” probablemente sea menor en magnitud a la inducida por patógenos naturales (Cutrera et al., 2010), que pueden desencadenar daño tisular al ingresar y adherirse al hospedador, así como respuestas sistémicas. Por lo tanto, el compromiso entre estas dos vías del sistema inmune (inflamatoria y humoral), pudo estar subestimado en el presente estudio. Aún así, esto podría reflejar que el impacto negativo del parasitismo sobre la respuesta inmune contra PHA previamente reportado (Capítulo 3) no esté dado principalmente por interacciones entre componentes de la respuesta humoral que los parásitos pueden inducir y los requeridos para la respuesta frente a PHA. Por lo tanto, sería interesante también explorar otros mecanismos aún no evaluados que puedan explicar la influencia negativa de las infecciones parasitarias sobre la respuesta a PHA, como podría ser la inmunomodulación que ejercen ciertos parásitos, como por ejemplo, los efectos antiinflamatorios mediados por acción de Th2 y T reguladoras (Biard et al., 2015; Goüy De Bellocq et al., 2006).

Por último, de los parámetros fisiológicos evaluados relacionados al estado inmune individual, los niveles de NAbs fueron afectados por el tratamiento, siendo, al día 10, menores en los individuos de los grupos inmunodesafiados con SRBC y SRBC+PHA que en los individuos control. Esto indicaría que la inducción de la respuesta de anticuerpos contra SRBC indujo una disminución en el nivel de NAbs circulantes. Los NAbs son producidos por linfocitos del tipo B1, que se encuentran principalmente en las cavidades peritoneal (donde se inyectaron los SRBC) y pleural; ante el ingreso de antígenos como eritrocitos, se sabe que los NAbs reaccionan inmediatamente (Fainboim y Geffner, 2005; Matson et al., 2005) y son importantes mediadores entre la respuesta innata y el inicio de la respuesta adaptativa contra el antígeno (Fainboim y Geffner, 2005). A su vez, los linfocitos B1 activados por los NAbs se diferencian (mediante la participación de células T) hacia plasmocitos productores de anticuerpos específicos para el antígeno en cuestión (Fainboim y Geffner, 2005). Así, nuestros resultados son coherentes con este proceso, pudiendo indicar que

los NAbs hayan actuado inicialmente ante el ingreso del antígeno (SRBC), disminuyendo sus niveles en sangre hacia el día 10, y que los linfocitos productores de estos anticuerpos (linfocitos B1) se hayan especializado hacia la producción de anticuerpos específicos para SRBC, disminuyendo la producción de NAbs. Por otro lado, los niveles de este componente inmune no se vieron afectados en el grupo inducido con PHA, y no hubo diferencias entre el grupo desafiado sólo con SRBC o con SRBC+PHA, indicando que la respuesta inducida por PHA no se relacionaría con los niveles de NAbs circulatorios y que no existiría una interacción entre ambos desafíos (SRBC y PHA) mediada por este componente. Sin embargo, se debe considerar también que no se contó con los valores previos a los experimentos (ej.: día 0) del nivel de NAbs, de manera que no se puede arribar a conclusiones firmes sobre este efecto, ya que diferencias previas podrían haber existido entre los individuos de cada grupo. Por otro lado, otros componentes inmunes, la CBP y el perfil leucocitario, fueron medidos antes y después del tratamiento. Tanto la respuesta a PHA como a SRBC implican la movilización de distintas poblaciones leucocitarias, y si bien éstas no generan cambios significativos en los conteos leucocitarios en sangre periférica (Cutrera et al., 2010; Merlo et al., 2014) de manera individual, el efecto del suministro en simultáneo sobre estos parámetros no podía ser descartado. Además, la respuesta humoral involucra la actividad de proteínas del complemento (principal componente de la CBP; Liebl y Martin, 2009), de manera que el desafío con SRBC podría haber alterado los niveles de estas proteínas en sangre. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que tanto la CBP como los perfiles leucocitarios no fueron afectados por los desafíos inmunes ensayados, tanto individualmente como en simultáneo. De esta manera, no puede arribarse a conclusiones adicionales acerca de la interacción mediada por componentes inmunes entre estos dos desafíos. De los restantes parámetros de condición monitoreados, sólo se vieron modificados por el tratamiento los conteos de neutrófilos y la relación N: L, aunque el efecto no es claro: los animales control tuvieron valores incrementados de estos parámetros, mientras que los conteos de neutrófilos aumentaron tanto en los individuos que recibieron el desafío doble como en los control. Dada la ausencia de patogenicidad de los antígenos utilizados, que no desencadenan daño físico o síntomas de enfermedad, se esperaba que, si se generaban efectos sobre la condición de los individuos, estos fueran debidos a la utilización de recursos o a la inmunopatología asociadas a la estimulación de las vías inmunes. En relación a la utilización de recursos, la alimentación *ad libitum* pudo haber enmascarado el posible detrimento de la condición general debido al desarrollo de uno o ambos desafíos inmunes. La repetición del presente protocolo experimental bajo condiciones de variación en la disponibilidad de nutrientes (ej.: *ad libitum* vs. restricción alimentaria), o, idealmente, en condiciones naturales donde los individuos se enfrenten a sus actividades demandantes usuales, aportaría la información necesaria para determinar la influencia de los recursos disponibles en la actividad en simultáneo de estos componentes inmunes.

En la naturaleza, la infección simultánea o secuencial por parásitos o patógenos es la situación más frecuente (Cox, 2001). Para defenderse, el hospedador cuenta con distintas vías inmunes asociadas al tipo de patógeno invasor. Sin embargo, dada la simultaneidad de infecciones, la activación de diversas vías inmunes puede conducir a complejos “resultados” en la defensa, donde también influyen interacciones adicionales (no mediadas por el sistema inmune) entre parásitos y entre éstos y el hospedador. Para lograr la comprensión de la dinámica de la infección en la naturaleza resulta fundamental que se realicen estudios como el presente, de manera de comenzar a contar con información sobre el sentido y las causas (compromisos energéticos, nutricionales, interacción de componentes inmunes) de las interacciones entre desafíos inmunes simultáneos. En el presente estudio se evidencia una independencia entre el desarrollo de la respuesta humoral e inflamatoria local (aunque esta última también involucraría, en menor medida, el componente adaptativo mediado por células; Merlo et al., 2014a) ante antígenos no patogénicos, en la especie *C. talarum*, ante condiciones de alimentación *ad libitum* y cautiverio. La demanda energética de la activación de estas vías inmunes en simultáneo no es distinta de la demanda que implican de manera individual. Como se mencionó anteriormente, resulta interesante que a futuro se explore la interacción entre estas respuestas durante condiciones nutricionalmente limitadas, a la vez que la interacción entre dos desafíos energéticamente demandantes. Así, la información sobre las condiciones en las que respuestas inmunes simultáneas se facilitan o contraponen resultará de gran utilidad para comprender como opera el sistema inmune en la naturaleza.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

Desde su origen, hace ya más de 30 años, los estudios ecoinmunológicos han ganado creciente interés. Los diversos enfoques de estos estudios, que van desde análisis comparativos sobre la evolución de las defensas inmunes (ej.: Nunn, 2002) hasta las dinámicas fisiológicas de las defensas a corto plazo (ej.: Navarro et al., 2003) han permitido comenzar a entender la variabilidad en las defensas inmunes en la naturaleza (Brock et al., 2014). De esta manera, se ha visto que la presión de selección que ejercen los parásitos sobre la defensa es inmensa, pero que a la vez existe una amplia variación en la resistencia a la infección. Además de las diferencias inherentes en la susceptibilidad a infecciones, se ha evidenciado que las características de historia de vida habrían dirigido la evolución de distintas estrategias inmunes (Abolins et al., 2011), donde los individuos realizarían una inversión diferencial de recursos hacia la inmunidad en relación a otros procesos demandantes, principalmente al crecimiento y la reproducción. Ante ciertos contextos, los individuos invertirían menos en la inmunidad de modo de favorecer la reproducción o el crecimiento (principalmente especies iteróparas y semélpas, respectivamente); sin embargo, ante situaciones de alta presión por parte de los patógenos, resultaría adaptativo favorecer la inmunidad por sobre estos procesos. Esta teoría sugiere, en general, que la variación en la defensa inmune refleja la interacción con la variación ambiental y los compromisos de historia de vida (Ardia et al., 2011); la flexibilidad en la defensa inmune permitiría la selección del óptimo nivel de respuesta para cada contexto dado.

Dentro de este marco, resulta indispensable el estudio de poblaciones silvestres, en condiciones seminaturales o naturales, dado que estas presentan variabilidad genética y fenotípica y están naturalmente expuestas a infecciones (Bradley, 2015). La función inmune de especies o poblaciones silvestres se ha reportado más variable en comparación con coespecíficos criados en laboratorio (Abolins et al., 2011), lo que refleja la exposición natural a un historial de presiones de selección que no ocurre en condiciones de laboratorio. Por ejemplo, la mayoría de las poblaciones naturales de vertebrados se encuentran infectadas por múltiples patógenos (co-infección), lo que genera en el hospedador un efecto que no puede ser predicho mediante la adición de los efectos individuales de cada patógeno, sino que éste resulta de una compleja dinámica de interacciones entre los patógenos y entre éstos y el hospedador (Cox, 2001). En general, las poblaciones silvestres representan la oportunidad de estudiar el efecto de factores intrínsecos y extrínsecos sobre la defensa inmune bajo una situación cercana a la natural. Hasta el momento, la gran mayoría de los estudios ecoinmunológicos han sido realizados en aves (ej.: revisiones de Ardia et

al., 2011; Hasselquist y Nilsson, 2012). Por ello, se ha resaltado la necesidad del estudio de otros grupos de vertebrados silvestres, de manera de poder establecer patrones más robustos en cuanto a la variación de las defensas inmunes (Lee, 2006).

El entendimiento de la variación en las defensas inmunes en la naturaleza pretende ser alcanzado, dentro del marco de la ecoinmunología, mediante la determinación de los costos y de los beneficios que conlleva el desarrollo, mantenimiento y uso de las respuestas inmunes. Los costos están determinados tanto por la genética como por la fisiología del individuo. El costo “genético” en realidad hace referencia al costo evolutivo de la capacidad de responder a un desafío inmune, que típicamente covaría negativamente con la fecundidad (Schmid Hempel, 2011). La variación genotípica en la función inmune se mantiene gracias a la variación en la exposición a patógenos; durante períodos de baja exposición a patógenos se favorecen los genotipos con alta fecundidad (y baja respuesta inmune) mientras que al aumentar la exposición, se favorecen los genotipos más inmunocompetentes (con menor fecundidad; Schmid Hempel, 2011). El costo fisiológico, por otra parte, es plástico y está asociado a las “decisiones” individuales en la asignación de recursos hacia la inmunidad vs. otros procesos fisiológicos. Las características que presentan gran variabilidad podrían indicar efectos fenotípicos importantes, amplia *norma de reacción* (conjunto de fenotipos que pueden ser producidos por un solo genotipo en un rango de diferentes condiciones ambientales; Pigliucci y Schlichting, 1998) y variaciones temporales en la condición del individuo (Matson et al., 2006a). La presente tesis surge de la observación de la gran variabilidad en la magnitud de la respuesta inflamatoria frente a PHA reportada para *C. talarum* (Merlo et al., 2014). En general, los costos fisiológicos que median el uso –y, por lo tanto, la magnitud de desarrollo- de una respuesta inmune pueden evidenciarse mediante:

- a. La estimación del gasto energético que implica la respuesta, por ejemplo mediante la medición de tasas metabólicas. La relación entre la respuesta inflamatoria contra PHA y el cambio en el metabolismo energético de reposo no es claro: se han reportado notables, leves y nulos incrementos en la tasa metabólica de individuos de distintas especies inmunodesafiados con PHA (Martin et al., 2003, Nilsson et al., 2007, Boughton et al., 2007, respectivamente) e incluso disminuciones en la misma (Lee et al., 2005). Para el caso de *C. talarum*, la respuesta a PHA no se encuentra asociada a un incremento significativo de la tasa metabólica, tanto en etapa adulta como en juvenil (Capítulo 1).
- b. La observación de que otra actividad simultánea reduce la capacidad de la función inmune, o que la activación del sistema inmune genera una pérdida en algún otro componente de la adecuación biológica. Esto es posible cuando se observa al organismo como una red fisiológica, donde existen moléculas (principalmente hormonas; Schmid Hempel, 2011)

capaces de integrar y coordinar los distintos sistemas (ej.: sistema inmune, reproducción, longevidad y metabolismo; Flatt et al., 2005). Para el caso de los tuco-tucos, la respuesta inflamatoria estudiada no se vio comprometida por la reproducción ni por el crecimiento (Capítulos 1 y 2; si bien cierto nivel de influencia sobre la magnitud de la respuesta a PHA por parte de la estacionalidad reproductiva se detectó, aunque de manera estadísticamente no significativa –Capítulo 2-). Además, componentes de la condición individual (peso corporal, sexo, hematocrito, estrés) tampoco se vieron asociados a la magnitud de la inflamación desencadenada (Capítulo 2).

- Bajo la premisa de que los organismos funcionan como redes fisiológicas integradas, también es posible detectar compromisos y sinergismos dentro del mismo sistema inmune, entre la actividad de distintas vías inmunes (Ardia et al., 2011). El estudio de estos compromisos y de los factores que afectan esta interacción resulta clave para el entendimiento de las defensas inmunes en su contexto natural, el cual implica la multiplicidad de desafíos debido a que usualmente los hospedadores se encuentran coinfectados por dos o más agentes infecciosos (Cox, 2001). Los estudios realizados en *C. talarum* demuestran que no existirían compromisos entre la respuesta inflamatoria inducida por PHA y componentes constitutivos del sistema inmune (NABs, leucocitos circulantes -Capítulo 2- y CBP –Capítulo 5-), así como tampoco entre ésta y la respuesta humoral desencadenada en simultáneo contra el antígeno no patogénico SRBC (Capítulo 5). Sin embargo, cuando se exploró la influencia de desafíos inmunes simultáneos contra antígenos patogénicos (parásitos naturales de *C. talarum*) sobre la respuesta inducida por PHA, se encontraron fuertes efectos moduladores del parasitismo sobre la magnitud de la misma: se detectaron asociaciones tanto positivas como negativas entre la respuesta inflamatoria local y la abundancia de parásitos, dependiendo del tipo de parásito considerado (asociaciones positivas con la abundancia de pulgas *Polygenis* sp. y negativas con la abundancia de nematodos *T. pampeana*; Capítulo 2), y también se evidenció un efecto negativo de la carga de *Eimeria* sp. y endoparasitaria total sobre la magnitud de la inflamación local (Capítulo 3).
- c. La evaluación del requerimiento de nutrientes para el desarrollo de la misma. Esto puede realizarse mediante el monitoreo del peso durante desafíos inmunes, que tiende a bajar, aunque el balance del mismo no siempre se ve afectado de manera notoria (Schmid Hempel, 2011). Otra estrategia consiste en evaluar el efecto de dietas de distinta composición nutricional sobre la magnitud de la respuesta inmune desencadenada. En este caso, sin embargo, es necesario considerar el efecto que la dieta tiene sobre la condición individual, la que también podrá afectar la función inmune. La manipulación

experimental de la dieta de los tuco-tucos reveló que la respuesta a PHA se encuentra notablemente comprometida ante condiciones sub-óptimas de alimentación (reducido contenido energético total y de macronutrientes y micronutrientes; Capítulo 4), situación que también condujo a la pérdida de peso (~ 10%) y a la generación de estrés. Otros componentes del sistema inmune, como la actividad del complemento (CBP), los anticuerpos naturales y los perfiles leucocitarios, no se vieron afectados por las dietas experimentales, sugiriendo que estos componentes constitutivos serían menos sensibles a las variaciones nutricionales en comparación con la respuesta inducida por PHA (Capítulo 4).

Por lo tanto, mediante el estudio de los costos y compromisos que la respuesta inflamatoria inducida por PHA implica, se determinó que ésta es modulada por factores intrínsecos (ej. infecciones simultáneas) y extrínsecos (ej. disponibilidad de alimento) al individuo, posiblemente como una estrategia que permitiría disminuir alguna de las demandas de recursos durante períodos desfavorables (como son aquellos con alta presión por parte de parásitos o escasez de recursos alimenticios).

La especie con la que se trabajó en la presente tesis representa un grupo con hábitos muy particulares y, por lo tanto, la información obtenida es valiosa para el entendimiento de las estrategias inmunes en la naturaleza. En primer lugar, *C. talarum* es una especie de mamífero, un grupo estudiado en notable menor medida si se compara con el conocimiento que se tiene sobre la ecoinmunología de aves. A su vez, dentro de los roedores, los tuco-tucos presentan las particularidades de tener hábitos de vida “lenta”, ser subterráneos y solitarios. Esto implica que sus “decisiones” de vida son distintas a la de los roedores con características de vida más “rápida”, que el ambiente en el que viven es más estable, menos ventilado y húmedo que la superficie, y que las interacciones con co-específicos son menos frecuentes que las de aquellas especies que viven en grupo, respectivamente. Estas particularidades conducirían a patrones de infección diferentes a los de roedores de superficie (Rossin et al., 2010a) y podrían haber dirigido la evolución de estrategias inmunes particulares.

En primer lugar, los resultados obtenidos en la presente tesis aportan evidencia a la teoría de historias de vida propuesta por Lee (2006) para explicar variaciones interespecíficas en la función inmune. Según esta teoría, las especies de vida “lenta” dependerían más de la inmunidad adaptativa, aunque esta sea más costosa de desarrollar, dado que es probable que se encuentren con infecciones repetidas a lo largo de sus vidas. Las especies de vida “rápida”, por el contrario, utilizarían más el sistema inmune innato, minimizando los costos del desarrollo de la defensa (pudiendo asignar esta energía a la reproducción), que facilita una rápida eliminación de los patógenos (Martin et al., 2008b). En base al análisis de los costos energéticos de la respuesta inflamatoria y humoral, podemos decir que los tuco-tucos –individuos de vida “lenta”- invertirían más energía en el uso de la defensa adaptativa que en la respuesta inflamatoria frente a PHA, que

en esta especie tiene un alto componente innato, lo que concuerda con lo postulado por la teoría. Así, la inversión energética en este componente de la defensa que genera memoria resultaría adaptativo para esta especie, que se encuentra expuesta a reiteradas infecciones por los mismos tipos parasitarios (Rossin y Malizia, 2002). Esta teoría también propone que las diferencias en las tasas metabólicas habrían modulado la variabilidad en las defensas inmunes: aquellas especies con bajas tasas metabólicas (TMR) peso-específicas serían capaces de invertir más en el desarrollo de respuestas inmunes costosas, como puede considerarse la mediada por anticuerpos. En concordancia con esto, se ha visto, por ejemplo, que ratones seleccionados para tener bajas TMRs desarrollaban mayores respuestas humorales contra SRBC que aquellos seleccionados para tener altas TMRs (Książek y Konarzewski, 2003). La subterrneidad impone condiciones de humedad y poca ventilación a los tuco-tucos, lo que se hipotetiza que habría favorecido las bajas tasas metabólicas de los mismos ya que esto les permitiría evitar el exceso de calor durante la excavación (McNab, 1966). Así, la estrategia inmune de estos individuos, con mayor inversión energética en la defensa adaptativa que en la innata, podría haber estado influenciada por el hábito subterráneo, a través del tipo de metabolismo. Por otra parte, el bajo costo energético detectado en la respuesta inflamatoria frente a PHA podría implicar que esta respuesta, que se desencadena rápidamente, pueda ser utilizada con frecuencia durante ciertos períodos. Por ejemplo, el modo de vida de los tuco-tucos implica peleas por territorialidad o hembras (para el caso de los machos) así como actividades de excavación, momentos energéticamente demandantes donde a la vez se requiere la actividad del sistema inmune innato para subsanar las heridas producidas por estas actividades. Otro período donde la respuesta inflamatoria local puede ser requerida con mayor frecuencia es al momento de abandonar la cueva materna, donde los individuos en estadio juvenil sufren una mayor incidencia de heridas debido al incremento en la agresión con la madre y hermanos (Zenuto et al., 2002b). Además, en esta etapa se asume que el sistema inmune adaptativo aún se encuentra en desarrollo y se sabe que, en esta especie, las infecciones por parte de algunas especies parasitarias son menos frecuentes durante la juventud (Rossin et al., 2010a). De esta manera, la mayor magnitud en la respuesta a PHA desencadenada por juveniles en comparación con adultos de *C. talarum* (Capítulo 1) puede estar evidenciando que la defensa inmune en esta especie durante estadios tempranos del desarrollo depende en mayor medida de este tipo de respuestas, de bajo costo energético.

En comparación con otras especies, a partir de los datos obtenidos se observa que, en general, la defensa innata de los tuco-tucos tiende a ser baja en magnitud en comparación con otros roedores. Por un lado, la capacidad bactericida del plasma (CBP) es menor en comparación con otras especies de roedores, como *Peromyscus leucopus*, *Tamias striatus* y *Sciurus carolinensis* (Previtali et al., 2012), y varias especies de *Peromyscus* (Martin et al., 2007b), las que presentan

diferentes ritmos de vida. La magnitud de la respuesta inflamatoria inducida por PHA, si bien es difícil de comparar con la encontrada en otros estudios debido a las diferentes dosis y métodos utilizados para calcular la inflamación, también tiende a ser menor en relación a otras especies de roedores, como los gerbilidos *Meriones unguatus* (Xu y Wang, 2010), *M. crassus*, y gerbos *Gerbillus andersoni*, *G. dasyurus*, *G. gerbillus* y *G. pyramidum* y ratas *Psammomys obesus* (Goüy de Bellocq et al., 2006), aunque es importante destacar que los tuco-tucos presentan una notable mayor variabilidad en la magnitud desarrollada en comparación con estas otras especies (Merlo et al., 2014). Los tuco-tucos también tendrían baja actividad del sistema de complemento (niveles nulos de esta actividad fueron reportados para la mayoría de los individuos aquí analizados), similar a lo encontrado para ciertas especies de aves, como petreles *Oceanodroma leucorhoa* (Mauck et al., 2005), palomas *Zenaida macroura*, pinzones cebra *Taeniopygia guttata* y albatros *Phoebastria immutabilis* (Matson et al., 2005). Así, según los valores encontrados en los primeros estudios de esta tesis (Capítulos 2, 3 y 4), los tuco-tucos mantendrían niveles mayores a los más altos reportados en bibliografía, que corresponden a gallos *Gallus domesticus*, pollos *G. gallus* y patos *Anas platyrhynchos* (Matson et al., 2005). Los títulos detectados en el último capítulo son similares a los reportados en otras especies de aves (*Passer domesticus*, *Coturnix coturnix japonica*, *Zenaida macroura*; Matson et al., 2005). En relación a roedores, lamentablemente son muy escasos los estudios donde se evalúa la actividad del sistema del complemento y anticuerpos naturales en mamíferos en general (Racca et al., 2014), mediante el ensayo propuesto por Matson et al. (2005). En comparación con roedores, los títulos de anticuerpos naturales detectados en el último capítulo son similares a los reportados en *Hydrochoerus hydrochaeris* (carpinchos; Racca et al., 2014). Sin embargo, dada la variación entre estudios dentro de *C. talarum*, no se puede arribar a conclusiones firmes sobre comparaciones interespecíficas en los niveles de anticuerpos naturales. En general, se resalta la necesidad de estudios adicionales en especies de roedores en cuanto a estas dos últimas medidas de inmunidad innata. Por otra parte, la defensa adaptativa de *C. talarum*, estudiada a través del desafío con SRBC, también parece encontrarse dentro del rango de magnitudes (títulos de anticuerpos) más bajas reportado (Cutrera et al., 2010). De esta manera, unificando lo descrito en la presente tesis en relación a la defensa principalmente innata, con los resultados previos reportados en cuanto a la defensa adaptativa, la baja capacidad de respuesta inmune aparece como patrón general para *C. talarum*, en relación a la información disponible, hasta el momento, sobre otras especies. En relación a esto, resultaría interesante analizar las causas de este patrón; por ejemplo, la magnitud del desarrollo de las respuestas inmunes podría estar limitada por una lenta producción de células del sistema inmune debido a la baja tasa metabólica de estos individuos (un menor recambio de células sanguíneas, por ejemplo, se ha reportado en roedores con bajas TMR en comparación con roedores de mayor TMR; MacAvoy et al., 2006). A su vez, para un mejor entendimiento de las estrategias inmunes en

relación a las características de historia de vida de las especies, futuros estudios que evalúen el efecto de antígenos patogénicos sobre las defensas serán de enorme utilidad. Como se mencionó anteriormente, el estudio de la ecoinmunología a través de la utilización de antígenos no patogénicos permite aislar el estudio de la respuesta inmune sin involucrar adicionales costos asociados a la patología de la enfermedad o al daño físico que los parásitos pueden generar. Sin embargo, en estos casos no puede asumirse que una mayor respuesta inmune es siempre indicativo de un mayor beneficio para el individuo, dados los costos en cuanto al consumo de recursos y a la inmunopatología que la actividad inmune implica (Martin et al., 2011; Viney et al., 2005). Es por esto que se ha sugerido que la respuesta inmune “óptima” -aquella que maximiza el *fitness* (o adecuación biológica)- puede estimarse mediante medidas funcionales del control de patógenos reales (ej.: viremia, títulos de anticuerpos contra patógenos naturales; Viney et al., 2005). Así, los resultados de esta tesis contribuyen a entender qué factores (intrínsecos y extrínsecos al individuo) serían importantes moduladores de la respuesta inmune en los tucucos, pero futuros estudios que involucren patógenos reales proveerán información sobre los niveles “óptimos” de las distintas respuestas inmunes en esta especie, en un contexto dado. A su vez, también resulta importante incorporar estudios sobre estrategias de tolerancia a parásitos en esta especie, ya éstas también influirían en la magnitud del desarrollo de las distintas respuestas inmunes. Al contrario de una estrategia de resistencia, que implica el desarrollo de respuestas inmunes que conducen a la eliminación de los parásitos (ej.: inflamación), la tolerancia implica la utilización de respuestas inmunes de tipo anti-inflamatorias, de manera de mitigar los efectos asociados a la inmunopatología (Råberg y Grahn, 1998; Sears et al., 2011). Así, el balance entre estrategias de tolerancia y resistencia es otro factor a considerar para el entendimiento de la variación en las distintas respuestas inmunes en la naturaleza.

El trabajo realizado en la presente tesis provee información adicional sobre la inmunidad de *C. talarum* a la ya obtenida de trabajos previos (ej.: Cutrera et al., 2010; Cutrera et al., 2011; Cutrera et al., 2014; Schleich et al., 2015), a la vez contribuyendo al desarrollo de la creciente disciplina de la Ecoinmunología. Sin embargo, los resultados obtenidos evidencian también la necesidad de continuar con el estudio de la inmunología en esta especie. Por un lado, a partir de la determinación de los costos energéticos y la influencia de la nutrición en la respuesta a PHA, surge la inquietud de explorar también los costos asociados a la inmunopatología que ésta puede implicar, probablemente a largo plazo. En relación al efecto negativo que se determinó de la carga endoparasitaria sobre la respuesta inflamatoria, aún se puede continuar investigando sobre los mecanismos que median esta influencia, que, en principio, no parecieran estar asociados a un efecto indirecto a través de la condición del individuo. La incorporación de otras medidas de la función inmune, por ejemplo de aquellas que induzcan síntomas de enfermedad (como fiebre,

mediante la utilización de LPS), también permitirían completar en mayor profundidad el panorama de la utilización de las distintas vías inmunes en esta especie.

Para concluir, se resalta que los roedores, el grupo de mamíferos con mayor número de especies reportadas (~ 1500), largos tamaños poblacionales y amplias distribuciones, representan importantes reservorios para enfermedades zoonóticas (Jackson, 2015). Así, el estudio de la inmunología y la dinámica de la infección en poblaciones naturales de este grupo de mamíferos resulta de gran interés. El análisis de los determinantes de la variación inmune en contextos ecológicos reales tiene la potencialidad de poder permitir la determinación de las causas ambientales de la heterogeneidad de hospedadores dentro de las poblaciones y predecir las consecuencias epidemiológicas de tal heterogeneidad, pudiendo anticipar el riesgo de enfermedades. Por ejemplo, el conocimiento sobre cómo la defensa inmune de los individuos varía en relación con factores climáticos (ej.: estacionalidad; Martin et al., 2008b; Zysling et al., 2009) y características del hábitat (ej.: Hopkins y Durant, 2011) permitirá identificar aquellas poblaciones más propensas a ser infectadas y por ende, de constituir reservorios de determinados patógenos (Jackson, 2015). Sin embargo, una importante limitación para este tipo de estudios es la poca disponibilidad de técnicas específicas para el estudio de especies no-modelo (Bradley y Jackson, 2008). En este contexto, las poblaciones naturales de roedores, en particular, han sido propuestas como valiosos candidatos para estudios ecoinmunológicos y epidemiológicos, ya que su cercanía filogenética con especies modelo, principalmente especies de *Mus* o *Rattus*, permite la utilización de herramientas que pueden tener reactividad cruzada, como puede ser la actividad de anticuerpos (Bradley y Jackson, 2008), permitiendo la interpretación de patrones inmunológicos a un nivel más detallado o de mecanismos. De esta manera, además de la importancia epidemiológica de los estudios en especies de roedores no modelo, éstos tienen la potencialidad de proveer nuevos conocimientos sobre el funcionamiento del sistema inmune en relación al ambiente, que el estudio en animales de laboratorio no puede proveer.

REFERENCIAS

- Abdou, H., Marichatou, H., Beckers, J.-F. O., Dufresne, I. y Hornick, J.-L.** (2014). Effect of bovine colostrum administration on plasma protein profile, growth, and survival in Red kid. *Small Rumin. Res.* **117**, 158-164.
- Abdukalykova, S. y Ruiz-Feria, C. A.** (2006). Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* **5**, 121-127.
- Abolins, S. R., Pocock, M. J. O., Hafalla, J. C. R., Riley, E. M. y Viney, M. E.** (2011). Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Mol. Ecol.* **20**, 881-92.
- Adelman, J. S.** (2015). Immune systems: linking organisms, populations, and evolution through disease. En *Integrative organismal biology* (ed. Martin, L. B., Ghahambor, C. K., y Woods, H. A.), pp. 169-181. New Jersey: Wiley Blackwell.
- Allen, P. C. y Jenkins, M. C.** (2010). Observations on the gross pathology of *Eimeria praecox* infections in chickens. *Avian Dis.* **54**, 834-840.
- Allen, J. E. y Maizels, R. M.** (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 375-388.
- Alonso-Alvarez, C. y Tella, J. L.** (2001). Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Can. J. Zool.* **79**, 101-105.
- Amat, J. A., Aguilera, E. y Visser, G. H.** (2007). Energetic and developmental costs of mounting an immune response in greenfinches (*Carduelis chloris*). *Ecol. Res.* **22**, 282-287.
- Antinuchi, C. y Busch, C.** (1992). Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Zeitschrift für Säugetierkd* **57**, 163-168.
- Antinuchi, C. D., Zenuto, R. R., Luna, F., Cutrera, A. P., Perissinotti, P. P. y Busch, C.** (2007). Energy budget in subterranean rodents: insights from the tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). En *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson* (ed. Kelt, D. A., Lessa, E., Salazar-Bravo, J. A., y Patton, J. L.), pp. 111-139. London: University of California Publications in Zoology.
- Ardia, D. R.** (2005). Tree swallows trade off immune function and reproductive effort differently across their range. *Ecology* **86**, 2040-2046.
- Ardia, D. R.** (2007). The ability to mount multiple immune responses simultaneously varies across the range of the tree swallow. *Ecography (Cop.)*. **30**, 23-30.
- Ardia, D. R., Parmentier, H. K. y Vogel, L. A.** (2011). The role of constraints and limitation in driving individual variation in immune response. *Funct. Ecol.* **25**, 61-73.
- Baker, D. G.** (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 231-266.
- Barnes, R. H.** (2009). Nutritional implications of coprophagy. *Nutr. Rev.* **20**, 289-291.
- Barton, K.** (2015). MuMIn: Model selection and model averaging based on information criteria. R package version 1.12-1. *J. Statistcal Softw.* **67**, 1-48.
- Behnke, J. M.** (2008). Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions or pure randomness? *Parasitology* **135**, 751-766.
- Behnke, J. M., Hannah, J. y Pritchard, D. I.** (1983). Nematospiroides dubius in the mouse: evidence that adult worms depress the expression of homologous immunity. *Parasite Immunol.* **5**, 397-408.
- Beldomenico, P. y Begon, M.** (2010). Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends Ecol. Evol.* **25**, 21-27.
- Beldomenico, P. M., Telfer, S., Gebert, S., Lukomski, L., Bennett, M. y Begon, M.** (2008). Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **275**, 1753-1759.
- Biard, C., Monceau, K., Motreuil, S. y Moreau, J.** (2015). Interpreting immunological indices: The importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds *Turdus merula*. *Methods Ecol. Evol.* **6**, 960-972.
- Bishop, C. R., Athens, J. W., Boggs, D. R., Warner, H. R., Cartwright, G. E. y Wintrobe, M. M.** (1968). Leukokinetic studies. 13. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J. Clin. Invest.* **47**, 249-60.
- Blaxhall, P. C. y Daisley, K. W.** (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* **5**, 771-781.
- Boughton, R. K., Bridge, E. S. y Schoech, S. J.** (2007). Energetic trade-offs between immunity and reproduction in male japanese quail (*Coturnix coturnix*). *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.*

307A, 479-487.

- Bowers, S. L., Bilbo, S. D., Dhabhar, F. S. y Nelson, R. J.** (2008). Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 105-113.
- Bozinovic, F. y Rosenmann, M.** (1989). Maximum metabolic rate of rodents: physiological and ecological consequences on distributional limits. *Funct. Ecol.* **3**, 173.
- Bradley, A. J.** (1987). Stress and mortality in the red-tailed phascogale, *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **67**, 85-100.
- Bradley, J. E.** (2015). Wild Immunology. *Parasite Immunol.* **37**, 217-219.
- Bradley, J. E. y Jackson, J. A.** (2008). Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. *Parasitology* **135**, 807-23.
- Brock, P. M., Murdock, C. C. y Martin, L. B.** (2014). The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integr. Comp. Biol.* **54**, 353-62.
- Brommer, J. E.** (2004). Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**, 110-113.
- Brown, C. R. y Brown, M. B.** (1989). Ectoparasitism as a cost of coloniality in cliff swallows (*Hirundo Pyrrhonota*). *Ecology* **67**, 1206-1218.
- Buchanan, K. L., Evans, M. R. y Goldsmith, A. R.** (2003). Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **55**, 50-59.
- Buffenstein, R.** (2000). Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. En *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents* (ed. Lacey, E. A., Patton, J. L., y Cameron, G.), pp. 62-110. Chicago: University of Chicago Press.
- Burthe, S., Telfer, S., Begon, M., Bennett, M., Smith, A. y Lambin, X.** (2008). Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: significant negative impacts on survival. *J. Anim. Ecol.* **77**, 110-119.
- Busch, C., Malizia, A. I., Scaglia, O. A. y Reig, O. A.** (1989). Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Mammal.* **70**, 204-208.
- Busch, C., Antinuchi, C. D., del Valle, J. C., Kittlein, M., Malizia, A. I., Vassallo, A. I. y Zenuto, R. R.** (2000). Population ecology of subterranean rodents. En *Life underground: the biology of subterranean rodents* (ed. Lacey, E. A., Cameron, G., y Patton, J. L.), pp. 183-226. Chicago, Illinois: University of Chicago Press.
- Cahill, R., Kimpton, W. y Washington, E.** (1999). The ontogeny of T cell recirculation during foetal life. *Semin. Immunol.* **11**, 105-114.
- Carr, R.** (2000). Neutrophil production and function in newborn infants. *Br. J. Haematol.* **110**, 18-28.
- Chandra, R. K. y Newberne, P. M.** (1977). *Nutrition, immunity, and infection: mechanisms of interactions*. Plenum Press.
- Chin, E., Love, O. y Clark, A.** (2005). Brood size and environmental conditions sex-specifically affect nestling immune response in the European starling *Sturnus vulgaris*. *J. Avian* **36**, 549-554.
- Christe, P., Arlettaz, R. y Vogel, P.** (2000). Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecol. Lett.* **3**, 207-212.
- Christe, P., Glaizot, O., Strepparava, N., Devevey, G. y Fumagalli, L.** (2011). Twofold cost of reproduction: an increase in parental effort leads to higher malarial parasitaemia and to a decrease in resistance to oxidative stress. *Proc. Biol. Sci.* **279**, 1142-9.
- Cohen, A. A., Martin, L. B., Wingfield, J. C., McWilliams, S. R. y Dunne, J. A.** (2012). Physiological regulatory networks: ecological roles and evolutionary constraints. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 428-35.
- Comparatore, V., Maceira, N. y Busch, C.** (1991). Habitat relations in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha, Octodontidae) in a natural grassland. *Zeitschrift für Säugetierkd.*
- Cooper, A., Fitzgeorge, R., Baskerville, A. y Little, R.** (1989). Bacterial infection (*Legionella pneumophila*) stimulates fever, metabolic rate and brown adipose tissue activity in the guinea pig. *Life Sci.* **45**, 843-847.
- Cox, F. E. G.** (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **122**, 23-38.
- Cutrerera, A., Antinuchi, C. y Busch, C.** (2003). Thermoregulatory development in pups of the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Physiol. Behav.* **79**, 321-330.
- Cutrerera, A. P., Zenuto, R. R., Luna, F. y Antenucci, C. D.** (2010). Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. *J. Exp. Biol.* **213**, 715-724.
- Cutrerera, A. P., Zenuto, R. R. y Lacey, E. A.** (2011). MHC variation, multiple simultaneous infections and physiological condition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1023-36.
- Cutrerera, A. P., Merlo, J. L., Paggi, R. y Zenuto, R. R.** (2013). Optimización del ensayo y evaluación de la

- capacidad bactericida en plasma del roedor subterráneo *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). XXVI Jornadas Argentinas Mastozoología. 5 al 8 noviembre 2013. Mar del Plata, Pcia. Buenos Aires. Poster.
- Cutrera, A. P., Zenuto, R. R. y Lacey, E. a.** (2014). Interpopulation differences in parasite load and variable selective pressures on MHC genes in *Ctenomys talarum*. *J. Mammal.* **95**, 679-695.
- Cutuli de Simón, M. T.** (2007). Inmunidad innata. En *Manual de inmunología veterinaria* (ed. Gómez-Lucía, E., Blanco, M. del M., y Doménech, A.), pp. 63-83. Madrid: Pearson Educación.
- Davis, A. K., Maney, D. L. y Maerz, J. C.** (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* **22**, 760-772.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S. y Bos, N.** (1997). Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **264**, 1021-1029.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S. y Bos, N.** (2007). Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **264**, 1021-1029.
- del Valle, J. C., Lohfelt, M. I., Comparatore, V. M., Cid, M. S. y Busch, C.** (2001). Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mamm. Biol.* **66**,.
- Demas, G. E. y Nelson, R. J.** (2012). Introduction to ecoimmunology. En *Ecoimmunology* (ed. Demas, G. E. y Nelson, R. J.), pp. 3-6. New York: Oxford University Press.
- Demas, G. E., Chefer, V., Talan, M. I. y Nelson, R. J.** (1997). Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **273**,.
- Derting, T. y Compton, S.** (2003). Immune response, not immune maintenance, is energetically costly in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 744-752.
- Derting, T. L. y Virk, M. K.** (2005). Positive effects of testosterone and immunochallenge on energy allocation to reproductive organs. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **175**, 543-556.
- Drazen, D., Trasy, A. y Nelson, R.** (2003). Photoperiod differentially affects energetics of immunity in pregnant and lactating Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Can. J. Zool.* **81**, 1406-1413.
- Duffy, D. L., Bentley, G. E., Drazen, D. L. y Ball, G. F.** (2000). Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behav. Ecol.* **11**, 654-662.
- Eberhardt, A. T., Costa, S. A., Marini, M. R., Racca, A., Baldi, C. J., Robles, M. R., Moreno, P. G. y Beldomenico, P. M.** (2013). Parasitism and physiological trade-offs in stressed capybaras. *PLoS One* **8**, e70382.
- Erickson, K. L., Medina, E. A. y Hubbard, N. E.** (2000). Micronutrients and Innate Immunity. *J. Infect. Dis.* **182**, S5-S10.
- Ezenwa, V. O. y Jolles, A. E.** (2011). From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 540-51.
- Ezenwa, V., Etienne, R., Luikart, G. y Beja-Pereira, A.** (2010). Hidden consequences of living in a wormy world: nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *Am.* **176**, 613-624.
- Fainboim, L. y Geffner, J.** (2005). *Introducción a la inmunología humana*. 5ta ed. (ed. Geffner, J.) y Fainboim, L.) Buenos Aires: Editoria Medica Panamericana.
- Fair, J. y Hansen, E.** (1999). Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **266**, 1735-1742.
- Fair, J. y Ricklefs, R.** (2002). Physiological, growth, and immune responses of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. *Arch. Environ. Contam.* **42**, 77-87.
- Fanjul, M. S., Zenuto, R. R. y Busch, C.** (2006). Seasonality of breeding in wild tuco-tucos *Ctenomys talarum* in relation to climate and food availability. *Acta Theriol. (Warsz)*. **51**, 283-293.
- Fargallo, J. A., Laaksonen, T., Poyri, V. y Korpimaki, E.** (2002). Inter-sexual differences in the immune response of Eurasian kestrel nestlings under food shortage. *Ecol. Lett.* **5**, 95-101.
- Fekete, Sg. y Kellems, R.** (2007). Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: a review. *Vet. Med. (Praha)*. **52**, 131-143.
- Festa-Bianchet, M.** (1989). Individual differences, parasites, and the costs of reproduction for Bighorn Ewes (*Ovis canadensis*). *J. Anim. Ecol.* **58**, 785-795.
- Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C. a, Morris, S. C., Madden, K. B., Gause, W. C. y Urban, J. F.** (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 505-533.
- Fitzgerald, S., Fitzgerald, A., Reed, W. y Burnstein, T.** (1992). Immune function in pheasants experimentally infected with marble spleen disease virus. *Avian Dis.* **36**, 410-414.
- Flatt, T., Tu, M.-P. y Tatar, M.** (2005). Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* **27**, 999-1010.

- Fox, J. y Weisberg, S.** (2011). Car: companion to applied regression Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=car> Accessed, 20.
- Fox, C. J., Hammerman, P. S. y Thompson, C. B.** (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 844-852.
- Francescoli, G.** (2000). Sensory capabilities and communication in subterranean rodents. En *Life underground: the biology of subterranean* (ed. Lacey, E. A., Patton, J. L., y Cameron, G.), pp. 128-141. Chicago: University of Chicago Press.
- Frank, S.** (1994). Coevolutionary genetics of hosts and parasites with quantitative inheritance. *Evol. Ecol.*
- Gannon, W. L. y Sikes, R. S.** (2007). Guidelines of the american society of mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* **88**, 809-823.
- Gitlin, J. D. y Colten, H. R.** (1987). Molecular biology of the acute phase plasma proteins. En *Lymphokines: A Forum for Immunoregulatory Cell Products* (ed. Pick, E.) y Landy, M.), pp. 123-153. San Diego, California.
- Gómez-Lucía, E.** (2006a). Tolerancia inmunológica. En *Manual de inmunología veterinaria* (ed. Gómez-Lucía, E., Blanco, M. M., y Doménech, A.), pp. 698-715. Madrid: Pearson Educación.
- Gómez-Lucía, E.** (2006b). *Manual de inmunología veterinaria.* (ed. Gómez-Lucía, E., Blanco, M. del M., y Doménech, A.) Pearson Educación, Madrid.
- Gonzalez, G., Sorci, G., Moller, A. P., Ninni, P., Haussy, C. y De Lope, F.** (1999). Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *J. Anim. Ecol.* **68**, 1225-1234.
- González Naranjo, L. A. y Molina Restrepo, J. F.** (2010). Laboratory evaluation of inflammation. *Rev. Colomb. Reumatol.* **17**, 35-47.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. y David, M. M.** (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- Goto, N., Kodama, H., Okada, K. y Fujimoto, Y.** (1978). Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poult. Sci.* **57**, 246-50.
- Goüy De Bellocq, J., Krasnov, B. R., Khokhlova, I. S., Ghazaryan, L. y Pinshow, B.** (2006). Immunocompetence and flea parasitism of a desert rodent. *Funct. Ecol.* **20**, 637-646.
- Goüy de Bellocq, J., Krasnov, B. R., Khokhlova, I. S. y Pinshow, B.** (2006). Temporal dynamics of a T-cell mediated immune response in desert rodents. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **145**, 554-559.
- Goüy de Bellocq, J., Ribas, A., Casanova, J. C. y Morand, S.** (2007). Immunocompetence and helminth community of the white-toothed shrew, *Crocidura russula* from the Montseny Natural Park, Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* **53**, 315-320.
- Graham, A. L., Cattadori, I. M., Lloyd-Smith, J. O., Ferrari, M. J. y Bjørnstad, O. N.** (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends Parasitol.* **23**, 284-91.
- Graham, R. I., Deacutis, J. M., Simpson, S. J. y Wilson, K.** (2015). Body condition constrains immune function in field populations of female Australian plague locust *Chortoicetes terminifera*. *Parasite Immunol.* **37**, 233-241.
- Greenman, C. G., Martin, L. B. y Hau, M.** (2005). Reproductive state, but not testosterone, reduces immune function in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol. Biochem. Zool.* **78**, 60-68.
- Greives, T., McGlothlin, J. y Jawor, J.** (2006). Testosterone and innate immune function inversely covary in a wild population of breeding dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Functional* **20**, 812-818.
- Grimble, R. F.** (1992). Dietary manipulation of the inflammatory response. *Proc. Nutr. Soc.* **51**, 285-294.
- Guillén, J. A., Hawkins, M. A., Mislov, B. E. y Flores, V. M.** (2001). Reactantes de fase aguda y su impacto en el estado nutricional. *Rev. Médico Científica* **14**, 12-18.
- Gwinner, H., Oltrogge, M., Trost, L. y Nienaber, U.** (2000). Green plants in starling nests: effects on nestlings. *Anim. Behav.* **59**, 301-309.
- Hamilton, W. y Zuk, M.** (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* (80-). **218**, 384-387.
- Hangalapura, B. N., Nieuwland, M. G., De Vries Reilingh, G., Buyse, J., Van Den Brand, H., Kemp, B. y Parmentier, H. K.** (2005). Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult. Sci.* **84**, 1520-1529.
- Harf, R. y Sommer, S.** (2005). Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Mol. Ecol.* **14**, 85-91.
- Harshman, L. G. y Zera, A. J.** (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 80-86.
- Hasselquist, D. y Nilsson, J.-Å.** (2012). Physiological mechanisms mediating costs of immune responses:

what can we learn from studies of birds? *Anim. Behav.* **83**, 1303-1312.

- Hasselquist, D., Marsh, J. y Sherman, P.** (1999). Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behav. Ecol.* **45**, 167-175.
- Hayward, a. D.** (2013). Causes and consequences of intra- and inter-host heterogeneity in defence against nematodes. *Parasite Immunol.* **35**, 362-373.
- Higgins, D. A.** (1996). Comparative immunology of avian species. *Poult. Immunol.* **24**, 149-205.
- Hill, G. E.** (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecol. Lett.* **14**, 625-634.
- Hoffman, P. C., Esser, N. M., Bauman, L. M., Denzine, S. L., Engstrom, M. y Chester-Jones, H.** (2001). *Short Communication: Effect of Dietary Protein on Growth and Nitrogen Balance of Holstein Heifers.*
- Hoi-Leitner, M., Romero-Pujante, M., Hoi, H. y Pavlova, A.** (2001). Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**, 333-339.
- Hopkins, W. A. y Durant, S. E.** (2011). Innate immunity and stress physiology of eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*) from two stream reaches with differing habitat quality. *Gen. Comp. Endocrinol.* **174**, 107-15.
- Hörak, P., Saks, L., Ots, I. y Kullissaar, T.** (2003). Physiological effects of immune challenge in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *J. Zool.* **81**, 371-379.
- Hurtrez-Boussès, S., Perret, P., Renaud, F. y Blondel, J.** (1997). High blowfly parasitic loads affect breeding success in a Mediterranean population of blue tits. *Oecologia* **112**, 514-517.
- Huyghe, K., Van Oystaeyen, A., Pasmans, F., Tadić, Z., Vanhooydonck, B. y van Damme, R.** (2010). Seasonal changes in parasite load and a cellular immune response in a colour polymorphic lizard. *Oecologia* **163**, 867-874.
- Jackson, J. A.** (2015). Immunology in wild nonmodel rodents: an ecological context for studies of health and disease. *Parasite Immunol.* **37**, 220-232.
- Jakob, E. M., Marshall, S. D. y Uetz, G. W.** (1996). Estimating Fitness: A Comparison of Body Condition Indices. *Oikos* **77**, 61-67.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. y Schlomchik, M. J.** (2004). *Immunobiology*. New York: Garland Science.
- Jolles, A., Ezenwa, V., Etienne, R. y Turner, W.** (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* **89**, 2239-2250.
- Jones, A., Bailey, T. A., Nothelfer, H. B., Gibbons, L. M., Samour, J. H., Bowardi, M. Al, Osborne, P. y Jones, A.** (1996). Parasites of wild houbara bustards in the United Arab Emirates. *J. Helminthol.* **70**, 21.
- Kamal, S. M. y El Sayed Khalifa, K.** (2006). Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunol.* **28**, 483-496.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W. y Bruss, M. L. eds.** (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
- Kaplan, S. S. y Basford, R. E.** (1976). Effect of vitamin B12 and folic acid deficiencies on neutrophil function. *Br. Rep. Blood* **47**,.
- Khokhlova, I. S., Spinu, M., Krasnov, B. R. y Degen, A. A.** (2004). Immune responses to fleas in two rodent species differing in natural prevalence of infestation and diversity of flea assemblages. *Parasitol. Res.* **94**, 304-311.
- Kittlein, M., Vassallo, A. y Busch, C.** (2001). Differential predation upon sex and age classes of tuco-tucos (*Ctenomys talarum*, Rodentia: Octodontidae) by owls. *Mamm. Biol.* **66**, 281-289.
- Klasing, K. C.** (1998). Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* **77**, 1119-1125.
- Klasing, K. C.** (2004). The costs of immunity. *Acta Zool. Sin.* **50**, 961-969.
- Klasing, K. C. y Leshchinsky, T. V.** (1999). Function, costs and benefits of the immune system during development and growth. En *Proceedings of the 22nd International Ornithology Congress Durban* (ed. Adams, N. J. y Slotow, R. H.), pp. 2817–2835. Johannesburg: Birdlife, South Africa.
- Klasing, K. C., Laurin, D. E., Peng, R. K. y Fry, D. M.** (1987). Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *J. Nutr.* **117**, 1629-1637.
- Kristan, D. M.** (2002). Maternal and direct effects of the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* on offspring growth and susceptibility to infection. *J. Exp. Biol.* **205**,.
- Kristan, D. y Hammond, K.** (2000). Combined effects of cold exposure and sub-lethal intestinal parasites on host morphology and physiology. *J. Exp. Biol.* **203**, 3495-3504.
- Kristan, D. M. y Hammond, K. A.** (2001). Parasite infection and caloric restriction induce physiological and morphological plasticity. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **281**, R502-510.
- Książek, A. y Konarzewski, M.** (2003). Costs of immune response in cold-stressed laboratory mice selected for high and low basal metabolism rates. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **270**, 2025-2031.

- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J. y Neter, J.** (2004). *Applied linear regression models (4th ed.)*. Boston: MA: McGraw-Hill/Irwin.
- König, C. y Schmid-Hempel, P.** (1995). Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. *Proc. Biol. Sci.*
- Lasiewski, R., Acosta, A. y Bernstein, M.** (1966). Evaporative water loss in birds: characteristics of the open flow method of determination, and their relation to estimates of thermoregulatory ability. *Comp. Biochem.* **19**, 445-457.
- Lazzaro, B. P. y Little, T. J.** (2009). Immunity in a variable world. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364**,
- Lee, K. a.** (2006). Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* **46**, 1000-1015.
- Lee, C.-H., Olson, P. y Evans, R. M.** (2003). Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144**, 2201-2207.
- Lee, K. A., Martin, L. B. y Wikelski, M. C.** (2005). Responding to inflammatory challenges is less costly for a successful avian invader, the house sparrow (*Passer domesticus*), than its less-invasive congener. *Oecologia* **145**, 243-250.
- Levy, O.** (2005). Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J. Endotoxin Res.* **11**, 113-116.
- Liebl, A. L. y Martin, L. B.** (2009). Simple quantification of blood and plasma antimicrobial capacity using spectrophotometry. *Funct. Ecol.* **23**, 1091-1096.
- Lochmiller, R. L. y Deerenberg, C.** (2000). Trade-Offs in Evolutionary Immunology: Just What Is the Cost of Immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- Lochmiller, R., Vestey, M. y Boren, J.** (1993). Relationship between protein nutritional status and immunocompetence in northern bobwhite chicks. *Auk*.
- Long, P. L.** (1982). *The biology of the coccidia*. London: Edward Arnold.
- Lozano, G. y Lank, D.** (2003). Seasonal trade-offs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). *Proc. R.* **270**, 1203-1208.
- Lucero, S., Agnolin, F., Obredor, R., Lucero, R., Cenizo, M. y de los Reyes, M.** (2008). Una nueva especie del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia) del plioceno tardío-pleistoceno temprano del sudeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Stud. Geol. Salmant.* **44**, 163-175.
- Luna, F. y Antinuchi, C. D.** (2007). Energy and distribution in subterranean rodents: Sympatry between two species of the genus *Ctenomys*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 948-954.
- Luna, F., Antinuchi, C. y Busch, C.** (2000). Ritmos de actividad locomotora y uso de las cuevas en condiciones seminaturales en *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *Rev. Chil. Hist.* **73**, 39-46.
- Luna, F., Antenucci, C. D. y Bozinovic, F.** (2009). Comparative energetics of the subterranean *Ctenomys* rodents: breaking patterns. *Physiol. Biochem. Zool.* **82**, 226-35.
- MacAvoy, S., Arneson, L. y Bassett, E.** (2006). Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* **150**, 190-201.
- Malizia, A. I. y Busch, C.** (1991). Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia* **55**, 293-306.
- Marshall-Clarke, S., Reen, D., Tasker, L. y Hassan, J.** (2000). Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol. Today* **21**, 35-41.
- Martin, L. B.** (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* **163**, 70-6.
- Martin, L. B. y Cohen, A. A.** (2011). Physiological regulatory networks: the orchestra of life? En *Integrative organismal biology* (ed. Martin, L. B., Ghalambor, C. K., y Woods, A. H.), pp. 137-152. New Jersey.
- Martin, L. B., Scheuerlein, A. y Wikelski, M.** (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. Biol. Sci.* **270**, 153-158.
- Martin, L. B., Hasselquist, D. y Wikelski, M.** (2006a). Investment in immune defense is linked to pace of life in house sparrows. *Oecologia* **147**, 565-575.
- Martin, L. B., Weil, Z. M., Kuhlman, J. R. y Nelson, R. J.** (2006b). Trade-offs within the immune systems of female white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. *Funct. Ecol.* **20**, 630-636.
- Martin, L. B., Navara, K. J., Weil, Z. M. y Nelson, R. J.** (2007a). Immunological memory is compromised by food restriction in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R316-R320.
- Martin, L., Weil, Z. y Nelson, R.** (2007b). Immune defense and reproductive pace of life in *Peromyscus* mice. *Ecology* **88**, 2516-2528.
- Martin, L. B., Weil, Z. M. y Nelson, R. J.** (2008a). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**, 321-339.
- Martin, L., Weil, Z. y Nelson, R.** (2008b). Fever and sickness behaviour vary among congeneric rodents.

Funct. Ecol. **22**, 68-77.

- Martin, L. B., Kidd, L., Liebl, A. L. y Coon, C. A. C.** (2011). Captivity induces hyper-inflammation in the house sparrow (*Passer domesticus*). *J. Exp. Biol.* **214**, 2579-85.
- Martino, N. S., Zenuto, R. R. y Busch, C.** (2007). Nutritional responses to different diet quality in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 974-982.
- Martino, N. S., Romero, M. D. y Malizia, A. I.** (2014). Parasitism underground: lice (Insecta: Phthiraptera) from *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) along its coastal distribution in Argentina. *Acta Parasitol.* **60**, 154-157.
- Matson, K. D., Ricklefs, R. E. y Klasing, K. C.** (2005). A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 275-86.
- Matson, K. D., Cohen, A. a, Klasing, K. C., Ricklefs, R. E. y Scheuerlein, A.** (2006a). No simple answers for ecological immunology: relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 815-822.
- Matson, K., Tieleman, B. y Klasing, K.** (2006b). Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. *Physiol. Biochem.* **79**, 556-564.
- Mauck, R. a., Matson, K. D., Philipsborn, J. y Ricklefs, R. E.** (2005). Increase in the constitutive innate humoral immune system in Leach's Storm-Petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) chicks is negatively correlated with growth rate. *Funct. Ecol.* **19**, 1001-1007.
- McElligott, A., Gammell, M., Harty, H. y Pains, D.** (2001). Sexual size dimorphism in fallow deer (*Dama dama*): do larger, heavier males gain greater mating success? *Behav. Ecol.* **49**, 266-272.
- McNab, B.** (1966). The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence. *Ecology* **47**, 712-733.
- Merlo, J. L., Cutrera, A. P. y Zenuto, R. R.** (2014). Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents. *Can. J. Zool.* **92**, 689-697.
- Møller, A. P., Merino, S., Brown, C. R. y Robertson, R. J.** (2001). Immune defense and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *Am. Nat.* **158**, 136-145.
- Mora, M. S., Lessa, E. P., Cutrera, A. P., Kittlein, M. J. y Vassallo, A. I.** (2007). Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Mol. Ecol.* **16**, 3453-3465.
- Müller, C., Jenni-Eiermann, S. y Jenni, L.** (2011). Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Funct. Ecol.* **25**, 566-576.
- Murphy, H. M. y Wideman, C. H.** (1992). Vasopressin, corticosterone levels, and gastric ulcers during food-restriction stress. *Peptides* **13**, 373-376.
- Navarro, C., Marzal, A., de Lope, F. y Moller, A. P.** (2003). Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* **101**, 291-298.
- Nilsson, J., Granbom, M. y Råberg, L.** (2007). Does the strength of an immune response reflect its energetic cost? *J. Avian Biol.* **38**, 488-494.
- Nordling, D. y Andersson, M.** (1998). Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **265**, 1291-1298.
- Norris, K. y Evans, M. R.** (2000). Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* **11**, 19-26.
- Norris, K., Anwar, M. y Read, A. F.** (1994). Reproductive effort influences the prevalence of haematozoan parasites in great tits. *J. Anim. Ecol.* **63**, 601-610.
- Nunn, C. L.** (2002). A comparative study of leukocyte counts and disease risk in primates. *Evolution (N. Y.)* **56**,.
- Owen-Ashley, N. T., Turner, M., Hahn, T. P. y Wingfield, J. C.** (2006). Hormonal, behavioral, and thermoregulatory responses to bacterial lipopolysaccharide in captive and free-living white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Horm. Behav.* **49**, 15-29.
- Page, K. R., Scott, A. L. y Manabe, Y. C.** (2006). The expanding realm of heterologous immunity: Friend or foe? *Cell. Microbiol.* **8**, 185-196.
- Palacios, M., Cunnick, J., Vleck, D. y Vleck, C.** (2009). Ontogeny of innate and adaptive immune defense components in free-living tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Comp. Immunol.* **33**, 456-463.
- Parker, B. B. y Duszynski, D. W.** (1986). Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *J. Parasitol.* **72**, 602-604.
- Pearson, O.** (1984). Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern

Argentina. *J. Zool.* **202**, 225-237.

- Pedersen, A. B. y Babayan, S. A.** (2011). Wild immunology. *Mol. Ecol.* **20**, 872-80.
- Peig, J. y Green, A. J.** (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* **118**, 1883-1891.
- Pérez, M., Angel, M. y Alonso, B.** (2010). aspectos ambientales y clínico-patológicos Coccidiosis hepática en el conejo : **17**, 269-276.
- Pickering, A. D.** (1986). Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta L.*, during the spawning season. *J. Fish Biol.* **29**, 335-347.
- Pigliucci, M. y Schlichting, C. D.** (1998). Reaction norms of Arabidopsis. V. Flowering time controls phenotypic architecture in response to nutrient stress. *J. Evol. Biol.* **11**, 285-301.
- Pitala, N., Siitari, H., Gustafsson, L. y Brommer, J. E.** (2010). Costs and benefits of experimentally induced changes in the allocation of growth versus immune function under differential exposure to ectoparasites. *PLoS One* **5**, e10814.
- Polat, U., Cetin, M. y Balci, F.** (2004). Detection of serum protein fractions and their concentrations in laying and non-laying ostriches (*Struthio camelus*) fed with different dietary protein levels. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. **155**, 570-574.
- Poston, J. P., Hasselquist, D., Stewart, I. R. K. y Westneat, D. F.** (2005). Dietary amino acids influence plumage traits and immune responses of male house sparrows, *Passer domesticus*, but not as expected. *Anim. Behav.* **70**, 1171-1181.
- Potti, J., Moreno, J., Merino, S., Frías, O. y Rodríguez, R.** (1999). Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledgling pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* **120**, 1-8.
- Poulin, R.** (1996). The evolution of life history strategies in parasitic animals. *Adv. Parasitol.* **37**, 107-134.
- Powell, N. D., Sloan, E. K., Bailey, M. T., Arevalo, J. M. G., Miller, G. E., Chen, E., Kobor, M. S., Reader, B. F., Sheridan, J. F. y Cole, S. W.** (2013). Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via α -adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16574-16579.
- Previtali, M., Ostfeld, R., Keesing, F. y Jolles, A.** (2012). Relationship between pace of life and immune responses in wild rodents. *Oikos* **121**, 1483-1492.
- Råberg, L. y Grahn, M.** (1998). On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **265**, 1637-1641.
- Råberg, L., Vestberg, M., Hasselquist, D., Holmdahl, R., Svensson, E. y Nilsson, J.** (2002). Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **269**,.
- Racca, A. L., Eberhardt, A. T., Moreno, P. G., Baldi, C. y Beldomenico, P. M.** (2014). Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Vet. J.* **199**, 308-309.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K.** (2001). *Animal physiology: mechanisms and adaptations*. 5 ta. (ed. Noe, J.) New York: W. H. Freeman and Company.
- Richner, H., Oppliger, A. y Christe, P.** (1993). Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *J. Anim. Ecol.* **62**, 703-710.
- Richner, H., Christe, P. y Oppliger, A.** (1995). Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proc. Nat. Academy Sci.* **92**, 1192-1194.
- Rivera, D., Olister, S., Liu, X., Thompson, J. y Zhang, X.** (1998). Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *FASEB J.* **12**, 189-197.
- Rose, M. E.** (1987). Immunity to eimeria infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**, 333-343.
- Rossin, M. A. y Malizia, A. I.** (2002). Relationship between helminth parasites and demographic attributes of a population of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Parasitol.* **88**, 1268-70.
- Rossin, A., Malizia, A. I. y Denegri, G. M.** (2004). The role of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) in the life cycle of *Taenia taeniaeformis* (Cestoda: Taeniidae) in urban environments. *Vet. Parasitol.* **122**, 27-33.
- Rossin, M. A., Poulin, R., Timi, J. T. y Malizia, A. I.** (2005). Causes of inter-individual variation in reproductive strategies of the parasitic nematode *Graphidioides subterraneus*. *Parasitol. Res.* **96**, 335-339.
- Rossin, M., Timi, J. y Malizia, A.** (2006a). A new species of Trichostrongylus (Nematoda, Trichostrongyloidea) parasitizing the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae) from Mar de Cobo, Argentina. *Acta Parasitol.* **51**, 286-289.
- Rossin, M. A., Timi, J. T. y Malizia, A. I.** (2006b). New Pudicinae (Trichostrongylina, Heligmosomoidea), *Pudica ctenomydis* n. sp. parasite of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina.

Parasitol. Int. **55**, 83-7.

- Rossin, M. A., Malizia, A. I., Timi, J. T. y Poulin, R.** (2010a). Parasitism underground: determinants of helminth infections in two species of subterranean rodents (Octodontidae). *Parasitology* **137**, 1569-1575.
- Rossin, M. A., Timi, J. T. y Hoberg, E.** (2010b). An endemic taenia from south america: validation of *T. talicei* Dollfus, 1960 (Cestoda: Taeniidae) with characterization of metacestodes and adults. *Zootaxa* **2636**, 49-58.
- Roulin, A., Christe, P., Dijkstra, C., Ducrest, A. y Jungi, T. W.** (2007). Origin-related, environmental, sex, and age determinants of immunocompetence, susceptibility to ectoparasites, and disease symptoms in the barn owl. *Biol. J.* **90**, 703-718.
- Saino, N. y Møller, A. P.** (1996). Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behav. Ecol.* **7**, 227-232.
- Saino, N., Cuervo, J., Krivacek, M., Lope, F. de y Møller, A.** (1997). Experimental manipulation of tail ornament size affects the hematocrit of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Oecologia* **110**, 186-190.
- Saino, N., Incagli, M., Martinelli, R. y Møller, A.** (2002). Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behav. Ecol.* **13**, 169-174.
- Saks, L., Karu, U., Ots, I. y Hõrak, P.** (2006). Do standard measures of immunocompetence reflect parasite resistance? The case of greenfinch coccidiosis. *Funct. Ecol.* **20**, 75-82.
- Sandland, G. y Minchella, D.** (2003). Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends Parasitol.* **19**, 571-574.
- Schad, J., Ganzhorn, J. U. y Sommer, S.** (2005). Parasite burden and constitution of major histocompatibility complex in the Malagasy mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Evolution (N. Y.)* **59**, 439.
- Schleich, C. E., Zenuto, R. R. y Cutrera, A. P.** (2015). Immune challenge but not dietary restriction affects spatial learning in the wild subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Physiol. Behav.* **139**, 150-156.
- Schmid Hempel, P.** (2011). Ecological immunology. En *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics* (ed. Schmid Hempel, P.), pp. 98-140. Oxford biology.
- Schmid-Hempel, P.** (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. Biol. Sci.* **270**, 357-366.
- Schmid-Hempel, P.** (2011). *Evolutionary parasitology. The integrated study of infections, immunology, and genetics*. New York: Oxford University Press.
- Schmid-Hempel, P. y Ebert, D.** (2003). On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.*
- Schneiderman, N., Ironson, G. y Siegel, S. D.** (2005). Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **1**, 607-28.
- Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y. y Siva-Jothy, M. T.** (2009). Introduction. Ecological immunology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 3-14.
- Schuurs, A. H. W. M. y Verheul, H. A. M.** (1990). Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* **35**, 157-172.
- Scrimshaw, N. S. y SanGiovanni, J. P.** (1997). Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 464-477.
- Sears, B. F., Rohr, J. R., Allen, J. E. y Martin, L. B.** (2011). The economy of inflammation: When is less more? *Trends Parasitol.* **27**, 382-387.
- Sheather, A. L.** (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *J. Comp. Pathol. Ther.* **36**, 266-275.
- Sheldon, B. C. y Verhulst, S.** (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 317-321.
- Slater, A. F. G. y Keymer, A. E.** (1986). Heligmosomoides polygyrus (Nematoda): the influence of dietary protein on the dynamics of repeated infection. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **229**, 69-83.
- Smith, H. G., Råberg, L., Ohlsson, T., Granbom, M. y Hasselquist, D.** (2007). Carotenoid and protein supplementation have differential effects on pheasant ornamentation and immunity. *J. Evol. Biol.* **20**, 310-319.
- Soler, J. J., De Neve, L., Pé Rez-Contreras, T. S., Soler, M. y Sorci, G.** (2002). Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study.
- Sorci, G., Soler, J. J. y Møller, A. P.** (1997). Reduced immunocompetence of nestlings in replacement clutches of the European magpie (*Pica pica*). *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **264**,.
- Surai, P.** (2002). *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham: Nottingham University Press.

- Svensson, E., Råberg, L., Koch, C. y Hasselquist, D.** (1998). Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Funct. Ecol.* **12**, 912-919.
- Swain, B. K. y Johri, T. S.** (2000). Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *Br. Poult. Sci.* **41**, 83-88.
- Takahashi, T. y Sakaguchi, E.** (1998). Behaviors and nutritional importance of coprophagy in captive adult and young nutrias (*Myocastor coypus*). *J. Comp. Physiol. B* **168**, 281-288.
- Team, R. D. C.** (2015). R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Document freely available on the internet at: <http://www.r-project.org>.
- Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S. y Begon, M.** (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* **330**, 243-246.
- Thomason, C. A., Hedrick-Hopper, T. L. y Derting, T. L.** (2013). Social and nutritional stressors: agents for altered immune function in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Can. J. Zool.* **91**, 313-320.
- Thompson, C. B.** (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* **3**, 531-539.
- Tsiagbe, V. K., Cook, M. E., Harper, A. E. y Sunde, M. L.** (1987). Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. *Poult. Sci.* **66**, 1147-1154.
- Turmelle, A. S., Ellison, J. a., Mendonça, M. T. y McCracken, G. F.** (2010). Histological assessment of cellular immune response to the phytohemagglutinin skin test in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **180**, 1155-1164.
- Twining, S. S., Schulte, D. P., Wilson, P. M., Fish, B. L. y Moulder, J. E.** (1997). Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J. Nutr.* **127**, 558-65.
- van der Most, P. J., de Jong, B., Parmentier, H. K. y Verhulst, S.** (2011). Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Funct. Ecol.* **25**, 74-80.
- Vera, F., Zenuto, R. R. y Antenucci, C. D.** (2008). Decreased glucose tolerance but normal blood glucose levels in the field in the caviomorph rodent *Ctenomys talarum*: the role of stress and physical activity. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **151**, 232-238.
- Vera, F., Antenucci, C. D. y Zenuto, R. R.** (2011). Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **170**, 550-557.
- Vera, F., Zenuto, R. R. y Antenucci, C. D.** (2013). Seasonal variations in plasma cortisol, testosterone, progesterone and leukocyte profiles in a wild population of tuco-tucos. *J. Zool.* **289**, 111-118.
- Versteegh, M., Schwabl, I. y Jaquier, S.** (2012). Do immunological, endocrine and metabolic traits fall on a single pace-of-life axis? Covariation and constraints among physiological systems. *J. Evol. Biol.* **25**, 1864-1876.
- Viney, M. E., Riley, E. M. y Buchanan, K. L.** (2005). Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 665-9.
- Vinkler, M. y Albrecht, T.** (2011). Handling «immunocompetence» in ecological studies: do we operate with confused terms? *J. Avian Biol.* **42**, 490-493.
- Vinkler, M., Bainová, H. y Albrecht, T.** (2010). Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct. Ecol.* **24**, 1081-1086.
- Vinkler, M., Schnitzler, J., Munclinger, P. y Albrecht, T.** (2012). Phytohaemagglutinin skin-swelling test in scarlet rosefinch males: low-quality birds respond more strongly. *Anim. Behav.* **83**, 17-23.
- Voigt, G. L.** (2000). *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*. IA, USA: John Wiley & Sons.
- von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. y Wittzell, H.** (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **266**, 1-12.
- Wada, H.** (2015). Developmental plasticity of individual variation in stress responses. En *Integrative organismal biology* (ed. Martin, L. B., Ghalambor, C. K.), y Woods, H. A.), pp. 187-205. New Jersey: Wiley Blackwell.
- Wakelin, P.** (2009). Genetic control of immune responses to parasites: immunity to *Trichuris muris* in inbred and random-bred strains of mice. *Parasitology* **71**, 51.
- Weil, Z. M., Martin, L. B. y Nelson, R. J.** (2006). Interactions among immune, endocrine, and behavioural response to infection. En *Micromammals and Macroparasites*, pp. 443-473. Tokyo: Springer Japan.
- Withers, P.** (1977). Measurement of VO₂, VCO₂, and evaporative water loss with a flow-through mask. *J. Appl. Physiol.* **42**, 120-123.
- Xu, D.-L. y Wang, D.-H.** (2010). Fasting suppresses T cell-mediated immunity in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **155**, 25-33.
- Yang, D.-B., Xu, Y.-C., Wang, D.-H. y Speakman, J. R.** (2013). Effects of reproduction on immuno-

suppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. *J. Exp. Biol.* **216**,

- Yun, C. H., Lillehoj, H. S. y Lillehoj, E. P.** (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* **24**, 303-324.
- Zenuto, R. R.** (1999). Sexual size dimorphism, testes size and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Nat. Hist.* **33**, 305-314.
- Zenuto, R. R., Vassallo, A. I. y Busch, C.** (2001). A method for studying social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol. (Warsz)*. **46**, 161-170.
- Zenuto, R. R., Antinuchi, C. D. y Busch, C.** (2002a). Bioenergetics of reproduction and pup development in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *Physiol. Biochem. Zool. Ecol. Evol. Approaches* **75**, 469-478.
- Zenuto, R. R., Vassallo, A. I. y Busch, C.** (2002b). Social and reproductive behavior of the subterranean solitary rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) in a seminatural enclosure. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **75**, 165-177.
- Zhiqiang, Z., Fengtong, Q. y Dehua, W.** (2011). Sex and seasonal differences and energetic cost of phytohemagglutinin responses in wild Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Acta Theriol.* **3**, 284-290.
- Zuk, M. y McKean, K. A.** (1996). Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. Parasitol.* **26**, 1009-1024.
- Zysling, D. A., Garst, A. D. y Demas, G. E.** (2009). Photoperiod and food restriction differentially affect reproductive and immune responses in Siberian hamsters *Phodopus sungorus*. *Funct. Ecol.* **23**, 979-988.

APÉNDICE

Figura A1. Estadístico PRESS_p (por sus siglas en inglés: suma de cuadrados residual predicha) para todas las posibles combinaciones de variables en los modelos de regresión múltiple para la respuesta inflamatoria contra PHA en *Ctenomys talarum*. Los puntos rojos corresponden a los mejores 100 modelos. El círculo azul indica el modelo con menor valor PRESS_p (0,8806), el cual incluye la estacionalidad reproductiva, los conteos de eosinófilos y monocitos, la abundancia de pulgas y el conteo de huevos de *Trichuris pampeana*.

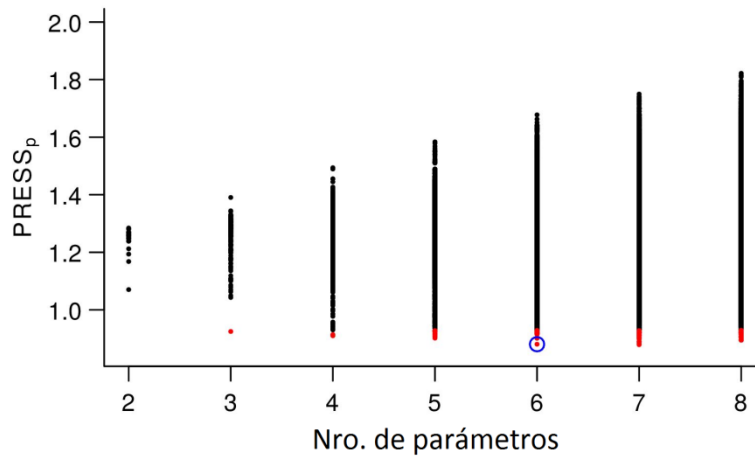


Tabla A1. Lista de los 100 mejores modelos de regresión múltiple para la respuesta inflamatoria contra PHA en *Ctenomys talarum*. Los modelos fueron ordenados de acuerdo a los valores de la suma de los residuales predichos (PRESSp). Las variables consideradas en el análisis fueron: estacionalidad reproductiva (ER), sexo (S), monocitos (MON), eosinófilos (EOS), *Polygenis* sp. (P), *Trichuris pampeana* (T), razón neutrófilos: linfocitos (N: L), ácaros hematófagos (AH), ácaros no hematófagos (ANH), anticuerpos naturales (AN), basófilos (BAS), *Eimeria* sp. (EIM), hematocrito (HTC), leucocitos totales (LT), linfocitos (L), neutrófilos (N), *Paraspidodera uncinata* (PAR), peso corporal (PC). “+” indica que el correspondiente factor está incluido en el modelo. Se limitó la complejidad de los modelos analizando todas las posibles combinaciones de variables independientes que generaran modelos con no más de 30 grados de libertad; para modelos con dos factores y 16 variables cuantitativas existieron 63004 posibles combinaciones.

Orden	Constante	ER	S	MON	EOS	P	T	N:L	AH	ANH	AN	BAS	EIM	HTC	LT	L	N	PAR	PC	PRESSp
1	0.588	+	.	-0.072	-0.063	0.054	-0.058	0.881
2	1.105	+	.	-0.077	-0.071	0.053	-0.053	-0.106	.	.	.	0.884
3	0.640	+	.	-0.068	-0.051	.	-0.055	.	0.036	-0.044	0.889
4	0.196	+	.	-0.076	-0.064	0.054	-0.052	0.080	0.890
5	2.891	+	.	-0.062	-0.078	.	-0.058	.	0.024	-0.327	-0.179	.	.	0.895
6	4.603	+	.	-0.077	-0.097	0.047	-0.053	-0.682	-0.761	.	.	.	0.895
7	1.124	+	.	-0.075	-0.071	0.039	-0.053	.	0.020	-0.116	.	.	.	0.895
8	1.052	+	+	-0.088	-0.074	0.053	-0.050	-0.098	.	.	.	0.896
9	0.652	+	.	-0.080	-0.057	0.055	-0.058	-0.027	0.898
10	1.173	+	.	-0.075	-0.066	0.047	-0.062	0.304	-0.174	.	.	0.901
11	0.620	.	.	-0.050	-0.065	.	-0.054	.	0.034	-0.041	0.901
12	0.578	+	.	.	-0.070	0.046	-0.063	0.902
13	0.564	+	.	-0.070	-0.062	0.042	-0.059	.	0.017	0.902
14	3.317	.	.	-0.037	-0.087	.	-0.062	.	.	0.024	-0.363	-0.244	.	.	0.903
15	3.228	.	.	.	-0.088	.	-0.065	.	.	0.025	-0.354	-0.235	.	.	0.903
16	0.643	+	.	-0.081	-0.054	0.037	-0.059	.	0.025	-0.039	0.904
17	1.141	+	.	-0.072	-0.060	.	-0.050	.	0.037	-0.038	-0.106	.	.	.	0.904
18	0.547	+	.	-0.076	-0.066	0.054	-0.054	0.090	0.904
19	0.553	+	+	-0.083	-0.067	0.042	-0.055	.	0.016	0.905
20	0.132	+	.	-0.075	-0.064	0.041	-0.053	.	0.018	0.088	0.905

Tabla A1. (Continuación)

Orden	Constante	ER	S	MON	EOS	P	T	N: L	AH	ANH	AN	BAS	EIM	HTC	LT	L	N	PAR	PC	PRESSp
21	0.347	+	.	-0.070	-0.052	.	-0.051	.	0.036	-0.040	.	.	.	0.058	0.906
22	1.050	+	+	-0.091	-0.066	0.055	-0.056	-0.124	0.907
23	0.606	.	.	.	-0.069	.	-0.058	.	0.032	-0.036	0.907
24	1.310	+	.	-0.080	-0.073	0.053	-0.055	.	.	.	-0.138	-0.105	.	.	.	0.907
25	3.324	.	+	-0.055	-0.091	.	-0.058	.	.	0.025	-0.363	-0.250	.	.	0.908
26	0.559	+	+	-0.081	-0.067	0.048	-0.054	.	.	0.009	0.909
27	1.151	+	.	-0.061	-0.069	.	-0.049	.	0.030	-0.124	.	.	.	0.910
28	0.583	+	.	-0.070	-0.040	.	-0.051	.	0.037	-0.051	.	.	0.023	.	0.910
29	0.596	.	.	.	-0.062	.	-0.057	.	.	0.033	-0.036	0.910
30	0.532	.	.	.	-0.076	.	-0.057	.	0.026	0.910
31	3.053	.	.	-0.043	-0.089	.	-0.061	.	0.020	-0.327	-0.220	.	.	0.911
32	0.811	+	.	-0.076	-0.065	0.054	-0.060	.	.	.	-0.144	0.911
33	2.786	+	.	.	-0.085	0.035	-0.067	-0.301	-0.178	.	.	0.912
34	0.623	+	+	-0.073	-0.054	.	-0.053	.	0.035	-0.038	0.913
35	0.514	+	.	-0.074	-0.065	0.041	-0.054	0.102	0.020	0.914
36	1.108	+	.	-0.072	-0.070	0.048	-0.053	.	.	0.009	-0.110	.	.	.	0.914
37	0.527	.	.	.	-0.070	.	-0.056	.	.	0.026	0.914
38	0.577	+	.	-0.069	-0.062	0.050	-0.058	.	.	0.006	0.914
39	3.461	.	.	-0.042	-0.089	.	-0.061	-0.370	-0.261	.	.	0.915
40	0.626	+	+	-0.088	-0.062	0.054	-0.055	-0.020	0.915
41	0.535	.	.	-0.037	-0.073	.	-0.054	.	0.027	0.915
42	0.608	.	.	-0.038	-0.060	.	-0.053	.	.	0.032	-0.038	0.916
43	0.540	+	+	-0.088	-0.070	0.053	-0.051	0.081	0.916
44	4.333	.	.	-0.040	-0.087	.	-0.066	.	.	0.029	.	.	.	-0.198	.	-0.399	-0.267	.	.	0.916
45	3.368	.	.	.	-0.092	.	-0.065	-0.359	-0.252	.	.	0.916
46	1.010	+	.	-0.076	-0.062	0.056	-0.060	-0.110	0.916
47	0.513	.	+	-0.047	-0.073	.	-0.049	.	.	0.027	0.918
48	0.573	+	+	-0.086	-0.067	0.053	-0.054	0.000	0.918
49	3.260	+	.	-0.052	-0.078	.	-0.060	.	.	0.021	-0.370	-0.218	.	.	0.919
50	0.618	+	.	.	-0.059	.	-0.061	.	0.034	-0.037	0.919

Tabla A1. (Continuación)

Orden	Constante	ER	S	MON	EOS	P	T	N: L	AH	ANH	AN	BAS	EIM	HTC	LT	L	N	PAR	PC	PRESSp
51	1.105	+	.	-0.078	-0.070	0.051	-0.054	0.003	.	.	-0.109	.	.	.	0.919
52	0.524	.	+	-0.053	-0.078	.	-0.050	.	0.026	0.919
53	0.780	+	+	-0.088	-0.069	0.053	-0.056	.	.	.	-0.132	0.919
54	0.549	+	.	-0.054	-0.060	.	-0.055	.	0.028	0.920
55	0.538	+	+	-0.067	-0.065	.	-0.051	.	0.027	0.920
56	0.150	+	.	-0.072	-0.063	0.049	-0.052	.	.	0.008	0.086	0.920
57	0.586	+	.	-0.072	-0.063	0.054	-0.058	0.001	0.920
58	0.824	+	.	-0.079	-0.071	0.053	-0.050	-0.098	.	.	0.049	0.920
59	3.385	+	.	-0.058	-0.079	.	-0.059	-0.376	-0.231	.	.	0.920
60	3.269	.	.	-0.045	-0.077	.	-0.063	.	.	0.030	-0.034	-0.343	-0.239	.	.	0.920
61	0.071	+	.	-0.060	-0.062	.	-0.048	.	0.029	0.097	0.921
62	0.376	+	.	-0.082	-0.059	0.054	-0.054	-0.024	.	.	.	0.055	0.921
63	2.964	.	.	.	-0.092	.	-0.065	.	0.020	-0.317	-0.212	.	.	0.921
64	0.510	.	+	.	-0.075	.	-0.054	.	.	0.028	0.921
65	0.928	+	.	-0.085	-0.059	0.054	-0.060	.	.	.	-0.174	.	.	.	-0.031	0.921
66	0.364	.	.	-0.052	-0.067	.	-0.050	.	0.034	-0.038	.	.	.	0.051	0.922
67	1.830	+	.	-0.084	-0.069	0.056	-0.055	-0.173	.	-0.118	.	.	.	0.922
68	3.238	.	.	-0.045	-0.092	0.018	-0.063	-0.339	-0.244	.	.	0.922
69	0.533	+	+	-0.085	-0.062	0.053	-0.052	0.013	.	0.922
70	0.546	+	.	-0.071	-0.057	0.054	-0.056	0.013	.	0.922
71	1.264	+	.	-0.074	-0.048	.	-0.058	.	0.038	-0.161	-0.047	0.922
72	1.096	+	.	-0.083	-0.065	0.054	-0.053	-0.022	-0.094	.	.	.	0.922
73	0.100	.	.	-0.042	-0.075	.	-0.047	.	0.027	0.088	0.922
74	0.807	.	.	-0.051	-0.065	.	-0.054	.	0.035	-0.049	-0.042	0.924
75	1.045	+	.	.	-0.077	0.045	-0.058	-0.096	.	.	.	0.924
76	0.587	+	.	-0.071	-0.055	.	-0.051	0.090	0.037	-0.039	0.924
77	0.515	+	.	-0.084	.	.	-0.047	.	0.039	-0.061	.	.	0.032	.	0.924
78	4.153	.	.	.	-0.089	.	-0.069	.	.	0.030	.	.	.	-0.182	.	-0.385	-0.255	.	.	0.924
79	1.076	+	.	-0.077	-0.065	0.052	-0.050	-0.110	.	0.015	.	0.924
80	0.633	+	.	-0.081	-0.063	0.056	-0.054	-0.116	0.082	0.924

Tabla A1. (Continuación)

Orden	Constante	ER	S	MON	EOS	P	T	N: L	AH	ANH	AN	BAS	EIM	HTC	LT	L	N	PAR	PC	PRESSp
81	0.639	+	.	-0.074	-0.054	0.046	-0.058	.	.	0.014	-0.033	0.924
82	1.102	+	+	-0.071	-0.073	.	-0.047	.	0.029	-0.116	.	.	.	0.924
83	0.161	.	.	.	-0.077	.	-0.052	.	0.027	0.075	0.925
84	0.572	.	.	.	-0.075	.	-0.054	0.925
85	4.782	+	.	-0.062	-0.097	.	-0.050	-0.708	0.027	-0.802	.	.	.	0.925
86	0.291	+	.	.	-0.071	0.045	-0.059	0.058	0.925
87	0.569	+	+	.	-0.073	0.044	-0.061	0.926
88	0.085	.	.	.	-0.072	.	-0.050	.	.	0.027	0.089	0.926
89	0.532	.	.	-0.029	-0.068	.	-0.053	.	.	0.025	0.927
90	0.553	+	.	.	-0.069	0.034	-0.063	.	0.018	0.927
91	1.157	+	.	-0.060	-0.064	.	-0.059	0.327	0.026	-0.181	.	.	0.927
92	3.187	.	.	.	-0.088	.	-0.065	.	.	0.026	0.031	-0.355	-0.235	.	.	0.927
93	0.600	.	+	-0.057	-0.069	.	-0.051	.	0.032	-0.035	0.927
94	1.186	+	.	-0.086	-0.055	0.057	-0.060	-0.138	-0.029	0.927
95	0.543	+	.	.	-0.066	.	-0.059	.	0.027	0.928
96	2.803	+	.	.	-0.083	.	-0.064	.	0.023	-0.313	-0.176	.	.	0.928
97	0.194	+	.	-0.077	-0.064	0.053	-0.053	0.000	0.080	0.928
98	3.162	.	.	.	-0.094	0.016	-0.066	-0.331	-0.237	.	.	0.929
99	0.605	+	.	-0.081	-0.048	0.054	-0.054	-0.033	.	.	0.019	.	0.929
100	0.826	+	+	-0.087	-0.068	0.053	-0.057	-0.052	0.929