



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL
DEL LITORAL**

**ESTUDIO DE MARCADORES DEL SISTEMA INMUNE EN
ROEDORES EN UN CONTEXTO DE ESTRÉS - SU APLICACIÓN
A ESTUDIOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS**

Por

PABLO F. CUERVO BUSTAMANTE

Directores

Dr. PABLO M. BELDOMENICO

Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral
(ICIVET - Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina

y

Dra. ANDREA L. RACCA

Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral
(ICIVET - Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina

2017

RESUMEN

Los animales despliegan diversas estrategias para afrontar los desafíos ambientales, siendo moduladas por la respuesta de estrés. Un desenlace habitual de su acción sostenida es la inmunosupresión, suponiendo consecuencias sobre la interacción hospedador-parásito. En vista del rol de los roedores como reservorios de agentes infecciosos, se evaluaron tres hipótesis: i) los factores estresantes poseen un efecto diferencial sobre los diferentes compartimentos del sistema inmune del roedor; ii) el incremento de un compartimento específico del sistema inmune redundante en la reducción de otro, cuya magnitud depende de la exposición al estrés; iii) la inversión diferencial en los distintos compartimentos del sistema inmune, influenciada por niveles de estrés, se encuentra asociada al tipo e intensidad de agente parasitario presente. Las primeras dos hipótesis se abordaron mediante un experimento de estrés crónico con ratas de laboratorio, en el que se evidenció que la exposición prolongada a restricción alimentaria y/o conflicto social resultó en diferentes patrones de inversión somática, y en la estimulación de la inmunidad humoral innata y adquirida. La tercera hipótesis se evaluó con un ensayo con roedores de vida libre, en que se manipuló la disponibilidad de alimento. Este ensayo develó que la densidad de individuos y la disponibilidad de recursos constituirían estímulos estresores; difiriendo las estrategias de defensa según especie y sexo del hospedador, y el tipo de parásito. Estos hallazgos de ensayos con distinto grado de control y realismo, suscitan nuevos interrogantes acerca de la interrelación hospedador-parásito-ambiente, expandiendo nuestra comprensión sobre la susceptibilidad del hospedador y las dinámicas parasitarias.

ABSTRACT

Animals display a series of strategies to cope with environmental challenges, which are met in light of the stress response. A frequent outcome of its sustained action is immunosuppression, which entails consequences for the host-parasite interaction. Due to the importance of rodents as reservoirs of infectious diseases, three hypotheses were evaluated: i) stressors pose a differential effect on distinct compartments of the rodent's immune system; ii) the enhancement of a specific compartment of the immune system results in the reduction of the other, and its magnitude depends on the exposure to stress; iii) the differential investment on distinct compartments of the immune system, influenced by the levels of stress, is associated with the type and intensity of the infectious agent. The first two hypotheses were assessed with a chronic stress experiment with laboratory rats, which evidenced that the prolonged exposure to food restriction and/or social conflict resulted in different patterns of somatic investment and the increase of the humoral immunity, both innate and acquired. The third hypothesis was evaluated with a trial with free-ranging field mice, where food availability was manipulated. The later revealed that density and resource availability constitute environmental stressors. The defence strategies displayed differed according to host species and sex, but also the type of parasite. These findings from trials with a diverse degree of control and realism, elicit new questions about the host-parasite-environment interaction, expanding our understanding of host susceptibility and the dynamics of parasites.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
Introducción general	1
Estrés: breve revisión de conceptos, fisiología y consecuencias	2
Respuesta de estrés	5
Evolución de la respuesta de estrés	8
Estrés crónico	9
Consecuencias del estrés crónico	10
Breve descripción del sistema inmune	12
Influencia del estrés sobre el sistema inmune	14
Relevancia del estudio	16
Objetivos e hipótesis de trabajo	19
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO PARA EL ESTUDIO DE MARCADORES DEL SISTEMA INMUNE	
Introducción	20
Roedores de laboratorio como modelo de estudio de la influencia del estrés crónico sobre el sistema inmune y su aplicación a poblaciones de roedores silvestres	20
Selección de estresores	22
Medidas de estrés seleccionadas	24
Materiales y Métodos	26
Consideraciones éticas	26
Origen de los individuos bajo estudio y condiciones de alojamiento	26
Diseño experimental y procedimientos	27
Medidas de estrés	30
Análisis estadístico	32

Resultados	32
Medidas de estrés	32
Discusión	36
CAPÍTULO III. PATRONES DE CRECIMIENTO E INVERSIÓN SOMÁTICA EN RATAS EXPUESTAS A ESTRESORES CRÓNICOS	
Introducción	38
Materiales y Métodos	40
Patrones de crecimiento, y medidas de condición corporal e inversión somática	40
Análisis estadístico	41
Resultados	42
Patrones de crecimiento, y medidas de condición corporal e inversión somática	42
Discusión	47
CAPÍTULO IV. EL PERFIL LEUCOCITARIO COMO MARCADOR DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR: SU VARIACIÓN BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS	
Introducción	52
El perfil leucocitario como marcador de la respuesta inmune celular	52
Materiales y Métodos	55
Toma de muestra y análisis hematológico	55
Análisis estadístico	56
Resultados	57
Efecto de los tratamientos y del desafío antigénico sobre las trayectorias semanales de los conteos de cada tipo leucocitario	57
Discusión	64
CAPÍTULO V. INFLUENCIA DEL ESTRÉS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL: LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ESTRESORES AMBIENTALES ESTIMULA LOS NIVELES DE ANTICUERPOS NATURALES Y ESPECÍFICOS	
Introducción	71

Aspectos relevantes a considerar sobre la respuesta inmune humoral y su regulación	71
Materiales y Métodos	74
Determinación de AcNs por hemaglutinación	75
Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	75
Análisis estadístico	77
Resultados	78
Niveles de anticuerpos naturales (AcNs)	78
Niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG)	80
Discusión	81
 CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNE EN ROEDORES SIGMODONTINOS DE VIDA LIBRE: SUS DETERMINANTES Y SU INFLUENCIA SOBRE LA INTENSIDAD PARASITARIA	
Introducción	85
Materiales y Métodos	88
Origen de los datos a utilizar	88
Ensayo de campo y toma de muestra	88
Evaluación del impacto de la suplementación de alimento sobre la condición corporal de roedores de vida libre	91
Evaluación del perfil leucocitario en roedores de vida libre	91
Evaluación de cambios hematológicos por estrés en roedores de vida libre ...	92
Evaluación de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) en roedores de vida libre	92
Análisis parasitológicos	93
Análisis estadístico	94
Resultados	96
Ensayo de campo	96
Evaluación del impacto de la suplementación de alimento sobre la condición corporal de roedores de vida libre	97
Evaluación de cambios hematológicos por estrés en roedores de vida libre ...	98
Asociación de factores individuales y ambientales con la inmunidad celular de roedores de vida libre	99

Asociación de factores individuales y ambientales con la inmunidad humoral de roedores de vida libre	100
Asociación de factores individuales y ambientales con la carga de parásitos presentes en roedores de vida libre	102
Asociación de la razón N:L con la intensidad y tipo de parásitos presentes en roedores de vida libre	108
Asociación de la función inmune con la intensidad y tipo de parásitos presentes en roedores de vida libre	110
Discusión	111
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	119
BIBLIOGRAFÍA	124
ANEXO I: GLOSARIO	150
ANEXO II: ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
Tablas de los modelos estadísticos aplicados	154
ANEXO III: PUBLICACIONES	201

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Datos descriptivos de la histo-arquitectura de la glándula adrenal de ratas expuestas a restricción alimentaria y/o conflicto social	33
Tabla 2. Datos descriptivos del peso de los órganos seleccionados de ratas expuestas a restricción alimentaria y/o conflicto social	46
Tabla 3. Detalles del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	76
Tabla 4. Número de ejemplares capturados de <i>Akodon azarae</i> y <i>Calomys callosus</i>	96
Tabla 5. Estadística descriptiva de la condición corporal en roedores de vida libre y sub-totales por categoría	98
Tabla 6. Estadística descriptiva de la razón N:L en roedores de vida libre y sub-totales por categoría	98
Tabla 7. Estadística descriptiva de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) en roedores de vida libre y sub-totales por categoría	101
Tabla 8. Tabla resumen del experimento de estrés crónico en ratas de laboratorio	120

Tablas: Anexo II

Tabla A1. Modelo lineal mixto describiendo la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de corticosterona plasmática total	154
Tabla A2. Modelos lineales mixtos describiendo la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre parámetros de la histo-arquitectura de la glándula adrenal	154
Tabla A3. Modelos lineales mixtos describiendo la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre parámetros de consumo de alimento	156
Tabla A4. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre parámetros de crecimiento seleccionados (μ , A)	157
Tabla A5. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre medidas longitudinales de inversión somática y condición corporal	157

Tabla A6. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre medidas finales de inversión somática y condición corporal (en Sem10 y Sem13)	159
Tabla A7. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los pesos absoluto y relativo de órganos seleccionados	160
Tabla A8. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de leucocitos	163
Tabla A9. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los conteos de leucocitos antes y después de cada inmunización	164
Tabla A10. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de linfocitos	165
Tabla A11. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los conteos de linfocitos antes y después de cada inmunización	166
Tabla A12. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de neutrófilos	166
Tabla A13. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los conteos de neutrófilos antes y después de cada inmunización	167
Tabla A14. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de monocitos	167
Tabla A15. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los conteos de monocitos antes y después de cada inmunización	168
Tabla A16. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de eosinófilos	169
Tabla A17. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los conteos de eosinófilos antes y después de cada inmunización	169
Tabla A18. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la razón N:L	170

Tabla A19. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de anticuerpos naturales obtenidos por la técnica de hemaglutinación	171
Tabla A20. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de anticuerpos naturales obtenidos por la técnica de ELISA	171
Tabla A21. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia de los niveles de anticuerpos naturales antes y después de cada inmunización	172
Tabla A22. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG) obtenidos por la técnica de ELISA	173
Tabla A23. Resumen de la selección de modelos que describen la influencia de la suplementación de alimento sobre la condición corporal	174
Tabla A24. Estimación de parámetros asociados con la condición corporal	174
Tabla A25. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con la razón neutrófilo:linfocito (N:L)	175
Tabla A26. Estimación de parámetros asociados con la razón neutrófilo:linfocito (N:L)	175
Tabla A27. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los indicadores seleccionados de inmunidad	176
Tabla A28. Estimación de parámetros asociados con el conteo total de leucocitos	178
Tabla A29. Estimación de parámetros asociados con el conteo de linfocitos	178
Tabla A30. Estimación de parámetros asociados con el conteo de monocitos ...	179
Tabla A31. Estimación de parámetros asociados con el conteo de eosinófilos ...	180
Tabla A32. Estimación de parámetros asociados con el conteo de neutrófilos ...	180
Tabla A33. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los niveles de anticuerpos naturales	181
Tabla A34. Estimación de parámetros asociados con los niveles de anticuerpos naturales	181
Tabla A35. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los tipos parasitarios analizados	182

Tabla A36. Estimación de parámetros asociados con la carga de nematodos gastrointestinales	184
Tabla A37. Estimación de parámetros asociados con la carga de cestodos gastrointestinales	185
Tabla A38. Estimación de parámetros asociados con la carga de garrapatas	185
Tabla A39. Estimación de parámetros asociados con la carga de ácaros	186
Tabla A40. Estimación de parámetros asociados con la carga de pulgas	186
Tabla A41. Estimación de parámetros asociados con la carga de piojos	187
Tabla A42. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación entre la razón N:L y parásitos presentes en roedores de vida libre	188
Tabla A43. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de nematodos gastrointestinales	189
Tabla A44. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de garrapatas	190
Tabla A45. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de pulgas	190
Tabla A46. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de nematodos gastrointestinales	191
Tabla A47. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de nematodos gastrointestinales	192
Tabla A48. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de cestodos gastrointestinales ...	193
Tabla A49. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de garrapatas	194
Tabla A50. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de garrapatas	195
Tabla A51. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de ácaros	196
Tabla A52. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de ácaros	197
Tabla A53. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de pulgas	197

Tabla A54. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de pulgas	198
Tabla A55. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de piojos	199
Tabla A56. Estimación de la asociación de los linfocitos y otros parámetros con la carga de piojos	200

Figuras

Figura 1a y b. Representación gráfica del “ <i>reactive scope model</i> ”	7
Figura 2. Línea de tiempo y diseño experimental	28
Figura 3. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de corticosterona plasmática total	32
Figura 4. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre las <i>zonas fasciculata</i> y <i>glomerulosa</i> de la corteza adrenal	34
Figura 5. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre medidas de consumo	35
Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la tasa máxima de crecimiento	42
Figura 7. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre medidas longitudinales de inversión somática y condición corporal	43
Figura 8. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre medidas de peso en Sem ₁₀ y Sem ₁₃	44
Figura 9. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre el peso relativo de órganos seleccionados	45
Figura 10. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de leucocitos	57
Figura 11. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en el conteo de leucocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	58
Figura 12. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de linfocitos	59

Figura 13. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en el conteo de linfocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	59
Figura 14. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de neutrófilos	60
Figura 15. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en el conteo de neutrófilos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	60
Figura 16. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de monocitos	61
Figura 17. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en el conteo de monocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	61
Figura 18. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los conteos semanales de eosinófilos	62
Figura 19. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en el conteo de eosinófilos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	63
Figura 20. Impacto de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la razón N:L	63
Figura 21. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de anticuerpos naturales (AcNs)	79
Figura 22. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre la diferencia semanal en los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) antes y después de los desafíos antigénicos con ASB	79
Figura 23. Influencia de la restricción alimentaria y el conflicto social sobre los niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG)	80
Figura 24. Localización geográfica de los sitios de captura de roedores sigmodontinos de vida libre	89
Figura 25. Número de roedores silvestres capturados luego de 21 sesiones de captura entre los años 2014 y 2016	97
Figura 26. Simulación del nivel de estrés (razón N:L) en roedores de vida libre, a partir de la inferencia de modelos múltiples	99

Figura 27. Simulación de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	101
Figura 28. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por nematodos gastrointestinales, según carga y especie	102
Figura 29. Simulación de la carga de nematodos en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	103
Figura 30. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por cestodos gastrointestinales, según carga y especie	103
Figura 31. Simulación de la carga de cestodos gastrointestinales en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	104
Figura 32. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por garrapatas, según carga y especie	104
Figura 33. Simulación de la carga de garrapatas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	105
Figura 34. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por ácaros, según carga y especie	105
Figura 35. Simulación de la carga de ácaros en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	106
Figura 36. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por pulgas, según carga y especie	106
Figura 37. Simulación de la carga de pulgas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	107
Figura 38. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por piojos, según carga y especie	108
Figura 39. Simulación de la asociación del estrés con la carga de nematodos gastrointestinales en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	109
Figura 40. Simulación de la asociación del estrés con la carga de garrapatas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples	109

Figura 41. Simulación de la asociación del estrés con la carga de pulgas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples 110

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac: anticuerpos

AcNs: anticuerpos naturales

ASB: albúmina sérica bovina

CORT: corticosterona

CS: conflicto social, en el cual el mecanismo de estrés social estuvo determinado tanto por inestabilidad social como hacinamiento (Blanchard y col., 2001) (Ver Capítulo II).

Ej.: ejemplo; por ejemplo

GCs: glucocorticoides

HCl: ácido clorhídrico

HPA: eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenocortical

h: hora

HRP: peroxidasa de rábano picante, del inglés “*Horseradish peroxidase*”.

μl: microlitro

min: minuto

mm: milímetro

nm: nanómetro

NK: células *natural killers*

OLS: órganos linfoides secundarios

RA: restricción alimentaria, representada por el acceso a un 60% de la ración promedio consumida por aquellos individuos con libre acceso al alimento (Ver Capítulo II).

r.p.m.: revoluciones por minuto

SAM: eje Simpático-Adreno-Medular

CAPÍTULO I

Introducción General

Los animales, tanto domésticos como silvestres, y al igual que los seres humanos, de manera rutinaria deben enfrentarse a un ambiente en cambio constante (Wingfield, 2013). Para ello, modifican su morfología, fisiología y comportamiento a lo largo de su ciclo de vida (McEwen y Wingfield, 2010). Estas modificaciones o ajustes son rutinarios, ocurriendo diariamente y, en algunos casos, de manera estacional (Boonstra, 2013a; McEwen y Wingfield, 2010). Las dificultades ecológicas con las que cada organismo debe lidiar habitualmente son las características abióticas propias de su ambiente, la competencia por recursos escasos (ej., alimento, refugio), el ambiente social (competencia inter- e intra-específica) y predadores (Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014). Además, deben considerarse la exposición e infección por parásitos, enfermedades, lesiones, entre otros (McEwen y Wingfield, 2010). En consecuencia, en su ambiente natural, los organismos deben exhibir una vasta serie de adaptaciones que les permitan hacer frente a esta amplia gama de dificultades (Boonstra y col., 2014).

Esto es particularmente cierto y notorio en un contexto de cambio global y climático, en que tanto los factores bióticos y abióticos se encuentran sufriendo modificaciones rápidamente (Angelier y Wingfield, 2013; IPCC, 2014). Mayormente, estos cambios son consecuencia de la actividad humana, que ocasiona destrucción y fragmentación del hábitat, contaminación, introducción de especies exóticas y cambios en las características climáticas (Angelier y Wingfield, 2013). Existe cada vez mayor evidencia que demuestra que el cambio climático resultará en más y mayores eventos climáticos extremos (Angelier y Wingfield, 2013; IPCC, 2014). La incidencia de catástrofes climáticas (como sequías, inundaciones, olas de calor o frío, tormentas) se ha incrementado unas 10 veces en los últimos 50 años (IPPC, 2014). Aunque sus consecuencias sean difíciles de predecir, es innegable que estas perturbaciones impactan sobre los individuos y las poblaciones, alterando su relación con el ambiente en que viven (Angelier y Wingfield, 2013; Martin y col., 2010; Refsnider y col., 2015; Wingfield y col., 2011): se estimulan cambios en su comportamiento, fisiología o morfología, en un intento de ajustarse a las nuevas condiciones dominantes (Angelier y Wingfield, 2013; Wingfield y col., 2011). A su vez, la combinación de estos cambios bien puede amplificar o moderar los efectos de la selección natural actuante sobre los individuos y poblaciones afectados (Boonstra, 2013a; Wingfield y col., 2011). El eje de estrés (ver a continuación) desempeñará un rol

primordial como mediador de los mecanismos fisiológicos que los organismos puedan poner en juego para hacer frente a estos desafíos, y así incrementar sus posibilidades de adaptación (Angelier y Wingfield, 2013; Boonstra y col., 2014).

Estrés: breve revisión de conceptos, fisiología y consecuencias

Dado lo extenso del tema y la inmensurable bibliografía disponible, en pos de la brevedad, limitaré esta revisión a los principales aspectos que considero relevantes para el desarrollo de esta tesis. Además, cabe consignar que el tema se abordará desde un punto de vista ecológico.

A pesar de que generalmente la palabra “estrés” posee una connotación negativa, el estrés se encuentra presente de manera constante en cada aspecto de la vida (Dhabhar, 2014). Sin embargo, definir adecuadamente la palabra “estrés” nunca ha sido una tarea sencilla (Bartolomucci, 2007; Beldomenico y Begon, 2015; Dantzer y col., 2014; Romero, 2004): “todos dicen conocer lo que es el estrés, y nadie sabe lo que es” expresaba en 1936 Hans Selye, precursor del término que actualmente usamos (en Bartolomucci, 2007), para reflejar la complejidad en torno al tema y la dificultad para brindar definiciones precisas. En términos generales, el apelativo “estrés” se utiliza para describir un estado de amenaza, real o percibida, para la supervivencia de un organismo o el mantenimiento de su “homeostasis” (ver en “Glosario”) (McEwen y Wingfield, 2003; Nicolaidis y col., 2015). Adicionalmente, se refiere al evento, o sucesión de eventos, que desencadenan cambios fisiológicos y/o comportamentales para ayudar a restablecer la homeostasis del organismo, por sobre aquellos impuestos por el ciclo normal de vida (Avitsur y col., 2009; McEwen y Wingfield, 2003).

Sin embargo, el término “estrés” se ha tornado ambiguo, ya que ha sido utilizado de manera indistinta para referirse tanto al evento que lo desencadena, como a la respuesta desencadenada y a la respuesta desproporcionada que culmina en enfermedad (Beldomenico y Begon, 2015; Dantzer y col., 2014; McEwen y Wingfield, 2003; Romero, 2004). Por tanto, corresponde indicar que se denomina “estresor” al estímulo, tanto interno como externo, que es percibido y procesado por el organismo, y que luego es capaz de alterar el estado de homeostasis y desencadenar la denominada “respuesta de estrés” (aquellos mecanismos fisiológicos, hormonales y comportamentales puestos en juego para sobrevivir o recuperarse de las condiciones adversas impuestas por el estresor) (Avitsur y col., 2009; Boonstra, 2013a; Nicolaidis y col., 2015; Romero, 2004). En tanto, Martin (2009) va más allá al juzgar al estresor como un estímulo adverso que

comprometerá la eficacia biológica, o “*fitness*”, del organismo si no es resistido o evitado de manera exitosa. A modo de ejemplo, los estresores podrían incluir cambios ambientales (como temperaturas extremas), dificultades fisiológicas (como escasez de alimento o agua), cargas psicosociales (como conflictos sociales, presencia de predadores) e incluso la infección por parásitos (Avitsur y col., 2009; Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a).

Según Boonstra (2013a) los estresores pueden ser diferenciados en “reactivos” y “anticipatorios” de acuerdo al grado de percepción por parte del organismo. Los estresores reactivos constituyen desafíos fisiológicos directos, que amenazan de manera directa a la homeostasis (Sapolsky y col., 2000). A modo de ejemplo, incluyen estímulos como frío, distrés respiratorio, dolor somático o visceral, pérdida de sangre, y señales concernientes a procesos infecciosos o inflamatorios (ej., citoquinas) y relativas al balance de energía (glucocorticoides, insulina, leptina). Estos estresores desencadenan respuestas que no requieren de un proceso cognitivo avanzado. En tanto que la segunda clase, los estresores anticipatorios, son señales ambientales percibidas por el organismo como una amenaza para la supervivencia o para el equilibrio homeostático, por lo que poseen una fuerte base psicológica (Boonstra, 2013a). Estas señales estimulan una respuesta anticipada a la amenaza (basada en la secreción de glucocorticoides [GCs¹]), sin necesidad de un perjuicio fisiológico. Claramente, estas señales requieren que el organismo “interprete” el significado de estas señales, lo que puede ocurrir como consecuencia de respuestas innatas específicas de la especie en cuestión (ej., miedo instintivo) o responder a experiencias previas (Boonstra, 2013a).

En cuanto a la caracterización de los estresores, uno de los puntos de mayor controversia se refiere a su predictibilidad y la capacidad para controlarlos (particularmente, la percepción de poder hacerlo [Koolhaas y col., 2011]). Desde un punto de vista biomédico, diversos autores indican que para ser considerado estresor el estímulo debiera ser impredecible y/o incontrolable (Koolhaas y col., 2011; Martin, 2009; Romero, 2004). Una situación impredecible se caracteriza por la ausencia de una respuesta fisiológica anticipatoria; mientras que la pérdida de control se refleja en una recuperación

¹ La abreviatura “GCs” hace referencia a los glucocorticoides de manera general, indistintamente se trate de cortisol o corticosterona.

demorada luego de la respuesta de estrés y por la presencia de adrenalina en la respuesta (Koolhaas y col., 2011).

En el área biomédica, la predictibilidad de un estímulo estresor es asociada a su previsión cognitiva luego de la exposición repetida al mismo (Beldomenico y Begon, 2015; Koolhaas y col., 2011), lo que ocurre a lo largo de la vida del individuo (Beldomenico y Begon, 2015). Esta habilidad de prever la demanda a la que se verá expuesto el organismo le permite actuar de manera anticipada, lo que mejora sus posibilidades de sobreponerse a la situación y sobrevivir. En consecuencia, los estímulos aversivos que son predecibles son menos propensos a ocasionar perjuicios al organismo que aquellos impredecibles (Beldomenico y Begon, 2015). En tanto, desde el área de la fisiología ecológica, se utiliza el término “predecible” para aquellos desafíos ambientales que ocurren de manera regular a lo largo de la historia de vida de una especie (McEwen y Wingfield, 2010; Wingfield, 2013), sin ponderar que quizás el individuo enfrente el desafío una sola vez en su vida (Beldomenico y Begon, 2015). De acuerdo a lo expuesto, lo más probable es que un estresor impredecible sea incontrolable; sin embargo, en una población natural, un estímulo predecible podría representar un estresor incontrolable. A su vez, algunos factores ambientales podrían ser incontrolables para algunos individuos pero no para otros, tornando la distinción entre controlable e incontrolable poco aplicable a nivel poblacional (Boonstra, 2013a). Esto dependerá de factores propios del estímulo (ej., intensidad), de las características propias de cada individuo (ej., genotipo y fenotipo), y las interacciones presentes (Beldomenico y Begon, 2015).

En concordancia con lo anterior, y de manera complementaria a la clasificación cualitativa de los estresores, los mismos también debieran ser considerados de acuerdo a su dimensión cuantitativa, es decir, su magnitud o intensidad (Koolhaas y col., 2011). La interpretación del organismo sobre la situación puede variar entre el control total, un control parcial o, por el contrario, la ausencia absoluta de control. Como tal, un estímulo podría constituir un estresor moderado con consecuencias potenciales, o constituirse en una amenaza directa que ponga en riesgo la supervivencia. Así es como un estímulo podría ser percibido como una demanda moderada por gran parte de la población, mientras que para una fracción de los individuos podría representar un estresor severo (Beldomenico y Begon, 2015). Aún más, enfrentado a una situación estresante, la interpretación que realiza de ella el organismo parece contribuir a la gravedad de sus consecuencias (Koolhaas y col., 2011; Romero, 2004).

Por todo lo expuesto, es evidente la complejidad reinante al definir y brindar precisiones sobre un estresor y su impacto. Más aun considerando que la respuesta puede variar entre individuos de una misma especie. Es por ello que cada caso y cada sistema deben ser evaluados cuidadosamente, de manera de realizar las interpretaciones más acordes a la situación. En este caso, y en concordancia con lo planteado por Beldomenico y Begon (2015), se considerará estresores a aquellos estímulos que inciten una respuesta que exceda la capacidad adaptativa del organismo (ver a continuación), pero no necesariamente como resultado de un estímulo considerado *a priori* como impredecible y/o incontrolable.

Respuesta de estrés

En líneas generales, la “respuesta de estrés” consiste de una cascada de eventos adaptativos, iniciada cuando un estresor es percibido por el organismo en cuestión (Beldomenico y Begon, 2015). Existe consenso en reconocer que el organismo ejecuta una serie de respuestas inespecíficas ante el estrés, mediadas por reacciones comportamentales y por la activación de dos sistemas clave: el eje Simpático-Adreno-Medular (SAM) y el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenocortical (HPA) (Angelier y Wingfield, 2013; Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014; Demas y col., 2011a; Koolhaas y col., 2011). Ambos sistemas poseen un rol primordial en la regulación de energía y la movilización de nutrientes y oxígeno a los tejidos (Koolhaas y col., 2011). El primero de estos ejes (SAM), regula principalmente los cambios fisiológicos asociados a una respuesta aguda, los cuáles consisten en la preparación para “luchar o huir” (del inglés *fight or flight*) (Boonstra y col., 2014). En cambio, si el estímulo estresor persiste, el eje HPA, a través de la secreción de GCs, regula la utilización de energía, pone en marcha procesos catabólicos, y suprime aquellas funciones fisiológicas innecesarias para lidiar con el estresor (Boonstra y col., 2014). Esta exposición continua al estímulo estresor podría resultar en habituación y declinación gradual de la respuesta, o en agotamiento del eje y eventualmente la muerte del individuo (Beldomenico y Begon, 2015).

Más allá de estos dos mecanismos centrales e inespecíficos, actualmente se reconoce la existencia de una amplia variedad de respuestas de estrés específicas (Avitsur y col., 2009). De hecho, en años recientes se ha reportado que estresores específicos inducen respuestas fisiológicas diferenciales, que incluyen activación de patrones cerebrales, expresión de receptores específicos y liberación de neurotransmisores (Bowers y col.,

2008). Incluso las respuestas puestas en marcha ante al estrés son dependientes del contexto y reflejarían diferencias ambientales, temporales (ej., momento del día, estacionalidad, historia de vida), experiencia adquirida sobre estresores previos, contexto social y variación individual (Bowers y col., 2008; Romero, 2004; Romero y col., 2015).

Con respecto a la respuesta de estrés, habitualmente se la analizaba en el contexto de la respuesta homeostática de “restituir los procesos fisiológicos alterados para restablecerlos en los valores constantes” (Koolhaas y col., 2011; McEwen y Wingfield, 2010; Wingfield, 2005). Sin embargo, sumado a la noción de que estresores diversos actuarían por vías diferentes, se ha comenzado a reconocer que esta concepción no incorpora de manera adecuada todos los procesos afrontados por los organismos, que son regulados por acción del eje de estrés: el balance homeostático de la rutina diaria, la respuesta a perturbaciones, los cambios en la susceptibilidad a esas perturbaciones y los ajustes anticipatorios para hacerles frente al menos durante parte del ciclo de vida (Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014; Dhabhar, 2014; McEwen y Wingfield, 2010). Así es como el concepto de homeostasis ha perdido vigencia y ha sido complementada por el de “alostasis”, el cual integra los mecanismos necesarios para establecer nuevos niveles del proceso fisiológico en cuestión, en previsión de demandas próximas (Koolhaas y col., 2011; McEwen y Wingfield, 2010). En pocas palabras, se define como “mantener la estabilidad a través del cambio” (McEwen y Wingfield, 2010). Es decir, la alostasis considera a la respuesta fisiológica no como un esfuerzo por mantener estable un punto fijo, sino como la modificación del mismo en ajuste a una predicción (Koolhaas y col., 2011). En definitiva, es más eficiente “prevenir que curar”.

Más recientemente, la noción de alostasis ha sido refinada y puesta en contexto en el marco del “*reactive scope model*” (Koolhaas y col., 2011; Romero y col., 2009) (Fig. 1a y b). Este marco de interpretación indica que los organismos (tanto a nivel de especie como de individuo) pueden desempeñarse adecuadamente en un determinado rango de variación de las condiciones ambientales, sin requerir de cambios adaptativos, y siendo mediado por una “homeostasis predictiva” (Romero y col., 2009). Este rango es denominado “rango regulatorio”. Este rango regulatorio debe diferenciarse de la “capacidad adaptativa”. Ésta última comprende las respuestas comportamentales y fisiológicas necesarias para adaptarse a las nuevas condiciones del entorno (“homeostasis reactiva”), pero encontrándose optimizada para un rango de condiciones ambientales (rango regulatorio) (Romero y col., 2009). La distinción entre rango regulatorio y

capacidad adaptativa implica que un estímulo estresor puede afectar tanto uno como la otra. Asimismo, es de importancia destacar que el concepto de rango regulatorio no sólo posee un aspecto cuantitativo, sino también cualitativo. Esto se refiere a que, incluso en una misma especie, los individuos pueden diferir cualitativamente en la manera en que lidian con los desafíos ambientales (Beldomenico y Begon, 2015; Romero y col., 2009).

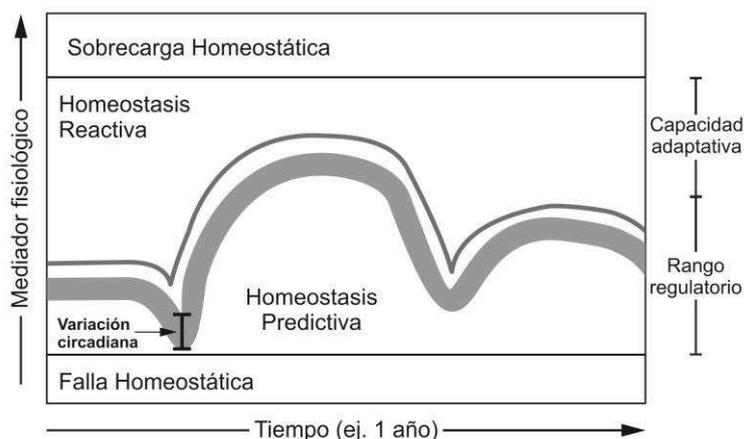


Figura 1a. Representación gráfica del “reactive scope model” (tomado y adaptado de Romero y col., 2009).

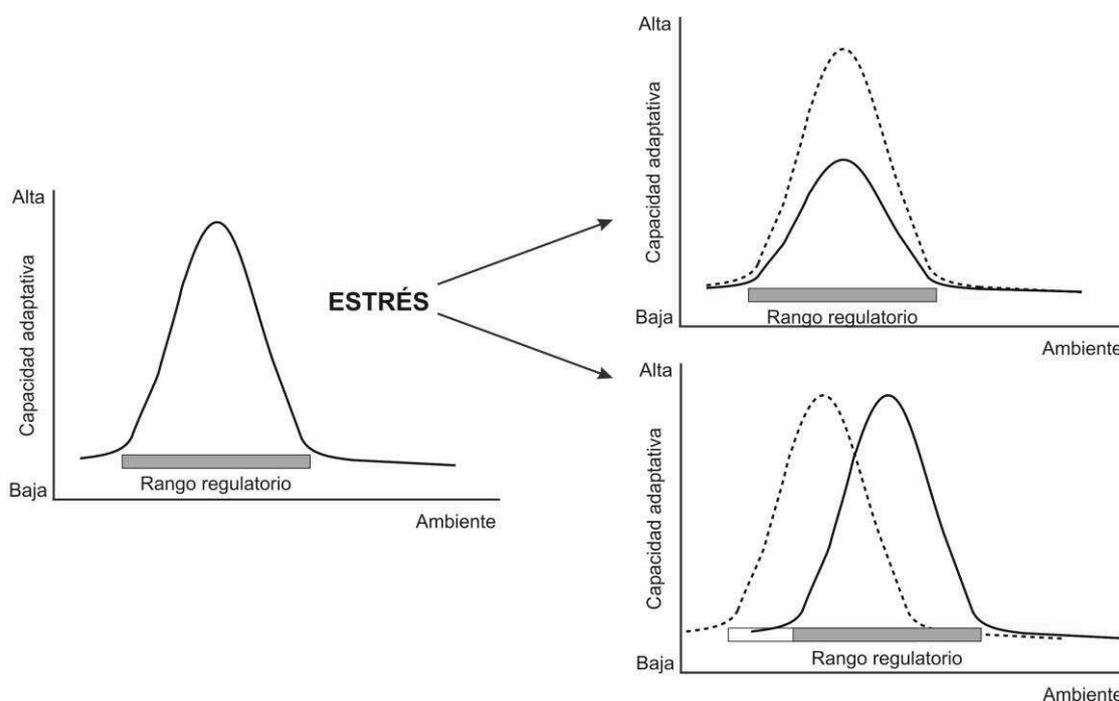


Figura 1b. Representación gráfica del “reactive scope model” (tomado y adaptado de Koolhaas y col., 2011).

En cuanto a las consecuencias sobre el organismo, se denomina “eustrés” cuando la respuesta de estrés logra mejorar, a veces por completo, los efectos del estresor; mientras que el término “distrés” describe el estado en que el organismo es incapaz de adaptarse o contrarrestar los efectos del estresor, comprometiendo su bienestar y *fitness* (Beldomenico y Begon, 2015; Pekow, 2005). Claramente que una respuesta beneficiosa, enmarcada en eustrés, igualmente tendrá un costo para el organismo (ej., en términos energéticos). Sin embargo, este entendimiento es puesto en duda por numerosos autores. Retomando la controversia sobre que los estresores deben ser impredecibles y/o incontrolables, estos autores simplifican la interpretación igualando estrés a distrés, indicando que el estrés ocurre ante situaciones impredecibles o incontrolables (McEwen y Wingfield, 2010), cuando el organismo es superado en su capacidad de adaptación (Beldomenico y Begon, 2015; Koolhaas y col., 2011). En tanto que el término eustrés no suele ser siquiera considerado (Beldomenico y Begon, 2015), y con ello tampoco la posibilidad de que el organismo sea capaz de montar una respuesta de estrés beneficiosa.

Esto último no sería lo adecuado al considerar individuos de la fauna silvestre. Esto se debe a que su estado de salud es extremadamente dinámico, al tiempo que constantemente se encuentran expuestos a situaciones que desencadenan respuestas de estrés, las cuáles pueden o no ser consideradas como impredecibles o incontrolables (Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a; Schultner y col., 2013). Por otro lado, para los animales silvestres también es relevante considerar las repercusiones del estrés a nivel poblacional. El hecho de que los individuos de una misma especie puedan presentar diferentes rangos regulatorios implica que lo que puede ser percibido como estresor para algunos no lo sea por otros, a pesar de enfrentarse a las mismas condiciones ambientales (Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a; Koolhaas y col., 2011; Romero y col., 2009). Aún más, esta variación en la percepción, y por tanto en la respuesta, posee consecuencias sobre el *fitness* individual y valor adaptativo (Koolhaas y col., 2011).

Evolución de la respuesta de estrés

Desde una mirada biomédica, tanto en humanos como animales domésticos, lo usual es que el estrés sea considerado perjudicial y se lo asocie a enfermedad. Sin embargo, desde un punto de vista ecológico, la variación en la percepción del estresor y en la respuesta incitada es considerada de utilidad como mecanismo adaptativo (Beldomenico y Begon, 2015; Dhabhar, 2014; Koolhaas y col., 2011). La evidencia reciente sugiere que la respuesta de estrés es consecuencia de fuerzas evolutivas que actúan sobre el *fitness*

del individuo (ej., supervivencia y reproducción), optimizando la respuesta ante desafíos ambientales específicos a través de una alostasis apropiada (Angelier y Wingfield, 2013; Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a). Lo mismo aplica para el estrés crónico. Es decir, si este supone una respuesta adaptativa beneficiosa, el organismo evolucionará para mantenerla; por el contrario, si supone una respuesta deletérea o perjudicial, el organismo sólo responderá de manera aguda (Boonstra, 2013a).

Los ajustes impuestos por una respuesta alostática poseen ventajas evidentes, pero pueden ser fisiológicamente costosas (Beldomenico y Begon, 2015; McEwen y Wingfield, 2010). Por tanto, si las consecuencias impuestas por el estímulo son menores, el organismo podría optar por ignorarlo y destinar los recursos para procesos fisiológicos más necesarios (Beldomenico y Begon, 2015). Así es como en el curso evolutivo de una especie, al enfrentarse a desafíos ambientales predecibles (ej., escasez de alimento) e impredecibles (ej., inundaciones, sequías), la respuesta de estrés ha sido moldeada por “*trade-offs*” (intercambios) que determinan un balance entre costos y beneficios (Beldomenico y Begon, 2015). Por tanto, dos especies filogenéticamente cercanas que pueden compartir mecanismos y mediadores ante el estrés, igualmente podrían presentar respuestas de estrés contrastantes, lo que surge mayormente de sus historias de vida diferentes (Beldomenico y Begon, 2015; Boonstra, 2013a).

Estrés crónico

Adicionalmente a las consideraciones previas sobre tipos de estresores, los mismos pueden ser clasificados de acuerdo a la frecuencia o duración de su impacto. Todos ellos pueden actuar de manera aguda (de corta duración, minutos u horas) o crónica (de mayor duración, típicamente días a semanas), y no necesariamente de manera independiente (Boonstra, 2013a; Brooks y Mateo, 2013; Dhabhar, 2014). Es decir, libremente del tipo de estresor y de su duración, algunos estresores agudos pueden poseer impactos prolongados (Boonstra, 2013a; Chester y col., 2010). Una característica importante del estrés crónico es que la respuesta fisiológica puede persistir de manera sostenida luego de que el estresor haya cesado (Dhabhar, 2014). A modo de ejemplo, luego del ataque de un predador o de un conoespecífico dominante, el individuo podría permanecer en alerta durante largo tiempo ante la posibilidad de que el ataque se repita, ocasionando una respuesta anticipada (ver “estresores anticipatorios”) de manera sostenida y, por consiguiente, estrés crónico (Boonstra, 2013a; Brooks y Mateo, 2013; Clinchy y col., 2013). A su vez, la exposición repetitiva a un estresor agudo puede producir un efecto

similar (Brooks y Mateo, 2013; Dhabhar, 2014). En resumen, se considera que un organismo se encuentra estresado de manera crónica cuando existe activación prolongada del eje HPA (Boonstra, 2013a; Romero, 2004) y consecuente incremento en la exposición a hormonas de estrés (principalmente GCs) (Dhabhar, 2014). Por tanto, el definir un estresor como agudo o crónico no debiera estar sólo basado en su duración inmediata, sino también en su frecuencia y en la duración de sus consecuencias sobre la fisiología del animal (Boonstra, 2013a), la cual puede tener efectos duraderos y profundos sobre la fisiología y comportamiento del organismo (Chester y col., 2010).

De acuerdo a lo expuesto sobre predictibilidad y control, se debe contemplar que la exposición repetida a un estímulo aumentará su predictibilidad y con ello su control (Koolhaas y col., 2011). Es lógico suponer que un estímulo percibido como estresor al comienzo del mismo, deje de serlo luego de un tiempo. La declinación gradual de la respuesta de estrés ante estímulos repetitivos ha sido usualmente interpretada como “habituaación”. Sin embargo, hay autores que argumentan que esta habituación del eje HPA es consecuencia de un procesamiento adaptativo a nivel nervioso central, que conduciría a mayor predictibilidad y control de la situación desafiante (Koolhaas y col., 2011).

Consecuencias del estrés crónico

Desde una visión biomédica, usualmente se asume que el estrés crónico es perjudicial (Boonstra, 2013a; Dhabhar, 2014), y que cuando un organismo lo sufre, el mismo resulta en la presentación de patologías asociadas: alteraciones cardiovasculares, hipertensión, úlceras, resistencia a la insulina, desórdenes inmunológicos, enfermedades infecciosas, entre otros (Boonstra, 2013a). Tanto es así, que incluso hay autores que indican que la exposición sostenida a hormonas de estrés ocasiona la disrupción y/o alteración de numerosos procesos fisiológicos, negando la posibilidad de que el estrés crónico pudiera representar alguna ventaja (ej., Dhabhar, 2014). Las respuestas nocivas se presentarían ante la desregulación del eje HPA, consecuencia de diversas anomalías, no excluyentes entre sí: i) percepción inapropiada de la perturbación, ii) integración inapropiada de la información por parte de los mecanismos centrales; iii) respuesta inadecuada por parte de las células/tejidos/órganos blanco, iv) ausencia de retroalimentación (“*feedback*”) negativa entre las glándulas adrenales y el encéfalo (Angelier y Wingfield, 2013; Boonstra, 2013a; Dhabhar, 2014). Estas respuestas nocivas son perjudiciales para el individuo, incluyendo supresión reproductiva, inmunosupresión, supresión del

crecimiento, entre otras (Boonstra, 2013a; Romero y col., 2009). La consecuencia neta de este proceso es la disminución del *fitness* individual, lo que incluso podría ocasionar la muerte del mismo (Boonstra, 2013a).

Sin embargo, en los últimos años, ha comenzado a reconocerse que el estrés crónico no siempre estaría asociado a efectos perjudiciales (Romero y col., 2015). Aún más, Boonstra (2013a) desafía la visión biomédica al afirmar que el estrés crónico existe en la naturaleza, pero no así su impacto biomédico -patología-. Así es que, a pesar de lo que se considera habitualmente, el organismo que se encuentra estresado de manera crónica dispondría de ciertas ventajas (Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014). En respuesta al estímulo del eje HPA, diversas especies de roedores favorecen la secreción de andrógenos adrenales, que les permite hacer frente a los duros periodos de hibernación o a la competencia intra-específica en pos de territorios favorables y alimento durante el invierno (Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014). En tanto que en otras especies, el estímulo crónico del eje HPA en hembras gestantes estimula un fenómeno de “*imprinting*” perinatal materno, maximizando el *fitness* de su descendencia ante las condiciones ambientales adversas que les toque afrontar (Boonstra y col., 2014; Dantzer y col., 2013). Aún más, juveniles de rata de laboratorio expuestos crónicamente a estresores impredecibles, han demostrado mejor rendimiento cuando son estresados nuevamente durante su adultez (Chaby y col., 2015, 2016). Por otro lado, en animales de laboratorio se ha encontrado que la función del eje HPA se deteriora conforme el individuo envejece (Sapolsky y col., 1986). Dado que la existencia de este deterioro no ha sido evidenciada en vertebrados silvestres, cabría preguntarse sobre la real importancia del eje de estrés en estas especies (Boonstra y col., 2014). Cuál indicado previamente, el hecho de que el estrés crónico resulte en patología, y por tanto perjudique el *fitness* y la supervivencia del organismo, no parece ser una respuesta adaptativa adecuada. Sino que más bien lo contrario, actuaría selectivamente en contra del individuo capaz de desarrollar tales respuestas.

Breve descripción del sistema inmune

Siendo que exponerse a un patógeno² supone una de las mayores amenazas que pone en riesgo la supervivencia de un individuo (Babayán y col., 2011; Bradley, 2015; Raffel y col., 2008), el sistema inmune y su funcionamiento han evolucionado para maximizar el *fitness* del individuo en su ambiente natural (Abolins y col., 2011). Para resistir o eliminar a los patógenos, el sistema inmune ejerce su acción a través de numerosos procesos (Martin y col., 2007a; Viney y col., 2005), clásicamente divididos en mecanismos innatos (o inespecíficos) y adquiridos (o adaptativos), compuestos ambos por componentes humorales y celulares (Murphy, 2012; Viney y col., 2005; Young y col., 2015a). En general, los mecanismos innatos (respuesta inmune innata) son inespecíficos y actúan relativamente rápido, sirviendo como línea de defensa inicial ante un patógeno invasor. Estos mecanismos incluyen barreras anatómicas (piel y membranas mucosas), microorganismos residentes, factores humorales (lisozimas, complemento, proteínas de fase aguda y anticuerpos naturales) y respuestas celulares (células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y macrófagos; mediadores inflamatorios liberados por basófilos, mastocitos y eosinófilos) (Demas y col., 2011b; Murphy, 2012). Por otro lado, los mecanismos adquiridos (respuesta inmune adquirida) son típicamente más lentos, pero de tipo patógeno-específico, para lo cual requieren activación. Su mayor valor radica en que, ante una nueva exposición al patógeno, estos mecanismos ponen en juego una respuesta secundaria veloz, de mayor especificidad y magnitud. De igual manera que la respuesta innata, presentan componentes celulares (células derivadas de linfocitos, como ser linfocitos T citotóxicas, linfocitos T colaboradores o *helpers*, que a su vez son capaces de reclutar otros tipos celulares) y componentes humorales (principalmente anticuerpos, producidos por linfocitos B) (Demas y col., 2011b; Murphy, 2012).

Mientras que la exposición al patógeno es mediada principalmente por el comportamiento del hospedador (Barron y col., 2015) (lo que no será tratado en esta tesis), la función inmune es responsable de modular los demás estadios de la interacción hospedador-patógeno: establecimiento, desarrollo y proliferación o reproducción sexual (Beldomenico y Begon, 2015). Como es lógico suponer, la puesta en marcha y

² En la presente tesis me refiero a patógeno y parásito indistintamente, tal como es utilizado en ecología de enfermedades o eco-epidemiología, y se define como: agente transmisible que mantiene con su hospedador una interacción inter-específica de parasitismo que resulta, en mayor o menor medida, deletérea para este último (mayor información en Glosario).

mantenimiento de este vital sistema de defensa no se encuentra exento de costos (Cutrera y col., 2010; Demas y col., 1997; Hanssen y col., 2004; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Martin y col., 2003; Valtonen y col., 2010). Estos costos son substanciales, variables entre componentes del sistema inmune y modificados por las condiciones ambientales (McDade y col., 2016). El reconocimiento de su importancia es menester a causa de la relación descrita entre la función inmune, otros procesos fisiológicos (ej., reproducción y crecimiento) y los estresores ambientales. La activación de defensas inmunes es fisiológicamente costoso, incluso en ausencia de infección (Cutrera y col., 2010; Derting y Compton, 2003; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Valtonen y col., 2010). En el caso de la inmunidad adquirida requiere de energía y precursores proteínicos (aminoácidos) para la generación de un extenso pool de linfocitos B y T con diferente especificidad antigénica. Se ha estimado que aproximadamente un 95% de este pool será eliminado en el timo durante un riguroso proceso de selección previo a su liberación al torrente sanguíneo, lo que torna al proceso en costoso e ineficiente. Por el contrario, el desarrollo de la inmunidad innata, que también requiere de energía y precursores proteínicos, supone un costo menor a causa de su gradualidad y mayor eficiencia. En cuanto al mantenimiento, en ambos tipos de inmunidad se supone que el costo es bajo, consistiendo en el reemplazo de células y proteínas solubles según su vida media. Por otro lado, aunque es complejo aislar entre inmunidad innata y adquirida (la respuesta inmune involucra ambos mecanismos), los costos de activación suelen ser altos, reflejado por cambios en la actividad metabólica del organismo. De todas maneras, se puede inferir que la activación de la inmunidad adquirida, particularmente ante respuestas secundarias, requiere de escasos recursos, al tiempo que inflige menores daños colaterales. En cambio, los mecanismos innatos tienen el potencial de ocasionar mayor daño al organismo, por su ausencia de especificidad, requiriendo de una mayor cantidad de recursos para subsanarlo (McDade y col., 2016; Murphy, 2012).

En consecuencia, es de esperar que diferentes ambientes y situaciones (al fin y al cabo, estresores) impongan distintos desafíos sobre el individuo, lo que conlleva a que la inversión de recursos entre procesos fisiológicos concurrentes sea dependiente del contexto. Esta inversión diferenciada es modulada por los ejes SAM y HPA, principalmente a través de catecolaminas y hormonas adrenales (Boonstra y col., 2014; Demas y col., 2011a; Martin, 2009; Neuman-Lee y col., 2015; Nicolaidis y col., 2015;

Wingfield, 2005), formando parte de las estrategias puestas en marcha en respuesta a los estresores ambientales.

Influencia del estrés sobre el sistema inmune

Es bien conocido que las hormonas de estrés regulan la actividad del sistema inmune en vertebrados e invertebrados, y que en vertebrados estas mismas hormonas pueden ejercer tanto un efecto inmunosupresor como inmunoestimulante (Demas y col., 2011a). De hecho, la activación inmune requiere de niveles basales de GCs, en tanto que sus efectos dependen mayormente de la duración de la exposición a los estresores, del tipo de estresor y de la respuesta inmune analizada (Beldomenico y Begon, 2015; Demas y col., 2011a), lo que conlleva a que distintos tipos de estrés ejerzan efectos diversos sobre cada componente del sistema inmune (Bowers y col., 2008; Brooks y Mateo, 2013; Chester y col., 2010). En general, se considera que la respuesta inmune se incrementa (particularmente a través de procesos innatos) en respuesta de estrés agudo, mientras que el estrés crónico habitualmente la desregula o deprime (Beldomenico y Begon, 2015; Dhabhar, 2014; Martin, 2009). Incluso se ha sugerido que la inducción inmunológica durante el estrés agudo sería uno más de los componentes de la respuesta “luchar o huir”, representando un mecanismo adaptativo para conferir protección ante heridas o infecciones (Dhabhar, 2014). El estrés agudo, a través de la secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) y GCs, incita un estado de “redistribución inmunológica” que favorece la migración de componentes inmunes desde órganos linfoides centrales hacia tejidos linfoides periféricos (piel, mucosas gastrointestinal y urogenital, pulmones, hígado y nódulos linfáticos) (Demas y col., 2011a; Dhabhar, 2014). Así es como durante el estrés agudo se observa una leucocitosis inicial seguida de linfopenia, monocitopenia y neutrofilia, con incremento del eritema, de leucocitos infiltrados en tejidos y de la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias (Demas y col., 2011a). Como consecuencia de esta redistribución inmunológica e inducción pro-inflamatoria, el estrés agudo experimentado de manera simultánea a la exposición antigénica, estimula tanto las respuestas inmune innata como adaptativa (revisado en Dhabhar, 2014). Este estímulo inicial de las defensas innatas representaría una estrategia para soportar o recuperarse del impacto y potenciales desafíos inmunes impuestos por los estresores (Beldomenico y Begon, 2015; Demas y col., 2011a; Dhabhar, 2014).

Por el contrario, el estrés crónico conduce a la secreción prolongada de GCs y la subsecuente supresión del sistema inmune (Demas y col., 2011a; Dhabhar, 2014; Martin,

2009). De hecho, la escasez prolongada de alimento deprime la respuesta inmune en una amplia variedad de especies (Graham y col., 2015; Hangalapura y col., 2005; Houston y col., 2007; Książek y Konarzewski, 2012; Neuman-Lee y col., 2015), e incluso compromete la memoria inmunológica (Martin y col., 2007a, 2008). De manera similar, la inestabilidad social y el hacinamiento también ejercen un impacto mayormente supresor sobre la función inmune (Bartolomucci, 2007; Bartolomucci y col., 2003; Martin, 2009). Para explicar esta supresión inmunológica se han postulado diversas hipótesis: las dos primeras, vinculadas al uso de los recursos energéticos, indican que i) se favorecería la movilización de recursos hacia funciones fisiológicas de mayor prioridad para la supervivencia inmediata del individuo, o que ii) la función inmune se sacrificaría en pos de procesos más críticos (Beldomenico y Begon, 2015; Martin, 2009). En una tercer explicación se interpreta que la inmunosupresión prevendría la activación excesiva de componentes inmunes, protegiendo al organismo de desórdenes autoinmunes o de los perjuicios ocasionados por el exceso de factores inflamatorios (Beldomenico y Begon, 2015; Demas y col., 2011a; Martin, 2009). Sin embargo, el análisis detallado de estas hipótesis sugiere algunos inconvenientes: suprimir el sistema inmune es fisiológicamente costoso y requiere de tiempo, por lo que sólo se ahorrarían recursos en el largo plazo; en tanto que la prevención de daños autoinmunes incluye esencialmente a la inmunidad adquirida, lo que no explicaría los cambios en la inmunidad innata (Martin, 2009). Aún más, todas ellas ignoran el costo más elevado que afrontaría el organismo: suprimir un sistema que podría ser esencial para la recuperación ante el estresor, justamente en el momento de necesidad (Martin, 2009). Así es como, en un contexto evolutivo, podría suponerse que deprimir el funcionamiento del sistema inmune durante el estrés crónico no representaría una estrategia razonable (Beldomenico y Begon, 2015; Dhabhar, 2014; Martin, 2009). Cabe considerar que la inmunosupresión ocasionada por el estrés crónico bien pudiera ser adaptativa (recordando que el ahorro de recursos sería efectivo en el largo plazo); o, en cambio, pudiera deberse a la incapacidad de hacer frente a las demandas impuestas por los estresores y por tanto podría ser considerado como distrés o sobrecarga alostática (Beldomenico y Begon, 2015; Martin, 2009).

En vista de lo expuesto, considerando que existen numerosos factores que pueden afectar la inmunidad de un individuo (Abolins y col., 2011), la variedad de estresores (revisado anteriormente), y la complejidad propias de la respuesta de estrés y del sistema inmune, resulta arriesgado aventurar patrones concretos acerca de la interacción

inmunidad-estrés (Boonstra y col., 2014; Brooks y Mateo, 2013; Martin, 2009; Wingfield, 2013; Wingfield y col., 2011).

Relevancia del estudio

La mayor parte de las enfermedades infecto-contagiosas que aquejan a la humanidad, particularmente a sectores vulnerables de la sociedad, tienen su origen en los animales (Thompson, 2013; Webster y col., 2016). Entre ellos, los roedores constituyen reservorios eficientes para innumerables patógenos, sólo comparables con los quirópteros (murciélagos) (Han y col., 2016; Himsworth y col., 2013; Luis y col., 2013; Meerburg y col., 2009), por lo que un mejor entendimiento de las dinámicas de agentes transmisibles en poblaciones de roedores silvestres es esencial para la salud pública. En Argentina, los roedores ocupan un rol preponderante en el mantenimiento de importantes zoonosis, como ser triquinelosis, mal de Chagas, leptospirosis, hantavirus y fiebre hemorrágica argentina, entre otras (Loffler y col., 2014; Martinez y col., 2010; Orozco y col., 2014; Polop y col., 2007; Sequeira y col., 2016; Vadell y Gómez Villafañe, 2016; Vanasco y col., 2003).

Para comprender los determinantes del riesgo de la exposición humana a estas enfermedades, es necesario analizar los causales de la variación en la susceptibilidad del hospedador y en las dinámicas de infección en roedores. Sin dudas, el contacto (directo o indirecto) entre individuos infectados y susceptibles es crucial en determinar el riesgo de infección. Sin embargo, ante la exposición a un patógeno, es posible un gradiente de diversos escenarios en la relación hospedador-parásito, pudiendo variar en gran medida, tanto para el hospedador (ej. mayor o menor virulencia) como para el parásito (ej. mayor o menor desarrollo / replicación / reproducción y transmisión) (Beldomenico y Begon, 2010, 2015). Ejemplos de resultados extremos son (Beldomenico y Begon, 2015; Johnson y col., 2015; Paull y col., 2012):

1. Infección que no progresa, con nula virulencia y sin transmisión del parásito;
2. Infección masiva con escasa virulencia (en algunos casos conocidos como “*superspreaders*”);
3. Infección masiva con muerte del hospedador, donde la transmisión se ve limitada.

Estos resultados dependerán, en parte, de las características del patógeno (ej., patogenicidad, dosis infectiva), pero también en gran medida de la integridad y eficiencia de las defensas que el hospedador ponga en juego para hacer frente a la infección

(Beldomenico y Begon, 2010; Gervasi y col., 2015; Sorci, 2013). Las defensas que se adopten suponen costos, perjuicios y beneficios, que variarán según el contexto (historia de vida de la especie, características del individuo, circunstancias ambientales, etc.), lo que influirá de manera determinante en la interacción hospedador-parásito y sus consecuencias (Brown y col., 2003; Gervasi y col., 2015; Jackson y col., 2014; Sagonas y col., 2016; Sorci, 2013). Estos diversos resultados influyen de manera crucial en las dinámicas de los patógenos y en el impacto que tienen sobre las poblaciones de sus hospedadores.

Es evidente que la comprensión de la distribución y abundancia de enfermedades zoonóticas en reservorios silvestres depende de dilucidar las dinámicas del sistema inmune y sus interacciones con agentes infecciosos. Esto es particularmente desafiante, dado que la interacción entre estrés, sistema inmune y parásitos está lejos de ser simple y bien comprendida. El sistema inmune de vertebrados se caracteriza por una serie de mecanismos celulares y humorales altamente relacionados y que interactúan entre sí. Estos mecanismos se dividen en dos grandes grupos: respuesta inmune innata y adaptativa (Murphy, 2012). Considerando la fisiología del hospedador, la inversión de recursos en inmunidad dependerá de la disponibilidad de nutrientes y otras demandas fisiológicas (Demas, 2004; Derting y Compton, 2003; French y col., 2007a; Lochmiller y Deerenberg, 2000). Diferentes *trade-offs*³, relacionados a la edad, co-infección, entre otros, determinan inversiones diferenciales en los diversos compartimentos del sistema inmune (Boonstra y col., 2001; Jolles y col., 2008). Con respecto a esto, suele considerarse que las defensas innatas suponen mayores costos que las defensas adquiridas (principalmente en cuanto a mantenimiento y activación) (Lee, 2006; McDade y col., 2016). Sin embargo, cabe considerar que las defensas innatas son inespecíficas, haciendo frente a un amplio espectro de patógenos; mientras que las defensas adquiridas deben ser desarrolladas para cada patógeno en particular (Murphy, 2012). Por ello, es razonable suponer que en momentos de dificultad y/o escasez de recursos, un organismo priorice defensas innatas por sobre defensas adquiridas. De todas maneras, ante historias de vida de idénticas condiciones, es razonable asumir que un individuo en buena condición estará mejor preparado para limitar una infección: cuanto más “saludable” el hospedador, más hostil el medio que deba enfrentar el parásito. En consecuencia, la influencia de la condición

³ Se entiende por *trade-off* a los intercambios entre compartimentos/sistemas que suponen un compromiso en la disponibilidad de recursos (mayor información en Glosario).

general del hospedador sobre la susceptibilidad intrínseca será substancial. Al mismo tiempo, existen evidencias que indican que la inmunocompetencia individual juega un rol primordial en las dinámicas parasitarias de poblaciones silvestres (Beldomenico y Begon, 2010). Se ha demostrado que individuos silvestres con un estado de salud empobrecido no sólo son más propensos a ser infectados, sino que las infecciones sufridas son de mayor intensidad (Beldomenico y col., 2008a, 2009b). Incluso, la interacción hospedador-parásito y sus consecuencias dependen de las circunstancias que rodean al hospedador (Gervasi y col., 2015; Sorci, 2013), siendo particularmente sensible al estrés, a través de mecanismos que involucran al sistema inmune (Beldomenico y Begon, 2015; Martin, 2009) (tratado anteriormente).

Siendo que los animales cumplen un rol preponderante en la transmisión de un sinnúmero de enfermedades de importancia económica y sanitaria, establecer qué determina variabilidad en el resultado de las interacciones parásito-hospedador y comprender los factores que modulan su capacidad como reservorios y transmisores de patógenos es esencial, y de particular importancia, en estudios eco-epidemiológicos en veterinaria, salud pública y en conservación. En consecuencia, **la relación entre una infección particular y cada compartimento del sistema inmune puede estar influenciada por el contexto ambiental del hospedador.**

Objetivos e hipótesis de trabajo

La presente tesis tiene como objetivo investigar la modulación de los diferentes compartimentos del sistema inmune de los roedores por parte del estrés, y su influencia, y consecuencias, sobre los *trade-offs* entre los mismos.

Objetivos específicos

- i) Establecer la influencia del estrés sobre diferentes compartimentos de la respuesta inmune innata y adaptativa de los roedores.
- ii) Evaluar en roedores los *trade-offs* entre los diversos compartimentos inmunes estudiados bajo diferentes escenarios de estrés.
- iii) Evaluar, en consideración del tipo e intensidad de diversos agentes infecciosos, las consecuencias de la influencia del estrés sobre diferentes compartimentos de la respuesta inmune.

Hipótesis de trabajo

Por los antecedentes expuestos, se espera que, ante la influencia de factores estresantes, se priorice la inmunidad inespecífica por sobre la adquirida. En virtud de esto, se trabajarán las siguientes hipótesis:

- i) Los factores estresantes poseen un efecto diferencial sobre los diferentes compartimentos del sistema inmune del roedor.
- ii) El incremento de un compartimento específico del sistema inmune redundará en una reducción de otro, y la magnitud de este *trade-off* depende de la exposición al estrés.
- iii) La inversión diferencial en los distintos compartimentos del sistema inmune, influenciada por niveles de estrés, se encuentra asociada al tipo e intensidad de agente parasitario presente.

CAPÍTULO II

Caracterización y validación de un modelo de estrés crónico para el estudio de marcadores del sistema inmune

Introducción

Para abordar los dos primeros objetivos específicos, poniendo a prueba las hipótesis correspondientes, se desarrolló un experimento de estrés crónico en ratas de laboratorio. Las mismas, fueron expuestas de manera prolongada a restricción alimentaria, conflicto social, o ambos. Como se explica más adelante, se trata de dos desafíos muy comunes en un ambiente natural, por lo que es muy factible que un individuo se enfrente a ellos a lo largo de su vida.

Roedores de laboratorio como modelo de estudio de la influencia del estrés crónico sobre el sistema inmune y su aplicación a poblaciones de roedores silvestres

El uso de animales de laboratorio como modelos de estudio dista de ser reciente, habiendo provisto de información de enorme valor, particularmente para la comprensión de innumerables procesos fisiológicos y patológicos en humanos (Boonstra, 2013a; Viney y col., 2015). La información que se ha generado acerca del estrés y del sistema inmune a partir de estudios en roedores de laboratorio es abrumadora (Abolins y col., 2011; Boonstra, 2013a; Viney y col., 2015). Esta información ha permitido, salvando distancias y diferencias, conocer su funcionamiento en mamíferos y vertebrados (Boonstra, 2013a; Viney y col., 2015), gracias a lo cual es posible concebir preguntas relevantes acerca de su comportamiento en animales silvestres (Viney y col., 2015), al tiempo que se indaga por las respuestas apropiadas.

Sin embargo, una de las objeciones habituales es que la aplicabilidad de esta información en estudios de animales silvestres debe analizarse cuidadosamente y validarse, con la posibilidad cierta de que una buena parte no pueda ser aplicada (Boonstra, 2013a). Es real que una diferencia fundamental a considerar, entre los estudios en animales silvestres y aquellos en animales de laboratorio, es que las bases ecológicas y evolutivas presentes en los primeros generalmente se encuentran ausentes en los segundos (Boonstra, 2013a). Las adaptaciones presentadas por las especies silvestres son consecuencia de la presión natural impuesta por los desafíos ambientales (MacColl, 2011). Estos se constituyen en agentes de selección, que operan a través de la aptitud (*fitness*) diferencial producto de los diversos fenotipos expresados por los individuos

(Boonstra, 2013a; Boonstra y col., 2014; MacColl, 2011). Por otro lado, las adaptaciones presentadas por los roedores de laboratorio son el resultado de necesidades humanas, actuando el hombre como principal agente de selección (Abolins y col., 2011; Boonstra, 2013a). Los roedores de laboratorio son criados en condiciones ambientales controladas y benignas, con abundancia de alimento, en ausencia de predadores o enfermedades infecciosas, y mediante selección artificial a través de endocría (Abolins y col., 2011; Boonstra, 2013a). En consecuencia, frecuentemente se trata de ejemplares menos agresivos, más sedentarios, más sociables, tendientes a la obesidad, con una función inmune generalmente de menor magnitud y con una respuesta a los estresores que puede ser mayor o menor a la de sus congéneres silvestres (Abolins y col., 2011; Boonstra, 2013a; Viney y col., 2015).

Ante estos inconvenientes, una de las propuestas que suele plantearse como alternativa consiste en el mantenimiento de ejemplares silvestres bajo condiciones controladas. Sin embargo, el comportamiento y la fisiología de los ejemplares silvestres mantenidos en condiciones de laboratorio, desconocidas para ellos, pueden diferir marcadamente de los expresados por sus congéneres de vida libre (Boonstra, 2013a; Calisi y Bentley, 2009). De hecho, tanto la respuesta inmune como la respuesta de estrés son fuertemente condicionadas por el contexto, por lo que estas alteraciones decididamente influirán sobre los resultados obtenidos (Calisi y Bentley, 2009; Viney y col., 2015). La manipulación de ejemplares silvestres, ya sea en el campo o en el laboratorio, frecuentemente induce la elevación de GCs y estrés, con el consabido efecto regulador sobre la función inmune (Boughton y col., 2011; Bowers y col., 2008). Aún más, deben considerarse los riesgos sanitarios que implica trabajar con roedores provenientes de la naturaleza. Como se mencionó previamente, los roedores silvestres participan del ciclo de transmisión de numerosas zoonosis, algunas de particular importancia en el país (por ej., hantavirus, fiebre hemorrágica, leptospirosis) (Loffler y col., 2014; Martínez y col., 2010; Polop y col., 2007; Vadell y col., 2011; Vanasco y col., 2003). De manera adicional, no puede descartarse el ingreso de patógenos que afecten a las colonias de roedores domésticos que pudieran encontrarse en el lugar de experimentación (Easterbrook y col., 2008). Si bien pueden implementarse ciertos recaudos (protocolos de cuarentena, monitoreo sanitario y tratamientos preventivos) para evitar la propagación de enfermedades y disminuir el riesgo, los mismos podrían resultar en mayores alteraciones sobre el comportamiento y fisiología de los animales a analizar.

Por último, es razonable suponer que la presencia de infecciones que pasen inadvertidas (no diagnosticadas, portadores asintomáticos, etc.) alterará los resultados obtenidos, al tiempo que la liberación de estadios infectantes al ambiente podría verse incrementada a causa de los mismos experimentos.

En vista de lo expuesto, y a pesar de las complicaciones planteadas, se considera que la información originada en animales de laboratorio es necesaria como punto de partida para el análisis de lo acaecido en ejemplares silvestres. Comprender el funcionamiento de la respuesta de estrés y del sistema inmune dentro de los límites impuestos por las condiciones de laboratorio, será de utilidad para la interpretación de su funcionamiento en la naturaleza, aunque se destaca que deben ser utilizados con precaución (Boonstra, 2013a).

Selección de estresores

Como indicado en el capítulo anterior, los animales de vida libre se enfrentan a multitud de desafíos ambientales a lo largo de sus vidas. De manera de mejorar la validez de un modelo animal que permita interpretar la respuesta de estos animales ante el estrés crónico, es prudente que los estresores que se seleccionen y la forma en que se apliquen presenten cierto grado de validez ecológica (Koolhaas y col., 2011). De esta forma, los estresores desafían los mecanismos naturales de defensa y estimulan la capacidad adaptativa del animal (Koolhaas y col., 2011), permitiendo que los resultados obtenidos puedan ser utilizados en la comprensión de fenómenos naturales. Entre los desafíos enfrentados por ejemplares de poblaciones silvestres, la escasez de recursos (principalmente, alimento) y el conflicto social constituyen dos de los más frecuentes (Chester y col., 2010; Creel y col., 2013; Schultner y col., 2013). Es de importancia indicar que ambos desafíos son reconocidos como relevantes para los animales silvestres (Dickens y Romero, 2013), por lo que su aplicación en condiciones experimentales satisface los criterios mencionados.

En el caso del conflicto social, no sólo se trata de uno de los estresores más frecuentes en la naturaleza, presente en la vida de prácticamente todas las especies (Blanchard y col., 2001), sino que además es considerado de relevancia desde un punto de vista ecológico y comportamental (Chester y col., 2010). Típicamente, el conflicto social ocurre entre ejemplares conespecíficos, tanto de especies sociales como de aquellas de hábitos solitarios, y de manera frecuente involucra competencia por parejas potenciales, territorio, o acceso a un recurso limitado (alimento) (Blanchard y col., 2001; Chester y

col., 2010; Creel y col., 2013). En la mayoría de los casos involucra comportamientos agonistas, los cuáles resultan en un “ganador” y un “perdedor” (Chester y col., 2010), pero que también ocasionan heridas, agotamiento o incluso la muerte (Blanchard y col., 2001). Sin embargo, este estresor no sólo incluye interacciones físicas, sino que involucra múltiples estímulos sensoriales (visuales y olfatorios) como indicadores de la presencia de un competidor (Chester y col., 2010). El grado de conflicto social puede variar desde comportamientos fuertemente insociables hasta tolerancia en ambos sexos a lo largo de todo el año (con excepción de la temporada reproductiva) (Creel y col., 2013).

En cuanto a la disponibilidad de recursos (por ej., alimento), el esfuerzo dedicado a la búsqueda de alimento es crucial para la supervivencia, formando parte de la vida diaria en la naturaleza (Koolhaas y col., 2011). Tanto es así, que la escasez de alimento se considera uno de los principales estresores ambientales que afectan a los animales silvestres (Kitaysky y col., 2010; McEwen y Wingfield, 2010; Schultner y col., 2013; Wingfield y col., 2011). En poblaciones naturales, las fluctuaciones en la disponibilidad de alimento serían percibidas como un estresor reactivo, activando una respuesta de estrés independiente de procesos cognitivos (Boonstra, 2013a). Esta respuesta de estrés permite que los organismos sean capaces de modificar sus respuestas fisiológicas para mantener un flujo constante de energía corporal, al tiempo que disponen de la energía disponible para cumplir con sus funciones vitales (por ej., termorregulación, crecimiento, reproducción, entre otros) (Zysling y col., 2009). Aún más, el acceso a fuentes de alimento es considerado como un potente agente de selección natural (Creel y col., 2013; MacColl, 2011), limitando el crecimiento de numerosas poblaciones de animales (Huitu y col., 2007). Estos cambios ambientales en la disponibilidad de alimento habrían influenciado el desarrollo de comportamientos migratorios, hibernación o almacenamiento de alimentos (Pravosudov y Smulders, 2010).

En relación a la presencia de estos estresores ambientales, debe considerarse que ante incrementos de la densidad poblacional el conflicto entre congéneres es prácticamente inevitable, mientras que los recursos finitos (esencialmente alimento) se vuelven cada vez más escasos conforme la densidad poblacional continúe creciendo (lo que a su vez exacerbará la competencia y el conflicto [Creel y col., 2013]). Por tanto, existe una posibilidad cierta de que ambos desafíos ambientales ocurran de manera simultánea e interactúen entre sí (Creel y col., 2013; Dantzer y col., 2013; Huitu y col., 2007). Sin

embargo, son relativamente pocos los estudios que contemplen estas interacciones entre estresores ambientales (Creel y col., 2013).

Cabe considerar que si bien existe un vasto conocimiento de los mecanismos fisiológicos que determinan la respuesta de estrés y sus efectos, gran parte del mismo ha sido obtenido a partir de aplicar estresores poco vinculados a lo experimentado por los animales en sus ambientes naturales (por ej., restricción física, natación forzada, aislamiento, entre otros) (Bowers y col., 2008; Chester y col., 2010). Asimismo, se ha demostrado que diferentes tipos de estresores utilizan mecanismos alternos para activar las vías neuroendocrinas responsables de la respuesta de estrés (Bowers y col., 2008; Chester y col., 2010). Esto último sugiere que enfocarse en un único tipo de estresor resulta en una comprensión incompleta de las respuestas fisiológicas puestas en juego para hacer frente a los efectos del estrés. En resumen, todo esto indica que gran parte de la información disponible podría ser inadecuada o insuficiente para la comprensión de las elecciones fisiológicas que deben tomar los animales silvestres ante situaciones de estrés, siendo necesario el análisis del efecto de una variedad de estresores ecológicamente relevantes.

Medidas de estrés seleccionadas

Los ejes SAM y HPA, a través de la respuesta de estrés, representan los mecanismos mediante los cuales el organismo interpreta la información proveniente del ambiente. La respuesta de estrés (esencialmente crónico) en vertebrados se caracteriza por la liberación de GCs (cortisol y corticosterona, según la especie: los peces y la mayoría de los mamíferos liberan cortisol; mientras que aves, reptiles, anfibios y muchos roedores liberan corticosterona [CORT]) (Romero, 2004). Una vez activado el eje HPA a nivel central, a través del hipotálamo, se estimula la liberación de adrenocorticotrofina (ACTH) desde la glándula pituitaria (Nicolaidis y col., 2015). La ACTH actúa sobre la porción interna de la corteza de la glándula adrenal, denominada *zona fasciculata*, estimulando la secreción de GCs (Nicolaidis y col., 2015; Ulrich-Lai y col., 2006). A su vez, también actúa sobre la corteza adrenal externa (*zona glomerulosa*) estimulando la secreción de aldosterona (un mineralocorticoide), y sobre la porción media de la corteza (*zona reticularis*) estimulando la secreción de andrógenos (Nicolaidis y col., 2015; Ulrich-Lai y col., 2006).

A pesar de cierta controversia acerca de su uso e interpretación (Breuner y col., 2013; Martin, 2009; Schoech y col., 2013), los niveles de GCs representan una medida utilizada

de manera habitual en la evaluación del estrés y para inferir el estado de salud en poblaciones de vertebrados (Dantzer y col., 2014; Dickens y Romero, 2013; Romano y col., 2010; Romero, 2004; Sheriff y col., 2010, 2011). Los metabolitos de GCs usualmente son medidos en plasma, aunque también podrían serlo en saliva, orina y materia fecal (siendo estos últimos más estables en el tiempo que los niveles plasmáticos, y de gran utilidad en estudios de poblaciones silvestres) (Dickens y Romero, 2013). Entre las medidas de GCs en plasma propuestas para la evaluación de la respuesta de estrés se encuentran: GCs totales, GCs fijados a globulinas fijadoras de corticosteroides (CBG, del inglés *corticosteroid binding globulins*), y GCs libre (Schoech y col., 2013). Si bien se ha argumentado que sólo la fracción de GCs libre en plasma tiene actividad biológica (Breuner y col., 2013), aún no existe consenso al respecto y otros autores consideran que la medida más apropiada e informativa para la mayoría de los estudios continúa siendo la valoración de los GCs totales (Schoech y col., 2013). En líneas generales, se interpreta que la elevación de GCs indica la presencia de estrés y de una respuesta coincidente en curso (Martin, 2009). Asimismo, la intensidad del estresor y/o el grado de control sobre el mismo (contexto) determinarían la intensidad de esta respuesta hormonal (Romero, 2004). En consecuencia, un incremento o un descenso en la concentración de GCs circulantes indicarían si el estímulo es interpretado como un empeoramiento o una mejoría de las condiciones previas (Romero, 2004), aunque estos cambios deben ser analizados con cautela, desde un enfoque integral.

Siendo que los GCs son sintetizados y liberados principalmente desde la corteza de la glándula adrenal (Dickens y Romero, 2013; Nicolaidis y col., 2015), la actividad adrenocortical ha sido utilizada como reflejo de la secreción de GCs. Para la evaluación de esta actividad, y por ende de la respuesta de estrés, clásicamente se han utilizado indicadores indirectos, como ser la variación en el tamaño de la glándula adrenal, y de la corteza adrenal con sus componentes (Nicolaidis y col., 2015; Ulrich-Lai y col., 2006). En general, ante una respuesta de estrés crónico, es esperable un incremento en el tamaño de la glándula adrenal y de la corteza (esencialmente de la *zona fasciculata*), sugiriendo un aumento en la secreción de GCs (Ulrich-Lai y col., 2006).

Otros índices generales utilizados de manera habitual para la evaluación de la respuesta ante el estrés crónico, lo constituyen la disminución del consumo de alimento y de la masa corporal (Dantzer y col., 2014; Dickens y Romero, 2013). Incluso, uno de los hallazgos más consistentes reportados en la literatura es el decremento del peso

corporal como consecuencia del estrés crónico (Dickens y Romero, 2013). De hecho, este efecto de la exposición al estrés crónico podría deberse a las alteraciones que el mismo ocasiona sobre los comportamientos alimentarios, resultando mayormente en una menor ingesta de alimento (Maniam y Morris, 2012; Martí y col., 1994).

En resumen, para verificar que los desafíos ambientales se comporten como estresores, es decir, efectivamente desencadenen una respuesta de estrés, es factible y necesario utilizar una serie de indicadores indirectos de la actividad del eje HPA y de su efecto sobre el organismo. En este Capítulo se evalúa la inducción de estrés por parte de los tratamientos implementados (restricción alimentaria y conflicto social), usando como indicadores los niveles plasmáticos de GCs, parámetros de las glándulas adrenales y el consumo de alimento. Se consideraron las hipótesis de que i) la restricción alimentaria y el conflicto social, enfrentados crónicamente, son percibidos como una amenaza por el organismo, lo que desencadena una respuesta de estrés factible de ser evidenciada con los indicadores seleccionados; y ii) al enfrentarse de manera simultánea, estos desafíos ambientales interactúan entre sí sinérgicamente. Se predice que los niveles de GCs aumentarían ante la exposición a los tratamientos, mientras que el consumo de alimento disminuiría y se presentarían alteraciones en la glándula adrenal. A su vez, ante una interacción entre tratamientos, se esperan diferencias de mayor magnitud que ante cada tratamiento por separado.

Materiales y métodos

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos realizados en el marco de esta tesis fueron desarrollados según lo expresado en “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (ILAR, 2010); mientras que los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) bajo el número 135/12, en el marco del proyecto PICT-2012-1552 “*Stress, host susceptibility and infection dynamics in wild rodents: unpacking the immune system*”.

Origen de los individuos bajo estudio y condiciones de alojamiento

Los animales de laboratorio utilizados en el experimento fueron provistos por el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC, ICIVET Litoral). Se utilizaron 32 ejemplares de *Rattus norvegicus* (cepa Wistar, variedad

albus), machos de 4 semanas de edad. Se utilizaron machos debido a que se ha demostrado que se estresan ante densidades altas (Baldwin y col., 1995; Brown y Grunberg, 1995) y que las jerarquías de dominancia son más marcadas en ellos que en hembras, influenciando un mayor rango de comportamientos (Blanchard y col., 2001). Los animales se alojaron en una sala de experimentación con un ciclo de 12 h de claridad/12 h de oscuridad, y condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad ($50 \pm 5\%$). Se seleccionaron 24 individuos al azar, que fueron distribuidos en ocho jaulas (tres individuos por cada jaula de polisulfona de 274 x 443 x 231 mm), ubicadas en racks microventilados para roedores (MicroVENT IVC, Allentown®). Las dos semanas siguientes fueron utilizadas como período de aclimatación, durante el cual los animales se mantuvieron en las condiciones descritas previamente, con libre acceso (*ad libitum*) a agua potable y alimento balanceado para rata. Los ocho ejemplares restantes fueron mantenidos en las mismas condiciones, para luego ser utilizados como “intrusos” durante la imposición del conflicto social (ver a continuación).

Diseño experimental y procedimientos

- *Diseño experimental*

Para poner a prueba las hipótesis de trabajo se utilizó un diseño factorial 2^2 , con restricción alimentaria y conflicto social como variables independientes. Durante el período de aclimatación, se efectuaron comparaciones de base para verificar que los animales no difirieran entre sí. Mediante el test del análisis de la varianza ($p \leq 0.1$) se contrastaron los valores de peso corporal, largo corporal e índice de masa corporal. Luego de esta verificación, los individuos fueron seleccionados al azar y se asignaron a uno de cuatro grupo experimentales (con dos réplicas cada uno): i) Control (C) ($n = 4$, 2 por réplica); ii) Restricción alimentaria (RA) ($n = 4$, 2 por réplica); iii) Conflicto social (CS) ($n = 8$, 4 por réplica); y iv) Restricción alimentaria + conflicto social (RA+CS) ($n = 8$, 4 por réplica).

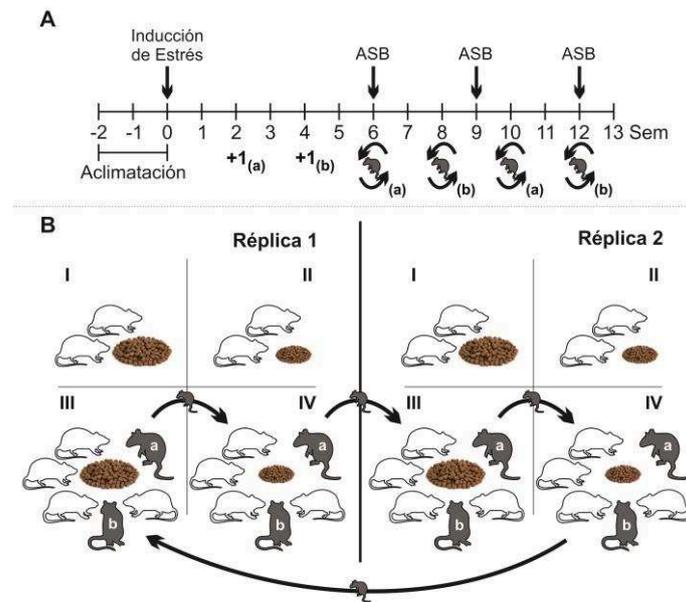


Figura 2. Línea de tiempo y diseño experimental

Desde su implementación (Sem₀), los animales se expusieron a los tratamientos (RA y CS) durante 13 semanas consecutivas, de manera continua. Los grupos “C” fueron alimentados *ad libitum*, mientras que la densidad se mantuvo baja y los grupos estables (2 individuos por jaula). En consecuencia, los grupos C refieren a la ausencia de restricción alimentaria y a la ausencia de conflicto social. A su vez, los animales expuestos a restricción alimentaria (RA+) recibieron un 60% de la ración promedio consumida por aquellos individuos con acceso *ad libitum* al alimento (C). En tanto, en el tratamiento “conflicto social” (CS+), el mecanismo de estrés social estuvo determinado tanto por inestabilidad social como hacinamiento (Blanchard y col., 2001). De manera de lograr altas densidades al comienzo del experimento, los grupos CS y RA+CS comenzaron con cuatro animales por jaula (Fig. 2B) (Baldwin y col., 1995; Brown y Grunberg, 1995). Luego, para mantener la inestabilidad social e incrementar la densidad por jaula, un animal intruso fue seleccionado al azar y agregado cada dos semanas a cada grupo, hasta alcanzar la máxima densidad permitida: seis ejemplares por jaula (Fig. 2A y 2B, individuos “grises”). Una vez alcanzada la densidad máxima, cada dos semanas, los animales intrusos fueron translocados entre jaulas (Fig. 2A y 2B). Estas translocaciones fueron realizadas de a un individuo intruso por vez, en una secuencia tal que los animales “residentes” no hubiesen estado en contacto previo con el intruso translocado (Fig. 2).

- *Inmunización*

Con la finalidad de simular, en cierta forma, lo que un individuo enfrenta al exponerse continuamente a patógenos, todos los individuos fueron inmunizados en las Sem₆, Sem₉ y Sem₁₂ posteriores al inicio del experimento. Las inmunizaciones se realizaron con 100 µg de albúmina sérica bovina (ASB, Fundación Universidad Nacional de San Luis, Argentina), suspendida en hidróxido de aluminio 15% como adyuvante (Alhydrogel[®] 2%) (Rivera-Aguilar y col., 2008). El volumen final de 200 µl se dividió en dos dosis y fue inyectado de manera subcutánea en cada uno de los flancos (Diehl y col., 2001). Las inmunizaciones fueron realizadas con ASB ya que es un antígeno T-dependiente (de características proteicas) extensamente utilizado en la evaluación de la respuesta inmune humoral (Dearman y col., 2000, 2003; Edwards y col., 1980; Rivera-Aguilar y col., 2008). La elección de ASB como inmunógeno está fundamentada en el hecho de que no produce fiebre ni otros signos de afección, como ser disminución en el consumo de alimento (un indicador indirecto de estrés, ver a continuación).

- *Registro de variables individuales y obtención de muestras*

Las muestras y variables de interés fueron obtenidas semanalmente, a lo largo de todo el experimento. Se registraron el peso corporal (en gramos, y una precisión de 0,1 g) y el largo corporal (de la punta del hocico a la base de la cola, en centímetros, y con una precisión de 1 mm). El índice de masa corporal se calculó de acuerdo a lo discutido por Labocha y col. (2014):

$$\text{Índice de masa corporal} = \frac{\log \text{ masa corporal}}{\log \text{ largo corporal}}$$

Además, semanalmente y previo a cualquier otro procedimiento, se obtuvieron muestras de sangre entera. Previo a la toma de muestra, los individuos fueron inmovilizados físicamente, la cola fue debidamente higienizada con alcohol 90°, realizándose la extracción sanguínea entre los 3-5 minutos siguientes para evitar distorsiones de las medidas de estrés (Vahl y col., 2005). Estas acciones fueron ejecutadas por personal del CMC. Las muestras sanguíneas se colectaron de las venas coccígeas, con un volumen máximo de 100 µl al comienzo del experimento, y alcanzando un máximo aproximado de 300 µl hacia el final del mismo (debido a la edad y tamaño de los animales). Cada muestra, inmediatamente extraída, fue colocada en un tubo tipo eppendorf con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. En el lapso

de las 2-3 horas posteriores a la extracción sanguínea, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

- En primer lugar, con una alícuota aproximada de 13 μ l de sangre entera, se efectuó el análisis hematológico completo mediante el uso de un analizador automático para hematología, de uso veterinario (BC-2800Vet, Mindray®).

- Luego de realizado el análisis hematológico, se efectuaron dos extendidos sanguíneos por individuo, con el fin de efectuar el conteo diferencial de glóbulos blancos (a tratar en el Capítulo IV).

- Finalmente, se separó y preservó el plasma. Para ello, el volumen restante de sangre entera fue centrifugado a razón de 5000 r.p.m., durante 3 min. Luego, el plasma fue separado del paquete celular, y preservado a -20 °C hasta su posterior utilización.

Al concluirse las 13 semanas de exposición a los estresores, los animales fueron anestesiados profundamente con una combinación de ketamina, acepromacina y xilacina. Una vez anestesiados, se colectó el mayor volumen sanguíneo posible por punción cardíaca (para posteriores determinaciones). Luego, todos los animales fueron decapitados y necropsiados. Durante el procedimiento se colectaron los siguientes órganos: corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, glándulas adrenales, testículos y epidídimos. Los mismos, fueron cuidadosamente separados del tejido conectivo y adiposo, para luego ser pesados con una precisión de 0,001 g. Los órganos pares se pesaron juntos, mientras que corazón y pulmones fueron vaciados de sangre antes de pesarse. Una vez pesados, las glándulas adrenales fueron preservadas en formol al 10% para estudios histopatológicos, mientras que el resto de los órganos se preservó a -80 °C.

Medidas de estrés

Con la finalidad de evaluar el efecto estresor inducido por los tratamientos aplicados, se registraron y analizaron los siguientes indicadores indirectos de la actividad del eje HPA y de su efecto sobre el organismo:

- *Niveles de glucocorticoides plasmáticos*

Se midieron los niveles de corticosterona plasmática (CORT) en muestras de plasma de semanas seleccionadas del experimento, a saber: Sem₀, Sem₃, Sem₆, Sem₉ y Sem₁₃. Los valores de CORT fueron determinados a partir de extracciones con éter dietílico de alícuotas de plasma (15 μ l) mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), según la metodología planteada por Jahn y col. (1995) y Valdez y col. (2012).

- *Análisis de las glándulas adrenales y su histo-arquitectura*

Para detectar cambios en la actividad secretoria de las glándulas adrenales, se analizó el peso de las mismas, tanto de manera absoluta como en relación al peso corporal (peso relativo). De la misma manera, se analizaron los pesos absoluto y relativo de la corteza adrenal y sus porciones (a saber, *zona fasciculata*, *zona glomerulosa* y *zona reticularis*). El análisis histopatológico de las glándulas adrenales se ejecutó utilizando técnicas de rutina de inclusión en parafina y coloración con hematoxilina-eosina, mientras que el tamaño absoluto de cada porción de la corteza adrenal se obtuvo mediante el análisis morfométrico de las secciones teñidas. El ancho de cada zona adrenocortical se midió, con escala milimetrada, en la porción media de un corte sagital de la glándula adrenal. En tanto que la masa relativa de cada porción se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{tamaño de la porción de interés}}{\text{tamaño de la corteza} + \text{tamaño de la médula}} \times \text{peso de glándulas adrenales} / \text{peso corporal final}$$

- *Consumo de alimento*

Como medidas indirectas del efecto del estrés sobre el organismo, se evaluaron aquellas concernientes al consumo de alimento. Aquellas medidas relacionadas al peso corporal que pudieran ser de interés para la evaluación del efecto del estrés serán analizadas en detalle en el Capítulo III.

En cuanto al consumo de alimento, siendo que los animales bajo estudio estaban alojados en grupos de dos o más, se evaluó diariamente, considerando la jaula como unidad de análisis ($n=8$). La ración entregada cada día se ajustó de acuerdo a la cantidad de animales por jaula y a lo establecido para cada tratamiento. Al día siguiente, el consumo de alimento fue estimado, en gramos, a partir de pesar el alimento remanente en cada jaula (el material de cama se revisó en detalle para incluir restos de alimento). Se consideraron las siguientes medidas de consumo absoluto y relativo, respectivamente:

i) Consumo acumulado medio:

$$\text{consumo total por jaula} / \text{número de individuos alojados}$$

Si bien considerar que el consumo fue similar entre individuos de una misma jaula no es lo más adecuado, no es posible evaluar el consumo acumulado a nivel jaula a causa de la diferencia en el número de individuos alojados.

ii) Consumo por kg-rata:

$$\frac{\text{suma del consumo semanal por jaula}}{\text{suma de kg - rata semanal por jaula}}$$

Análisis estadístico

Las medidas de estrés analizadas fueron consideradas como variables respuesta. Los niveles de CORT fueron analizados de manera longitudinal, mientras que el resto de las variables constituyen medidas de punto final (derivadas de glándulas adrenales y medidas de peso y consumo). Los detalles generales en cuanto a la construcción y selección de los modelos se presentan en el “Anexo II: Análisis estadísticos”.

Resultados

Medidas de estrés

- Niveles de glucocorticoides plasmáticos

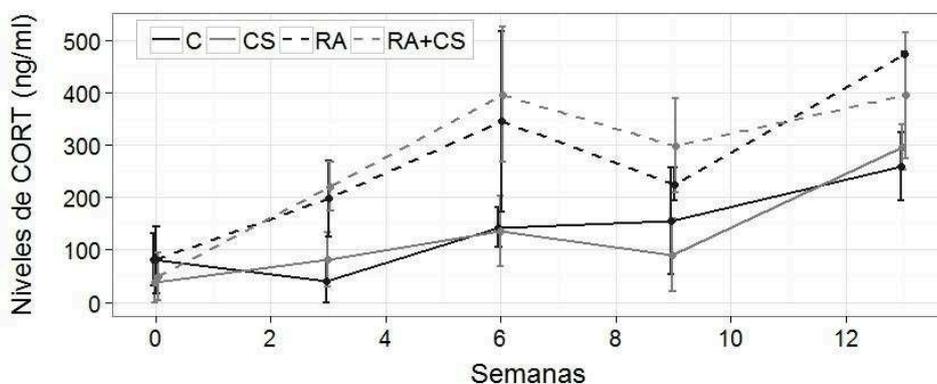


Figura 3. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de corticosterona plasmática total (CORT).

Al comenzar el experimento, no hubo diferencias entre los niveles de CORT demostrados por cada grupo. Sin embargo, con el correr de las semanas, los individuos expuestos a RA presentaron mayores niveles de CORT que aquellos individuos alimentados *ad libitum* (Fig. 3). Esta diferencia se evidencia en las interacciones significativas de RA×Sem y RA×Sem² (Tabla A1, Anexo II). Por otro lado, los individuos

bajo CS no demostraron un impacto sobre los niveles de CORT (Fig. 3), en tanto no se evidenció sinergismo entre los tratamientos aplicados (Tabla A1).

- *Análisis de la histo-arquitectura de la glándula adrenal*

En la Tabla 1 se presentan los datos descriptivos de las medidas resultantes del análisis histológico de las glándulas adrenales.

Tabla 1. Datos descriptivos de la histo-arquitectura de la glándula adrenal de ratas expuestas a restricción alimentaria (RA) y/o conflicto social (CS) (medidas en mm).

Parámetros	Grupos			
	C	RA	CS	RA + CS
Médula adrenal	0,213 ± 0,02	0,25 ± 0,1	0,212 ± 0,06	0,2 ± 0
Corteza adrenal	0,575 ± 0,05	0,6 ± 0,29	0,569 ± 0,2	0,57 ± 0,04
Zona glomerulosa	0,1 ± 0	0,1 ± 0,04	0,065 ± 0,02	0,082 ± 0,02
Zona fasciculata	0,375 ± 0,05	0,4 ± 0,22	0,362 ± 0,13	0,381 ± 0,04
Zona reticularis	0,1 ± 0	0,1 ± 0,04	0,141 ± 0,15	0,106 ± 0,02
Media ± desvío estándar				

El análisis detallado de la histo-arquitectura de la corteza adrenal demostró que los animales expuestos a RA presentaron la corteza adrenal ($p = 0,009$) y las zonas fasciculata ($p = 0,019$) y glomerulosa ($p = 0,027$) de mayor tamaño en relación a su tamaño corporal (Fig. 4, Tabla A2 en Anexo II). Por otro lado, la zona glomerulosa de los individuos sujetos a CS tendió ($p = 0,073$) a un menor tamaño en relación al tamaño corporal (que fue significativa al considerar el tamaño absoluto, $p = 0,021$) (Fig. 4, Tabla A2). De igual manera a lo sucedido con los niveles de CORT, no se detectó ningún sinergismo en la acción de los tratamientos.

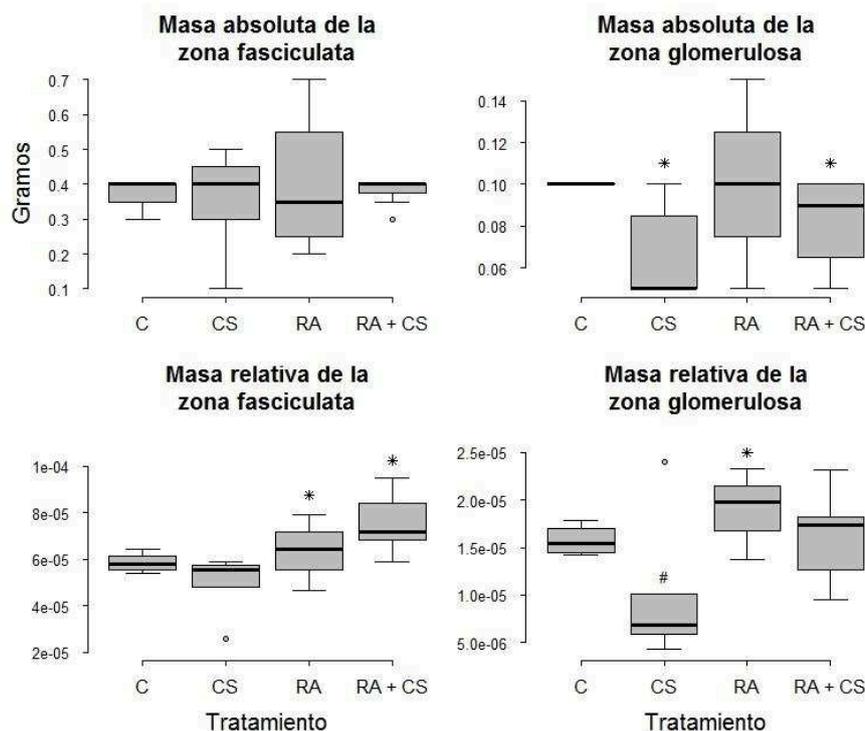


Figura 4. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre las zonas fasciculata y glomerulosa de la corteza adrenal (#: $p = <0,1$; *: $p = <0,05$; **: $p = <0,01$; ***: $p = <0,001$) (mediana, 1er y 3er cuartil, y valores mínimo y máximo).

- *Consumo de alimento*

Los animales con libre acceso al alimento siempre dejaron remanentes de alimento en los alojamientos. Por el contrario, en el caso de los animales con alimento restringido, nunca quedó alimento sobrante. Sin embargo, en la Sem₁₁ se detectó un marcado descenso del consumo de alimento, luego de que se introdujera en la sala un rack de jaulas con ratones. Este manejo fue ajeno a las personas abocadas al experimento, y las consecuencias se detectaron tres días luego de la introducción de ratones, momento en el cual el consumo se redujo prácticamente a cero hasta que el rack fue retirado. Desafortunadamente, el mismo permaneció durante seis días, afectando no sólo el consumo inmediato, sino también las medidas corporales de las semanas siguiente (Sem₁₂ y Sem₁₃) (Fig. 8 en Capítulo III).

Dado que el consumo de alimento no pudo ser medido de manera individual, no se pudo detectar si hubiera habido diferencias entre los individuos. Estas diferencias eran de esperar debido a jerarquías de dominancia entre individuos, de igual manera que estos

patrones de dominancia podrían haber diferido entre grupos de tratamientos. Si esto hubiese sido así, es razonable suponer que las varianzas del peso corporal hubiesen diferido entre grupos de tratamientos. Sin embargo, luego de aplicar los test de Levene y de Bartlett para comparar las varianzas entre grupos, se constató que no fue así ($p = 0,73$ y $p = 0,52$, respectivamente). Esto último sugiere que la supuesta jerarquía de dominancia no tuvo una influencia relevante sobre las variables somáticas analizadas.

Cual esperado, dado que fue forzado por el tratamiento, el consumo acumulado medio fue un 32% menor en los animales RA en comparación con los alimentados *ad libitum*. En cuanto a los animales expuestos a CS, consumieron un 15% menos de alimento que aquellos en condiciones de estabilidad social y densidad baja (Fig. 5, Tabla A3 en Anexo II). En tanto que al considerar el consumo de alimento por kg-rata, se detectó un efecto aditivo entre los tratamientos. Los individuos CS redujeron su consumo de alimento en relación a los controles, mientras tendieron a consumir la misma cantidad de alimento en relación a su peso que los animales bajo RA ($p = 0,057$) (Fig. 5, Tabla A3).

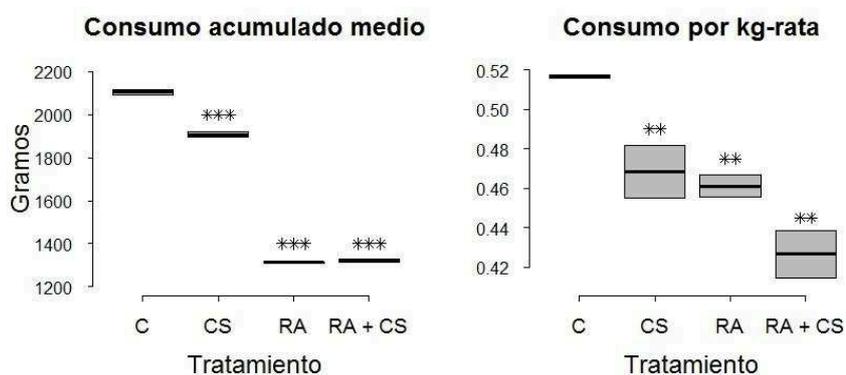


Figura 5. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre medidas de consumo (#: $p = <0,1$; *: $p = <0,05$; **: $p = <0,01$; ***: $p = <0,001$) (mediana, 1er y 3er cuartil, y valores mínimo y máximo).

Los modelos resultantes en las Sem₁₀ y Sem₁₃ fueron consistentes entre sí, no encontrándose diferencias entre ellos. Los hallazgos reportados en el consumo de alimento durante la Sem₁₃ fueron igualmente encontrados en la Sem₁₀. En cuanto a las medidas de peso corporal, se analizan en detalle en el Capítulo III.

Discusión

De acuerdo a lo planteado en la primera hipótesis, ambos tratamientos implementados (restricción alimentaria RA y conflicto social CS) generaron un número de cambios en los indicadores seleccionados, los que se encuentran asociados a la influencia del estrés crónico. En contraste, los resultados obtenidos son contrarios a la segunda hipótesis planteada, dado que no fue evidente que los estresores interactuasen entre sí de manera sinérgica. Los individuos bajo restricción alimentaria presentaron niveles elevados de corticosterona plasmática total (CORT) a lo largo de todo el experimento, prácticamente duplicando los niveles presentados por los animales control (con libre acceso al alimento y en un ambiente social estable). Además de ello, estos animales presentaron glándulas adrenales de mayor tamaño en relación a su masa corporal, junto con incrementos en el tamaño relativo de la corteza adrenal y de la *zona fasciculata*. Todas estas alteraciones han sido reconocidas como indicadores robustos del impacto del estrés crónico (Blanchard y col., 2001; Eberhardt y col., 2013; Sterlemann y col., 2008; Ulrich-Lai y col., 2006).

Los sujetos expuestos a CS presentaron una disminución del tamaño de la *zona glomerulosa* (responsable de la secreción de aldosterona). Esta última alteración es una consecuencia reconocida de la exposición repetida a niveles elevados de ACTH durante el estrés crónico (Aguilera y col., 1996; Nicolaidis y col., 2015; Ulrich-Lai y col., 2006). Aún más, la reducción en el consumo de alimento en estos mismos animales constituye otro marcador confiable de estrés crónico (Maniam y Morris, 2012; Martí y col., 1994; Vallès y col., 2000). A pesar de haberse descrito algunos indicadores indirectos de la acción del estrés crónico en los animales sujetos a CS, tanto de la actividad del eje HPA como de su impacto sobre el organismo, los niveles de CORT permanecieron inalterados. Esto podría deberse a la disponibilidad plasmática de CBG. Como se mencionó previamente, una de las funciones de la CBG es fijar y transportar corticosteroides, entre ellos la CORT. Se supone que de esta manera se regula la actividad de esta hormona, ya que sólo la fracción libre ejercería un efecto relevante sobre los tejidos (Breuner y Orchinik, 2002; Breuner y col., 2013; Desantis y col., 2013). Sin embargo, esto aún se encuentra en discusión y no existe un consenso firme entre los autores (Schoech y col., 2013). A pesar de ello, es razonable argumentar que las CBG podrían haber disminuido como consecuencia del CS, aumentando la disponibilidad de CORT libre, lo que explicaría la ausencia de un incremento en los niveles totales. Si bien en este estudio no

se analizaron los niveles de CBG, se han reportado hallazgos similares en ratas expuestas a modelos de estrés social (Spencer y col., 1996; Stefanski, 2000).

El modelo de estrés crónico evaluado en esta tesis difiere de otros anteriores fundamentalmente en la duración de la exposición al estrés y en el tipo de estrés social evaluado. En este experimento, los animales fueron expuestos a los estresores de manera continua por un lapso de 13 semanas, durante las cuáles se evaluó el impacto generado. Sin embargo, lo usual es que los experimentos de estrés crónico se ejecuten en períodos menores (conforme a los estudios revisados, el máximo suelen ser cuatro semanas). En cuanto al estrés social crónico, la mayoría de los modelos descriptos están basados en interacciones agonistas (disrupción social, estrés psicosocial crónico) (Avitsur y col., 2009; Bartolomucci, 2007), lo cual difiere del escenario de disrupción social + altas densidades aquí presentado. Los resultados obtenidos a partir de interacciones agonistas deben interpretarse en consideración del sexo, estatus social (dominante *vs* subordinado, residente *vs* intruso) y de las condiciones de alojamiento (aislado, de a pares, en grupo), siendo inconsistentes en los hallazgos o al menos dispersos (Habig y Archie, 2015). De manera adicional, ese tipo de modelos no tiene en cuenta la influencia potencial de la densidad de animales. En contraste, el modelo de estrés social crónico aquí evaluado resta relevancia al comportamiento agonista e incluye el efecto del incremento de densidad, lo cual no ha sido explorado previamente.

En conclusión, mediante los métodos propuestos, se pudo confirmar que los tratamientos aplicados activaron el eje de estrés, e indujeron la aparición de cambios asociados al efecto del estrés crónico. Estos resultados no son llamativos, ya que ambos desafíos ambientales han sido reconocidos como estresores (Boonstra y col., 2014; Creel y col., 2013; Dickens y Romero, 2013; Kitaysky y col., 2010; Schultner y col., 2013). Aún más, ante la ausencia de sinergismo en su accionar, es posible indicar que ambos estresores difieren en su forma de actuar, lo que explicaría los diferentes cambios observados. Cabe destacar que de acuerdo al esquema de exposición utilizado en este experimento, los estresores debieran clasificarse como continuos y predecibles (Dickens y Romero, 2013; Koolhaas y col., 2011). Sin embargo, independientemente de esto, los resultados sugieren que ambos estresores fueron lo suficientemente incontrolables como para producir alteraciones características de un estado de estrés crónico, aunque hayan diferido en su intensidad.

CAPÍTULO III

Patrones de crecimiento e inversión somática en ratas expuestas a estresores crónicos

Introducción

En un sinnúmero de especies de animales, la variación en el tamaño y la condición corporal determinan características propias del individuo, como ser interacciones competitivas, habilidad en el uso de recursos, conductas ante la búsqueda de alimento, defensas anti-predadores, exposición y resistencia a parásitos, entre otras (Blanckenhorn, 2000; Bolnick y col., 2011; Burthe y col., 2010; Griffiths y Brook, 2005; Okie y col., 2013; Preisser y Orrock, 2012; Yan y col., 2014). Por ejemplo, los individuos de mayor tamaño son más capaces de competir por recursos, usualmente presentan un mayor *fitness* reproductivo y son menos propensos a ser predados (Berner y Blanckenhorn, 2007; Muñoz y Bonal, 2008; Preisser y Orrock, 2012). Aún más, los individuos en mejor condición corporal están mejor preparados para enfrentar y limitar una infección (Beldomenico y Begon, 2010). En consecuencia, el crecimiento y la inversión somática representan factores determinantes del *fitness* en muchas especies de animales.

Desde el nacimiento hasta alcanzar la madurez sexual, los recursos son principalmente destinados al crecimiento (esfuerzo somático), pero también necesitan invertirse en demandas concurrentes y futuras, como ser la respuesta inmune a infecciones y el desarrollo del sistema reproductivo. Los *trade-offs* resultantes de la disposición de recursos entre diversos aspectos fisiológicos (Burthe y col., 2010; Oli, 1999) determinan que exista variabilidad fenotípica entre individuos, representando consecuencias de importancia para el crecimiento, supervivencia y reproducción del individuo (Bolnick y col., 2011; Boonstra, 2013b). Aún más, esta variabilidad entre aspectos individuales bien podría tener un impacto sobre parámetros demográficos (Bolnick y col., 2011).

A su vez, el crecimiento es influenciado por numerosos factores durante el transcurso de la vida de un individuo; no sólo por la disponibilidad de alimento, pero también por la densidad poblacional, la competencia y aspectos de salud, al igual que otros desafíos ambientales (English y col., 2012; Griffiths y Brook, 2005; Lee y col., 2012; Schmidt y col., 2012). Ante la escasez de recursos y los desafíos del ambiente, los organismos deben priorizar el desarrollo y mantenimiento de algunos procesos en particular por sobre otros, lo que resulta en un intercambio de recursos entre estas funciones (por ej., entre

crecimiento e inmunidad) (Bolnick y col., 2011; Burthe y col., 2010; Kriengwatana y col., 2013). Asimismo, el impacto de los desafíos ambientales sobre el crecimiento dependerá de la fase de desarrollo en que sean enfrentados (Kriengwatana y col., 2013). A causa de los numerosos procesos fisiológicos que maduran en distintas etapas del desarrollo, el crecimiento puede verse afectado de manera diferencial si los desafíos ambientales son enfrentados en una etapa temprana (por ej., juveniles) o más tardía (por ej., sub-adultos) (Kriengwatana y col., 2013). La inversión diferencial en aspectos somáticos puede también influenciar un desarrollo desigual de diversos tejidos y órganos, lo cual se determina no sólo por alometría, pero también por la plasticidad fenotípica exhibida por el organismo.

En este sentido, la reproducción es una de las primeras funciones fisiológicas que se deprimen durante la exposición a desafíos ambientales (Derting y Compton, 2003; French y col., 2007b). Por ejemplo, en un estudio experimental con lagartijas (*Urosaurus ornatus*) se demostró que las hembras fueron capaces de invertir tanto en reproducción como en curar sus heridas, pero sólo cuando el alimento abundaba (French y col., 2007a). Por el contrario, cuando el alimento escaseaba, para curar sus heridas debieron reducir la inversión en el sistema reproductivo. De igual manera, en un experimento con ratones silvestres (*Peromyscus maniculatus*), se observó que al desafiarlos inmunológicamente redujeron la asignación de energía para el sistema reproductivo, a pesar del libre acceso al alimento y a la bebida (Derting y Compton, 2003). Por otro lado, los tejidos digestivos, de mantenimiento costoso, presentan una gran plasticidad para hacer frente a las demandas energéticas impuestas por el medio (Bozinovic y col., 2007; Naya y col., 2007).

Dado que muchas de las características de un organismo se encuentran relacionadas al tamaño corporal y la inversión somática, es de interés para el desarrollo y análisis de esta tesis comprender los factores que podrían estar afectando esta variación, al tiempo que expande nuestro conocimiento sobre las consecuencias de la exposición de los organismos a un ambiente cambiante. Considerando que en el mundo real los animales están continuamente expuestos a patógenos que requieren de costosas respuestas inmunes (Beldomenico y Begon, 2010; Beldomenico y col., 2008a; Graham y col., 2011), el desafío antigénico de los animales en estudio le confiere al experimento un mayor grado de realismo. Este desafío inmunológico no pone en riesgo las hipótesis acerca del impacto de los estresores ambientales sobre el crecimiento y la inversión somática, ya que todos los individuos fueron inmunizados por igual.

En este capítulo, se plantearon las hipótesis de que i) la exposición prolongada a escasez de alimento y conflicto social alteran los patrones de crecimiento en ratas, ya sea actuando por separado o de manera sinérgica; y ii) estos estresores afectan de manera diferenciada la inversión entre sistemas, resultando en *trade-offs* entre ellos. De acuerdo a lo planteado previamente, los animales expuestos a los desafíos ambientales crecerían más lentamente y alcanzarían un menor tamaño, plasmándose en curvas de crecimiento de menor magnitud; al tiempo que se espera que el impacto difiera entre estresores. Adicionalmente, algunas funciones fisiológicas serán priorizadas por sobre otras, anticipándose que la inversión en reproducción se reduzca en vista de favorecer funciones pertinentes para la supervivencia inmediata.

Materiales y Métodos

Patrones de crecimiento, y medidas de condición corporal e inversión somática

La obtención de los datos necesarios para el desarrollo de este capítulo fue descrita en la sección de “Materiales y Métodos” del Capítulo II.

- *Patrones de crecimiento*

En mamíferos, los patrones de crecimiento suelen ser representados matemáticamente con una función no lineal de la edad, mejor caracterizada por una ecuación sigmoide (Zullinger y col., 1984). Los modelos no lineales más comunes proveen de parámetros que pueden ser utilizados para efectuar comparaciones entre grupos, ya que se controlan las diferencias que pudiera haber en tamaño corporal (English y col., 2012; Griffiths y Brook, 2005). Para caracterizar el desarrollo de la masa corporal, los pesos semanales de ratas de entre seis y 16 semanas de vida (correspondiente a los pesos semanales entre las Sem₀ y Sem₁₀ del experimento) fueron ajustados a tres modelos de crecimiento utilizados frecuentemente en mamíferos: las ecuaciones de Gompertz, Richards, y logística (Zullinger y col., 1984). Se consideró el crecimiento hasta la Sem₁₀ del experimento para evitar la influencia de las alteraciones producto de la introducción del rack con ratones (ver Capítulo II).

Se seleccionó el modelo que presentó el mejor ajuste a los datos mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC, del inglés *Akaike Information Criterion*), para luego extraer los parámetros que describen las curvas de crecimiento. Este procedimiento de selección y extracción se realizó de manera automática mediante el uso del paquete “*grofit*” (Kahm y col., 2010). El modelo denominado “Gompertz” presentó el mejor

ajuste de los pesos semanales (Gompertz: 42% de los 24 individuos considerados, logístico: 33%, y Richards: 25%), en concordancia con estudios previos sobre el crecimiento en roedores (Antinuchi y Luna, 2002; De Conto y Cerqueira, 2007; Jackson y Van Aarde, 2003). Por tanto, el procedimiento fue programado para aplicar el modelo Gompertz a todos los individuos, de manera que permita la comparación entre ellos (Merkling y col., 2012). Para cada espécimen se obtuvieron los siguientes parámetros de crecimiento: retraso al inicio de la fase de crecimiento acelerado λ , tasa máxima de crecimiento representada por la pendiente máxima μ , y crecimiento máximo A representado por la asíntota superior (Merkling y col., 2012; Zullinger y col., 1984). La tasa máxima de crecimiento μ indica el incremento de peso por unidad de tiempo durante la fase de crecimiento acelerado. Mientras que el crecimiento máximo A , donde la pendiente de la curva de crecimiento alcanza el valor 0, se refiere al peso corporal máximo del grupo en cuestión.

- *Análisis longitudinal de condición corporal e inversión somática*

En los análisis longitudinales se consideraron las medidas semanales de crecimiento y condición corporal: el peso corporal, la ganancia de peso corporal, y el índice de masa corporal (log peso corporal / log largo corporal) (Labocha y col., 2014).

- *Análisis de punto final de condición corporal e inversión somática*

En los análisis de punto final se consideraron las siguientes medidas de condición corporal e inversión somática registradas en la Sem₁₃, al finalizar el experimento: peso corporal final, ganancia absoluta de peso corporal, índice de masa corporal final (Labocha y col., 2014), y los pesos de los órganos colectados (absoluto y relativo, es decir, en relación al peso corporal). Asimismo, con el propósito de verificar el impacto que pudiera haber tenido la introducción del rack con ratones sobre las medidas de punto final (ver Capítulo II), se compararon las variables de peso y condición corporal registradas en las Sem₁₀ y Sem₁₃.

Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los patrones de crecimiento (del tipo “punto final”) se incluyeron como variables respuesta la tasa máxima de crecimiento μ y el crecimiento máximo A , que fueron obtenidos del modelo de crecimiento Gompertz. El retraso al inicio de la fase de crecimiento acelerado λ fue incluido en las curvas de crecimiento para describir la forma de la curva, pero no fue considerado como variable respuesta debido a

que este parámetro no refleja ningún dato de relevancia biológica acerca del crecimiento previo (el peso se registró recién a partir de los 28 días de vida) (Downs y col., 2016).

Los análisis de condición corporal e inversión somática incluyeron como variable respuesta las medidas repetidas (análisis longitudinales) de peso corporal, ganancia de peso corporal e índice de masa corporal; mientras que en los análisis de punto final se incluyeron las medidas finales de esas mismas variables y los pesos de órganos seleccionados (absolutos y relativos).

Los detalles generales en cuanto a la construcción y selección de los modelos se presentan en el “Anexo II: Análisis estadísticos”.

Resultados

Patrones de crecimiento, y medidas de condición corporal e inversión somática

- *Patrones de crecimiento y análisis longitudinal*

Los individuos expuestos a restricción alimentaria demostraron un crecimiento bastante menor en comparación de aquellos con libre acceso al alimento (evidenciado en los análisis longitudinales de inversión somática y en los análisis de los parámetros de crecimiento) (Fig. 6 y 7, Tablas A4 y A5 en Anexo II).

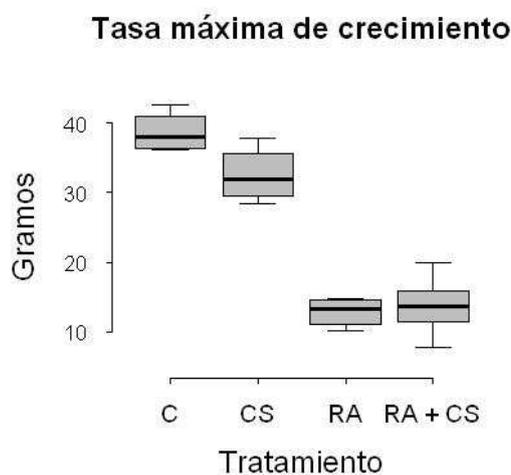


Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la tasa máxima de crecimiento (mediana, 1er y 3er cuartil, y valores mínimo y máximo).

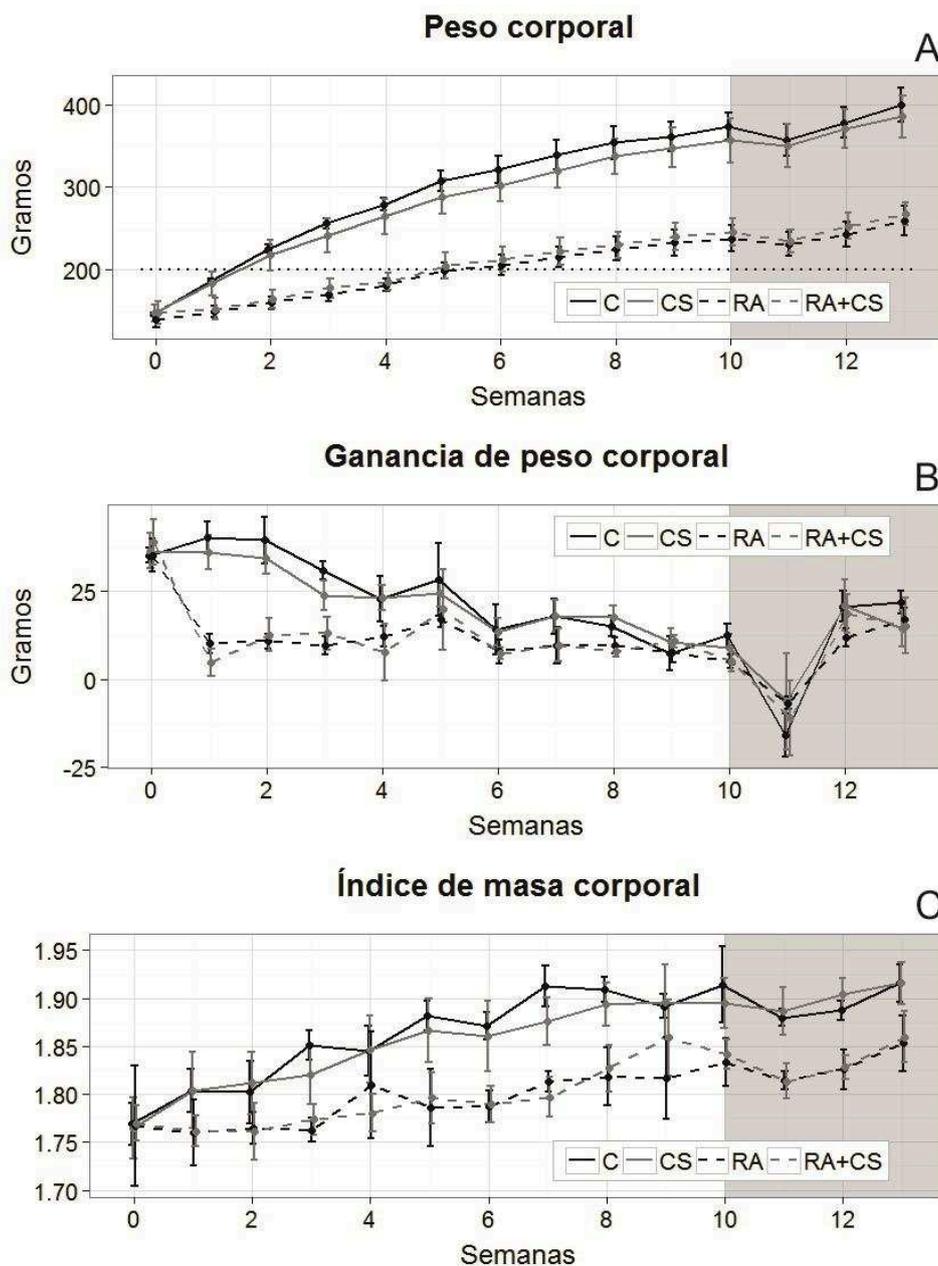


Figura 7. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre medidas longitudinales de inversión somática y condición corporal (el área sombreada corresponde a las semanas excluidas de los análisis; mientras que en el gráfico A, la línea punteada representa el peso crítico en que se alcanza la madurez sexual).

La tasa máxima de crecimiento presentó grandes diferencias entre los grupos de tratamientos: los animales en RA crecieron alrededor de 13 g/semana, en contraste con los 38,6 g/semana que crecieron los controles (Fig. 6, Tabla A4). Por el otro lado, los animales sólo bajo CS (alimentados *ad libitum*) crecieron por semana 6 g menos que los animales del grupo control (Fig. 6, Tabla A4). Cabe mencionar que la interacción RA*CS

fue significativa ($p = 0,028$), aunque de signo opuesto a los coeficientes de RA o CS por separado, lo que indicaría que el impacto sobre la tasa de crecimiento estuvo limitado al efecto de la RA (Fig.6, Tabla A4). Por otro lado, cabe destacar que no se encontraron diferencias en el crecimiento máximo (asíntota superior) que podría alcanzar cada uno de los grupos (Tabla A4). De manera adicional, al finalizar el experimento, la ganancia de peso corporal no difirió entre tratamientos, lo que podría deberse a que los animales con libre acceso al alimento alcanzaron su tamaño adulto y detuvieron su crecimiento naturalmente (Fig. 7, Tabla A5). Acerca del índice de masa corporal, durante las primeras semanas se detectó una diferencia entre animales con acceso libre o limitado al alimento, pero que fue disminuyendo promediando el experimento (Fig. 7, Tabla A5).

- *Análisis de punto final*

Al finalizar el experimento, los individuos sometidos a restricción alimentaria (independientemente de estar sometidos a CS o no), pesaron menos (32%) y presentaron menor índice de masa corporal (3%) que aquellos con libre acceso al alimento, al tiempo que ganaron casi la mitad del peso (43% menor) (Fig. 8, Tabla A6 en Anexo II). En cuanto a los individuos bajo CS, a pesar de las diferencias en el consumo de alimento (ver Capítulo II), no presentaron diferencias con respecto a los animales en densidades bajas y un ambiente social estable. Asimismo, al comparar las medidas obtenidas en las Sem₁₀ y Sem₁₃ (final), no se detectaron diferencias entre los efectos seleccionados ni entre los coeficientes de los modelos (Fig. 8, Tabla A6).

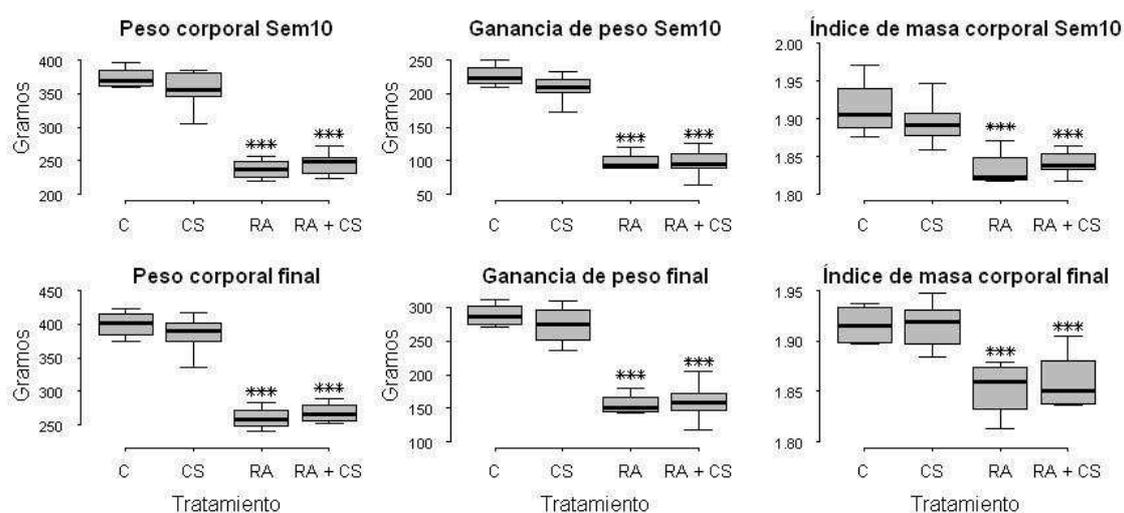


Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre medidas de peso en Sem₁₀ y Sem₁₃ (#: p

= <0,1; *: $p = <0,05$; **: $p = <0,01$; ***: $p = <0,001$) (mediana, 1er y 3er cuartil, y valores mínimo y máximo).

La mayoría de los órganos de los animales en RA pesaron menos (entre 10,1% - glándulas adrenales- y 40% -hígado-) que aquellos de los animales alimentados *ad libitum* (Tabla 2 y Tabla A7 en Anexo II). Sin embargo, al considerar el peso corporal, los pesos relativos del bazo (27%), corazón (19%), glándulas adrenales (31%), testículos (42%) y epidídimos (22%) fue mayor en los animales con alimento restringido (Tabla 2 y Fig. 9). En contraste, el hígado de estos mismos animales fue un 13% menor en relación al peso corporal (Fig. 9). Se destaca que el peso absoluto de los testículos no fue diferente entre grupos.

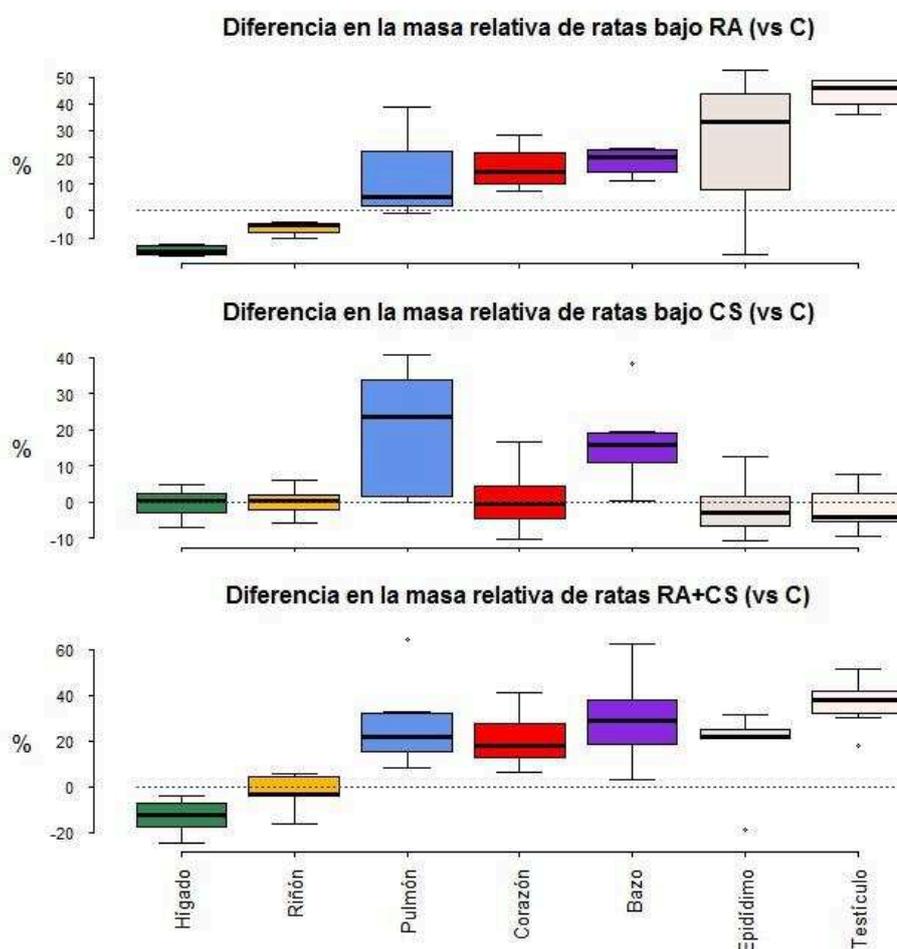


Figura 9. Gráfico de cajas y bigotes representando la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre el peso relativo de órganos seleccionados, expresado en relación al grupo Control (mediana, 1er y 3er cuartil, y valores mínimo y máximo).

En cuanto a los individuos expuestos a CS, el peso absoluto y relativo de bazos y pulmones fue mayor que el de aquellos animales en un ambiente social estable (respectivamente, una diferencia de 13% y 10% en el peso absoluto, y de 24% y 18% en el peso relativo) (Tablas 2 y A7, Fig. 9).

En la Tabla 2 se presentan datos descriptivos de los pesos de los órganos seleccionados (absolutos y relativos).

Tabla 2. Datos descriptivos del peso de los órganos seleccionados de ratas expuestas a restricción alimentaria (RA) y/o conflicto social (CS).

Peso de los órganos (g)	Tratamiento			
	C	RA	CS	RA + CS
Corazón	1,05 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,12 ^b	1,03 ± 0,11 ^a	0,85 ± 0,08 ^b
relativo (x10 ²)	0,26 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,02 ^{ab}	0,27 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,0 ^b
Pulmones	1,41 ± 0,13 ^{ab}	1,03 ± 0,17 ^c	1,64 ± 0,25 ^a	1,20 ± 0,15 ^{bc}
relativo (x10 ²)	0,35 ± 0,05 ^a	0,40 ± 0,06 ^{ab}	0,43 ± 0,06 ^b	0,45 ± 0,06 ^b
Bazo	0,50 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,03 ^c	0,57 ± 0,08 ^b	0,44 ± 0,05 ^{ac}
relativo (x10 ²)	0,13 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^{ab}	0,15 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,02 ^b
Hígado	12,93 ± 0,83 ^a	7,18 ± 0,59 ^b	12,44 ± 1,06 ^a	7,56 ± 0,76 ^b
relativo (x10 ²)	3,24 ± 0,22 ^a	2,76 ± 0,07 ^b	3,23 ± 0,13 ^a	2,82 ± 0,24 ^b
Riñones	2,66 ± 0,08 ^a	1,62 ± 0,07 ^b	2,56 ± 0,1 ^a	1,75 ± 0,16 ^b
relativo (x10 ²)	0,66 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,65 ± 0,05
Glánd. adrenales (x10)	0,49 ± 0,04 ^a	0,37 ± 0,07 ^b	0,43 ± 0,07 ^{ab}	0,41 ± 0,05 ^{ab}
relativo (x10 ³)	0,12 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^b
Testículos	2,87 ± 0,06	2,70 ± 0,23	2,71 ± 0,11	2,64 ± 0,23
relativo (x10 ²)	0,72 ± 0,05 ^a	1,04 ± 0,04 ^b	0,71 ± 0,04 ^a	0,98 ± 0,07 ^b
Epidídimos	1,19 ± 0,08 ^a	0,98 ± 0,27 ^b	1,13 ± 0,1 ^a	0,95 ± 0,15 ^b
relativo (x10 ²)	0,30 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,09 ^b	0,29 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,05 ^b

Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas.

Discusión

Considerando que la exposición de machos juveniles de rata a dos de los desafíos ambientales más comunes en la naturaleza modificó sus patrones de crecimiento y de inversión somática, se acepta la primera de las hipótesis planteadas en este capítulo. Conforme a lo esperado, la escasez de alimento resultó en una declinación marcada del crecimiento, con una tasa máxima de crecimiento de los animales expuestos a RA 67% inferior a la presentada por aquellos con alimento *ad libitum*. Un hallazgo interesante fue encontrar que las ratas expuestas a un ambiente social inestable (CS), que disminuyeron su ingesta a pesar de ser alimentadas *ad libitum* (ver en Capítulo II), presentaron una tasa máxima de crecimiento 6% inferior que aquellos en condiciones sociales estables, al tiempo que su crecimiento se redujo en 6 g cada semana.

Es sabido que el crecimiento del tamaño corporal se limita de acuerdo a la cantidad de energía disponible y los gastos de mantenimiento del individuo (Griffiths y Brook, 2005). La declinación abrupta que se observó durante las primeras semanas del experimento en la ganancia de peso corporal de las ratas con restricción alimentaria, podría reflejar un intento por destinar los recursos disponibles a satisfacer los costos de mantenimiento, reduciendo los recursos destinados al crecimiento somático. Esta estrategia de restringir el crecimiento para hacer frente a los costos de mantenimiento es habitual entre diversas especies de mamíferos de menor tamaño, siendo puesta en juego ante situaciones adversas y escasez de recursos (Bozinovic y col., 2007; Yan y col., 2014; Zhu y col., 2013). Por otro lado, la influencia del conflicto social sobre el crecimiento corporal es menos clara. La reducción detectada en la tasa máxima de crecimiento de los animales en un ambiente social inestable responde a la disminución en el consumo de alimento descrita en el Capítulo II. Como bien se indicó previamente, sería consecuencia de la respuesta de estrés ejecutada ante la inestabilidad social y el incremento de densidad (Blanchard y col., 2001; Chaby y col., 2016; Maniam y Morris, 2012).

A pesar del marcado contraste en las tasas máximas de crecimiento, no se detectaron diferencias en el crecimiento máximo (representado por la asíntota superior) (Tabla A4) de las ratas expuestas a los desafíos ambientales. Esto parecería sugerir que, si las condiciones prevalecieran, los animales bajo restricción alimentaria continuarían creciendo hasta alcanzar un tamaño adulto estándar. Sin embargo, esto parece poco probable, dado que los mamíferos presentan un crecimiento determinado, que se enlentece considerablemente luego de alcanzar la madurez sexual (Mumby y col., 2015).

Además, si se considera la tasa máxima de crecimiento presentada por esos individuos, el crecimiento máximo se alcanzaría pasados los dos años, lo que supera las expectativas de vida de la especie.

El patrón de crecimiento corporal es un parámetro clave en la historia de vida de un organismo, ya que influencia la edad en que se alcanza la madurez sexual y por tanto condiciona el potencial y éxito reproductivo de los individuos (Griffiths y Brook, 2005). De hecho, la transición de la etapa de crecimiento a la de reproducción produce una relación notoria entre edad y tamaño corporal a la madurez (Berner y Blanckenhorn, 2007). En ratas de laboratorio, de la cepa Wistar, los machos alcanzarían la madurez sexual con aproximadamente 160 g de peso (Campion *et al.*, 2013); mientras que en ejemplares de ratas pardas (*Rattus norvegicus*) de vida libre, tanto de poblaciones templadas como tropicales, sucedería a los 200 g de peso (Porter y col., 2015). Esto sugiere que este sería el rango de pesos críticos en los que se activan los procesos fisiológicos que subyacen a la vida reproductiva de esta especie (Berner y Blanckenhorn, 2007; Porter y col., 2015). Basado en esto, las ratas del experimento con libre acceso al alimento alcanzaron este peso crítico entre la 6^a y 8^a semana de vida, mientras que aquellas con acceso restringido lo hicieron casi un mes más tarde (Fig. 7). Esta diferencia indica que las ratas alimentadas *ad libitum* habrían iniciado su reproducción más temprano, lo que incrementaría su potencial reproductivo con respecto a las ratas con alimentación restringida.

En cuanto a la segunda hipótesis planteada, acerca de los recursos asignados a otras funciones fisiológicas, efectivamente se verificó una inversión diferencial entre sistemas, reflejada de manera indirecta por el peso de los órganos asociados. Sin embargo, contrario a lo esperado, los resultados obtenidos demostraron un incremento de la inversión en tejidos reproductivos en los animales expuestos a RA. El desarrollo de la masa de los testículos y epidídimos se encuentran asociado a un aumento de la espermatogénesis (Derting y Virk, 2005) y a la competencia espermática (Klemme y col., 2014), por lo que frecuentemente es utilizado como indicador de la inversión en reproducción (Klemme y col., 2014). La limitación de recursos determinó que la masa corporal de los individuos expuestos a restricción alimentaria fuese un 32% menor que la de aquellos alimentados *ad libitum*. Sin embargo, la masa de los testículos y epidídimos no fue afectada, determinando que una mayor cantidad relativa de energía fuese invertida en tejido reproductivo (por ej., la masa testicular representó el 1% de la masa corporal en las ratas

con alimento restringido, mientras que sólo alcanzó el 0,7% en aquellas con libre acceso al alimento). Rocha y col. (2012) reportaron un incremento similar de la masa relativa de testículos y epidídimos en ratas expuestas a restricción alimentaria del 30% durante 150 días, aunque en ese experimento no contemplaron la comparación con otras funciones fisiológicas o variables causales de estrés.

Estos resultados sugieren que la inversión en tejidos reproductivos por parte de las ratas expuestas a la restricción de alimento podría representar una estrategia adaptativa para maximizar la reproducción ante el compromiso de su propia supervivencia. De hecho, estos animales invirtieron en reproducción a pesar de haber inmunizadas con ASB (en representación de la exposición a un patógeno). De manera similar, experimentos previos demostraron que roedores no estresados priorizaron su reproducción ante la exposición a un antígeno: machos adulto de ratones silvestres (*Peromyscus maniculatus*) que fueron desafiados con un antígeno incrementaron tanto la función inmune como la masa de tejidos reproductivos (Derting y Virk, 2005), en tanto que machos de hámster siberiano inyectados con lipopolisacárido retardaron la regresión estacional de sus gónadas (Weil y col., 2006). Los resultados obtenidos en el marco de esta tesis sugieren que la reducida disponibilidad de alimento y el incremento de la exposición a patógenos, lo que usualmente ocurre de manera simultánea ante densidades poblacionales altas, podrían comportarse como indicadores de malas perspectivas de sobrevivencia. Cuando los recursos son limitados y las infecciones abundan, los roedores machos favorecerían el desarrollo de tejido reproductivo, aunque ello represente la reducción de otras funciones fisiológicas relevantes (como ser inmunidad y crecimiento), como una estrategia de inversión terminal ante condiciones ambientales adversas.

El bazo y los pulmones fueron otros de los órganos favorecidos por la respuesta ante el estrés, aunque no en la misma magnitud que los testículos y epidídimos. El incremento de la masa esplénica es frecuente ante la exposición a un antígeno (Murphy, 2012), lo que incluso es considerado como una medida indirecta de la función inmune (Bordes y col., 2012; Corbin y col., 2008; Schulte-Hostedde y col., 2012). La masa relativa del bazo fue mayor en los individuos expuestos a cada uno de los estresores analizados que en aquellos no expuestos. Este incremento relativo en la masa esplénica podría ser el reflejo de una función inmune aumentada, siendo que cada estresor estimuló la inmunidad humoral adaptativa en estas mismas ratas (ver en Capítulo V).

Por otro lado, la masa relativa de los pulmones se encontró aumentada en los animales expuestos a conflicto social, no así en aquellos expuestos a restricción alimentaria. Si bien no se realizó una valoración de la histología pulmonar, este hallazgo puede atribuirse a una respuesta pro-inflamatoria, cual ha sido descrita en ratones expuestos a un modelo de estrés psicosocial, ya sea con (Quan y col., 2001) o sin exposición a un antígeno (Curry y col., 2010). Este estado inflamatorio a nivel pulmonar, que induce el acúmulo de neutrófilos y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, se ha vinculado a un estado de resistencia a los GCs (Curry y col., 2010), que incluso ha sido propuesto como una forma de protección contra los efectos inmunosupresivos del estrés crónico (Bartolomucci, 2007). Por tanto, teniendo en cuenta el aumento del tamaño de los pulmones de las ratas expuestas a conflicto social y los resultados de otros autores, se considera que el proceso mencionado en los pulmones podría ser adaptativo, representando un incremento profiláctico de la inmunidad. Esta interpretación tiene sentido desde un punto de vista biológico ante altas densidades poblacionales, cuando abundan las oportunidades de interacción social y los individuos podrían enfrentar mayores riesgos de transmisión de patógenos (Caillaud y col., 2013; May y Anderson, 1979; Nunn y col., 2015), en particular patógenos respiratorios (ej., *Bordetella bronchiseptica*, ver en Forbes y col., 2015).

En cuanto a la disminución de masa hepática observada en los animales con alimento restringido, se trata de un hallazgo consistente con estudios previos sobre hibernación e inanición, tanto experimentales como de campo (ver en Bozinovic y col., 2007; y McCue, 2010). Dado que el hígado es considerado un órgano “costoso” desde el punto de vista metabólico (Bozinovic y col., 2007; Burton y col., 2011; Książek y col., 2009), la reducción de su tamaño podría haber reservado recursos para dar prioridad a otras funciones (por ej., reproducción y/o inmunidad).

En conclusión, estos resultados enfatizan que los animales ponen en juego diversas estrategias para responder a los desafíos ambientales enfrentados durante el desarrollo. Las diferencias observadas en los patrones de crecimiento y en el desarrollo somático de diversos órganos evidencia la plasticidad fenotípica exhibida por las ratas en respuesta a dos de los estresores ambientales comúnmente enfrentados durante periodos de alta densidad poblacional. Siendo que el tamaño corporal posee gran relevancia en la competencia entre ejemplares de la misma especie, el mayor tamaño alcanzado por los animales alimentados *ad libitum* representa una ventaja competitiva por sobre los

animales con alimento restringido. Aún más, sumado al retraso del inicio de la temporada reproductiva, sugiere que el éxito reproductivo de los ejemplares de menor tamaño estaría en riesgo. Sin embargo, estos mismos animales priorizaron la inversión de recursos en tejidos reproductivos, en un intento de inversión terminal para compensar lo expuesto previamente. Por otro lado, los ejemplares enfrentados a un mayor número de interacciones sociales, y por ello potencialmente expuestos a un mayor riesgo de contagio de patógenos, no invirtieron en reproducción, pero sí lo habrían hecho en inmunidad profiláctica. En resumen, la clara divergencia entre las estrategias implementadas por ratas expuestas de manera prolongada a diferentes desafíos ambientales podría representar importantes consecuencias para la reproducción y supervivencia de los individuos.

CAPÍTULO IV

El perfil leucocitario como marcador de la respuesta inmune celular: su variación bajo condiciones de estrés

Introducción

¿Qué medidas o métodos son los apropiados para explorar la variación e inversión en defensas inmunes? La respuesta a este interrogante constituye un factor clave para el estudio y la comprensión de la función inmune ante la influencia ejercida por el ambiente. Una sola medida usualmente no abarca la complejidad del sistema inmune, por lo que debe considerarse que cada medida analizada constituye sólo un reflejo parcial de esta complejidad, y no debieran considerarse como indicadores generales de inmunocompetencia. La inmunocompetencia de un individuo, entendida como la capacidad para montar una respuesta inmune apropiada ante la exposición a un patógeno, es un aspecto crítico de la resistencia a enfermedades y, por tanto, de la supervivencia (Beldomenico y Begon, 2010; Biard y col., 2015; Demas y col., 2011b; Viney y col., 2005). Sin embargo, debido a que la modulación de diversos aspectos específicos de la respuesta inmune puede diferir, se trata de un concepto de difícil aplicación e interpretación en la práctica (Demas y col., 2011b). De manera que, para lograr una mayor comprensión de la inmunocompetencia de un organismo, debieran analizarse en paralelo múltiples medidas del sistema inmune (Boughton y col., 2011; Pedersen y Babayan, 2011). En este Capítulo se abordará la influencia de dos estresores ambientales sobre el perfil leucocitario como marcador de la respuesta inmune celular; mientras que en el Capítulo V se tratará su impacto sobre parámetros seleccionados de la respuesta inmune humoral.

El perfil leucocitario como marcador de la respuesta inmune celular

Desde hace algún tiempo atrás, se ha vuelto común el uso de variables fisiológicas como “herramientas” para analizar aspectos ecológicos (Davis y col., 2008). Este enfoque, enmarcado en una nueva disciplina denominada “fisiología de la conservación”, ha permitido afrontar preguntas ecológicas claves acerca de la relación entre especies y ambiente o de los factores subyacentes a los eventos de historias de vida (Davis y col., 2008; Johnstone y col., 2015). En los últimos años, se ha demostrado que herramientas de uso frecuente para el monitoreo y diagnóstico del estado de salud y enfermedad en veterinaria y medicina humana, como ser la valoración de parámetros hematológicos

(Weiss y Wardrop, 2010), son también de utilidad para el estudio de dinámicas de salud en especies silvestres (Beldomenico y col., 2008b; Budischak y col., 2012; Eberhardt y col., 2015). Debido a que los glóbulos blancos (o leucocitos) están directamente involucrados en la respuesta inmune de los mamíferos (Weiss y Wardrop, 2010), la estimación de los niveles de leucocitos en circulación provee de una estimación global de la actividad inmune (Cutrera y col., 2010). De similar manera, el análisis del perfil leucocitario es considerado como un indicador adecuado para la evaluación de la respuesta inmune mediada por células en estudios ecológicos (Biard y col., 2015; Boughton y col., 2011; Young y col., 2015a). Constituye una herramienta de uso frecuente, principalmente debido a su relativa simplicidad, la posibilidad de uso en condiciones de campo, y no precisar de evaluaciones repetidas (en contraste con la clásica prueba de hipersensibilidad diferida en respuesta a la inoculación con fitohemaglutinina) (Boughton y col., 2011; Demas y col., 2011b; Salvante, 2006).

El análisis del perfil leucocitario comprende el conteo total de glóbulos blancos y el conteo diferencial de cada uno de los cinco tipos celulares (en la mayoría de las especies): linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos (Davis y col., 2008; Weiss y Wardrop, 2010). Estas células derivan de células madre hematopoyéticas, las cuáles luego se diferencian en leucocitos mononucleares (linfocitos y monocitos) y polimorfonucleares. A su vez, los linfocitos se diferencian en linfocitos B, linfocitos T. En conjunto, los linfocitos B y T coordinan la respuesta inmune adquirida: los linfocitos B poseen un rol primordial en la respuesta inmune humoral a través de la producción de anticuerpos (serán tratados en el Capítulo V); mientras que los linfocitos T participan de la inmunidad humoral a través de la activación de los linfocitos B, y de la inmunidad celular mediante la eliminación de células infectadas o tumorales (T citotóxicos y *helpers*) (Davis y col., 2008; Demas y col., 2011b; Weiss y Wardrop, 2010).

En cuanto a la respuesta inmune innata celular, se encuentra mediada por las células NK (del inglés *natural killers*), los leucocitos polimorfonucleares, y los monocitos. Las células NK atacan y lisan células infectadas de manera inespecífica. Los leucocitos polimorfonucleares incluyen tres tipos de células: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos proliferan en circulación en respuesta a infecciones, inflamación y estrés, y cumplen funciones como fagocitos, reconociendo y eliminando células o microorganismos que han sido marcados con anticuerpos y/o proteínas del complemento. Los eosinófilos y basófilos participan en procesos inflamatorios a través de la secreción

de proteínas activas, como toxinas, prostaglandinas e histamina, además de actuar como células presentadoras de antígenos. Además, los eosinófilos cumplen un rol esencial en las defensas contra parásitos. Por último, los monocitos, de larga vida media, están asociados a las defensas contra infecciones, convirtiéndose en macrófagos al migrar a los tejidos. Estos últimos, ejercen su acción a través de la fagocitosis de células infectadas o envejecidas y de la activación de los linfocitos T y B, además de actuar como células presentadoras de antígenos (Davis y col., 2008; Demas y col., 2011b; Weiss y Wardrop, 2010).

Sin embargo, es menester destacar que la interpretación de estas medidas fisiológicas en animales de vida libre es compleja, ya que son influenciadas por múltiples factores ambientales e individuales (Johnstone y col., 2015). Cada medida a considerar estará condicionada por la especie en particular, en una compleja interacción entre su historia de vida, fisiología, comportamiento, y el contexto ambiental de ese momento (estresores ambientales) (Eberhardt y col., 2015; Johnstone y col., 2015). De hecho, se encuentra ampliamente demostrado que el estrés agudo produce importantes cambios en la composición leucocitaria del torrente sanguíneo: en los primeros minutos, el número de linfocitos se incrementa, para luego disminuir (linfopenia); al tiempo que se incrementa el número de neutrófilos (neutrofilia) (Davis y col., 2008; Dhabhar y McEwen, 1997; Dhabhar, 2014; Dhabhar y col., 1995). Esta respuesta ante el estrés desencadena un fenómeno de redistribución y migración leucocitaria (conocido como inmunodistribución), por el cual los leucocitos abandonan el torrente sanguíneo y se trasladan hacia potenciales sitios de acción en los diferentes tejidos del organismo (Dhabhar y McEwen, 1997; revisado en Dhabhar, 2014). Incluso, estos cambios en los niveles leucocitarios y en la razón neutrófilos:linfocitos han sido propuestos y usados regularmente como medida indirecta del impacto de los estresores sobre el organismo (revisado en Davis y col., 2008). En cuanto al impacto del estrés crónico, existe evidencia que indica que la activación del eje HPA y la exposición prolongada a GCs provocarían un efecto similar al estrés agudo (Davis y col., 2008), o una reducción general de los leucocitos circulantes (Dhabhar, 2008). De todos modos, el impacto del estrés, principalmente del crónico, sobre el perfil leucocitario aún no es claro, más aún al considerar que distintos estresores ambientales podrían diferir en la respuesta puesta en marcha por el organismo (Bowers y col., 2008; Brooks y Mateo, 2013; Chester y col., 2010) y en su influencia sobre cada tipo leucocitario (Johnstone y col., 2012)

Por lo expuesto, ante la elección de marcadores del sistema inmune para su aplicación a estudios eco-epidemiológicos, se requiere del estudio de los factores que influyen en su variación, lo que puede aportar información valiosa para la interpretación y comprensión de lo que suceda en especies silvestres (Eberhardt y col., 2015). Acerca de los estresores ambientales aplicados en el experimento con ratas (detallado en Capítulo II), se ha reportado que el estrés social crónico tiene un efecto similar al ya descrito, indicándose la presencia de leucopenia y neutrofilia (Bartolomucci, 2007; Engler y col., 2004; Stefanski, 2001). En el caso de la restricción alimentaria prolongada, los resultados obtenidos han sido dispares, dependiendo de la duración y la intensidad de la restricción, desde no afectar los niveles de leucocitos ni de sus tipos celulares (Książek y Konarzewski, 2012) hasta descensos marcados de leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos (Hubert y col., 2000).

En este Capítulo se explora el efecto de dos estresores ambientales sobre la inmunidad mediada por células. Considerando que el fin último es identificar potenciales marcadores de inmunidad para estudios eco-epidemiológicos en roedores silvestres, se evaluó el perfil leucocitario como marcador de este tipo de respuesta inmune. Se analizaron las siguientes hipótesis: i) el perfil leucocitario en ratas es alterado de manera diferencial por la exposición prolongada a restricción alimentaria o conflicto social; ii) debido al efecto inmunosupresor del estrés crónico, no es evidente un incremento de la inmunidad celular adquirida. Se predijo que los animales expuestos crónicamente a conflicto social evidenciarían una clásica respuesta de estrés, con neutrofilia y linfopenia; mientras que en aquellos animales expuestos a restricción alimentaria primaría un descenso generalizado de los distintos tipos de leucocitos. Además, de acuerdo a lo planteado previamente en el Capítulo I acerca de la influencia del estrés crónico sobre el sistema inmune, los conteos de linfocitos no se incrementarían en respuesta a la exposición a un antígeno.

Materiales y Métodos

Toma de muestra y análisis hematológico

A partir del experimento detallado en el Capítulo II, se obtuvieron muestras semanales de sangre entera de cada uno de los individuos bajo estudio. Cabe señalar que esto fue realizado de manera previa a cualquier otro procedimiento. Los animales fueron inmovilizados mediante sujeción física, y las muestras fueron obtenidas en un tiempo inferior a los 3-5 minutos por animal (ambas acciones a cargo del personal del CMC). La

venipunción se realizó en las venas coccígeas y laterales de la cola, extrayéndose un volumen sanguíneo semanal máximo de entre 100 y 300 μ l (según la edad y peso del animal). Las muestras de sangre entera se colocaron en tubos eppendorf, con EDTA como anticoagulante, y se mantuvieron refrigeradas hasta su posterior análisis. En la Sem₂, una buena parte de las muestras se coaguló (parcial o totalmente) durante la extracción, por lo que no pudieron ser analizadas.

El conteo total de leucocitos se efectuó a través de un analizador hematológico de uso veterinario (BC 2800 Vet, Mindray®), dentro de las 2-4 h de efectuada la extracción. A continuación, se prepararon extendidos sanguíneos, los cuáles fueron teñidos mediante la técnica de May-Grünwald-Giemsa. Para el conteo diferencial de los leucocitos se consideró un mínimo de 100 células, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a sus características morfológicas (Weiss y Wardrop, 2010). El conteo absoluto de cada población leucocitaria se obtuvo a partir de multiplicar el conteo diferencial por el conteo total de leucocitos.

Como indicadores de la inmunidad celular innata, se consideraron los conteos absolutos de monocitos y granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), en tanto que para medir la inmunidad celular adquirida se utilizaron los conteos absolutos de linfocitos. Por último, se evaluó la razón neutrófilo:linfocito (N:L), como indicador de un patrón hematológico usualmente asociado al estrés crónico. Los basófilos no fueron considerados, debido a que fueron detectados en pocos individuos y con conteos bajos. Se optó por analizar sólo los conteos absolutos y no las proporciones de cada tipo celular, debido a que ésta última medida provee escasa información acerca de los cambios que ocurren en el perfil leucocitario, por lo que su valor analítico es limitado (revisado en Weiss y Wardrop, 2010).

Análisis estadístico

El análisis estadístico consideró dos objetivos: i) un análisis longitudinal (medidas repetidas), para analizar el impacto de los tratamientos sobre el perfil leucocitario a lo largo del experimento; y ii) un análisis del tipo “pre/post” para analizar el cambio en la trayectoria del perfil leucocitario antes y después de cada desafío antigénico con ASB. En los análisis longitudinales, se consideraron como variables respuesta el conteo total de glóbulos blancos, el conteo absoluto de cuatro de los tipos leucocitarios (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos) y la razón N:L; mientras que en los análisis del tipo “pre/post”, la variable respuesta fueron los conteos de cada tipo leucocitario, aunque

expresados como la diferencia entre semanas (semana actual - semana previa). Dada la magnitud de sus valores, estas variables fueron tratadas como variables continuas (normalizándose cuando fuese necesario). En el caso de los análisis longitudinales, se dividieron en dos partes: “fase de inducción de estrés”, entre las Sem₀ y Sem₆, para analizar el impacto de los estresores; y “fase de estrés + inmunización” para analizar el efecto de los estresores durante entre las Sem₇ y Sem₁₃. Cabe indicar que la Sem₂ fue excluida de los análisis longitudinales, debido a que los valores obtenidos fueron alterados por encontrarse muchas muestras coaguladas, total o parcialmente.

Los detalles generales en cuanto a la construcción y selección de los modelos se presentan en el “Anexo II: Análisis estadísticos”. Cabe señalar que para la correcta interpretación de los análisis “pre/post” (interacciones de 4º orden) se ofrecen gráficos predictivos a partir de los modelos lineales mixtos.

Resultados

Efecto de los tratamientos y del desafío antigénico sobre las trayectorias semanales de los conteos de cada tipo leucocitario

Los análisis estadísticos se presentan en las Tablas A8-A17, en Anexo II.

- *Leucocitos*

El conteo semanal de glóbulos blancos no demostró diferencias entre los tratamientos aplicados en ninguna de las dos fases analizadas (Fig. 10, Tabla A8). El único efecto que pudo observarse es un incremento semanal de los leucocitos durante la fase de estrés (Sem₀ a Sem₆) (el término “Sem” fue significativo, $p = 0.031$) (Tabla A8).

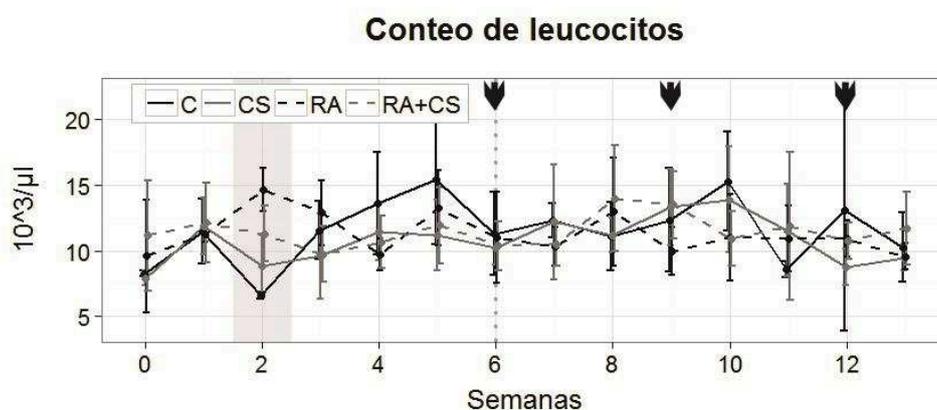


Figura 10. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de leucocitos (la línea punteada representa la diferencia entre fases,

el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

En cuanto al cambio en la trayectoria antes y después de cada desafío antigénico, se observó que el conteo aumentó en todos los grupos luego de la 1ª inoculación de ASB (Fig. 11, Tabla A9). Sin embargo, luego de la 2ª y 3ª inmunización, se evidenció una divergencia en las trayectorias de animales expuestos y no expuestos a CS: en los grupos sin CS, el conteo de leucocitos se incrementó luego de la 2ª inmunización, y disminuyó luego de la 3ª. En contraste, en los grupos expuestos a CS, los leucocitos disminuyeron luego del 2º desafío antigénico, y se incrementaron luego del 3º.

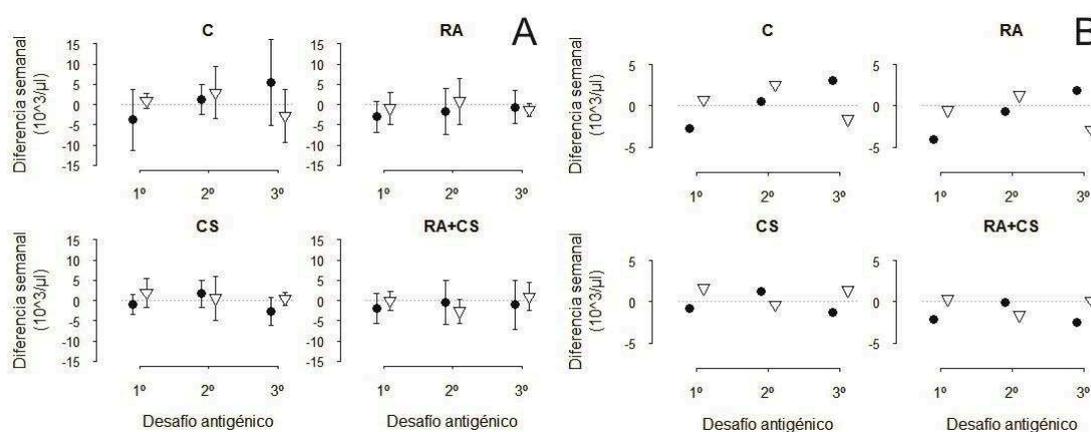


Figura 11. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en el conteo de leucocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior): A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

- *Linfocitos*

De manera similar a lo ocurrido con el conteo total de glóbulos blancos, no se encontraron diferencias entre los tratamientos en el conteo semanal de linfocitos, en ninguna de las dos fases analizadas (Fig. 12, Tabla A10). En tanto, se detectó que en cada fase del experimento los conteos incrementaron para luego disminuir.

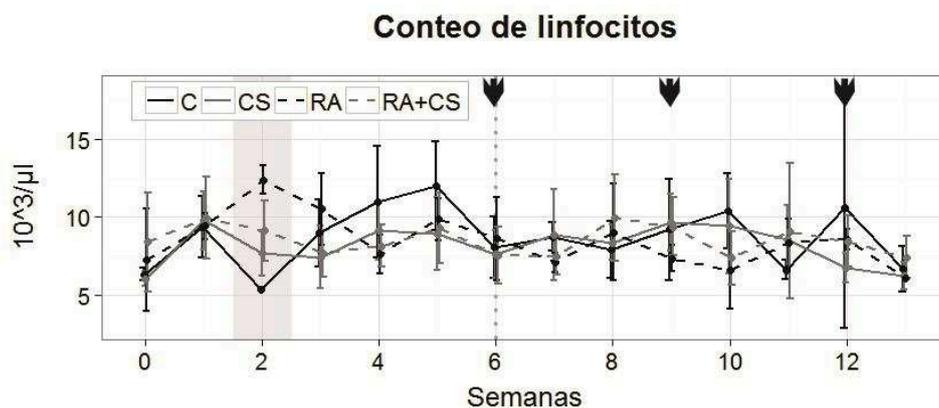


Figura 12. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de linfocitos (la línea punteada representa la diferencia entre fases, el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

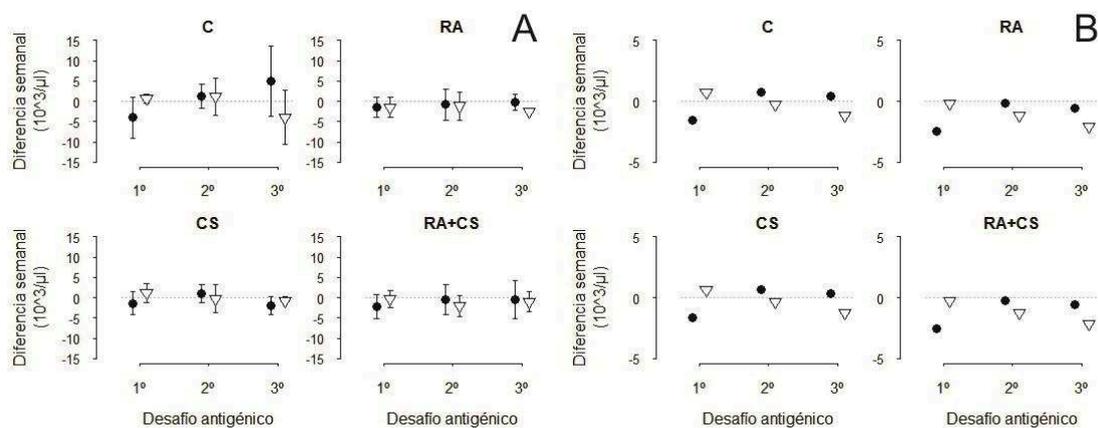


Figura 13. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en el conteo de linfocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior): A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

El comportamiento del conteo de linfocitos luego de los desafíos antigénicos fue similar para todos los grupos de tratamientos (Fig. 13, Tabla A11): se incrementaron luego del 1°, y disminuyeron luego del 2° y 3°.

- *Neutrófilos*

En el caso de los neutrófilos, se observó un incremento sostenido durante la fase de estrés, aunque no se detectó un impacto por parte de cada uno de los tratamientos implementados (Fig. 14, Tabla A12). Además, no se detectó ningún tipo de efecto durante la fase de estrés + inmunización (Tabla A12). Por otro lado, luego de cada una de las inmunizaciones los neutrófilos incrementaron su conteo en el torrente sanguíneo, de manera indistinta del grupo que se tratara (Fig. 15, Tabla A13).

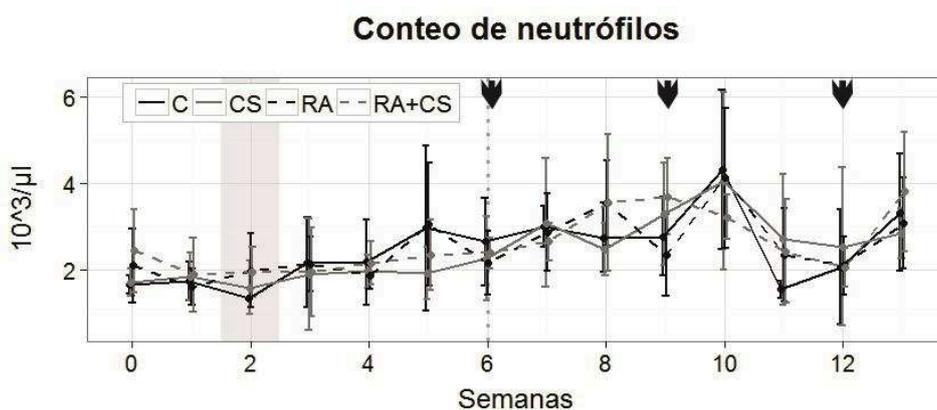


Figura 14. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de neutrófilos (la línea punteada representa la diferencia entre fases, el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

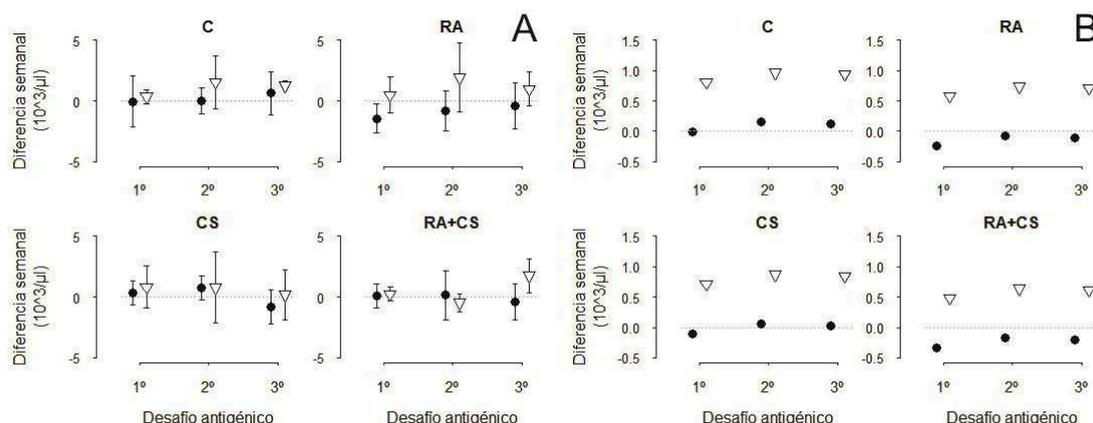


Figura 15. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en el conteo de neutrófilos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior): A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

- *Monocitos*

En ninguna de las dos fases analizadas se detectó un efecto de los tratamientos sobre el conteo de monocitos (Fig. 16, Tabla A14). Sin embargo, se observó un descenso general de los conteos luego de los desafíos antigénicos.

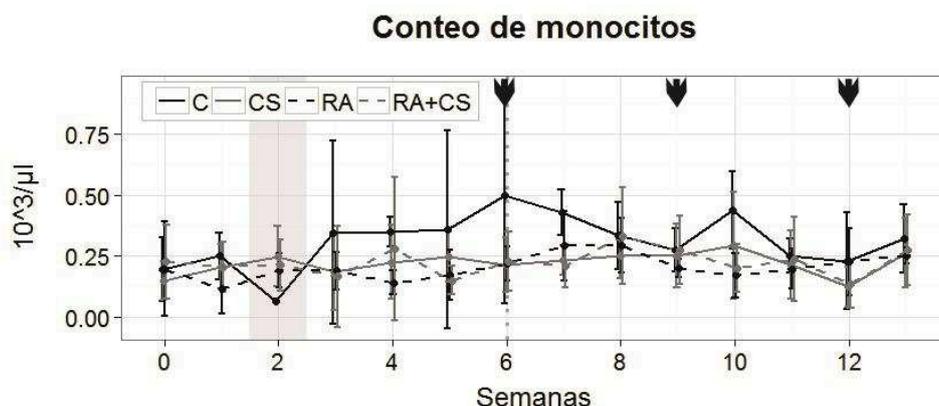


Figura 16. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de monocitos (la línea punteada representa la diferencia entre fases, el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

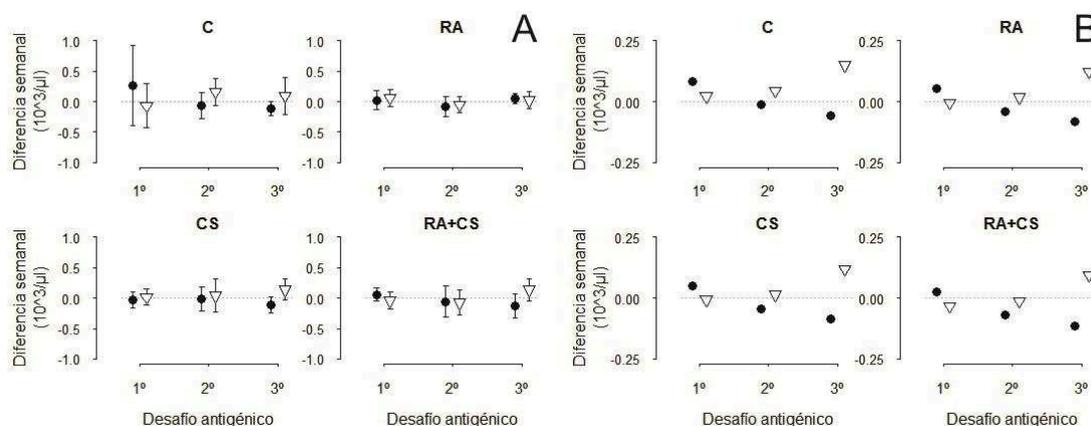


Figura 17. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en el conteo de monocitos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior): A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

En cuanto al impacto de las inmunizaciones sobre el conteo de monocitos: disminuyeron luego de la 1ª inmunización, y aumentaron luego de las otras dos, efecto

inverso al observado en los conteos de linfocitos (Fig. 17, Tabla A15). Asimismo, no se detectaron diferencias entre los tratamientos.

- *Eosinófilos*

Durante la fase de estrés, los conteos de eosinófilos no evidenciaron ningún impacto por parte de los estresores, como tampoco algún efecto debido al paso del tiempo (Fig. 18, Tabla A16). Sin embargo, luego de comenzados los desafíos antigénicos, se observó un incremento general de esta población leucocitaria, aunque sin evidencia de efecto por parte de los estresores (Tabla A16).

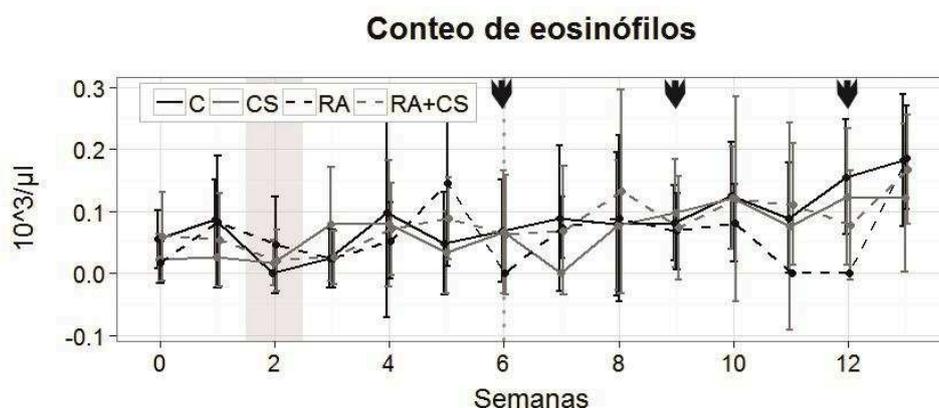


Figura 18. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de eosinófilos (la línea punteada representa la diferencia entre fases, el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

En esta serie de resultados llama la atención que los conteos de eosinófilos se incrementaron luego de cada inmunización en los animales expuestos a RA, mientras que disminuyeron en aquellos con libre acceso al alimento (Fig. 19, Tabla A17). El incremento fue el mismo luego de cada desafío antigénico.

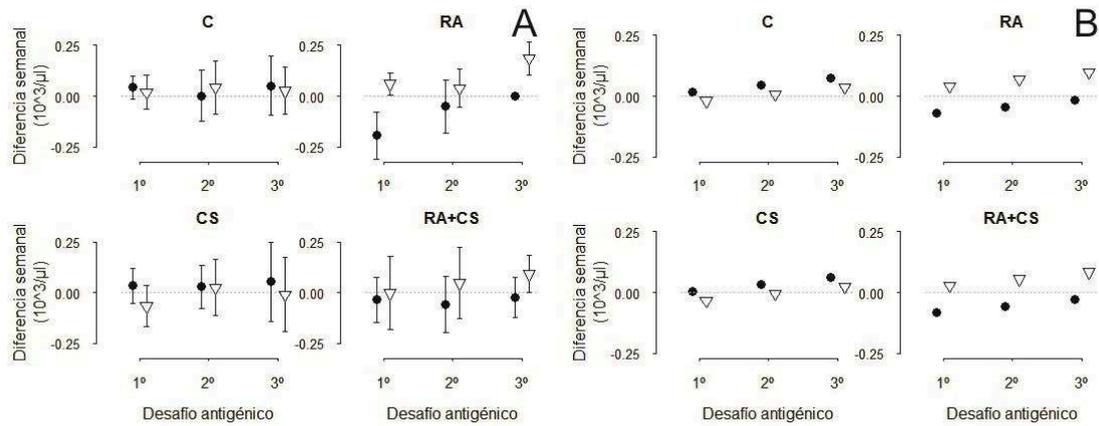


Figura 19. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en el conteo de eosinófilos antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior): A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

- Razón N:L

No fue posible evidenciar ningún efecto de los tratamientos sobre la razón N:L (Fig. 20, Tabla A18).

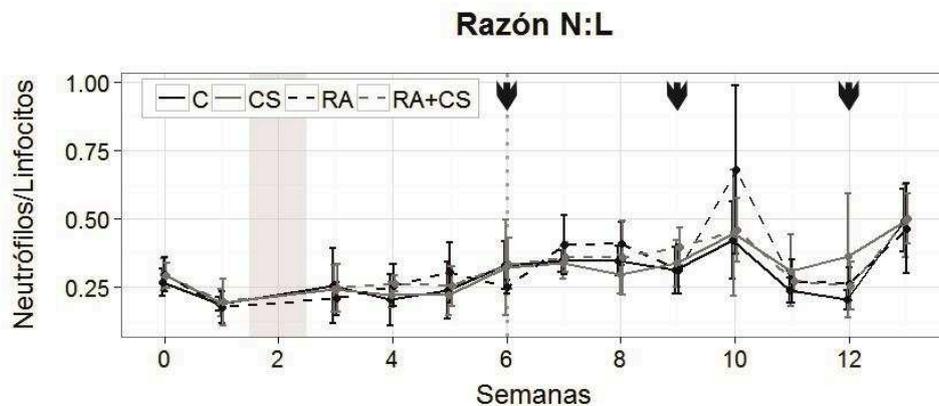


Figura 20. Impacto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la razón N:L (la línea punteada representa la diferencia entre fases, el área sombreada indica la semana excluida de los análisis, mientras que las flechas negras indican las semanas en que se inmunizó con ASB).

Discusión

El análisis longitudinal del perfil leucocitario como marcador de inmunidad celular en ratas expuestas a dos desafíos comunes en el ambiente no evidenció los cambios esperados. Contrario a la primera de las hipótesis planteadas, los conteos semanales, tanto de leucocitos totales como de cada tipo leucocitario en particular, no se vieron alterados por la exposición a restricción alimentaria y/o conflicto social. En cambio, los cambios que presentó el perfil leucocitario a lo largo del experimento serían atribuibles a la edad de los individuos. Por ejemplo, los linfocitos propendieron a disminuir a lo largo del experimento, mientras que los neutrófilos incrementaron. Esta variación de la relación neutrófilo:linfocito se considera normal y es dependiente de la maduración del sistema inmune acorde a la edad del individuo (Weiss y Wardrop, 2010), por lo que no sería consecuencia del impacto de los estresores evaluados en este estudio. Asimismo, los cambios semanales observados en los conteos de monocitos y neutrófilos, estos también han sido descriptos previamente como dependientes de la edad (Weiss y Wardrop, 2010; Wolford y col., 1987).

La ausencia de cambios en el perfil leucocitario como consecuencia de la exposición a conflicto social o restricción alimentaria es cuanto menos llamativa. En general, estudios previos en roedores han reportado que los cambios hematológicos relacionados al estrés se caracterizan por disminución de linfocitos y monocitos, e incremento de neutrófilos, lo cual genera alteración de la razón N:L (revisado en Bartolomucci, 2007; y Dhabhar, 2008). Estas mismas alteraciones han sido reportadas al analizar el impacto del estrés social crónico sobre variables hematológicas (Bartolomucci, 2007; Engler y col., 2004; Stefanski y Engler, 1999); mientras que la restricción alimentaria provocaría un efecto inverso al observado bajo estrés social (Stefanski, 2001), deprimiría los conteos de todas las poblaciones leucocitarias (Hubert y col., 2000) o simplemente no modificaría los niveles (Książek y Konarzewski, 2012). Por el contrario, y en contraste a lo observado previamente, tales cambios no fueron evidenciados en este experimento. En una primera instancia, cabe considerar que el reducido tamaño de los grupos experimentales podría ser una posible explicación a la ausencia de efectos sobre los perfiles leucocitarios. De por sí, estos últimos presentan una importante variabilidad a nivel individual, por lo que existen dos factores que atentan contra el poder estadístico, el limitado tamaño muestral y la alta varianza del parámetro medido. Por otro lado, bien podría argumentarse que el conflicto social y la restricción alimentaria, cual implementados en este estudio,

constituyen desafíos homotípicos y repetidos, por lo que los individuos podrían haberse habituado a los mismos, reduciendo o anulando la respuesta de estrés ejecutada en un primer momento (revisado en Grissom y Bhatnagar, 2009). Sin embargo, tal proceso de habituación no explicaría los niveles elevados de corticosterona durante todo el experimento en respuesta a la restricción alimentaria; o los cambios en indicadores de estrés más sutiles, pero confiables, que fueron observados en los animales expuestos a conflicto social, como ser alteraciones histopatológicas en las glándulas adrenales, disminución en el consumo de alimento y modificaciones en los patrones de crecimiento e inversión somática (ver en Capítulos II y III).

En vista de lo expresado, una observación que podría ayudar a comprender estos hallazgos contradictorios es la efectuada por Dhabhar y McEwen (1997, 1999; revisado en Dhabhar, 2000). Estos autores han reportado que el estrés agudo favorece un incremento en la inmunidad celular de la piel, vinculado a un mayor tráfico leucocitario desde el torrente sanguíneo a los tejidos periféricos, y como adaptación para hacer frente al riesgo inmediato ante una respuesta aguda del tipo “luchar o huir” (ej., heridas producto de enfrentamientos) (ver en Capítulo I). En contraste, el estrés crónico suprime esta inmunidad cutánea mediada por células (Dhabhar y McEwen, 1997, 1999), argumentándose que se debería a una inhibición de la necesaria inmunodistribución leucocitaria (Dhabhar y McEwen, 1997; Dhabhar, 2000, 2014). De ser correcta esa argumentación, es razonable suponer que la ausencia de alteraciones en los conteos semanales de leucocitos representa en sí misma un efecto del estrés crónico. Sin lugar a dudas que esta apreciación debe ser puesta a prueba y verificada, pero cabe preguntarse acerca de la significancia biológica de una estrategia de este tipo: ante la persistencia de un mismo estímulo estresor, frente al cual la táctica de “luchar o huir” podría haberse “agotado” o no haber sido la respuesta más adecuada (de lo contrario, el estímulo hubiese cesado), parece razonable atenuar la inmunidad cutánea y preservar los leucocitos en el torrente sanguíneo, prestos a responder ante una nueva amenaza.

El análisis del cambio en las trayectorias de las poblaciones leucocitarias antes y después de cada desafío antigénico con ASB evidenció resultados de interés, algunos de ellos atribuibles al efecto de los tratamientos. Estos resultados indican que la segunda hipótesis fue verificada sólo parcialmente, ya que los linfocitos incrementaron sus conteos luego de la primera inmunización, para disminuir luego de las otras dos. A su vez, se evidenciaron distintos incrementos de neutrófilos y eosinófilos, células *a priori*

consideradas de la inmunidad innata, aunque nueva evidencia sugiere cuando menos un rol dual en ambos tipos de inmunidad. La interpretación de estos hallazgos debe ser realizada a la luz de los procesos inmunológicos que se desencadenan ante la exposición a un antígeno, los cuáles serán abordados brevemente, dado lo extenso del tema. Al mismo tiempo, en consideración de la complejidad de esos procesos y del rol particular que cumple cada tipo leucocitario, se opta por no incluir en la discusión el análisis “pre/post” del conteo total de leucocitos. Esta decisión responde a que cualquier intento por analizar los cambios observados en la Figura 9 conllevará una interpretación arbitraria de la población celular responsable de los mismos, por lo que cada una de ellas será analizada por separado.

Los linfocitos presentes en el torrente sanguíneo son, en su inmensa mayoría (78,5%, [Franch y col., 1993]), del tipo T, los cuales se encuentran en continua circulación y recorriendo los órganos linfoides secundarios (OLS), para favorecer las chances de detección antigénica (Masopust y Schenkel, 2013; Weiss y Wardrop, 2010). Hasta encontrar el antígeno específico para el que se encuentran programados, el que debe ser procesado y expuesto por una célula presentadora de antígenos, se considera a los linfocitos T como *naïve* (vírgenes) (Weiss y Wardrop, 2010). En el caso de que un linfocito T reconozca a su contraparte antigénica (mayormente en los OLS), el mismo es activado por medio de una serie de eventos y señales que llevan a la expansión clonal (Murphy, 2012). Finalizado este proceso de proliferación, la mayor parte de estos linfocitos T, ahora denominados “efectores”, abandona los OLS y retorna al torrente sanguíneo con el objetivo de infiltrar los tejidos, donde mediarán sus funciones efectoras (Masopust y Schenkel, 2013), lo que explicaría el incremento de linfocitos detectado en este experimento luego del primer desafío antigénico. A su vez, la expansión clonal de los linfocitos B en los OLS, también podría verse reflejada en el torrente sanguíneo luego de la primera exposición antigénica, aunque representando un impacto menor. Resuelta la infección, la mayoría de los linfocitos T mueren, pero una fracción de ellos se diferencia en linfocitos T de memoria (centrales y efectores) (Masopust y Schenkel, 2013). Los linfocitos T de memoria centrales permanecen en médula ósea, sangre y OLS en espera de una 2ª exposición al antígeno, a partir de la cual proliferarán y luego de varios días serán liberados al torrente sanguíneo para migrar a los tejidos. En cambio, los linfocitos T de memoria efectores permanecen en el torrente sanguíneo, circulando entre los tejidos no-linfoides, donde muchos de ellos logran asentarse y en algunos caso formar OL

terciarios. Ante una nueva exposición al antígeno, migran rápidamente hacia los tejidos y expresan funciones de tipo “efector”, sin necesidad de una nueva diferenciación, proveyendo de protección inmediata (Masopust y Schenkel, 2013). Esta redistribución de linfocitos T de memoria efectores se podría corresponder con la disminución de linfocitos en sangre observada luego de cada repetición del desafío antigénico con ASB.

En cuanto a los neutrófilos, durante años se consideró que su rol principal consistía en representar la primera línea de defensa innata contra bacterias y hongos (Mócsai, 2013). Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que participan en varios niveles de la modulación de las defensas adquiridas (Kolaczowska y Kubes, 2013; Mócsai, 2013). Los neutrófilos son capaces de estimular la inmunidad adquirida mediante la activación de linfocitos B esplénicos, promoviendo la secreción de anticuerpos del tipo IgM e IgG (Kolaczowska y Kubes, 2013); al tiempo que se ha demostrado que pueden actuar como células presentadoras de antígenos (Kolaczowska y Kubes, 2013). Adicionalmente, cumplen una función regulatoria de la inmunidad adquirida, regulando la actividad de las células dendríticas, y de los linfocitos T y B (Mócsai, 2013). En su conjunto, estas características de la actividad de los neutrófilos permiten suponer que el incremento en los conteos, evidenciado luego de las inmunizaciones con ASB, podría ser el reflejo de su participación en la inducción y regulación de la respuesta inmune humoral adaptativa.

Adicionalmente, podría argumentarse que la manipulación y la inyección de ASB (en ambos flancos) resultaron en un estrés agudo para las ratas, induciendo el incremento de neutrófilos y el descenso de linfocitos luego de cada desafío inmune (excepto los linfocitos en la primera inoculación). En este último caso, la disminución de linfocitos causada por el estrés podría haberse visto contrarrestada por la expansión clonal de linfocitos B durante la respuesta primaria al antígeno. Sin embargo, cabe señalar que en todos los casos, la toma de muestra se realizó previo a la inmunización con ASB, en tanto que la muestra siguiente se obtuvo una semana después; por lo que sería poco factible que el incremento de neutrófilos se deba al estrés agudo de las inoculaciones. Adicionalmente, si este incremento respondiese exclusivamente al estrés de las manipulaciones semanales, no se hubieran detectado diferencias antes y después de las inoculaciones, por ya encontrarse elevados los niveles de neutrófilos en cada toma de muestra.

El descenso inicial en los conteos de monocitos, evidenciado luego del 1^{er} desafío antigénico, posiblemente sea consecuencia del reclutamiento de células sanguíneas por

parte de macrófagos y células dendríticas al entrar en contacto con el antígeno (ASB) (Iwasaki y Medzhitov, 2015; Rivera y col., 2016). En cambio, el análisis de los incrementos de monocitos en sangre luego de los siguientes dos desafíos inmunológicos es algo más complejo: podrían deberse a un estímulo persistente de las defensas innatas en respuesta a la exposición antigénica repetida, como parte de la recientemente propuesta “*trained immunity*” (inmunidad “entrenada”) (Muraille, 2016; Netea y col., 2011). En los últimos años, un acúmulo creciente de evidencia ha permitido sugerir que, ante la exposición antigénica, es posible cierto “entrenamiento” epigenético de la inmunidad innata para que sea capaz de manifestar propiedades adaptativas, entre ellas retener memoria de encuentros antigénicos pasados que le permitan mediar respuestas secundarias innatas más robustas (Blok y col., 2015; Muraille, 2016; Rivera y col., 2016). Si bien aún queda mucho por dilucidar al respecto (Rivera y col., 2016), se ha demostrado que ante algunos antígenos los monocitos cumplirían un rol relevante como células efectoras de este “entrenamiento adaptativo” de la inmunidad innata (Muraille, 2016; Quintin y col., 2013). Este hallazgo es llamativo, por lo que esta posibilidad debe ser contemplada y analizada en estudios futuros.

Al igual que a los neutrófilos, clásicamente se ha visto a los eosinófilos como células efectoras del sistema inmune innato, pero exhibiendo un protagonismo esencial en la defensa ante helmintos (Berek, 2016; Rivera y col., 2016). Sin embargo, a partir de trabajos recientes, se ha comenzado a comprender que desempeñan un rol crucial en la respuesta inmune adaptativa, siendo que son imprescindibles para la supervivencia a largo plazo de las células plasmáticas en médula ósea (Chu y Berek, 2012), y para la generación y mantenimiento de células plasmáticas secretoras de IgA en las mucosas (Berek, 2016). A los días siguientes de una inmunización, se ha observado que la cantidad de eosinófilos en médula ósea y bazo se incrementa (Chu y Berek, 2012). Aún más, al presentar los eosinófilos una alta tasa de reposición, continuamente deben ser reemplazados para garantizar la supervivencia de las células plasmáticas en médula ósea (Berek, 2016; Chu y Berek, 2013). Siendo que la función de los eosinófilos ha demostrado ser más compleja de lo que se creía, la interpretación de los resultados obtenidos resulta poco sencilla. Al considerar estos hallazgos recientes, es razonable suponer que el incremento de eosinófilos, observado en todos los grupos luego de los desafíos antigénicos, responda al rol de los eosinófilos en la inmunidad adquirida. Sin embargo, es importante recordar que

no se analizaron animales no inmunizados (por no ser el objetivo del estudio), lo que es necesario para dar solvencia a esta afirmación.

Por último, ¿a qué se debe que los conteos de eosinófilos se hayan incrementado luego de cada desafío antigénico en los animales expuestos a restricción alimentaria? Un indicio de una posible respuesta a este interrogante proviene de un experimento realizado con carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*), la especie de roedor de mayor tamaño. En carpinchos sujetos a restricción alimentaria, se observó que estos individuos presentaron mayores niveles de eosinófilos (y de anticuerpos naturales) que aquellos con libre acceso al alimento, lo que fue interpretado como una inversión preventiva de recursos en defensas innatas en preparación a un mayor riesgo de infección parasitaria (Eberhardt y col., 2013). Sin embargo, aquí cabe considerar que el incremento de eosinófilos observado en el experimento con ratas no fue detectado en los análisis longitudinales (lo esperado ante una estrategia preventiva), sino en respuesta a los desafíos antigénicos. Este hallazgo pareciera sugerir que, lejos de ser preventiva, la inversión en defensas por parte de individuos expuestos a restricción alimentaria ocurre ante la exposición a un estímulo antigénico, al menos en lo que concierne a los eosinófilos. De todas maneras, a causa del rol dual de los eosinófilos en la inmunidad (innata-adaptativa) (Berek, 2016; Rivera y col., 2016), debe contemplarse que su incremento no sólo fortalecería las defensas innatas ante helmintos, pero que también redundaría en beneficios para la inmunidad adquirida. Acerca de esto último, vale la pena destacar el potencial efecto sobre la secreción de IgA en el tracto gastrointestinal, lo que podría ser de particular importancia para el control de los organismos allí presentes, más aun considerando los cambios de hábitos alimentarios que suele exhibir un animal expuesto a escasez de recursos (ej., consumo en sitios o de componentes dietarios con cierto riesgo sanitario, que en otro contexto hubiera evitado).

En resumen, el análisis de las poblaciones leucocitarias en sangre provee una representación de gran valor acerca de su distribución y del estado de activación del sistema inmune. Sin embargo, su correcta interpretación reviste de una complejidad mayor y debe efectuarse con cautela, cual evidenciado en este experimento, en el que los resultados obtenidos difirieron del conocimiento previo. La exposición prolongada a restricción alimentaria y conflicto social, dos desafíos ambientales usualmente enfrentados de manera crónica en poblaciones naturales, no parecen tener un impacto directo sobre el perfil leucocitario. De todas maneras, el análisis del número de leucocitos en sangre antes y después de un desafío antigénico evidenció resultados que de otra

manera hubiesen pasado desapercibidos. Esto conduce a la conclusión de que este tipo de pruebas con evaluaciones repetidas son requeridas para una completa evaluación de la inmunidad. Si bien un buen número de las apreciaciones aquí realizadas deben ser verificadas empíricamente, el conocimiento obtenido será relevante para el diseño de nuevos estudios y para la interpretación de la variación e inversión en defensas inmunes por parte de roedores silvestres, lo que debe realizarse con cautela.

CAPÍTULO V

Influencia del estrés sobre la respuesta inmune humoral: la exposición crónica a estresores ambientales estimula los niveles de anticuerpos naturales y específicos

Introducción

En este Capítulo se analiza la influencia de la exposición prolongada a dos estresores ambientales sobre la respuesta inmune humoral, utilizando como indicador la evaluación de los niveles de anticuerpos. Este tipo de evaluación es usado regularmente como un indicador diagnóstico de la interacción hospedador-parásito (Owen y col., 2014; Sandmeier y col., 2012). Por otro lado, la diversidad de roles que los anticuerpos desempeñan en la resistencia frente a parásitos enfatizan la importancia de las defensas humorales en el desarrollo y desenlace de la interacción hospedador/parásito (Owen y col., 2014).

Aspectos relevantes a considerar sobre la respuesta inmune humoral y su regulación

El respuesta inmune humoral comprende diversos factores presentes en el torrente sanguíneo y en tejidos, como ser lisozimas, complemento, proteínas de fase aguda e inmunoglobulinas (Murphy, 2012). Estas últimas, inmunoglobulinas o anticuerpos, cumplen un rol esencial en la inmunidad de los vertebrados, siendo producidas por los linfocitos B de manera espontánea (los denominados “anticuerpos naturales”) o en respuesta a un estímulo antigénico (“anticuerpos específicos”) (Murphy, 2012; Nussey y col., 2014). Los anticuerpos desempeñan su acción en la sangre o en los espacios extracelulares, siendo capaces de neutralizar diversos patógenos y sus productos, bloquear sus sitios de unión a células del hospedador, provocar la activación del sistema de complemento, promover la migración celular a sitios de infección y estimular la fagocitosis (Demas y col., 2011b). Existen diferentes isotipos de anticuerpos que difieren en sus propiedades funcionales (afinidad, avidéz y especificidad, ver en Glosario), siendo las principales IgM, IgG e IgA (en mamíferos) (Murphy, 2012).

Los anticuerpos naturales (AcNs) se encuentran presentes en gran variedad de taxones de vertebrados, siendo únicos en cuanto a que brindan protección de amplio espectro, reconociendo una amplia diversidad de determinantes antigénicos (Baumgarth y col., 2005; Ochsenbein y Zinkernagel, 2000; Panda y Ding, 2015). Esto se debe a que su síntesis no depende de la exposición previa a ningún antígeno ni requiere de

hipermutación somática (Murphy, 2012; Panda y Ding, 2015), por lo que usualmente se los considera como componentes de la respuesta inmune innata. Dada su naturaleza inespecífica, cumplirían un rol defensivo relevante ante la primoinfección por un patógeno, además de participar en la remoción de células dañadas y en la regulación del sistema inmune (Murphy, 2012; Nussey y col., 2014), por lo que en años recientes los AcNs han comenzado a ser reconocidos como relevantes en la evaluación del sistema inmune. Aún más, se ha descrito que cumplirían un rol clave como nexo entre la inmunidad innata y adquirida (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000; Panda y Ding, 2015). Su expresión estaría influenciada por factores ecológicos y ambientales, como ser especie, edad, sexo, vida libre *vs* cautiverio, disponibilidad de alimento y exposición antigénica (Eberhardt y col., 2013; Flies y col., 2015; Racca y col., 2014; Sandmeier y col., 2012; Ujvari & Madsen, 2011). Sin embargo, aún resta mucho para comprender la influencia que ejercen estos y otros factores ambientales sobre su expresión.

Por otro lado, los anticuerpos específicos se consideran una pieza clave de la inmunidad adquirida, presentando una muy alta afinidad, avidéz y especificidad por el antígeno que estimuló su producción (Murphy, 2012; Viney y col., 2005). Brevemente, los antígenos deben ser reconocidos, procesados y presentados por células presentadoras de antígenos (principalmente células dendríticas y macrófagos, entre otras), para lograr la activación de los linfocitos T y B (específicos del antígeno en cuestión). Una vez activados, en los órganos linfáticos secundarios (OLS), los linfocitos T proliferan y ejercen su acción como linfocitos T efectores citotóxicos o colaboradores (*o helpers*). Los linfocitos T *helpers* serán los que colaboren en la activación de los linfocitos B para producir anticuerpos (del tipo T-dependiente), aunque también ocurre que algunos antígenos son capaces de activar a los linfocitos B de manera directa (T-independiente). En esta primera instancia, la mayoría de los patógenos estimulan una respuesta humoral conocida como “respuesta inmune primaria”, que se caracteriza por una elevación rápida y temprana de anticuerpos específicos del isotipo IgM (usualmente en el transcurso de 5-7 días). Esta respuesta inicial es seguida de un proceso de maduración de la afinidad, cambio del isotipo y la posterior producción masiva de anticuerpos IgG, IgA e IgE (Boes, 2000; Murphy, 2012). Posteriormente, ante exposiciones repetidas a un mismo antígeno, se pone en marcha lo que se conoce como “respuesta inmune secundaria”, que se caracteriza por un aumento exponencial de IgG y por un leve incremento de IgA e IgE.

Estos anticuerpos son producidos por los linfocitos B de memoria, originados como consecuencia de la respuesta primaria.

Cual mencionado anteriormente, el sistema inmune requiere de recursos (energía, nutrientes, etc.), de los que el individuo dispone de manera limitada, pero que además deben ser distribuidos entre otros aspectos presentes de manera simultánea a lo largo de su vida, como ser crecimiento, mantenimiento de la condición corporal, competencia por el acceso a alimento y parejas, reproducción, entre otros (Demas y col., 2011a; Graham y col., 2011; Lee, 2006; Lochmiller y Deerenberg, 2000). En consecuencia, son frecuentes los *trade-offs* en la disposición de recursos entre componentes inmunes u otras funciones que demanden energía (Abolins y col., 2011; French y col., 2007a; Graham y col., 2011; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Sandmeier y col., 2012). A causa de ello, en años recientes se ha planteado que un organismo invierte en inmunidad innata o adquirida, pero que no podría hacerlo en ambas (Lee, 2006; Martin y col., 2007b; McDade y col., 2016; Previtalli y col., 2012). Esta regulación se debería a los rasgos propios de las historias de vida. Por ejemplo, individuos con un ritmo de vida lento, proclives a exposiciones antigénicas repetidas, se beneficiarían de la inversión de recursos en inmunidad adquirida; mientras que individuos con un ritmo de vida acelerado, con chances reducidas de sobrevivir lo suficiente como para beneficiarse de ese tipo de defensas inmunes, obtendrían provecho de invertir en inmunidad innata (Lee, 2006). Por otro lado, al considerar la amplia diversidad de parásitos que podrían infectar a un hospedador en la naturaleza, una estrategia razonable ante el incremento del riesgo de infección consistiría en invertir en defensas innatas e inespecíficas, antes que en defensas adquiridas y específicas contra cada integrante de la comunidad parasitaria (Eberhardt y col., 2013; Martin y col., 2007b). Sin embargo, es poco aun lo que se conoce acerca de la influencia del contexto individual y ambiental sobre la regulación de los distintos componentes del sistema inmune.

En el presente Capítulo se abordan dos preguntas de interés: i) ¿El componente humoral de las respuestas inmunes innata y adquirida es modulado de manera diferencial por la exposición crónica a estresores ambientales? ii) ¿Los estresores ambientales estudiados interactúan en la modulación del componente humoral de la respuesta inmune? Estas preguntas se respaldan en la hipótesis de que los organismos favorecen algunos componentes de la función inmune por sobre otros, como estrategia para maximizar la eficacia biológica y la supervivencia ante el riesgo de ser infectados. Por ejemplo, en un

experimento en que carpinchos (*H. hydrochaeris*) se expusieron de manera prolongada a restricción alimentaria, estos ejemplares favorecieron las defensas inmunes contra helmintos, aunque no fueron capaces de controlar las infecciones por protozoos (Eberhardt y col., 2013). Al considerar que durante su alimentación los carpinchos se exponen a la ingestión de los estadios infectantes de helmintos, favorecer las defensas contra este tipo de parásitos parece ser una estrategia adecuada especialmente durante la escasez de alimento, cuando deben pastorear más cerca del suelo, donde la densidad parasitaria es mayor (Sykes, 1987).

Se anticipó que los niveles de AcNs aumentarían, o al menos no se reducirían, ante la exposición prolongada a estresores ambientales. Esta predicción se basó en el supuesto de que las especies con tiempo de vida corto y ritmo acelerado, como las ratas, priorizarían la inversión de recursos en defensas innatas antes que adquiridas (Lee, 2006; Martin y col., 2007b; McDade y col., 2016; Previtali y col., 2012). De manera complementaria, Eberhardt y col. (2013) demostraron experimentalmente que la restricción prolongada de alimentos favorece la producción de AcNs en carpinchos, que si bien se trata de una especie de roedor con rasgos de vida diferentes (prolongado tiempo de vida, con ritmo lento) es de interés destacar el impacto del estresor evaluado. Por otro lado, en virtud de lo expuesto previamente, se consideró que la inversión en AcNs sería en desmedro de la producción de anticuerpos específicos, por lo que se predijo un descenso de sus niveles con un *trade-off* entre ambos tipos de respuesta humoral.

Materiales y Métodos

Para abordar las preguntas acerca de la influencia del contexto sobre inversión diferencial en el componente humoral de las respuestas inmunes innata y adquirida, se utilizaron las muestras de plasma obtenidas a lo largo del experimento descrito en el Capítulo II. Se evaluaron los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) y específicos anti-albúmina sérica bovina (Ac anti-ASB), dado que este tipo de inmunidad juega un rol primordial en la respuesta inmune de vertebrados y representa una medida integrada de las defensas del hospedador (Murphy, 2012). En la sección de “Materiales y Métodos” del Capítulo II se han descrito los detalles acerca del experimento realizado, la inmunización de los animales con ASB y la obtención de las muestras utilizadas.

Determinación de AcNs por hemaglutinación

La determinación de los títulos de AcNs inicialmente se realizó por el ensayo de hemaglutinación propuesto por Matson y col. (2005), con algunas modificaciones (Racca y col., 2014). Mediante esta técnica, debido al volumen de muestra requerido (25 μ l por determinación), se analizaron semanas seleccionadas (Sem₀, Sem₃, Sem₆, Sem₉ y Sem₁₃). Cada individuo fue analizado por duplicado (una repetición por fila). Brevemente, en las columnas 1 y 2 de una placa de aglutinación de 96 pocillos de fondo en U (Cromoion[®]) se colocaron sendas alícuotas del plasma a evaluar (25 μ l). Luego, se adicionaron 25 μ l de una solución buffer de fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) en las columnas 2 a 11, de manera que el segundo pocillo contuvo una dilución final de 1:2. Las demás diluciones se consiguieron a partir de transferir 25 μ l de un pocillo al contiguo consecutivo, desde el pocillo 2 hasta el 11, dejando el pocillo 12 como control negativo (sólo PBS). Luego, en cada pocillo se agregaron 25 μ l de una suspensión estabilizada de glóbulos rojos de conejo al 1% en PBS 1X, se homogeneizó mecánicamente y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Terminada la incubación, las placas se inclinaron a 45° para mejorar la visualización de la aglutinación, la que se determinó siguiendo los criterios indicados por Matson y col. (2005). Se registraron títulos intermedios cuando se observaron aglutinaciones intermedias o ambiguas. Finalmente, la titulación se determinó observando el último pocillo en que se observó aglutinación evidente.

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los niveles de anticuerpos, tanto naturales como adquiridos, se evaluaron mediante la técnica de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-linked immunosorbant assay*). Esta técnica se basa en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de anticuerpos a un antígeno (Ag) en particular. Esta unión Ag-Ac se produce sobre una superficie (en este caso, el fondo plano de los pocillos de una microplaca), a la que previamente se ha unido el anticuerpo o el antígeno, por lo que el conjugado Ag-Ac queda inmovilizado. Para su lectura, es menester que uno de los componentes del ensayo (Ag o Ac) se encuentre unido a una enzima (generalmente, peroxidasa del rábano picante [HRP, del inglés *horseradish peroxidase*] o fosfatasa alcalina), que al interactuar con el sustrato adecuado catalizará la formación de un producto coloreado, observable a simple vista y cuantificado por espectrofotometría.

Los AcNs fueron evaluados semanalmente entre las Sem₀ y Sem₁₃; mientras que en el caso de los Ac anti-ASB, se evaluaron los isotipos IgM e IgG entre las Sem₆ (momento de la primera inmunización) y Sem₁₃. El análisis de los niveles de anticuerpos mediante la técnica de ELISA requiere de una serie de pasos, relativamente sencillos. A continuación, se describen brevemente los procedimientos comunes para la determinación tanto de AcNs como Ac anti-ASB (IgM e IgG); mientras que en la Tabla 3 se ofrecen los detalles específicos para cada tipo de Ac.

Tabla 3. Detalles del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

	AcNs	IgM anti-ASB	IgG anti-ASB
Dilución del antígeno	0.017 µg/100 µl KLH (H7017)*	0.5 µg/100 µl ASB [§]	0.5 µg/100 µl ASB [§]
Dilución de la muestra a evaluar	1:100	1:200	1:200
Anticuerpo secundario (dilución con PBS)	1:1,000 Ac de conejo anti-IgG+IgM+IgA de rata, marcado con HRP (ab102199) [¥]	1:500 Ac de cabra anti-IgM de rata marcado, con HRP (ab98373) [¥]	1:20,000 Ac de cabra anti-IgG de rata, marcado con HRP (ab97090) [¥]
Punto de corte y lectura	10 min	15 min	15 min

* Sigma-Aldrich[®] (Saint Louis, USA); [§] Fundación Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina); [¥] Abcam[®] (Cambridge, USA)

En primer lugar, las microplacas de poliestireno (de fondo plano y alto pegado, Grenier Bio-One[®]) fueron sensibilizadas con el Ag requerido diluido en una solución buffer de bicarbonato de sodio (pH = 9,6) (Tabla 3). En el caso de los AcNs se utilizó hemocianina de lapa (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), una proteína de uso frecuente en inmunología; mientras que para los Ac específicos se utilizó la misma ASB con la que se inmunizó a las ratas. Para permitir el pegado del Ag a la placa, se incubó a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación a 4 °C hasta el día siguiente. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS (pH = 7,4) y 0,05% de detergente Tween 20 (PBS-T; pH = 7,4). Luego de la serie de lavado (3 lavados de 1 min), las placas fueron bloqueadas con

200 µl/pocillo de una solución al 3% de leche descremada en polvo en PBS para reducir uniones inespecíficas. A continuación, se incubó durante 1 h a 37 °C, luego de lo cual se realizó una nueva serie de lavados con PBS-T.

Una vez lavados los pocillos, se agregaron por duplicado 100 µl/pocillo de cada muestra de plasma a evaluar, las cuáles fueron previamente diluidas con una solución al 1% de leche descremada en polvo en PBS (Tabla 3). En cada placa de 96 pocillos se procesaron todas las muestras semanales de cada individuo (3 individuos por placa), cuidando de que las muestras procesadas no pertenecieran al mismo grupo experimental. De esta manera, se buscó disminuir la influencia que pudiera tener la variación entre placas. En forma complementaria, en cada placa se incorporó como control interno y por duplicado una muestra de plasma obtenida en la Sem₁₃, de una rata de la misma edad, inmunizada y alojada en las mismas condiciones que los animales C, pero no involucrada en el experimento (*a posteriori*, esta muestra se utilizó para relativizar los datos). Posteriormente, las placas se sellaron e incubaron a 37 °C durante 1 h para permitir que los Ac primarios, presentes en las muestras de plasma, se unan al Ag. Luego, los pocillos se lavaron nuevamente con PBS-T para remover de los pocillos el Ac primario no unido.

Terminada la serie de lavados, se añadió a los pocillos 100 µl de la dilución de Ac secundarios unido a enzima (Tabla 3), luego de lo cual las placas se sellaron e incubaron durante 1 h a 37 °C para permitir que el Ac secundario se una al primario. Finalizada la incubación, se lavó nuevamente con PBS-T para remover el Ac secundario sin unir, y se añadió a cada pocillo 100 µl del sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB Single Solution, Life Technologies[®]; USA). La reacción enzimática se detuvo con el agregado de 100 µl de HCl 1 M (Tabla 3). Inmediatamente de terminada la reacción enzimática, se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo mediante un lector de absorbancia equipado con un filtro de 450 nm de longitud de onda (SPECTROstar Nano, BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Germany). El análisis de los datos se realizó con la DO media de cada par de pocillos, considerando la proporción con respecto a la muestra de plasma añadida como control interno de la variación entre placas.

Análisis estadístico

Los niveles de anticuerpos fueron analizados mediante análisis longitudinales. En estos análisis se incorporó como variable respuesta las medidas repetidas de AcNs (tanto obtenidas por hemaglutinación como por ELISA) y de Ac anti-ASB (IgM e IgG). En el caso de las determinaciones efectuadas por ELISA, las medidas consideradas fueron las

proporciones con respecto al control interno. En el caso de los AcNs, el análisis longitudinal de los datos de la técnica de hemaglutinación contempló todas las semanas seleccionadas; mientras que el análisis de los datos obtenidos por ELISA se dividió en dos partes: entre las Sem₀ y Sem₆, de manera de analizar el impacto de los tratamientos durante la “fase de inducción de estrés”; y entre las Sem₇ y Sem₁₃, para analizar el efecto de los tratamientos durante la “fase de estrés + inmunización”.

Con el fin de poner a prueba la hipótesis de que la inversión de recursos en inmunidad humoral específica requiere de un *trade-off* con la inversión en anticuerpos naturales, se realizó un análisis del tipo pre/post inmunización. En este caso, la variable respuesta fueron los niveles de AcNs obtenidos por ELISA, aunque expresados como la diferencia entre semanas (semana actual - semana previa), al tiempo que se incluyó como efecto a la interacción cuádruple de los estresores con las variables “pre-post” y “desafío”.

Cabe mencionar que en los análisis de los datos obtenidos por ELISA, además del término anidado “Jaula / Individuo”, se incluyó otro factor al azar “Placa” de manera de considerar la diferencia que pudiera haber en la lectura de las diferentes placas de ELISA. Si bien las determinaciones se realizaron de manera simultánea, analizándose todas las muestras en la misma semana, no se puede descartar que hubiera habido alguna diferencia.

Los detalles generales en cuanto a la construcción y selección de los modelos se presentan en el “Anexo II: Análisis estadísticos”.

Resultados

Los análisis estadísticos se presentan en las Tablas A19-A22, en Anexo II.

Niveles de anticuerpos naturales (AcNs)

Al comienzo del experimento, todas las ratas demostraron niveles similares de AcNs (Fig. 21). El análisis mediante la técnica de hemaglutinación develó un descenso semanal de los títulos a lo largo del experimento, en tanto que no hubieron diferencias entre los tratamientos (Fig. 21a, Tabla A19). En contraste, el análisis mediante la técnica de ELISA, de mayor sensibilidad, demostró que los niveles de AcNs se incrementaron de manera gradual durante la fase de inducción de estrés, y se estabilizaron durante la fase de estrés + inmunización (Fig. 21b, Tabla A20). Los individuos expuestos a ambos estresores (RA+CS) evidenciaron un efecto sinérgico positivo, presentando mayores

niveles de AcNs que los individuos de otros grupos. La comparación entre fases demostró que esta diferencia se generó durante la fase de inducción de estrés (Tabla A20).

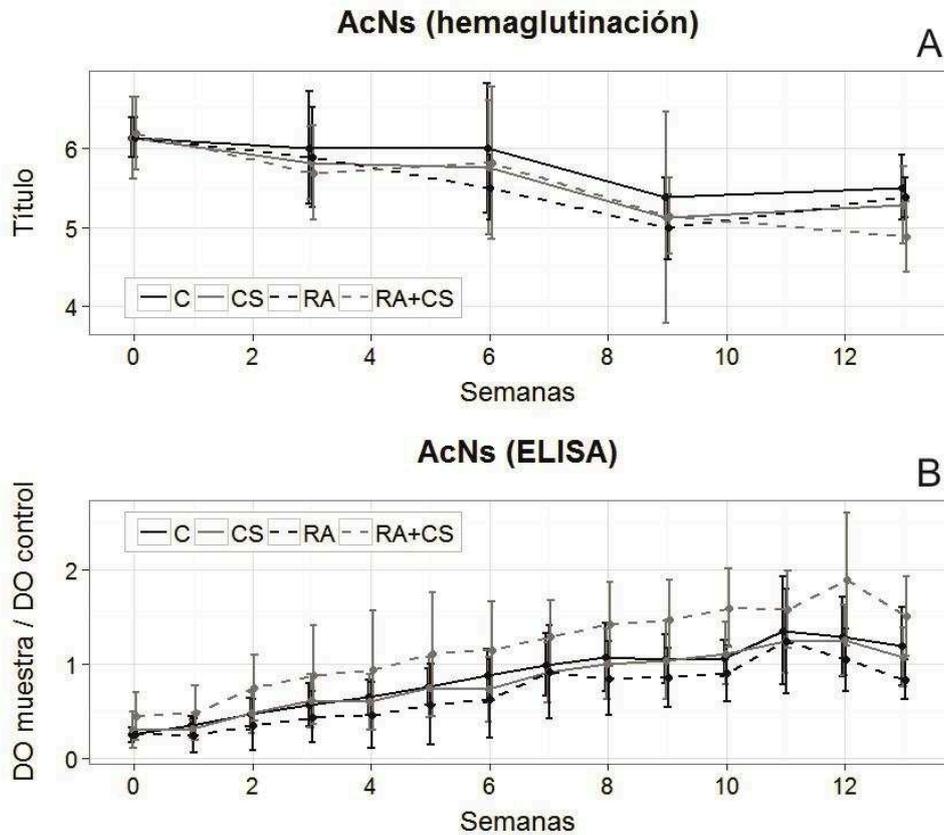


Figura 21. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de anticuerpos naturales (AcNs).

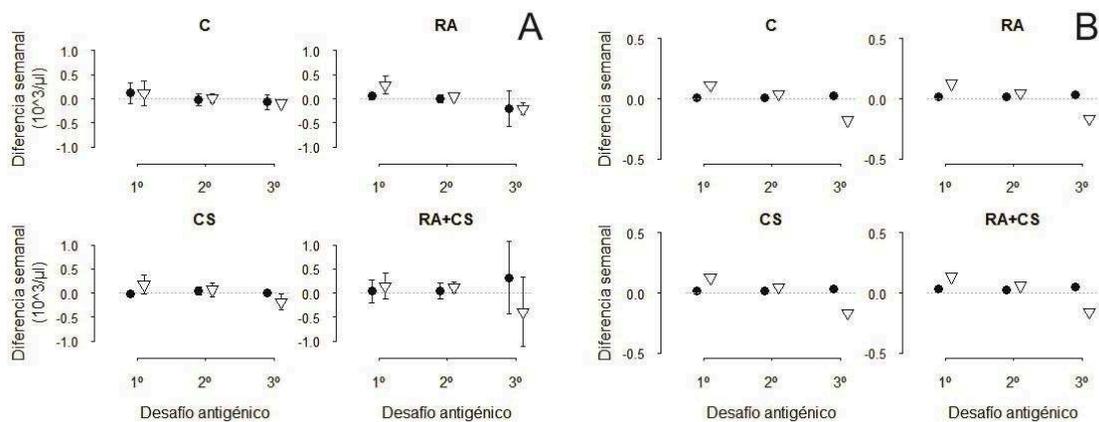


Figura 22. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia semanal en los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) antes y después de los desafíos antigénicos con ASB (círculo relleno = previo; triángulo vacío = posterior):

A) Media y desvío estándar de los datos obtenidos; B) Datos predichos a partir de modelos lineales mixtos.

La exposición al antígeno ASB en las tres inmunizaciones no tuvo impacto sobre los niveles de AcNs antes y después de cada inmunización, cual demostrado en el análisis pre/post inmunización. Los niveles de AcNs no disminuyeron luego de cada inmunización, con la excepción del 3^{er} desafío inmunológico. Aún más, e incluso también en la 3^a inmunización, los niveles de AcNs no difirieron entre los estresores, indicando la ausencia de un *trade-off* entre las respuestas humorales innata y adquirida (Fig. 22, Tabla A21).

Niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG)

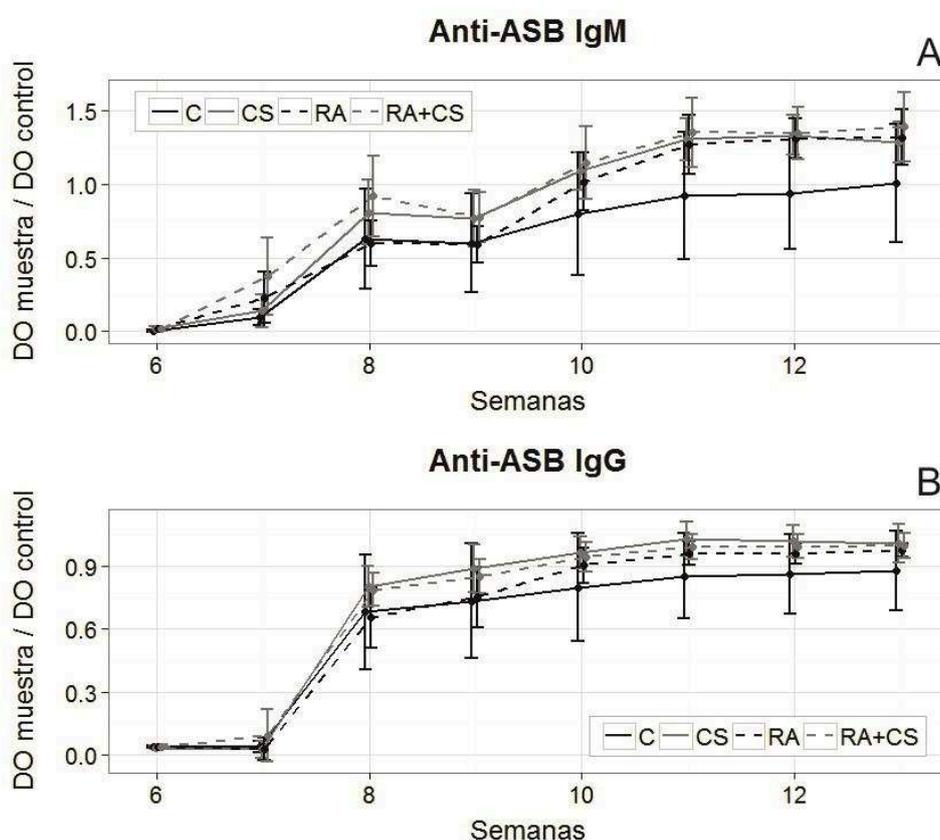


Figura 23. Influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG).

En todos los grupos de tratamientos se detectó una respuesta humoral adquirida, tanto del isotipo IgM como IgG. Los niveles de Ac anti-ASB del isotipo IgM incrementaron con el paso del tiempo, estabilizándose luego del 2^o desafío antigénico con ASB (Tabla A22). Los animales expuestos a RA o CS presentaron mayores niveles de anticuerpos

IgM que aquellos animales no expuestos a los estresores (C), lo que se evidenció recién luego de la 2ª inmunización (Sem₉) (Fig. 23a). A pesar de que los dos estresores analizados estimularon la respuesta inmune humoral adquirida, en los grupos expuestos a ambos de manera simultánea no se encontró evidencia de un efecto aditivo o sinérgico (Fig. 23a). De hecho, el coeficiente de la interacción RA×CS×Sem fue de similar magnitud pero signo opuesto que en los efectos simples, sugiriendo que se alcanzó un efecto máximo en la respuesta (Tabla A22).

La respuesta presentada por los Ac anti-ASB IgG no difiere de aquella presentada por los IgM. Los niveles de anticuerpos IgG incrementaron de manera abrupta dos semanas después del 1^{er} desafío antigénico (Fig. 23b). Nuevamente, los animales expuestos a los estresores (RA o CS) presentaron mayores niveles de Ac anti-ASB, en este caso IgG, que los animales no expuestos, mientras que no se detectó un efecto sinérgico (Tabla A22). Cabe destacar que si bien se observa una clara respuesta primaria anti-ASB, no se aprecia una respuesta secundaria evidente (Fig. 23b).

Discusión

Si bien se encuentra ampliamente aceptado que el estrés crónico deprime la función inmune (Dhabhar, 2014; Martin, 2009), los resultados aquí obtenidos son contrarios a esa suposición inicial: los niveles de anticuerpos naturales y específicos fueron estimulados por la exposición prolongada a los estresores. La hipótesis inicial de que habría una modulación o *trade-off* entre los componentes innato y adquirido de la inmunidad humoral fue respaldada parcialmente por los resultados obtenidos. Se predijo que los AcNs incrementarían, lo que ocurrió, aunque ello no fue en desmedro de los anticuerpos específicos (anti-ASB). Adicionalmente, se verificó que los estresores ambientales evaluados interactúan entre sí en la modulación de los AcNs, pero no así con los anticuerpos anti-ASB.

El análisis de AcNs demostró que los resultados obtenidos por las técnicas de hemaglutinación o ELISA difirieron marcadamente: si bien con ambas técnicas se encontró que la exposición prolongada a cada uno de los estresores ambientales no tuvo efecto sobre los niveles de AcNs, los resultados obtenidos mediante ELISA permitieron develar que la combinación de estresores tuvo un efecto sinérgico positivo, demostrado durante la fase de inducción del estrés (entre las semanas 0 y 6). Si bien esta diferencia pudiera deberse al antígeno empleado en cada técnica (eritrocitos de conejo *vs.* KLH), bien podría explicarse desde la sensibilidad y especificidad de cada una: la técnica de

ELISA es reconocida por ser específica, muy sensible y de sencilla interpretación (Boughton y col., 2011; Demas y col., 2011b); mientras que la técnica de hemaglutinación es menos sensible que la de ELISA y su interpretación no es sencilla, ya que puede inducir a subjetividad por parte del operador (Boughton y col., 2011). En cuanto al hecho de que ambas técnicas demostraran un efecto opuesto a causa del paso del tiempo, un análisis sobre ello es riesgoso: los fundamentos que subyacen a cada técnica son diferentes, por lo que una comparación directa entre ambas no se considera apropiado. En virtud de lo expuesto, los niveles de anticuerpos debieran analizarse por medio de la técnica de ELISA, por su mayor sensibilidad y especificidad, lo que permitió evidenciar resultados que de otra manera hubiesen pasado desapercibidos. Como dificultad se observa que requiere de anticuerpos específicos, los cuales son costosos y no siempre se encuentran disponibles (Boughton y col., 2011; Demas y col., 2011b), más aun al contemplar su uso con muestras de especies silvestres. En cuanto a la técnica de hemaglutinación, ha demostrado su valor en el análisis de la función inmune de ejemplares silvestres (Horrocks y col., 2015; Matson y col., 2005; Racca y col., 2014), por lo que siempre debiera tenerse en cuenta como una alternativa de valor. Adicionalmente, cabe destacar que los ejemplares de vida libre suelen presentar una mayor variabilidad de su función inmune en comparación con sus contrapartes domésticas o en cautiverio (Abolins y col., 2011; Viney y col., 2015), lo que parcialmente podría allanar la menor sensibilidad de esta técnica.

El sinergismo detectado en los niveles de AcNs sugiere que las ratas percibieron y respondieron a la combinación de desafíos de manera diferente que al exponerse a cada uno de ellos por separado. Estos resultados proponen que en ratas la disponibilidad de alimento y el entorno social interactúan para favorecer un incremento de la respuesta humoral innata, lo que biológicamente tendría sentido al considerar la historia de vida de la especie, *Rattus norvegicus*. En roedores, los incrementos de la densidad poblacional son habituales, durante los cuales es factible que ambos estresores ocurran de manera simultánea, lo que a su vez se encuentra asociado a una mayor exposición a patógenos (Caillaud y col., 2013; May y Anderson, 1979; Nunn y col., 2015). Con esto en cuenta, se propone que la exposición a ambos estresores combinados, pero no a cada uno de manera independiente, induce un aumento en la producción de AcNs para hacerles frente en momentos en que el riesgo de infección se incrementa. La inversión de recursos en defensas innatas, anticipando momentos de exposición exacerbada a los parásitos,

representaría una estrategia adaptativa capaz de brindar protección rápida y de amplio espectro contra patógenos. Por otro lado, al responder de una manera diferente cuando estos estresores se presentan por separado, se ahorran recursos en momentos en que el riesgo de infección no sería tan elevado, pudiendo ser destinados a suplir otras demandas o procesos.

En cuanto a la respuesta humoral adquirida, los pocos estudios que han examinado de manera específica la inmunidad mediada por anticuerpos en roedores expuestos a restricción alimentaria no encontraron evidencia de un efecto claro (Kristan, 2007, 2008; Xu y col., 2011; Zysling y col., 2009). Por otro lado, los estudios experimentales que se encontraron sobre la influencia del estrés social presentan evidencia a favor de la hipótesis de la inmunosupresión. En ratas y ratones se ha reportado que los anticuerpos específicos del isotipo IgG disminuyen ante la derrota en enfrentamientos sociales (Bartolomucci y col., 2001; Demas y col., 2004; Fleshner y col., 1989; Jasnow y col., 2001). Aún más, en hámsteres siberianos se ha demostrado que la derrota ejerce efectos opuestos sobre la inmunidad adquirida y la innata (Chester y col., 2010). En estos animales, los niveles de IgG específicos disminuyeron en los individuos vencidos, mientras que se incrementó la capacidad bactericida del suero (un indicador robusto de inmunidad innata) (Chester y col., 2010). Por el contrario, en otros estudios con roedores de laboratorio no se encontró un efecto del estrés social sobre los niveles de anticuerpos específicos ante un inmunógeno (Karp y col., 1993; Klein y col., 1992).

El incremento de los niveles de anticuerpos anti-ASB en los animales expuestos a RA o CS contraría gran parte de lo expuesto, y provee evidencia de que el estrés crónico en ratas podría estimular la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Es de notar la ausencia de una respuesta inmune secundaria evidente, lo que podría sugerir un compromiso de la memoria inmunológica, cual señalado previamente por otros autores (aunque sólo ante restricción alimentaria) (Martin y col., 2007a, 2008). Igualmente, el inesperado incremento de la inmunidad humoral adquirida contradice lo que se ha propuesto para especies con ritmo de vida acelerado (Lee, 2006; Martin y col., 2007b; McDade y col., 2016; Previtali y col., 2012). Este tipo de estrategia podría ser ventajosa desde una perspectiva ecológica, al considerarse que los anticuerpos específicos confieren inmunidad pasiva a la descendencia, asegurando defensas contra patógenos relevantes en etapas tempranas de la vida, especialmente en momentos en que el riesgo de infección puede ser particularmente alto. El hecho de que la progesterona incremente la producción

de anticuerpos (revisado en Klein, 2004) respalda esta suposición. Siendo que este efecto sobre la inmunidad adquirida ha sido detectado en ratas macho, en estudios futuros resulta de interés evaluar las consecuencias de estos mismos estresores sobre ratas hembra de diferentes estados reproductivos.

A pesar de que estudios previos sugieren que un organismo debiera priorizar la inversión de recursos en inmunidad innata o adquirida (Chester y col., 2010; Martin y col., 2007b; Previtali y col., 2012), los resultados que aquí se presentan demuestran que la exposición simultánea a restricción alimentaria y conflicto social (RA+CS) estimula tanto la inmunidad innata como adquirida al mismo tiempo. Estas respuestas inmunes inesperadas podrían deberse a las características de los dos estresores analizados. Estresores de diferente naturaleza activan mecanismos y vías neuroendocrinas distintas (Bowers y col., 2008; Chester y col., 2010), lo que puede resultar en una variedad de efectos sobre los componentes del sistema inmune (Bowers y col., 2008; Brooks y Mateo, 2013; Chester y col., 2010).

En resumen, la exposición prolongada a dos estresores que comúnmente se enfrentan combinados durante densidades poblacionales altas, eleva los niveles de anticuerpos naturales y específicos en ratas. A pesar de la limitación de recursos en algunos animales (los individuos bajo restricción alimentaria), no hubo evidencia de *trade-off* entre ambos componentes de la inmunidad humoral. Dado que los dos estresores que se evaluaron usualmente se asocian con un incremento en el riesgo de infección, estos resultados se interpretan como una priorización adaptativa de las defensas inmunes por sobre otro procesos, como por ejemplo fue observado en el crecimiento de estos mismos animales (ver Capítulo III). Si la exposición a un estresor se acompaña de un incremento en el riesgo de infección, que la respuesta de estrés estimule la inmunidad del hospedador tiene sentido desde una perspectiva evolutiva. De todas maneras, se reconoce que es necesario evaluar la capacidad de estas estrategias inmunes para contrarrestar de manera eficiente la exposición a un patógeno.

CAPÍTULO VI

Evaluación de la función inmune en roedores sigmodontinos de vida libre: sus determinantes y su influencia sobre la intensidad parasitaria

Introducción

En los ambientes naturales, las enfermedades infecciosas y parasitarias representan una causa mayor de morbilidad y mortalidad entre individuos de vida libre (Beldomenico y Begon, 2010; Beldomenico y col., 2008; Bradley, 2015; Turner y col., 2014). Ante tal escenario, la variación en la susceptibilidad del hospedador constituye un elemento clave al determinar el desenlace de una infección (Beldomenico y Begon, 2010; Beldomenico y col., 2009a, 2009b; Bradley, 2015). Por ello, mantener una función inmune eficiente es esencial para maximizar la eficacia biológica del organismo en ambientes ricos en patógenos (Beldomenico y Begon, 2010; McDade y col., 2016; Viney y col., 2005). En poblaciones naturales la función inmune demuestra una alta variabilidad y es fuertemente dependiente del contexto (Downs y col., 2015; Lee, 2006; Young y col., 2015a), siendo afectada por la disponibilidad de recursos, densidad de hospedadores, época del año y estacionalidad, carga parasitaria del ambiente, historial de exposiciones a patógenos, sexo, estado reproductivo, estrés, entre muchos otros factores (Downs y col., 2015; Gervasi y col., 2015; Horrocks y col., 2015; Lee, 2006; Pedersen y Babayan, 2011; Young y col., 2015a). En consecuencia, todos estos condicionantes pueden causar cambios en el grado y tipo de inversión inmune desplegados por el organismo (Lee, 2006; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Pedersen y Babayan, 2011).

Cual señalado en el Capítulo IV, la inmunocompetencia es un término general que refiere a la capacidad de la función inmune para afrontar la exposición a un patógeno y minimizar el impacto sobre el *fitness* (Owens y Wilson, 1999; Viney y col., 2005). La determinación del estado y la eficacia de la función inmune en poblaciones silvestres representa un desafío, debido al limitado acceso a los animales, la dificultad para monitorearlos durante periodos prolongados de tiempo, y el estrés inducido al capturarlos (Boughton y col., 2011; Demas y col., 2011b; Gilot-Fromont y col., 2012). Ante estas condiciones, los ensayos a implementar se limitan a aquellos que permitan obtener medidas de la función inmune de manera sencilla y confiable en condiciones de campo (Boughton y col., 2011). Asimismo, estos debieran ser interpretados teniendo en cuenta

que dependen fuertemente de la presencia de patógenos, relación acerca de la cual se conoce poco en la mayoría de las especies silvestres (Biard y col., 2015).

A pesar del uso frecuente de algunas medidas de la función inmune en estudios ecológicos, aún resta por develar un interrogante central (Adamo, 2004; Biard y col., 2015): las medidas de indicadores de inmunidad, ¿son el reflejo de la inmunocompetencia del individuo o de su estado de infección? De hecho, si los niveles de los indicadores de inmunidad reflejan el nivel de inmunocompetencia, los individuos que presenten mayor expresión del indicador evaluado debieran presentar cargas parasitarias menores. En contraste, si los índices de inmunidad son el reflejo de una infección activa y de los niveles de estimulación del sistema inmune, los individuos con niveles más altos debieran ser los más fuertemente parasitados (Biard y col., 2015; Davis y col., 2008). Por caso, la neutrofilia ¿es indicadora de estrés e infección (y por ello, menor *fitness*), o de mayor habilidad para responder a una infección (mayor *fitness*)? La linfopenia, ¿constituye una señal de inmunosupresión, de una respuesta de estrés, o de la ausencia de parásitos? En especies silvestres, esto se torna particularmente complejo, ya que se suele carecer de información estandarizada acerca de los niveles de referencia de los indicadores de la función inmune. Al mismo tiempo, la notable variabilidad de los mismos observada en individuos de vida libre atenta contra este propósito.

Para afrontar este interrogante, usualmente se correlacionan las medidas de inmunidad con las medidas vinculadas al estado de infección, como ser prevalencia o carga parasitaria (Biard y col., 2015). Sin embargo, debe considerarse no solo que cada hospedador aloja una comunidad parasitaria, donde la co-infección es la regla más que la excepción, sino también que la relación entre infección e indicador de inmunidad dependerá del tipo de parásito en cuestión (Budischak y col., 2012; Cox, 2001). De hecho, distintos tipos de parásitos pueden inducir una respuesta diferente, lo que potencialmente conduce a diversos *trade-offs* entre componentes de la función inmune (Cox, 2001). Típicamente, los parásitos intracelulares estimulan respuestas del tipo Th1 y Th17, mediadas por la inmunidad celular; mientras que los parásitos extracelulares, como los helmintos, inducen principalmente respuestas del tipo Th2, (Cox, 2001; Jolles y col., 2008). Por otro lado, los ectoparásitos mayormente conducen a una respuesta inflamatoria por parte del hospedador (Owen y col., 2010).

En virtud de lo expuesto, en este capítulo se analizó la influencia de factores individuales y ambientales sobre la relación entre función inmune e intensidad parasitaria,

siendo ésta última representada por medidas agregadas de cada tipo de macroparásito. Entre los factores ambientales, y en consonancia con el experimento previo con ratas de laboratorio, se posee particular interés en analizar el efecto de la disponibilidad de alimento y la densidad específica (entendida como la densidad de ejemplares de la misma especie). Para ello, se propuso un ensayo de campo con roedores sigmodontinos de vida libre (Cricetidae, Sigmodontinae), en el cual se manipuló la disponibilidad de alimento por medio de la suplementación periódica. Como sugerido por otros autores para lograr una mejor comprensión de la función inmune (Boughton y col., 2011; Palacios y col., 2012; Pedersen y Babayan, 2011), se analizaron indicadores de inmunidad de los mecanismos innato y adquirido, incluyendo los componentes celular y humoral. Como índices de inmunidad celular innata se utilizaron los conteos absolutos de monocitos y granulocitos (neutrófilos y eosinófilos); mientras que la evaluación de anticuerpos naturales (AcNs) se utilizó como indicador de inmunidad innata humoral. Por otro lado, los conteos de linfocitos se evaluaron como indicadores de la inmunidad celular adquirida. Por medio de los indicadores mencionados, se procuró dar respuesta a los siguientes interrogantes i) ¿en qué medida la función inmune es influenciada por variables individuales y del ambiente?; ii) ¿cómo se relacionan las características del individuo y del ambiente con la carga y tipo de parásito?; y iii) ¿cuál es la relación entre los indicadores de inmunidad seleccionados y la carga y tipo de parásito? Al responder los primeros dos interrogantes, se procuró identificar variables predictoras de la función inmune y del tipo e intensidad parasitaria, lo que permitió considerarlas como co-variables en el 3^{er} análisis de asociación entre parasitismo/inmunidad. Estudios previos permiten anticipar que la función inmune será afectada por el sexo, la condición corporal, la densidad específica o la época del año (Beldomenico y col., 2008b; Bordes y col., 2012; Eberhardt y col., 2013; Young y col., 2015a). A su vez, la intensidad y tipo de parásitos serán influenciados por la función inmune, pero además por la especie, el sexo, la condición corporal o la época del año (Beldomenico y col., 2008a; Colombo y col., 2015; Rynkiewicz y col., 2013; Warburton y col., 2016). Se incorporó la razón neutrófilo:linfocito como medida indirecta de estrés (Davis y col., 2008), contribuyendo a la interpretación de los resultados como potencial mecanismo intermediario.

Materiales y Métodos

Origen de los datos a utilizar

Los datos requeridos para evaluar la influencia de factores individuales y ambientales sobre la relación entre función inmune e intensidad parasitaria en roedores sigmodontinos de vida libre, se obtuvieron en el marco de un ensayo de campo correspondiente a otra tesis doctoral en curso (se describe brevemente a continuación). En la tesis aquí presente, se incluyeron las especies de roedores sigmodontinos que presentaron mayor abundancia a lo largo de dos años de muestreo, *Akodon azarae* y *Calomys callosus*.

Las 2 especies de roedores silvestres aquí tratadas pertenecen a la familia Cricetidae, subfamilia Sigmodontinae, grupo que incluye al menos 376 especies y que predomina en América del Sur. *Akodon azarae* se encuentra presente en el noreste y centro de Argentina, Paraguay, Uruguay y extremo sur de Brasil. Se trata de una especie omnívora (Bilenca y col., 1992), poligínica, que habita en pastizales con alta cobertura vegetal, especialmente de gramíneas, siendo la especie dominante en agroecosistemas pampeanos (Ávila y col., 2016; Bilenca y col., 1992; Gómez Villafañe y col., 2005). A su vez, *Calomys callosus* se distribuye en el este de Bolivia, centro y norte de Argentina, Paraguay y sudoeste de Brasil. Esta especie, también poligínica, se presenta frecuentemente en ambientes alterados, con vegetación de crecimiento secundario (Barquez y col., 1991). Estas especies de roedores han sido implicadas en la transmisión de importantes zoonosis, como ser Leptospirosis, Hantavirus y/o Fiebre Hemorrágica Argentina, entre otras (Palma y col., 2012; Singh y Ruzed, 2016; Vanasco y col., 2003)

Ensayo de campo y toma de muestra

El ensayo de campo con roedores sigmodontinos de vida libre se desarrolló en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, en la ecorregión de El Espinal (Cabrera, 1976; Morrone, 2014) (Fig. 24). Esta ecorregión se encuentra cubierta por llanuras, serranías bajas y medanales, y diferenciándose 3 distritos: del Ñandubay, del Algarrobo, y del Caldén. Los sitios de muestreo se encuentran en la transición entre los distritos del Ñandubay y del Algarrobo, caracterizándose por un clima cálido y húmedo, con lluvias abundantes en primavera y verano (precipitación anual de 340 a 1170 mm) y con temperatura media anual de 15 a 20 °C. El tipo de vegetación dominante es un bosque bajo, xerófilo, con dominancia de especies arbóreas del género *Prosopis*, alternando con pastizales puros (Cabrera, 1976).

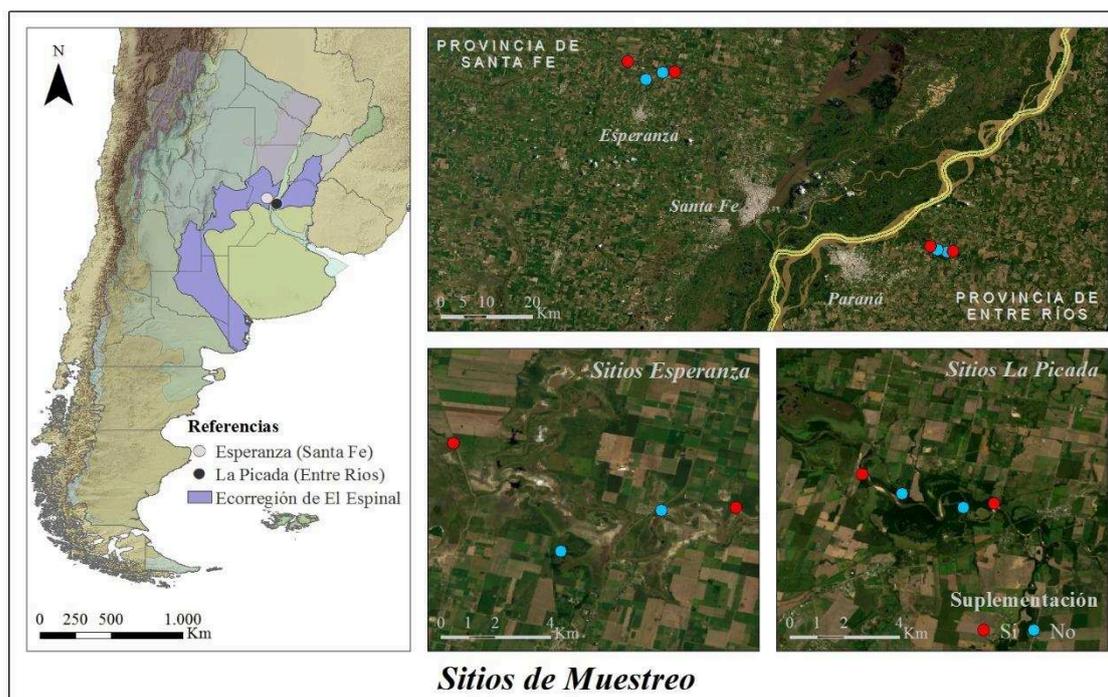


Figura 24. Localización geográfica de los sitios de captura de roedores sigmodontinos de vida libre (en rojo, las parcelas con acceso al alimento suplementado; y en azul, las parcelas con el acceso restringido).

Bajo el supuesto de que en la naturaleza la disponibilidad de alimentos es usualmente limitada y en consecuencia los roedores silvestres se encuentran restringidos en energía o recursos (Beldomenico y col., 2008b; Turner y col., 2014), se procuró aliviar la restricción alimentaria por medio de la suplementación estratégica y sistemática de alimento. Para ello se establecieron 8 parcelas de muestreo de 0,5 ha en pastizales naturales, repartidas entre 2 sitios: 4 de ellas ubicadas en la localidad de Esperanza, provincia de Santa Fe; y las 4 restantes ubicadas en la localidad de La Picada, provincia de Entre Ríos. (Fig. 24). Para el establecimiento de las parcelas, se seleccionaron zonas de pastizal natural alejadas de áreas de cultivo, aunque sometidas parcialmente a pastoreo extensivo de ganado lechero. Las parcelas se encontraban separadas entre sí por una distancia mínima de 1 kilómetro, lo cual es ampliamente superior al *home range* de las especies dominantes esperadas (*Akodon azarae* y *Oligoryzomys* sp. [Sequeira y col., 2003]; siendo el *home range* máximo aproximado de 900 m² para *A. azarae* [Priotto y Steinmann, 1999]).

La intervención se ejecutó sobre 4 parcelas (2 de cada sitio), a lo largo de 2 años, mediante la colocación mensual por parcela de 10 kg de alimento (una mezcla de alimento

comercial para perros, para conejos y maíz) repartidos en 10 contenedores de PVC (adaptado de Meserve y col., 2001). En las parcelas restantes (no suplementadas), mensualmente se colocó la misma cantidad de alimento, pero el acceso al mismo se encontraba bloqueado. Este procedimiento se ejecutó para evitar un potencial sesgo en la intensidad parasitaria, que pudiera ser atribuido a la tasa de contacto entre los individuos atraídos por el alimento. La elección de las parcelas a intervenir se definió a partir de la cantidad de capturas de roedores en muestreos piloto, en un diseño factorial 2²: en cada sitio, se suplementó una parcela con captura alta y otra con captura baja; en tanto que se restringió el acceso al alimento en una parcela con captura alta y otra con captura baja.

Entre Junio 2014 y Julio 2016, se llevaron a cabo 21 sesiones de captura de 3 noches, cada 5 semanas. En cada una de las 8 parcelas, se estableció una cuadrícula de trampeo de 5×5 estaciones separadas por 15 m, cada una con 2 trampas Sherman. Se propuso un límite máximo de remoción de 5 individuos por especie y por parcela (un máximo anual por parcela de 60 individuos de la misma especie) en cada sesión de captura. Este máximo de individuos a remover por sesión de captura se determinó a los fines de no comprometer las sesiones subsiguientes. La remoción de individuos fue necesaria para obtener muestras para determinación del estado fisiológico, inmunológico y de infección de los individuos.

Los roedores a sacrificarse fueron anestesiados profundamente con isoflurano para la extracción de una muestra de sangre por punción cardíaca, luego de la cual se eutanasiaron mediante dislocación cervical. La muestra de sangre obtenida se colocó en un eppendorf con EDTA como anticoagulante, y se preservó refrigerada hasta su posterior análisis (dentro de las 8 h de colectada). Una vez eutanasiado el individuo, se registraron medidas morfométricas (peso, largo desde la punta del hocico a la base de la cola) y condición corporal. Luego, se procedió a realizar la necropsia, en la que se colectaron y preservaron diversos órganos para otros estudios complementarios. Cada tracto digestivo se identificó y se preservó entero en bolsas plásticas individuales, en formol al 4%, hasta su posterior análisis en laboratorio. En tanto, una vez terminada la necropsia, la carcasa se preservó en bolsas plásticas individuales en alcohol etílico 96°, para luego ser revisada exhaustivamente en busca de ectoparásitos. Se prestó particular atención a la recolección de los ectoparásitos que pudieran desprenderse durante la manipulación de cada roedor en la mesa de trabajo.

Evaluación del impacto de la suplementación de alimento sobre la condición corporal de roedores de vida libre

Una vez eutanasiado cada ejemplar, y antes de comenzar con la necropsia, la condición corporal fue estimada mediante la palpación de la cobertura de músculos y grasa sobre la columna vertebral y pelvis (se registra mediante un *score* de 2 a 10) (Beldomenico y col., 2008a). Este *score* de condición corporal fue posteriormente utilizado como variable respuesta para evaluar el impacto de la suplementación de alimento. Además del tratamiento en sí mismo, como variables predictoras se incluyeron variables individuales y ambientales. En el apartado “Análisis Estadístico” se ofrece mayor información al respecto.

Evaluación del perfil leucocitario en roedores de vida libre

El perfil leucocitario se utilizó como indicador de la inmunidad celular de los roedores de vida libre, evaluándose mediante el conteo de leucocitos totales y de cada uno de los tipos leucocitarios. Considerando el valor de cada muestra sanguínea de un ejemplar silvestre, y que debe obtenerse la mayor cantidad posible de información de cada muestra, se aplicó la metodología propuesta por Beldomenico y col. (2008b). De manera de trabajar con volúmenes reducidos, se diluyeron 5 μ l de sangre entera en 45 μ l de PBS. Para efectuar el conteo de leucocitos, se diluyeron 45 μ l de esta dilución inicial 1:10 en 45 μ l de ácido acético 4% con cristal de violeta 1%. Los conteos de leucocitos se efectuaron en cámara de Neubauer, contando las células sanguíneas en cuadrantes específicos de la grilla y así determinar su número por microlitro. Los conteos absolutos totales de leucocitos se obtuvieron a partir de corregir los conteos en cámara por las diluciones correspondientes.

A continuación, con parte de la muestra restante, se prepararon extendidos sanguíneos, los cuáles fueron teñidos mediante el método de May-Grünwald-Giemsa. Para el conteo diferencial de los leucocitos se consideró un mínimo de 100 células, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a sus características morfológicas (Weiss y Wardrop, 2010). Si bien en estudios ecológicos es frecuente el uso de los conteos diferenciales de leucocitos (proporciones o porcentajes) como indicador de inmunidad (ej., Biard y col., 2015; Young y col., 2015), su valor se considera limitado ya que provee poca información acerca de los cambios que ocurren en el perfil leucocitario (Weiss y Wardrop, 2010), por lo que es preferible el cálculo y análisis de conteos absolutos (Johnstone y col., 2012). En consideración de ello, el conteo absoluto de cada población

leucocitaria se obtuvo a partir de multiplicar el conteo diferencial (como proporción) por el conteo total de leucocitos. Los conteos absolutos de monocitos y granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) se consideraron índices de inmunidad celular innata; mientras que los conteos de linfocitos se evaluaron como indicadores de la inmunidad celular adquirida. Los basófilos no se incluyeron como indicador de inmunidad celular innata debido a que su presencia fue registrada en muy baja proporción en un número reducido de individuos.

Una vez efectuados los conteos de células sanguíneas, el volumen remanente de sangre fue centrifugado durante 5 min a 5000 revoluciones. Luego, el plasma fue separado del paquete celular y preservado a -20 °C para análisis posteriores.

Evaluación de cambios hematológicos por estrés en roedores de vida libre

Como indicador de los cambios hematológicos por estrés se utilizó la razón entre neutrófilos y linfocitos (en adelante N:L). Esta medida es considerada de utilidad en el campo de la fisiología de la conservación, siendo frecuente su uso como indicador de los cambios por estrés crónico y de la condición del hospedador en estudios ecológicos de diversas especies de mamíferos (Davis y col., 2008; Gilot-Fromont y col., 2012; Springer y col., 2015; Warburton y col., 2016; Young y col., 2015a). En este sentido, el estrés produce incrementos en la razón N:L, que serían proporcionales a la liberación de GCs (Davis y col., 2008). En un estudio de laboratorio con una especie de roedor subterráneo, *Ctenomys talarum*, se determinó que individuos cautivos, aclimatados y sin perturbaciones, presentan valores de la razón N:L entre 0,1 y 1,5 (Vera y col., 2008). Al ser expuestos a estrés agudo, estos valores incrementan hasta 2,5-3, mientras que alcanzan valores de 5 durante el estrés crónico. Si bien se trata de una especie diferente de roedor a los aquí estudiados, de hábitos disímiles, estos resultados sugieren que la medida podría ser utilizada como indicador de la exposición de los ejemplares de *A. azarae* y *C. callosus* a estresores ambientales. Asimismo, sirven como una aproximación para discernir entre la variación que pudiera presentarse al analizar esta variable.

Evaluación de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) en roedores de vida libre

La evaluación de AcNs en roedores de vida libre fue incluida como indicador de la inmunidad humoral innata. Los niveles fueron determinados por medio de la técnica de ELISA descrita en el Capítulo V, aunque con algunas particularidades propias de la evaluación de muestras de especies silvestres. Siendo que no se encuentran disponibles comercialmente anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos provenientes de

roedores sigmodontinos (en este caso, los anticuerpos IgM e IgG de *A. azarae* y *C. callosus*), los niveles de AcNs se evaluaron por medio de la reacción cruzada con los anticuerpos adquiridos previamente para la evaluación de AcNs en ratas de laboratorio (ver Capítulo V, Ac de conejo anti-IgG+IgM+IgA de rata, marcado con HRP, Abcam® [ab102199]). En el análisis se incluyeron las muestras de los roedores capturados hasta octubre de 2015 (6 meses antes de finalizar los muestreos), debido a la necesidad de evaluar si la reacción cruzada con los anticuerpos anti-rata brindaba una respuesta adecuada.

Para la verificación de esta reacción cruzada, en una primera instancia se compararon los resultados obtenidos de un ELISA en que se evaluaron 3 diluciones (1:50, 1:100, 1:200) de sendos pools de plasma de *A. azarae*, de *C. callosus* y de rata (el “control interno” mencionado en el Capítulo V). Las condiciones del ensayo fueron similares a las de aquel en que se evaluaron los AcNs de las ratas de laboratorio (ver en Capítulo V). La única modificación fue la dilución del conjugado anti-IgG+IgM+IgA (anti inmunoglobulinas totales) de rata, que debió utilizarse en 1:250 a causa de la disminución de su actividad. Luego de constatar que las densidades ópticas obtenidas fueron similares entre las 3 especies, se seleccionaron las diluciones de plasma que presentaron mejor lectura, siendo 1:100 para *A. azarae* y 1:50 para *C. callosus*. Una vez definidas las diluciones de trabajo, se procesaron las muestras de 114 ejemplares de *A. azarae* y de 67 *C. callosus*, de acuerdo al protocolo descrito previamente. Para disminuir la potencial variación entre placas, en cada placa se analizó como control interno un pool de las muestras de cada especie a analizar. Para el análisis de los datos se consideró la proporción de la DO media de cada par de pocillos con respecto al pool añadido como control interno.

Análisis parasitológicos

Los roedores silvestres son hospedadores de numerosos microparásitos (virus, bacterias, hongos y protozoos) y macroparásitos (helmintos y artrópodos), pero por cuestiones prácticas los análisis del presente capítulo se focalizaron en los helmintos gastrointestinales y artrópodos ectoparásitos. Los helmintos gastrointestinales suelen ser responsables de infecciones crónicas (Bordes y col., 2012), mientras que los ectoparásitos principalmente producirían reacciones inflamatorias (Owen y col., 2010). La piel de las carcasas preservadas fue revisada exhaustivamente bajo lupa estereoscópica para detectar y contar ectoparásitos; en tanto que los tractos digestivos fueron diseccionados

cuidadosamente y lavados con agua destilada, para recuperar su contenido, que luego fue revisado bajo lupa estereoscópica para preservar los helmintos gastrointestinales. Para la evaluación de las respuestas del hospedador al parasitismo se consideraron las intensidades parasitarias, agrupadas por tipo de agente: nematodos gastrointestinales, cestodos gastrointestinales, garrapatas, ácaros, pulgas y piojos. Los trematodos no fueron considerados ya que fueron reportados en sólo 4 ejemplares de *A. azarae*, con intensidades bajas.

Análisis estadístico

Dado que los análisis realizados en este Capítulo difieren de los ejecutados previamente, se optó por explicarlos aquí, en lugar de diferirlos al Anexo II.

Los análisis estadísticos para evaluar la asociación de factores individuales y ambientales con la función inmune e intensidad parasitaria en roedores sigmodontinos de vida libre se implementaron en 3 instancias diferentes, mediante la aplicación de modelos lineales (generalizados) mixtos. En una 1ª instancia, se evaluó la asociación de factores individuales y ambientales con los parámetros seleccionados de la función inmune (conteos leucocitarios y niveles de AcNs). En todos los casos se verificó la normalidad de los residuos, y cuando fue necesario la variable respuesta fue transformada para normalizar. En el caso de los conteos de monocitos y eosinófilos, que no pudieron ser normalizados, se analizaron con modelos mixtos generalizados (distribución binomial negativa). En una 2ª instancia, se evaluó la asociación de los mismos factores con los distintos tipos parasitarios (nematodos, cestodos, garrapata, ácaros, pulgas y piojos). Y por último, en una 3ª instancia, se evaluó la asociación de cada parámetro inmune con cada tipo parasitario, incluyendo como co-variables los factores identificados como influyentes en los análisis previos, con el propósito de corregir por potenciales variables enmascaradoras. En los análisis 2º y 3º, donde la variable respuesta fueron los conteos por tipo parasitario (intensidad), se utilizaron modelos mixtos generalizados, con distribución binomial negativa. En los 3 tipos de modelos se incluyeron como efectos al azar los términos “grilla” y “campana”, para considerar la dependencia de las muestras provenientes de la misma grilla de muestreo y de la misma sesión de captura. Para el análisis de la razón N:L como indicador de cambios hematológicos por estrés se siguió una lógica similar: en un primer lugar se analizó la asociación con factores individuales y ambientales. Luego, se incluyó como variable independiente en los análisis parasitarios, para analizar su asociación con las intensidades parasitarias.

El número de variables a evaluar se mantuvo al mínimo, mientras que se optó por no incluir interacciones. Esta decisión responde a no comprometer el poder estadístico de los análisis, debido al limitado número de ejemplares capturados. En cuanto a los factores ambientales e individuales incluidos como variables independientes en los distintos modelos, se consideraron los siguientes:

i) Factores individuales: especie, sexo, y condición corporal (*score* del 2 al 10).

ii) Factores ambientales: tratamiento (suplementación de alimento), capturas por especie (número de individuos de cada especie capturados por sesión y por grilla, como indicador de la densidad específica), sitio de muestreo (Esperanza/La Picada), estación del año (Invierno, Primavera, Verano y Otoño), y año de captura (Año 1: Junio 2014 - Junio 2015; Año 2: Julio 2015 - Julio 2016).

Con el propósito de obtener una estimación de parámetros de mayor robustez, la selección de los modelos se llevó a cabo usando procedimientos basados en Teoría de la Información, a partir de lo cual se efectúa una inferencia ponderada de los parámetros a partir de la selección de múltiples modelos (inferencia de modelos múltiples, del inglés “*multimodel inference*”) (Burnham y Anderson, 2002; Grueber y col., 2011). La comparación y selección de modelos se ejecutó a partir de un modelo global máximo utilizando la estimación de máxima verosimilitud (ML, del inglés “*maximum likelihood*”) (Zuur y col., 2009), y mediante el criterio de Akaike de segundo orden (AICc), que es de utilidad ante muestras de número reducido (Arnold, 2010; Burnham y col., 2011; Johnson y Omland, 2004). Se seleccionaron todos aquellos modelos cuyo ΔAICc no difiriera en más de 2 unidades con respecto al mejor modelo posible. El peso AICc de un modelo (w_i) representa la plausibilidad relativa de que un modelo específico sea el mejor entre todos. En el caso particular de los modelos lineales mixtos, la estimación de los coeficientes se realizó mediante la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML, del inglés “*restricted maximum likelihood*”) (Zuur y col., 2009). Luego, el valor final de cada parámetro se calculó mediante el promedio de los coeficientes de todos los modelos seleccionados. La plausibilidad de cada parámetro se estimó a partir de sumar el w_i de aquellos modelos que lo incluyeran (Burnham y Anderson, 2002; Svagelj y col., 2012). Adicionalmente, de manera de complementar la evidencia de efectos relevantes, se calculó el intervalo de confianza del 95% de cada coeficiente final, considerándose significativos aquellos que no incluyeran el 0 (Manzoli y col., 2013; Svagelj y col., 2012).

Resultados

Los análisis estadísticos se presentan en las Tablas A23-A56, en Anexo II.

Ensayo de campo

Luego de 21 sesiones de muestreo, efectuadas a lo largo de 2 años, se capturaron 136 ejemplares de *A. azarae* y 124 de *C. callosus* (un total de 260 individuos). Se destaca que en contadas sesiones de captura se alcanzó el número máximo de 5 individuos de alguna de las especies por parcela, habiéndose marcado y liberado 20 ejemplares de *A. azarae* y 20 de *C. callosus*. En la Tabla 4 se presenta la cantidad de ejemplares capturados, según especie, sexo, edad y sitio de captura.

Tabla 4. Número de ejemplares capturados de *Akodon azarae* y *Calomys callosus* (según sexo, sitio de captura, e intervención realizada).

		<i>Akodon azarae</i>		<i>Calomys callosus</i>		TOTAL
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	
<u>Sitio: Esperanza (Santa Fe) (n= 205)</u>						
<u>Con suplemento</u>	Juveniles	4	10	2	7	23
	Adultos	28	18	48	33	127
<u>Sin suplemento</u>	Juveniles	7	10	0	2	19
	Adultos	23	10	3	0	36
<u>Sitio: La Picada (Entre Ríos) (n= 55)</u>						
<u>Con suplemento</u>	Juveniles	2	1	0	2	5
	Adultos	13	7	9	7	36
<u>Sin suplemento</u>	Juveniles	0	1	0	0	1
	Adultos	2	0	7	4	13
TOTAL		79	57	69	55	260

En líneas generales, no se evidenció un impacto claro de la intervención realizada sobre la captura de ejemplares de *A. azarae* y *C. callosus*. Se destaca que en el sitio de

Esperanza, casi la totalidad de ejemplares de *C. callosus* se capturaron en el sitio con suplemento de alimento.

Debido al número reducido de individuos juveniles y a la gran variabilidad que presentan por tratarse de animales en crecimiento, en los análisis siguientes se incluyeron sólo animales adultos. Los adultos fueron identificados como tales de acuerdo a sus características morfológicas y reproductivas (testículos descendidos en los machos, y vulvas perforadas en las hembras). En la Figura 25 se presenta la cantidad de capturas efectuadas en cada año y estación, según la especie y el sexo.

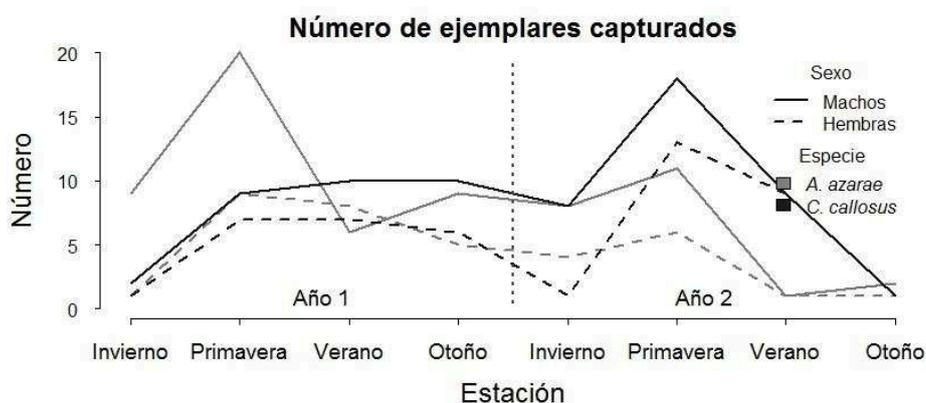


Figura 25. Número de roedores silvestres capturados luego de 21 sesiones de captura entre los años 2014 y 2016 (sólo se incluyen adultos).

Evaluación del impacto de la suplementación de alimento sobre la condición corporal de roedores de vida libre

En la Tabla 5 se presenta la estadística descriptiva de la condición corporal obtenida de los 136 ejemplares de *A. azarae* y 124 de *Calomys callosus*.

El análisis de la condición corporal evidenció que su variación se debe esencialmente a la influencia estacional a lo largo del año y al año en cuestión ($w_i = 0,97$, Tabla A23). Entre primavera y otoño se presenta una condición corporal deteriorada con respecto al invierno; en tanto que durante el segundo año de muestreo los animales estuvieron en peor condición que el primero (Tabla A24). No se evidenció ningún impacto de la suplementación sobre la condición corporal de los ejemplares evaluados.

Tabla 5. Estadística descriptiva de la condición corporal en roedores de vida libre (media \pm desvío estándar) y sub-totales por categoría.

	Sin Suplemento	Con Suplemento	TOTAL
<u><i>Akodon azarae</i> (n= 136)</u>			
Juveniles	4,89 \pm 1,32 (2-7)	4 \pm 1,17 (2-6)	35
Adultos	4,23 \pm 1,42 (2-7)	4,45 \pm 1,34 (2-8)	101
<u><i>Calomys callosus</i> (n= 124)</u>			
Juveniles	4 \pm 1,41 (3-5)	4 \pm 1,34 (2-6)	13
Adultos	3,43 \pm 1,6 (2-6)	3,70 \pm 1,58 (2-8)	111
TOTAL	69	191	

Evaluación de cambios hematológicos por estrés en roedores de vida libre

En la Tabla 6 se presenta la estadística descriptiva de la razón N:L obtenida de 127 ejemplares de *A. azarae* y 120 de *Calomys callosus*. La diferencia en el número de ejemplares con respecto a la Tabla 4 responde a que en 9 ejemplares de *A. azarae* y 4 de *C. callosus* los frotis no pudieron ser evaluados (frotis de mala calidad, tinción inadecuada, etc.).

Tabla 6. Estadística descriptiva de la razón N:L en roedores de vida libre (media \pm desvío estándar) y sub-totales por categoría.

	Machos	Hembras	TOTAL
<u><i>Akodon azarae</i> (n= 127)</u>			
Juveniles	0,16 \pm 0,21 (0,01-0,77)	0,24 \pm 0,24 (0-0,68)	32
Adultos	0,30 \pm 0,52 (0-2,52)	0,46 \pm 0,62 (0,02-3,19)	95
<u><i>Calomys callosus</i> (n= 120)</u>			
Juveniles	0,08 \pm 0,01 (0,07-0,09)	0,29 \pm 0,28 (0,06-1,02)	13
Adultos	0,59 \pm 0,68 (0,01-2,83)	0,46 \pm 0,48 (0-1,90)	107
TOTAL	142	105	247

El análisis de la razón N:L, utilizada como indicador indirecto de estrés, demostró que su variación estaría explicada por un modelo que incluye la condición corporal y la densidad específica (capturas por especie) ($w_i = 0,54$, Tabla A25). La razón N:L se incrementa según aumenta el número de individuos de la especie, y difiere con la condición corporal (Fig. 26, Tabla A26). Los individuos con una condición corporal empobrecida presentan niveles más elevados de la razón N:L (Fig. 26, Tabla A26).

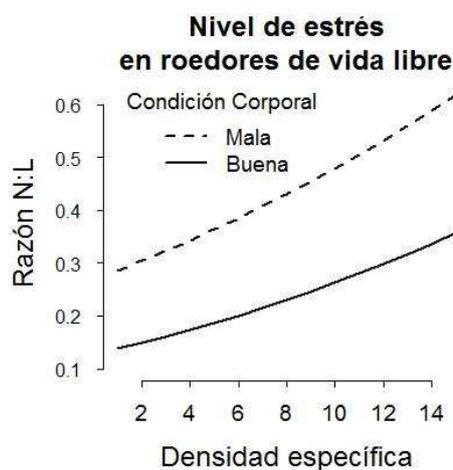


Figura 26. Simulación del nivel de estrés (razón N:L) en roedores de vida libre, a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado para un ejemplar de *A. azarae*, durante el 1^{er} año de muestreo).

Asociación de factores individuales y ambientales con la inmunidad celular de roedores de vida libre

Para explicar la variación en los conteos totales de leucocitos se seleccionaron 10 modelos alternativos, comprendidos en un $\Delta AICc < 2$ (Tabla A27). El mejor de ellos presentó una plausibilidad muy baja ($w_i = 0,16$) (Tabla A27), en tanto que ninguno de los parámetros incluidos resultó ser significativo (Tabla A28).

En el caso de los conteos de leucocitos mononucleares (linfocitos y monocitos), en ambos casos se seleccionaron 7 modelos (Tabla A27), a partir de los cuales se demostró que sólo el año de muestreo explica parcialmente la variación observada: durante el 2^o año de muestreo se presentaron mayores conteos de linfocitos y monocitos que durante el 1^o (Tablas A29 y A30). El mejor modelo que explicó la variación en los conteos de monocitos sólo incluyó "Año" como variable independiente ($w_i = 0,21$) (Tabla A27). En el caso de los conteos de linfocitos, el mejor modelo incluyó también al sitio de muestreo

($w_i = 0,24$), aunque esta última variable no fue significativa; mientras que el modelo que incluyó “Año” como única variable dependiente fue el 2° seleccionado por presentar una plausibilidad menor ($w_i = 0,16$) (Tablas A27 y A29).

Al considerar los conteos de leucocitos polimorfonucleares, los eosinófilos presentaron resultados similares a los obtenidos con los linfocitos y monocitos. Se seleccionó un conjunto de 6 modelos, donde el mejor presentó una plausibilidad de 0,29 (Tabla A27), y de los cuales se infiere que la variable “Año” es la única significativa (Tabla A31). A diferencia de lo observado en los leucocitos mononucleares, en este caso el “Año” se asoció de manera negativa con la variación de los conteos de eosinófilos (Tabla A31). En el caso de los neutrófilos, el mejor de los 3 modelos seleccionados para explicar la variación en sus conteos incluye la condición corporal de los individuos y la densidad específica ($w_i = 0,54$) (Tabla A27). De manera similar a lo observado en la razón N:L, el número de neutrófilos se incrementó ante el aumento de la densidad específica y en aquellos individuos con condición corporal empobrecida (Tabla A32).

Asociación de factores individuales y ambientales con la inmunidad humoral en roedores de vida libre

En primer lugar, debe destacarse que la técnica de ELISA demostró ser una técnica adecuada para el análisis de los niveles de AcNs en roedores de vida libre. A pesar de no contar comercialmente con anticuerpos específicos para realizar evaluaciones en roedores sigmodontinos, tanto en *A. azarae* como *C. callosus* se obtuvieron reacciones cruzadas con los anticuerpos anti-rata disponibles. La única diferencia entre el protocolo para cada especie fue la dilución de la muestra de plasma: las muestras de *A. azarae* se diluyeron 1:100, mientras que las de *C. callosus* 1:50. Esto permitió que en ambas especies se obtuvieran lecturas de densidad óptica adecuadas para su utilización.

Se procesaron muestras de 81 adultos de *A. azarae* y de 58 adultos de *C. callosus* (Tabla 7). Como se comentó previamente, estos ejemplares corresponden a los capturados hasta Octubre de 2015. Las muestras del resto de los animales no pudieron ser procesadas al terminar las campañas de captura dado que la actividad de los anticuerpos anti-rata conjugados con HRP decayó rápidamente (hubo que disminuir el factor de dilución de 1:1000 a 1:250, en aproximadamente un mes entre la evaluación de AcNs en ratas Wistar y la de roedores silvestres). A causa de este inconveniente, no se pudo realizar la evaluación de las muestras obtenidas 6 meses de la evaluación.

Tabla 7. Estadística descriptiva de los niveles de AcNs (densidad óptica) en roedores de vida libre (media \pm desvío estándar) y sub-totales por categoría.

	Machos	Hembras	TOTAL
<u><i>Akodon azarae</i> (n= 127)</u>			
Juveniles	0,72 \pm 0,68 (0,05-1,84)	0,64 \pm 0,52 (0,06-1,87)	33
Adultos	0,77 \pm 0,55 (0,06-1,97)	0,74 \pm 0,51 (0,14-1,83)	81
<u><i>Calomys callosus</i> (n= 120)</u>			
Juveniles	0,26 \pm 0,22 (0,10-0,42)	0,62 \pm 0,43 (0,18-1,35)	9
Adultos	0,69 \pm 0,38 (0,11-1,62)	0,93 \pm 0,61 (0,02-2,47)	58
TOTAL	105	76	181

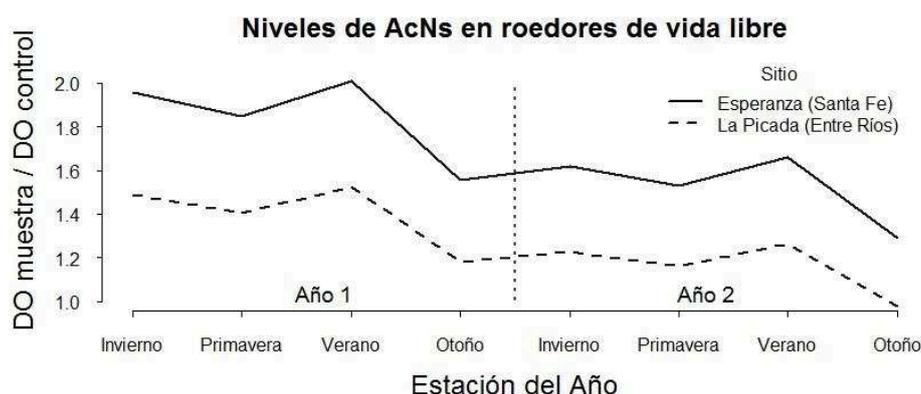


Figura 27. Simulación de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado para una hembra de *A. azarae*, en sitios con suplementación de alimento y ante una densidad específica media).

La variación en los niveles de AcNs de roedores de vida libre fue descrita en base a la selección de dos modelos bastante similares entre sí, ya que difirieron en sólo una variable y la plausibilidad de ambos es aproximadamente la misma ($w_i \approx 0,50$) (Tabla A32). Ambos modelos incluyen la especie y sexo, como variables individuales, y sitio, estación del año y año de muestreo, como variables ambientales (Tabla A33). La diferencia radica en que el 1^{er} modelo incluye la suplementación de alimento (“Tto”), mientras que el 2^o incluye la densidad específica (Tabla A33). Sin embargo, de todas las

variables incluidas, sólo el sitio y año de muestreo resultaron ser significativas (Tabla A34). Los roedores capturados en La Picada (Entre Ríos) presentaron menores niveles de AcNs que aquellos individuos de Esperanza (Santa Fe) (Fig. 27, Tabla A34). Asimismo, los niveles de AcNs fueron menores durante el 2° año de muestreo (Fig. 27, Tabla A34).

Asociación de factores individuales y ambientales con la carga de parásitos presentes en roedores de vida libre

- *Nematodos*

En la Figura 28 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por nematodos gastrointestinales, según intensidad parasitaria y especie de roedor.

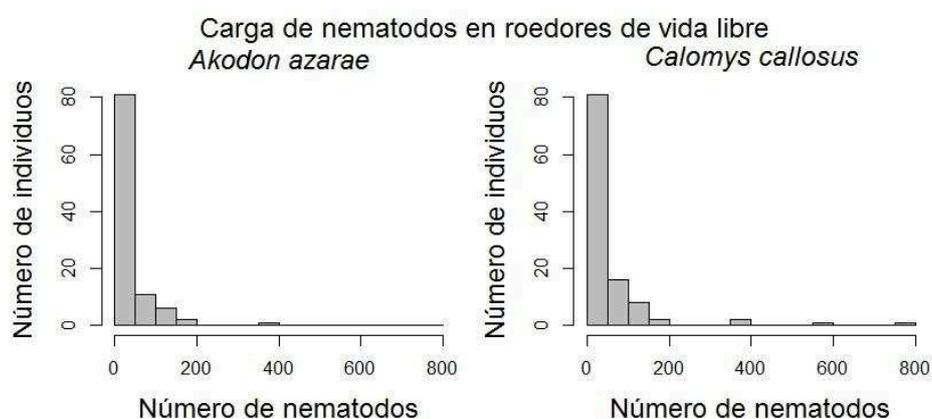


Figura 28. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por nematodos gastrointestinales, según carga y especie.

El modelo lineal generalizado que mejor explica la variación de la carga de nematodos gastrointestinales en roedores silvestres incluye la especie, la condición corporal, el sexo y la estación del año (aunque sólo estas últimas 3 variables fueron significativas) ($w_i = 0,50$) (Tablas A35 y A36).

La carga de nematodos gastrointestinales disminuye conforme mejora la condición corporal, al tiempo que difiere según se trate de machos o hembras y de acorde a la estación del año (Tabla A36, Fig. 29). Los machos presentan mayores cargas de nematodos gastrointestinales que las hembras; en tanto que los niveles más bajos se presentan en otoño e invierno, para aumentar durante la primavera y alcanzar el pico máximo en verano (Tabla A36, Fig. 29).

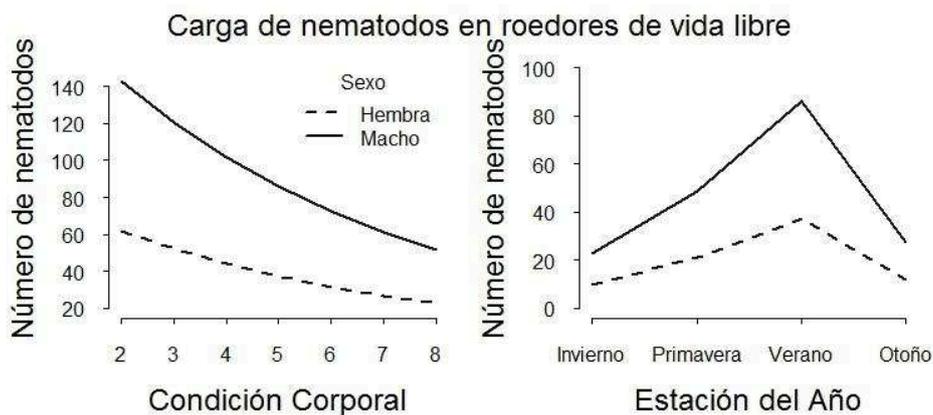


Figura 29. Simulación de la carga de nematodos en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado para ejemplares de *A. azarae*, en verano en el 1º gráfico y con buena condición corporal en el 2º).

- *Cestodos*

En la Figura 30 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por cestodos gastrointestinales, en consideración de la intensidad parasitaria y especie de roedor.

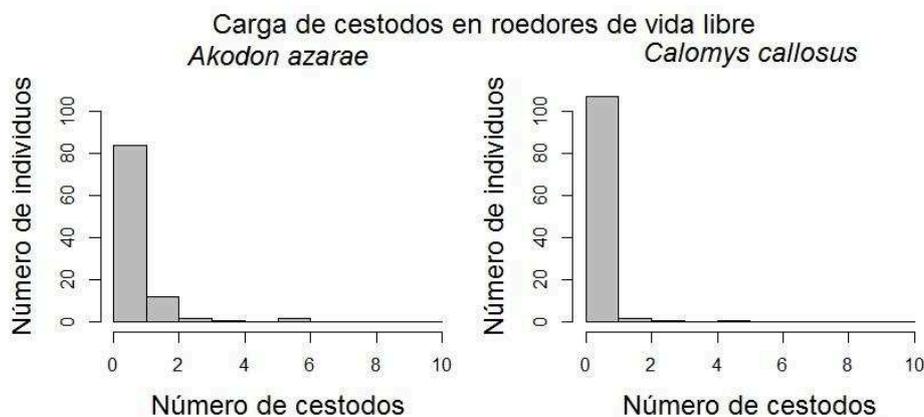


Figura 30. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por cestodos gastrointestinales, según carga y especie.

La intensidad del parasitismo por cestodos gastrointestinales en roedores de vida libre fue mejor explicada por un modelo que incluyó la especie de roedor y la estación del año ($w_i = 0,56$) (Tabla A35). El modelo seleccionado demostró que los ejemplares de *A. azarae* presentan mayor cantidad de cestodos gastrointestinales que *C. callosus* (Fig. 30 y 31), en tanto que las cargas aumentan en primavera y alcanzan su pico durante el verano

(Tabla A37, Fig. 31). Cabe destacar que las intensidades parasitarias durante otoño son mayores que aquellas presentadas durante la primavera (Tabla A37, Fig. 31).

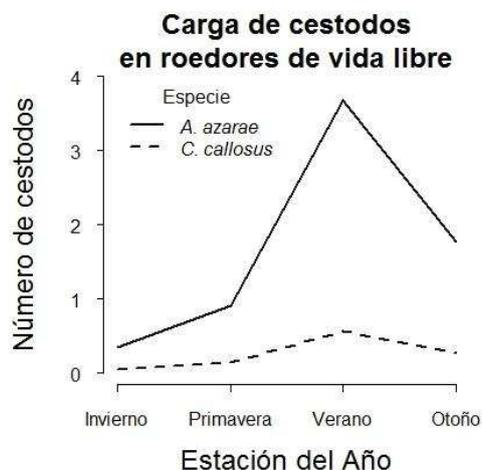


Figura 31. Simulación de la carga de cestodos gastrointestinales en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado en Esperanza durante el 1º año de muestreo).

- *Garrapatas*

En la Figura 32 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por garrapatas, en consideración de la intensidad parasitaria y especie de roedor.

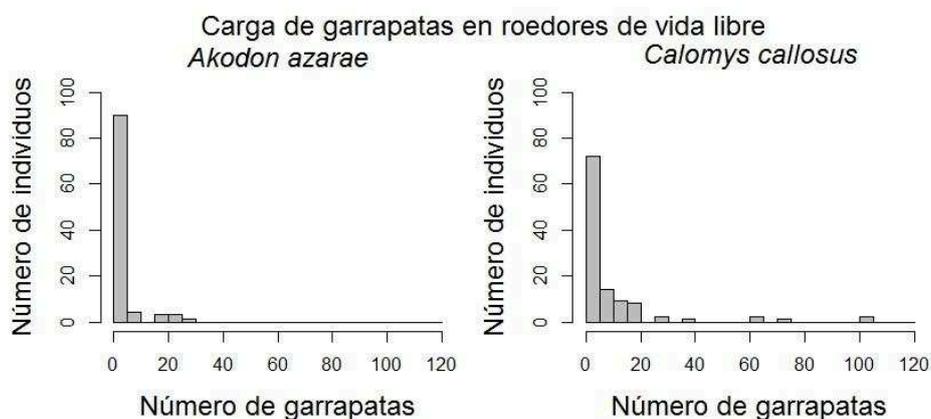


Figura 32. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por garrapatas, según carga y especie.

En el análisis de los factores asociados con la carga de garrapatas en roedores de vida libre se seleccionaron 7 modelos, de los cuales el primero de ellos ($w_i = 0,21$) incluyó variables individuales (especie y sexo) y ambientales (estación y año) (Tabla A35). De estas variables, el sexo resultó no ser significativo (Tabla A38). Los ejemplares de C.

callosus presentaron mayor número de garrapatas que los de *A. azarae* (Fig. 32 y 33), mientras que el parasitismo se incrementó de manera sostenida de invierno a otoño, siendo más intenso durante el 2º año de muestreo (Tabla A38, Fig. 33).



Figura 33. Simulación de la carga de garrapatas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado en Esperanza durante el 1º año de muestreo).

- Ácaros

En la Figura 34 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por ácaros, en consideración de la intensidad parasitaria y especie de roedor.

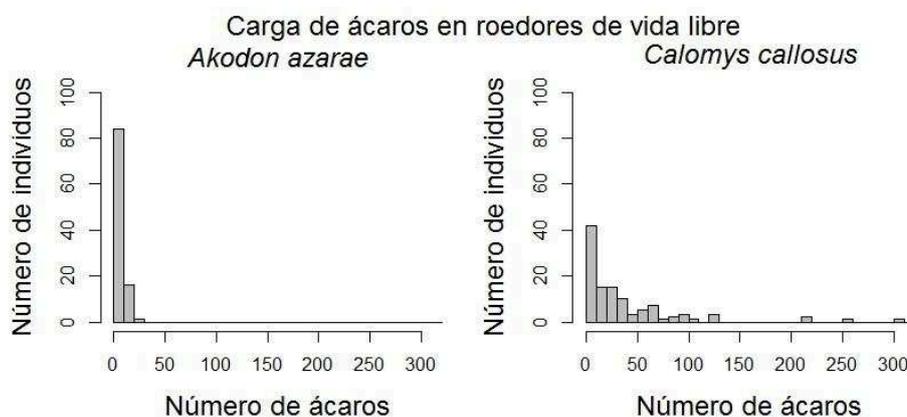


Figura 34. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por ácaros, según carga y especie.

A partir del modelo global se seleccionaron 10 modelos para explicar la carga de ácaros en roedores de vida libre (Tabla A35). El 1º de ellos presentó una plausibilidad de 0,17 e incluyó la especie y el sexo como variables independientes, que *a posteriori* fueron las únicas variables significativas (Tablas A35 y A39). Los ejemplares de *C. callosus*

presentaron mayor intensidad de parasitismo por ácaros que los de *A. azarae* (Fig. 34 y 35), mientras que en ambas especies los machos presentaron cargas más altas (Tabla A39, Fig. 35).

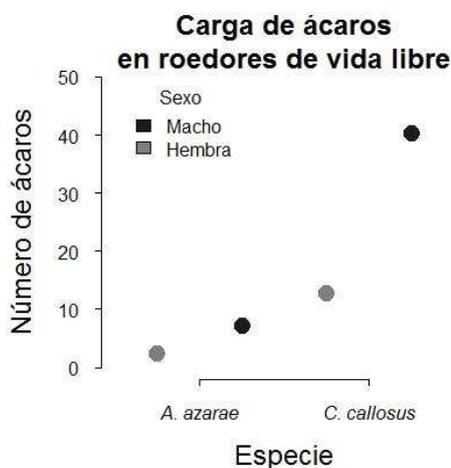


Figura 35. Simulación de la carga de ácaros en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulación para ejemplares con una condición corporal buena [5], ante una densidad específica media y suplementación de alimento, durante el 1º año de muestreo).

- *Pulgas*

En la Figura 36 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por pulgas, en consideración de la intensidad parasitaria y especie de roedor.

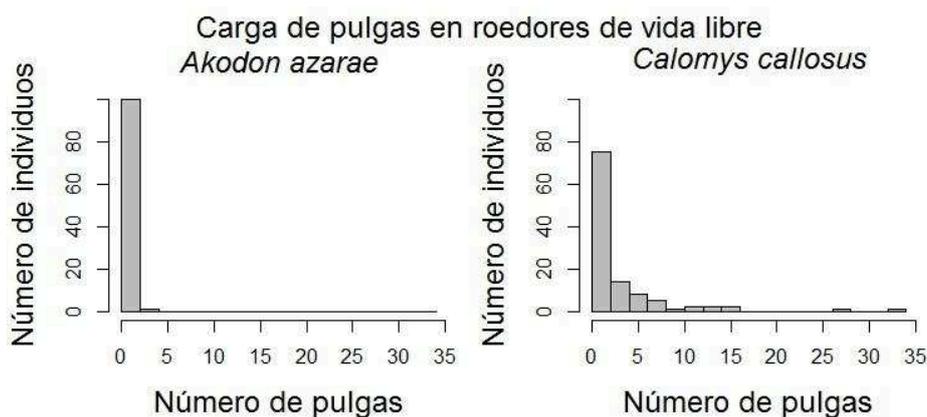


Figura 36. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por pulgas, según carga y especie.

El análisis de la carga de pulgas en roedores de vida libre se efectuó a partir de una selección de 7 modelos, de los cuales el mejor incluyó como variables independientes a

la especie, el sexo, la condición corporal y la densidad específica ($w_i = 0,23$) (Tabla A35). Por medio de la inferencia de modelos múltiples, se demostró que los machos presentaron mayor número de pulgas que las hembras, siendo esta diferencia marcadamente superior en *C. callosus* (Tabla A40, Fig. 37). Los ejemplares de *C. callosus* tuvieron más pulgas que los de *A. azarae* (Fig. 36 y 37), en tanto que en ambas especies el parasitismo se incrementó conforme incrementó la densidad específica (Tabla A40, Fig. 37).

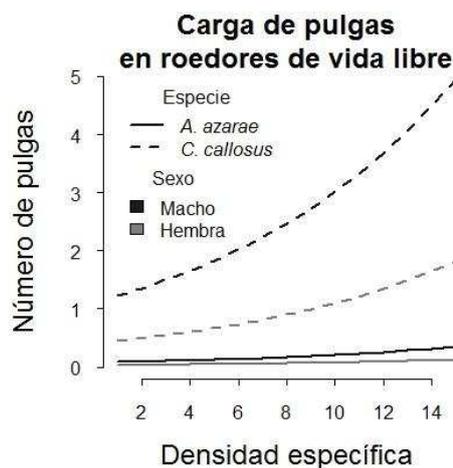


Figura 37. Simulación de la carga de pulgas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado para ejemplares con una condición corporal buena [5] y suplementación de alimento, durante el 1º año de muestreo en Esperanza).

- *Piojos*

En la Figura 38 se presentan las frecuencias de roedores silvestres parasitados por piojos, en consideración de la intensidad parasitaria y especie de roedor.

El modelo que mejor explica la intensidad del parasitismo por piojos en roedores de vida libre incluyó tres variables individuales y la influencia estacional a lo largo del año ($w_i = 0,37$), aunque la única variable de significancia resultó ser la especie (Tablas A35 y A41). Mientras que en general pocos ejemplares de *A. azarae* presentaron cargas de piojos, los ejemplares de *C. callosus* con piojos fueron más numerosos y con cargas mayores (Fig. 38).

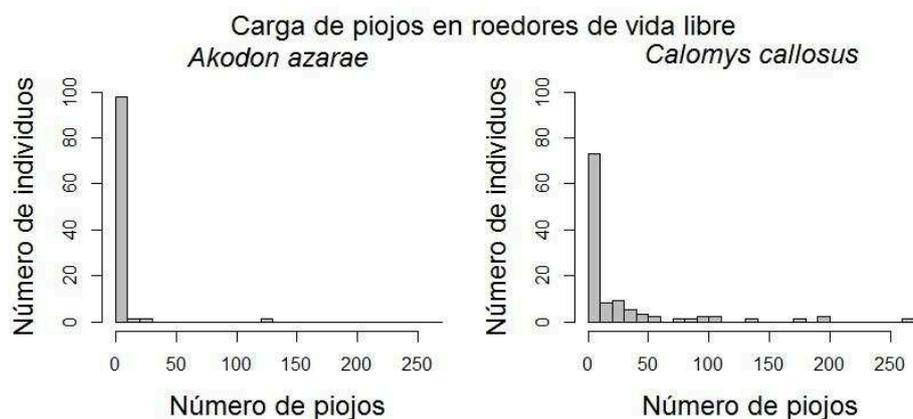


Figura 38. Frecuencia de roedores de vida libre parasitados por piojos, según carga y especie.

Asociación de la razón N:L con la intensidad y tipo de parásitos presentes en roedores de vida libre

Los análisis estadísticos de la asociación entre la razón N:L y la intensidad de cada tipo parasitario se presentan en el Anexo II, en las Tablas A42-A45. A los fines de simplicidad, sólo se presentan las inferencias de los modelos en que la razón N:L fue significativa, es decir, que estuvo asociada con la intensidad del tipo parasitario en cuestión.

La asociación de los cambios hematológicos por estrés (reflejado por los niveles de la razón N:L) con las cargas parasitarias fue dispar para cada tipo de parásito, cual demostrado a través de la inferencia de modelos múltiples (Tabla A42). La inferencia realizada a partir de los diversos modelos demostró que este indicador de estrés estuvo asociado con la intensidad parasitaria de nematodos, garrapatas y pulgas (Tablas A43-A45). En los modelos de ácaros y piojos, la razón N:L fue una de las variables incluida en cada uno de los mejores modelos ($w_i = 0,65$ y $w_i = 0,37$, respectivamente), aunque no resultó significativa en ninguno de ellos; mientras que en el caso de los cestodos, ni siquiera integró el modelo con mayor respaldo ($w_i = 0,54$) (Tabla A42).

La asociación de la razón N:L con el número de nematodos gastrointestinales en roedores de vida libre fue mejor explicada por un modelo que incluyó, además de la razón N:L, el sexo y la condición corporal de los ejemplares ($w_i = 0,72$) (Tabla A42). En la Figura 39 se observa la asociación positiva del estrés con el número de nematodos gastrointestinales (la diferencia entre sexos ya fue detectada en el análisis previo de factores individuales) (Fig. 39 y Tabla A43).

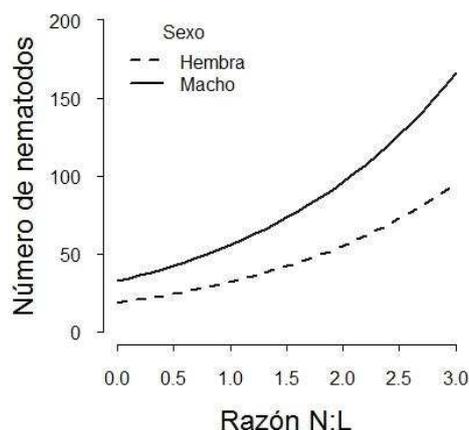


Figura 39. Simulación de la asociación del estrés con la carga de nematodos gastrointestinales en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulación para individuos con una condición corporal buena [5], en verano).

En cuanto a las garrapatas, su número también se encontró asociado a los niveles de la razón N:L. Además de la razón N:L, el mejor modelo incluyó las variables que previamente fueron determinadas como influyentes (sexo, estacionalidad, año) ($w_i = 0,70$) (Tabla A42). Estas mismas variables fueron significativas, con un efecto similar al descrito anteriormente (Tabla A44, Fig. 33 y 40). Se destaca que, en ambas especies, los animales con mayores niveles de la razón N:L presentaron un mayor número de garrapatas (Tabla A44, Fig. 40).

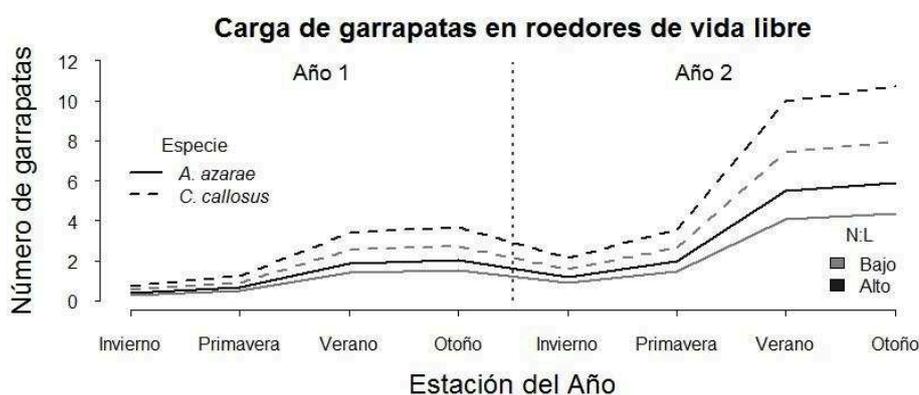


Figura 40. Simulación de la asociación del estrés con la carga de garrapatas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulado ante una densidad específica media).

En el caso de la asociación entre razón N:L y el número de pulgas, un único modelo fue seleccionado. Además de la razón N:L, este modelo incluyó variables individuales (especie, sexo y condición corporal) y la densidad específica, siendo todas ellas significativas (Tablas A42 y A45). La especie, el sexo y la densidad específica presentaron un efecto similar al descrito previamente (Fig. 37, Tablas A40 y A45); mientras que la condición corporal se asocia negativamente con el número de pulgas: (Fig. 41, Tabla A45). En este contexto, el incremento de la razón N:L se refleja en un aumento del número de pulgas en el hospedador (Fig. 41, Tabla A45).

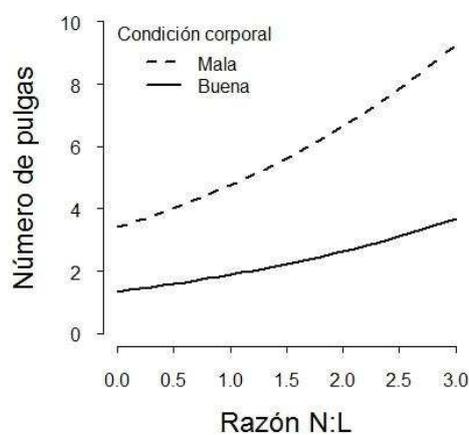


Figura 41. Simulación de la asociación del estrés con la carga de pulgas en roedores de vida libre, según las asociaciones determinadas a partir de la inferencia de modelos múltiples (simulación para machos de *C. callosus*, ante una densidad específica media).

Asociación de la función inmune con la intensidad y tipo de parásitos presentes en roedores de vida libre

Los análisis estadísticos de la asociación de la función con la intensidad de cada tipo parasitario se presentan en el Anexo II, en las Tablas A46-A56. De manera similar a lo expresado en el punto anterior, con el propósito de ser sucinto, sólo se presentan las inferencias de los modelos en que la función inmune fue significativa, es decir, que estuvo asociada con la intensidad del tipo parasitario en cuestión.

El análisis de la asociación entre la función inmune y el número de parásitos presentes en roedores de vida libre evidenció pocas asociaciones, aunque los cestodos son el único tipo parasitario en que no se encontró ninguna relación con la inmunidad. Se encontró que el número de neutrófilos se asocia positivamente a la carga de nematodos, garrapatas, ácaros y pulgas (Tablas A47, A49, A52 y A54, respectivamente); mientras

que el conteo de linfocitos se asocia negativamente con el número de piojos (Tabla A56). En el caso de los nematodos, el único modelo seleccionado incluyó también el sexo y la condición corporal (Tablas A46 y A47), variables ya identificadas previamente como de influencia. De manera similar, el modelo que mejor describe el número de garrapatas ($w_i = 0,66$) incluye el conteo de neutrófilos y los mismos factores encontrados en los análisis anteriores (especie, estacionalidad y año de muestreo) (Tabla A49 y A50). En cambio, los modelos que mejor describen las intensidades de ácaros y pulgas, incluyen a los neutrófilos y las variables identificadas previamente, pero también a la condición corporal (Tabla A51-A54), que no había sido significativa en modelos anteriores (Tablas A35, A39 y A40). Aún más, la condición corporal presenta un efecto opuesto en ambos modelos: se asocia positivamente con el número de ácaros y de manera negativa con el número de pulgas (Tablas A52 y A54).

En cuanto al número de piojos, el único modelo seleccionado incluyó especie y linfocitos (Tabla A55). Al igual que en modelos anteriores, los ejemplares de *C. callosus* presentan mayor carga de piojos; en tanto que se detectó una asociación negativa entre el número de linfocitos y el número de piojos presentes en el hospedador (Tabla A56).

Discusión

El gran número de análisis realizados, en distintos niveles, ha generado numerosos resultados, por lo que se procuró discutir los más relevantes. Los resultados aquí obtenidos constituyen evidencia de que la relación entre la función inmune y la infección por parásitos es compleja y varía según el tipo de parásito que se considere. Esta complejidad reside mayormente en la multitud de factores e interacciones que pueden asociarse tanto a la función inmune como a cada tipo de población parasitaria. Debe señalarse que, en contra de lo esperado, la manipulación experimental no resultó en un cambio en la condición corporal de los animales de parcelas con suplementación de alimento, por lo que los análisis se realizaron como si se tratara de un muestreo de 4 parcelas (en 2 sitios) a lo largo de 2 años.

La evaluación de la razón N:L como indicador indirecto de los niveles de estrés con cierto consenso en estudios de mamíferos de vida libre (Davis y col., 2008; Gilot-Fromont y col., 2012; Springer y col., 2015; Warburton y col., 2016; Young y col., 2015a). Sin embargo, debe considerarse que no representa más que el efecto del estrés sobre las dinámicas leucocitarias, por lo que debe de interpretarse con precaución ya que sus niveles son susceptibles de ser afectados por el estado de infección (Davis y col., 2008) o

podrían presentar alguna discrepancia con aquellos de las hormonas de estrés (Johnstone y col., 2012; Müller y col., 2011). De acuerdo a lo planteado por Vera y col. (2008), los niveles de la razón N:L aquí presentados (Tabla 5) podrían ser interpretados como reflejo del impacto del estrés agudo (entre 2,5 y 3). Sin embargo, se encontró que estos niveles de estrés estarían asociados a la densidad de ejemplares de la misma especie y la condición corporal, factores que usualmente se presentan de manera sostenida en el tiempo, lo que sugiere una cronicidad en su acción. En todo caso, debe considerarse que los valores de referencia propuestos se obtuvieron en el marco de estudios con una especie de roedor subterráneo, *Ctenomys talarum*, en condiciones controladas (Vera y col., 2008), lo que difiere marcadamente del contexto y de las especies aquí analizadas. Si los niveles de estrés detectados constituyeran señal del estrés agudo consecuencia de las capturas, se considera que la asociación con la densidad y condición corporal no debiera haber sido evidenciada. De todas maneras, la veracidad de estas interpretaciones debe ser analizada y verificada en estudios posteriores mediante la comparación con los niveles de las hormonas de estrés, ya que no serían intercambiables entre sí y presentarían distinta sensibilidad (Müller y col., 2011).

La variación de los niveles de estrés a causa de la densidad poblacional de especies de roedores, puede responder a los cambios que ocurren en la conformación de territorios ante incrementos de la misma (Ávila y col., 2016). En este escenario, se incrementan las confrontaciones entre machos (Bonatto y col., 2013), al tiempo que tanto machos como hembras reducen sus territorios (Ávila y col., 2016). De hecho, Young y col. (2015a) han reportado que la razón N:L se incrementó en parcelas con alta densidad de roedores del género *Saccostomus*. El incremento de densidad poblacional, en conjunción con esta reducción de los territorios, pueden traer aparejada una disminución en las fuentes de alimento (Ávila y col., 2016), lo que se vincularía con la influencia de la condición corporal sobre los niveles de estrés. Siendo que la escasez de alimento es uno de los estresores que más afectan a los animales silvestres en la naturaleza (Kitaysky y col., 2010; McEwen y Wingfield, 2010; Schultner y col., 2013; Wingfield y col., 2011), es razonable suponer que los individuos con una condición corporal empobrecida presenten valores elevados de los índices de estrés. Adicionalmente, cabe destacar que el efecto estresor de estos dos desafíos ambientales ha sido verificado de manera experimental en el Capítulo II de esta tesis.

La asociación de factores individuales y ambientales con la función inmune de roedores sigmodontinos, fue menor de la esperada. Clásicamente, el sexo y la condición corporal son reconocidas como variables de influencia sobre las defensas (Beldomenico y col., 2008b; Bordes y col., 2012), sin embargo esto no pudo ser verificado en la mayoría de los indicadores evaluados. Asimismo, la asociación detectada con el año de muestreo (y el sitio, en AcNs) puede ser atribuido a condiciones ambientales circunstanciales, no contempladas en estos análisis. El último tercio del año 2015 y el primero del 2016 se caracterizó por una fuerte influencia del fenómeno de El Niño, con temperaturas superiores a las normales y cuantiosas precipitaciones. Este incremento en las precipitaciones en toda la zona del noreste Argentino trajo aparejado el crecimiento de los ríos del área y el anegamiento de vastas zonas, incluyendo los sitios de muestreo. Estas alteraciones climáticas poseen un impacto innegable sobre el ambiente y las poblaciones, lo que bien podría justificar la diferencia detectada entre años de muestreo en la mayoría de los indicadores de función inmune (y de sitio en AcNs). Asimismo, para develar los factores ambientales causales de esta diferencia anual se requiere de un análisis más minucioso que el realizado. De todas maneras, no se descarta que esta fuerte influencia del ambiente pueda haber enmascarado un impacto más sutil de las variables individuales.

El incremento en el conteo de neutrófilos de aquellos individuos con una condición corporal empobrecida, o expuestos a una mayor densidad específica, es contrario a reportes previos. En un estudio longitudinal con ratones de campo del género *Microtus*, Beldomenico y col. (2008b) reportaron que, ante incrementos en la densidad poblacional o una condición corporal deteriorada, los picos estacionales de neutrófilos fueron menores que ante densidades bajas o buena condición. Asimismo, también reportaron que una condición corporal empobrecida antecede a un incremento en el conteo de neutrófilos, en vistas de un mayor riesgo de infección (Beldomenico y col., 2008a). Ante esto, debe indagarse acerca de que la actual asociación entre los neutrófilos y la condición corporal o la densidad poblacional no sea consecuencia de las condiciones previas a las que se expuso el individuo, que continuaban presentes al momento de la captura. Por otro lado, no debe obviarse que estos resultados posiblemente sean reflejo de la respuesta de estrés puesta en juego ante estos mismos desafíos (cual evidenciado por la razón N:L).

En una primera instancia, el número de nematodos gastrointestinales presentes en los roedores sigmodontinos parece estar explicado por la asociación con el sexo, la condición corporal y la estación del año (Tabla A33). Sin embargo, es de notar que al incluir en el

modelo la evaluación de estrés, sólo el sexo continuó siendo significativo (además de la razón N:L) (Tabla A40). Esto último sugiere que la asociación de la condición corporal y de la estación del año con los nematodos podría estar mediada por acción del estrés, lo que se refuerza en el hecho de que la condición corporal es una de las variables que explica la variación en los niveles de la razón N:L (Tabla A22), y en el menor AICc del modelo que incluye la razón N:L ($\Delta\text{AICc} = 6,88$) (Tablas A32 y A39). Como revisado por Beldomenico y Begon (2015), el estrés crónico desencadena respuestas que alteran el comportamiento y la condición fisiológica (incluyendo la función inmune) del hospedador, lo cual predispone a un incremento del parasitismo, que a su vez puede inducir mayor estrés. Los cambios de comportamiento asociados a la búsqueda de alimento y a la disputa de territorios, ambos como consecuencia de una condición corporal deteriorada y de un incremento en la densidad, redundan en una mayor exposición a parásitos y consecuente riesgo de infección (Beldomenico y Begon, 2015). A su vez, estos mismos comportamientos se ven exacerbados durante la etapa reproductiva, que en estos roedores se presenta justamente entre primavera y verano. En cuanto al hecho de que los machos presenten más cantidad de nematodos que las hembras, representa un hallazgo habitual, atribuido a diferencias comportamentales (mayor exposición), hormonales (inmunosupresión por testosterona), e incluso inmunológicas (hembras más resistentes) (Barron y col., 2015; Bordes y col., 2012; Ferrari y col., 2003; Poulin, 1996). De todas maneras, esto debe ser verificado en estudios futuros, dado que lo contrario ha sido reportado para especies de nematodos en particular (Grzybek y col., 2014).

Por otro lado, al considerar la función inmune, es de notar que sólo el conteo de neutrófilos se encontró asociado al número de nematodos gastrointestinales (Tabla A44). Sin embargo, los neutrófilos en general se encuentran asociados a respuestas inflamatorias agudas (Weiss y Wardrop, 2010), y no a la respuesta contra helmintos gastrointestinales. En este caso en particular, es probable que esta asociación se deba a los cambios leucocitarios producidos por la misma respuesta de estrés asociada al incremento del parasitismo por nematodos. De hecho, al contrastar los mejores modelos que explican el número de nematodos, el que incluye la razón N:L presenta menor AICc que aquel que incluye a los neutrófilos ($\Delta\text{AICc} = 3,76$) (Tablas A39 y A43), lo que respalda la suposición de que la fuerza imperante en este caso es la respuesta de estrés, y no la función inmune en respuesta al parasitismo. Esta asociación complementaríala lo

expuesto en el párrafo anterior, acerca del rol de estrés crónico en ese “círculo vicioso” que representa la relación entre condición fisiológica del hospedador y estado de infección (Beldomenico y Begon, 2015). Como eje central del concepto de círculo vicioso se entiende que ambas partes son tanto causa como efecto: la infección parasitaria ejerce un impacto sobre el hospedador, lo que a su vez predispone a mayor infección parasitaria, que nuevamente refuerza el impacto sobre el hospedador (ver en Beldomenico y Begon, 2010; Beldomenico y col., 2008a; Blanchet y col., 2009).

A la fecha, es poco lo que se sabe acerca de los cestodos de roedores sigmodontinos en Argentina (Guerreiro Martins y col., 2014). Los escasos trabajos publicados describen que los cestodos gastrointestinales (adultos) encontrados pertenecen al orden Cyclophyllidea, familia Hymenolepididae (Guerreiro Martins y col., 2014; Navone y col., 2009). Aquí se encontró que su presencia en roedores de vida libre presenta variación estacional y difiere entre especies, presentando *A. azarae* cargas mayores que *C. callosus*. Siendo que los cestodos Hymenolepididae dependen de diversos taxones de artrópodos (Orthoptera, Dermaptera, Coleoptera) como hospedadores intermediarios, esta diferencia entre especies de roedores estaría sustentada en la dieta de cada una: *A. azarae* es una especie omnívora, con fuerte requerimiento de insectos (Bilenca y col., 1992); mientras que las especies del género *Calomys* presentan una importante dependencia de hojas y semillas (Bilenca y col., 1992; Castellarini y col., 2003). En cuanto a la estacionalidad, puede atribuirse al consumo de artrópodos durante la etapa reproductiva, particularmente en *A. azarae*. Al respecto, se ha reportado que esta especie incrementa drásticamente el consumo de insectos para satisfacer las necesidades proteicas durante la reproducción (entre octubre y marzo, según las condiciones imperantes) (Bilenca y col., 1992). Por último, la ausencia de asociación con la función inmune puede deberse al efecto inmunomodulador reconocido en cestodos Hymenolepididae como parte de su estrategia de evasión (McKay, 2009).

Es de notar que la intensidad de ectoparásitos (garrapatas, ácaros, pulgas y piojos) presentes en roedores de vida libre puede ser atribuida, entre otros factores, a la especie. De manera consistente, los ejemplares de *C. callosus* fueron parasitados más frecuentemente y por un número mayor de cada uno de los tipos de ectoparásitos que lo observado en *A. azarae*. De hecho, la especie de hospedador ha sido descripta como uno de los factores asociados a la determinación de los ensambles de ectoparásitos en roedores sigmodontinos (Lareschi y Krasnov, 2010). Sponchiado y col. (2015) indican a *C.*

callosus entre las especies que presentan mayor prevalencia e intensidad de parasitismo por ectoparásitos; mientras que *A. azarae* no suele aparecer entre las especies más afectadas en distintos ensambles de hospedadores (Lareschi y col., 2003, 2007; Navone y col., 2009). Por otro lado, se destaca que los ejemplares macho de *A. azarae* y *C. callosus* presentaron un mayor número de ácaros y pulgas que las hembras, lo que también ha sido evidenciado en otras especies de roedores, incluyendo sigmodontinos (Kowalski y col., 2015; Lareschi, 2004, 2006). Por último, se evidenció que la intensidad del parasitismo por pulgas en *A. azarae* y *C. callosus* se asocia a la densidad de cada especie: ante un incremento del número de ejemplares capturados por especie de roedor, el número de pulgas por ejemplar aumentó. Este hallazgo no es de extrañar, ya que se encuentra demostrado que en la mayoría de los casos la intensidad (e incluso también la prevalencia) del parasitismo por pulgas se encuentra asociada a la densidad de hospedadores (Krasnov y col., 2002; Young y col., 2015b). Esto se debería a un incremento en la tasa de contacto entre individuos, lo que favorece la exposición y contagio, con un incremento de la intensidad y prevalencia del parasitismo (Krasnov y col., 2002; Young y col., 2015b).

En cuanto a las garrapatas, la intensidad del parasitismo presentaría cierta estacionalidad. Sin embargo, esta aparente asociación estacional debe ser verificado: Colombo y col. (2014) demostraron que una supuesta estacionalidad en la presencia de garrapatas resultaba de la omisión tanto de variables enmascaradoras como de la interacción con el año de muestreo. La diferencia notoria encontrada entre los 2 años de muestreo permite suponer que la estacionalidad aquí reportada podría ser espuria y causada por la omisión de la interacción Estación×Año. Estos hallazgos no han podido ser verificados aún, ya que el escaso número de individuos capturados limita la cantidad de variables e interacciones a evaluar, a riesgo de perder poder estadístico o tornar los modelos en inviables. Sin embargo, no dejan de ser de interés, y ameritan ser explorados en mayor profundidad y detalle.

La presencia de garrapatas, ácaros y pulgas se encontró asociada con el conteo de neutrófilos. En estos 3 tipos de ectoparásitos se evidenció que un incremento en su número estuvo acompañado por un aumento de los neutrófilos en sangre. De por sí, esta asociación no sería de extrañar, ya que la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos forma parte de las defensas inmunes puestas en juego ante ectoparásitos (Glatz y col., 2016; Owen y col., 2010). Sin embargo, lejos de indicar un incremento en la inmunocompetencia (se esperaría una reducción de la carga de parásitos), esta asociación

positiva entre el número de neutrófilos y la intensidad del parasitismo por ectoparásitos sería el reflejo de una infección activa y de los niveles de estimulación de la inmunidad innata (Biard y col., 2015; Davis y col., 2008). Entre estos resultados, se destaca particularmente la asociación opuesta que se presenta entre condición corporal y pulgas o ácaros al incorporar el conteo de neutrófilos en los modelos (Tablas A49 y A51): un individuo con condición corporal deteriorada presenta más pulgas y menos ácaros que un ejemplar en buena condición corporal. Esta situación sugeriría que la presencia de pulgas es perjudicial para el *fitness* del hospedador. Asimismo, cabe considerar que las familias de ácaros usualmente reportadas en roedores sigmodontinos (Lareschi y col., 2003, 2007; Navone y col., 2009) son hematófagos facultativos y no producirían un perjuicio de importancia (Rynkiewicz y col., 2013). Ante esto, se presume que los roedores sigmodontinos serían poco tolerantes a la presencia de pulgas y favorecerían su resistencia, mientras que se toleraría la presencia de ácaros. Considerando que un mismo mecanismo de defensa puede ser partícipe de estrategias de resistencia o tolerancia (Råberg, 2014), este efecto diferencial parece indicar que la inversión en inmunidad innata, a través de los neutrófilos, mediaría estrategias distintas frente al parasitismo por pulgas o ácaros. Adicionalmente, en esta tesis se demostró que ratas expuestas a altas densidades invirtieron en inmunidad humoral adquirida, lo que sugeriría otro mecanismo de resistencia ante el parasitismo denso-dependiente por pulgas.

La asociación negativa entre el número de piojos y el conteo de linfocitos es algo más compleja de analizar. La disminución de la cantidad de piojos ante la inversión en componentes de la inmunidad adquirida parece sugerir un incremento de la inmunocompetencia de los individuos infectados, en un intento de resistir la infección. Aunque por otro lado, la disminución en el conteo de linfocitos acompañado de un incremento en el número de piojos es compatible con un escenario de inmunosupresión, en el cual el hospedador es incapaz de regular la población parasitaria. Contrario a los resultados aquí reportados, en especies domésticas (ej., cerdos y ovejas) se ha descrito que la infección por piojos estaría asociada a incrementos en el número de linfocitos en sangre, favoreciendo la inmunidad adquirida (Bany y col., 1995; Davis y Williams, 1986). Considerando que las especies de piojos son específicas de cada hospedador, es razonable suponer que la relación hospedador-parásito difiera en cada caso en particular, y por ende las asociaciones que se presenten. Ante este escenario, se precisan de estudios longitudinales que permitan vislumbrar la naturaleza de la relación aquí descrita.

A modo de cierre, y a pesar de la complejidad de la interacción hospedador-parásito-ambiente, fue posible develar algunos aspectos de interés a considerar en estudios futuros: la relación hospedador-parásito en roedores sigmodontinos se ve afectada por estresores ambientales, como ser la densidad de individuos y la disponibilidad de recursos. A su vez, la competencia o susceptibilidad de estos roedores como hospedadores varía principalmente según la especie y el sexo, lo que plantea interrogantes acerca de las estrategias puestas en juego para resistir o tolerar cada tipo de macroparásito. Análisis futuros que contemplen indicadores adicionales de inmunidad (ej., IgM e IgG totales, actividad bactericida del plasma, respuesta a la fitohemaglutinina), la interacción entre distintas especies parasitarias, y entre los diversos factores de influencia (individuales y ambientales), son necesarios y serán de ayuda para confirmar y refinar las asociaciones aquí descritas, al tiempo que serán de utilidad para abordar la pregunta acerca de las estrategias defensivas puestas en juego por estos roedores antes diferentes infecciones parasitarias.

CAPÍTULO VII

Conclusiones y Perspectivas

En consideración de la importancia de los roedores como hospedadores de enfermedades zoonóticas, el propósito de esta tesis fue evaluar el rol modulador del estrés crónico sobre la función inmune, y el impacto que esto conlleva sobre poblaciones parasitarias. Aún más, se analizó si esta modulación difiere entre los mecanismos innato y adquirido de la inmunidad ante diferentes escenarios de estrés. Para ello, se plantearon tres hipótesis de trabajo: i) los factores estresantes poseen un efecto diferencial sobre los diferentes compartimentos del sistema inmune del roedor; ii) el incremento de un compartimento específico del sistema inmune redundante en una reducción de otro, y la magnitud de este *trade-off* depende de la exposición al estrés; y iii) la inversión diferencial en los distintos compartimentos del sistema inmune, influenciada por niveles de estrés, se encuentra asociada al tipo e intensidad de agente parasitario presente. Para la evaluación de estas hipótesis, se propusieron dos ensayos, uno de laboratorio y otro de campo (Capítulo II y Capítulo VI), los que permitieron abordar el tema con diferentes niveles de control y realismo.

En el ensayo de laboratorio, se propuso un modelo de exposición prolongada a restricción alimentaria y conflicto social (Capítulo II). Este modelo de estrés crónico permitió evaluar en ratas el impacto sobre la función inmune de dos desafíos ambientales frecuentes en la naturaleza. El modelo propuesto cumplió con las expectativas y se evidenció la puesta en marcha de una respuesta de estrés, de diferente magnitud, ante ambos desafíos ambientales (Tabla 8, Capítulo II). De todas maneras, se considera que hay aspectos del modelo que deben ser revisados y considerados en ensayos futuros, como ser la especie y el número de animales a evaluar en cada grupo, la evaluación del comportamiento en los grupos de conflicto social, la adición de indicadores complementarios de estrés (ej., medición de globulinas fijadoras de corticosteroides), entre otros. La consideración de estos puntos complementará los resultados ya obtenidos y brindará herramientas que ayuden en su interpretación.

Tabla 8. Tabla resumen del experimento de estrés crónico en ratas de laboratorio. Las flechas o ‘=’ señalan la comparación entre grupos experimentales.

Variables		Grupos experimentales			
		C*	RA	CS	RA + CS
<u>Estrés</u>	CORT ¹		↑	=	↑
	Zona fasciculata ²		↑	=	↑
	Zona glomerulosa ²		↑	↓	=
	Consumo relativo ³		↓	↓	↓↓
	Razón N:L		=	=	=
<u>Crecimiento y Esfuerzo somático</u>	Tasa máxima de crecimiento		↓↓↓	↓	↓↓↓
	Peso corporal final		↓	=	↓
	Sist. reproductivo ⁴		↑	=	↑
	Sist. inmune ⁵		↑	↑	↑
	Sist. digestivo ⁶		↓	=	↓
<u>Inmunidad celular</u>	Dinámicas leucocitarias ⁷		=	=	=
	Linfocitos post-ASB ⁸	↓	↓	↓	↓
	Neutrófilos post-ASB ⁸	↑	↑	↑	↑
	Monocitos post-ASB ⁸	↑	↑	↑	↑
	Eosinófilos post-ASB ⁸	↓	↑	↓	↑
<u>Inmunidad humoral</u>	AcNs ⁹		=	=	↑
	AcNs post-ASB ⁸	=	=	=	=
	IgM anti-ASB ¹⁰		↑	↑	↑
	IgG anti-ASB ¹⁰		↑	↑	↑

Grupos experimentales: C = control; RA = restricción alimentaria; CS = conflicto social; RA + CS = restricción alimentaria y conflicto social.

* En los grupos Control sólo se pueden efectuar comparaciones en los análisis antes y después de los desafíos inmunológicos con albúmina sérica bovina (ASB).

¹ Niveles de corticosterona plasmática.

² Peso relativo de porciones histológicas de la corteza adrenal.

³ Consumo de alimento por kg-rata

⁴ Representado por el peso relativo de testículos y epidídimos.

⁵ Representado por el peso relativo del bazo (equivalente al índice bazosomático) y de pulmones.

⁶ Representado por el peso relativo del hígado.

⁷ Comprende las dinámicas semanales de cada tipo leucocitario: linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos.

⁸ Análisis antes y después del desafío inmunológico con ASB.

⁹ Dinámicas semanales de anticuerpos naturales (AcNs), medidos por ELISA.

¹⁰ Dinámicas semanales de anticuerpos específicos anti-ASB, medidos por ELISA.

Ante la exposición prolongada a dos desafíos diferentes, comunes en ambientes naturales, las ratas pusieron en juego estrategias disímiles para hacerles frente. Los individuos que se enfrentaron al conflicto social, originado de grupos sociales inestables y condiciones de alta densidad, se prepararon para afrontar una eventual exposición a infecciones. La inestabilidad social y los cambios en la densidad poblacional suelen acompañarse de un aumento en el número de contactos entre individuos, con un consecuente incremento de la exposición a parásitos y el contagio de los mismos (por caso, pulgas, [Capítulo VI]). Ante ello, las ratas favorecieron un aparente estado pro-inflamatorio en pulmones (Tabla 8, Capítulo III) y la inversión de recursos en inmunidad humoral adquirida (Tabla 8, Capítulo V).

Por otro lado, los animales enfrentados a una limitada disponibilidad de alimento debieron reducir su desarrollo somático y la masa de órganos metabólicamente costosos (Tabla 8, Capítulo III). Sorpresivamente, porque no era lo esperado, estos individuos priorizaron el desarrollo de tejido reproductivo (Tabla 8, Capítulo III) y estimularon la inmunidad celular y humoral ante la exposición a un antígeno (Tabla 8, Capítulo IV y V). El menor tamaño corporal y la escasez de recursos suponen una importante desventaja competitiva, lo que compromete el éxito reproductivo e incluso la supervivencia de estos

individuos. Ante este escenario desfavorable, se infiere que las ratas pusieron en juego una estrategia del tipo “inversión terminal”, en la cual buscan garantizar el éxito inmediato (reproducción) a expensas de la incertidumbre de una supervivencia y reproducción futura. Sin embargo, en un contexto en que la búsqueda imperiosa de alimento expone al individuo a un mayor peligro, ¿qué sentido tiene arriesgar el “todo por el todo” si una infección conduce al fracaso de la estrategia? Ante esto, el refuerzo de la función inmune sugeriría un intento por proteger esta inversión terminal en reproducción.

Además, se puso en evidencia que, ante escenarios de mayor complejidad, los roedores son capaces de favorecer tanto la inmunidad innata como la adquirida de manera simultánea. Lejos de evidenciarse un *trade-off* entre mecanismos de inmunidad, los individuos expuestos a la combinación de desafíos ambientales priorizaron una mayor producción tanto de anticuerpos naturales como de anticuerpos específicos (Tabla 8, Capítulo V). Esto sugiere que ante estresores que usualmente se asocian con un incremento en el riesgo de infección, se favorecería una priorización adaptativa de las defensas inmunes por sobre otro procesos, como por ejemplo fue observado en el crecimiento de estos mismos animales (Tabla 8, Capítulo III).

El ensayo con roedores de vida libre permitió efectuar una primera aproximación a la compleja interrelación entre hospedador-parásito-ambiente. No se tiene conocimiento de trabajos previos que hayan procurado evaluar las asociaciones entre estado de infección parasitaria, estrés y función inmune en roedores sigmodontinos. Esto es de particular importancia para ayudar a la comprensión de la transmisión de diversas zoonosis, como ser Leptospirosis, Hantavirus y Fiebre Hemorrágica. Los análisis aquí realizados develaron que la densidad de individuos y la disponibilidad de recursos poseerían un impacto relevante sobre la fisiología de estos roedores. Estos desafíos ambientales parecen constituir estímulos estresores para estos roedores, lo que resulta en un mayor nivel de parasitismo por nematodos, al tiempo que se asocian de manera directa con la transmisión de potenciales parásitos vectores (ej., pulgas). Por otro lado, se evidenció que las estrategias de defensa puestas en marcha difieren según el tipo de parásito, pero también de acuerdo a la especie y el sexo. Como consecuencia, esto resulta en una complejidad todavía mayor, que debe procurarse incluir futuro. Para mejorar nuestra comprensión de esta interrelación, en estudios próximos se debe incorporar un indicador de estrés más robusto (ej., GCs fecales), diferenciar e identificar las especies de

parásitos más influyentes dentro de cada tipo, y quizás incluir algún otro indicador de función inmune (ej., inmunoglobulinas totales y/o capacidad bactericida del plasma). Asimismo, es necesario refinar los análisis estadísticos, planteando preguntas concretas y definidas, que puedan ser abordadas con el reducido número con que se cuenta.

La evaluación de ensayos con un grado muy distinto de control y realismo permite presentar una mirada integral del problema. Con el ensayo de laboratorio se pudo verificar que los estresores poseen un impacto diferencial sobre los distintos compartimentos del sistema inmune (Hipótesis I), aunque esto no necesariamente resulta en un *trade-off* entre los mismos (Hipótesis II). Los resultados obtenidos evidenciaron estrategias de potencial relevancia en la transmisión de agentes infecciosos y/o en las dinámicas poblaciones de roedores silvestres. El ensayo de campo sólo permitió validar parcialmente la asociación entre estrés-inmunidad-infección (Hipótesis III), por lo que se requiere de nuevos experimentos y diseños que permitan abordar esta hipótesis en su totalidad. No obstante, se comenzó a desentrañar la complejidad de la relación entre hospedador-parásito-ambiente de especies de roedores de relevancia para la salud pública. En ensayos futuros se procurará evaluar la eficacia de las estrategias puestas en juego ante el estrés por roedores en condiciones controladas, mientras que en lo que concierne a roedores de vida libre se afrontarán en mayor profundidad nuevos interrogantes acerca de su relación con el ambiente y los parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

Abolins SR, Pocock MJO, Hafalla JCR, Riley EM, Viney ME. 2011. Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Mol. Ecol.* 20, 881-892.

Adamo SA. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity?. *Anim. Behav.* 68, 1443-1449.

Aguilera G, Kiss A, Lu A, Camacho C. 1996. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr. Res.* 22, 433-443.

Angelier F, Wingfield JC. 2013. Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: theory, hypotheses and perspectives. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 118-128.

Antinuchi CD, Luna F. 2002. Assessing the effect of litter size on growth pattern and homeothermy acquisition in the Pampas mice *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). *Growth, Dev. Aging* 66, 63-69.

Arnold TW. 2010. Uninformative parameters and model selection using Akaike's information criterion. *J. Wildl. Manage.* 74, 1175-1178.

Ávila B, Bonatto F, Priotto J, Steinmann AR. 2016. Effects of high density on spacing behaviour and reproduction in *Akodon azarae*: A fencing experiment. *Acta Oecologica* 70, 67-73.

Avitsur R, Powell N, Padgett DA, Sheridan JF. 2009. Social interactions, stress, and immunity. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29, 285-293.

Babayan SA, Allen JE, Bradley JE, Geuking MB, Graham AL, Grencis RK, Kaufman J, McCoy KD, Paterson S, Smith KGC, Turnbaugh PJ, Viney ME, Maizels RM, Pedersen AB. 2011. Wild immunology: converging on the real world. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1236, 17-29.

Baldwin DR, Wilcox ZC, Baylois RC. 1995. Impact of differential housing on humoral immunity following exposure to an acute stressor in rats. *Physiol. Behav.* 57, 649-653.

Bany J, Pfeffer A, Phegan M, Heath ACG. 1995. Proliferative responses of lymphocytes in *Bovicola ovis*-infested lambs. *Int. J. Parasitol.* 25, 765-768.

Barquez RM, Mares MM, Ojeda RA. 1991. Mamíferos de Tucumán, Special Pu. ed. Oklahoma Museum of Natural History, Norman, Oklahoma.

- Barron DG, Gervasi SS, Pruitt JN, Martin LB. 2015. Behavioral competence: How host behaviors can interact to influence parasite transmission risk. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 6, 35-40.
- Barrows EM. 2011. Animal behavior desk reference: a dictionary of animal behavior, ecology, and evolution, 3.^a ed. CRC Press, Inc.
- Bartolomucci A. 2007. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 28-49.
- Bartolomucci A, Palanza P, Gaspani L, Limiroli E, Panerai AE, Ceresini G, Poli MD, Parmigiani S. 2001. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiol. Behav.* 73, 401-410.
- Bartolomucci A, Sacerdote P, Panerai AE, Peterzani T, Palanza P, Parmigiani S. 2003. Chronic psychosocial stress-induced down-regulation of immunity depends upon individual factors. *J. Neuroimmunol.* 141, 58-64.
- Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 347-362.
- Beldomenico PM, Begon M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends Ecol. Evol.* 25, 21-27.
- Beldomenico PM, Begon M. 2015. Stress-host-parasite interactions: a vicious triangle?. *Rev. FAVE - Sección Ciencias Vet.* 14, 6-19.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008a. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 1753-1759.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008b. The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective. *J. Anim. Ecol. Ecol.* 77, 984-997.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2009a. The vicious circle and infection intensity: the case of *Trypanosoma microti* in field vole populations. *Epidemics* 1, 162-167.
- Beldomenico PM, Telfer S, Lukomski L, Gebert S, Bennett M, Begon M. 2009b. Host

- condition and individual risk of cowpox virus infection in natural animal populations: cause or effect?. *Epidemiol. Infect.* 137, 1295-1301.
- Berek C. 2016. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 57-64.
- Berner D, Blanckenhorn WU. 2007. An ontogenetic perspective on the relationship between age and size at maturity. *Funct. Ecol.* 21, 505-512.
- Biard C, Monceau K, Motreuil S, 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.
- Bilenca DN, Kravetz PO, Zuleta GA. 1992. Food habits of *Akodon azarae* and *Calomys laucha* (Cricetidae, Rodentia) in agroecosystems of central Argentina. *Mammalia* 56, 371-383.
- Blanchard R, McKittrick C, Blanchard D. 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* 73, 261-271.
- Blanchet S, Thomas F, Loot G. 2009. Reciprocal effects between host phenotype and pathogens: new insights from an old problem. *Trends Parasitol.* 25, 364-369.
- Blanckenhorn WU. 2000. The evolution of body size: what keeps organisms small?. *Q. Rev. Biol.* 75, 385-407.
- Blok BA, Arts RJW, van Crevel R, Benn CS, Netea MG. 2015. Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *J. Leukoc. Biol.* 98, 347-356.
- Boes M. 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37, 1141-1149.
- Bolnick DI, Amarasekare P, Araújo MS, Bürger R, Levine JM, Novak M, Rudolf VHW, Schreiber SJ, Urban MC, Vasseur D a. 2011. Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 26, 183-192.
- Bonatto F, Coda J, Gomez D, Priotto J, Steinmann A. 2013. Inter-male aggression with regard to polygynous mating system in Pampean grassland mouse, *Akodon azarae* (Cricetidae: Sigmodontinae). *J. Ethol.* 31, 223-231.
- Boonstra R. 2013a. Reality as the leading cause of stress: Rethinking the impact of

- chronic stress in nature. *Funct. Ecol.* 27, 11-23.
- Boonstra R. 2013b. The ecology of stress: a marriage of disciplines. *Funct. Ecol.* 27, 7-10.
- Boonstra R, Dantzer B, Delehanty B, Fletcher QE, Sheriff MJ. 2014. Equipped for life in the boreal forest: the role of the stress axis in mammals. *Arctic* 67, 82-97.
- Boonstra R, McColl CJ, Karels TJ. 2001. Reproduction at all costs: the adaptive stress response of male arctic ground squirrels. *Ecology* 82, 1930-1946.
- Bordes F, Ponlet N, de Bellocq JG, Ribas A, Krasnov BR, Morand S. 2012. Is there sex-biased resistance and tolerance in Mediterranean wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations facing multiple helminth infections?. *Oecologia* 170, 123-135.
- Boughton RK, Joop G, Armitage SAO. 2011. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Funct. Ecol.* 25, 81-100.
- Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ. 2008. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain. Behav. Immun.* 22, 105-113.
- Bozinovic F, Muñoz JLP, Naya DE, Cruz-Neto AP. 2007. Adjusting energy expenditures to energy supply: food availability regulates torpor use and organ size in the Chilean mouse-opossum *Thylamys elegans*. *J. Comp. Physiol. B.* 177, 393-400.
- Bradley JE. 2015. Wild Immunology. *Parasite Immunol.* 37, 217-219.
- Breuner CW, Delehanty B, Boonstra R. 2013. Evaluating stress in natural populations of vertebrates: total CORT is not good enough. *Funct. Ecol.* 27, 24-36.
- Breuner CW, Orchinik M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J. Endocrinol.* 175, 99-112.
- Brooks KC, Mateo JM. 2013. Chronically raised glucocorticoids reduce innate immune function in Belding's ground squirrels (*Urocitellus beldingi*) after an immune challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 149-157.
- Brown KJ, Grunberg NE. 1995. Effect of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. *Physiol. Behav.* 58, 1085-1089.
- Brown MJF, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. 2003. Strong context-dependent virulence in a host – parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *J. Anim. Ecol.* 72, 994-1002.

- Budischak SA, Jolles AE, Ezenwa VO. 2012. Direct and indirect costs of co-infection in the wild: linking gastrointestinal parasite communities, host hematology, and immune function. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 1, 2-12.
- Burnham KP, Anderson DR. 2002. Information and likelihood theory: a basis for model selection and inference, *en: Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer-Verlag, New York, pp. 49-97.
- Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP. 2011. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65, 23-35.
- Burthe SJ, Lambin X, Telfer S, Douglas A, Beldomenico PM, Smith A, Begon M. 2010. Individual growth rates in natural field vole, *Microtus agrestis*, populations exhibiting cyclic population dynamics. *Oecologia* 162, 653-661.
- Burton T, Killen SS, Armstrong JD, Metcalfe NB. 2011. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences?. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 3465-3473.
- Cabrera AL. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas, *en: Kugler, W.F. (Ed.), Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. ACME, Buenos Aires, pp. 1-85.
- Caillaud D, Craft ME, Meyers LA. 2013. Epidemiological effects of group size variation in social species. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130206.
- Calisi RM, Bentley GE. 2009. Lab and field experiments: Are they the same animal?. *Horm. Behav.* 56, 1-10.
- Campion SN, Carvalho FR, Chapin RE, Nowland WS, Beauchamp D, Jamon R, Koitz R, Winton TR, Cappon GD, Hurtt ME. 2013. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 38, 16-24.
- Castellarini F, Dellafiore C, Polop JJ. 2003. Feeding habits of small mammals in agroecosystems of central Argentina. *Mamm. Biol.* 68, 91-101.
- Chaby LE, Sheriff MJ, Cavigelli SA, Hirrlinger AM, Lim J, Braithwaite VA. 2016. Stress during adolescence shapes performance in adulthood: context-dependent effects on foraging and vigilance. *Ethology* 122, 1-14.

- Chaby LE, Sheriff MJ, Hirrlinger AM, Braithwaite VA. 2015. Does early stress prepare individuals for a stressful future? Stress during adolescence improves foraging under threat. *Anim. Behav.* 105, 37-45.
- Chester EM, Bonu T, Demas GE. 2010. Social defeat differentially affects immune responses in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Physiol. Behav.* 101, 53-58.
- Chu VT, Berek C. 2012. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* 42, 130-137.
- Chu VT, Berek C. 2013. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol. Rev.* 251, 177-188.
- Clinchy M, Sheriff MJ, Zanette LY. 2013. Predator-induced stress and the ecology of fear. *Funct. Ecol.* 27, 56-65.
- Colombo VC, Guglielmone AA, Monje LD, Nava S, Beldomenico PM. 2014. Seasonality of immature stages of *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) in the Paraná Delta, Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 701-705.
- Colombo VC, Nava S, Antoniazzi LR, Monje LD, Racca AL, Guglielmone AA, Beldomenico PM. 2015. Factors affecting patterns of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) parasitism in a rodent host. *Vet. Parasitol.* 211, 251-258.
- Corbin E, Vicente J, Martin-Hernando MP, Acevedo P, Pérez-Rodríguez L, Gortazar C. 2008. Spleen mass as a measure of immune strength in mammals. *Mamm. Rev.* 38, 108-115.
- Cox FEG. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122, S23-38.
- Creel S, Dantzer B, Goymann W, Rubenstein DR. 2013. The ecology of stress: effects of the social environment. *Funct. Ecol.* 27, 66-80.
- Curry JM, Hanke ML, Piper MG, Bailey MT, Bringardner BD, Sheridan JF, Marsh CB. 2010. Social disruption induces lung inflammation. *Brain. Behav. Immun.* 24, 394-402.
- Cutrera AP, Zenuto RR, Luna F, Antenucci CD. 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.

- Dantzer B, Fletcher QE, Boonstra R, Sheriff MJ. 2014. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species?. *Conserv. Physiol.* 2, 1-18.
- Dantzer B, Newman AEM, Boonstra R, Palme R, Boutin S, Humphries MM, McAdam AG. 2013. Density triggers maternal hormones that increase adaptive offspring growth in a wild mammal. *Science* (80-.). 340, 1215-1218.
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Davis DP, Williams RE. 1986. Influence of hog lice, *Haematopinus suis*, on blood components, behavior, weight gain and feed efficiency of pigs. *Vet. Parasitol.* 22, 307-314.
- De Conto V, Cerqueira R. 2007. Reproduction, development and growth of *Akodon lindberghi* (Hershkovitz, 1990) (Rodentia, Muridae, Sigmodontinae) raised in captivity. *Brazilian J. Biol.* 67, 707-713.
- Dearman R, Caddick H, Basketter DA, Kimber I. 2000. Divergent antibody isotype responses induced in mice by systemic exposure to proteins: a comparison of ovalbumin with bovine serum albumin. *Food Chem. Toxicol.* 38, 351-360.
- Dearman RJ, Stone S, Caddick HT, Basketter DA, Kimber I. 2003. Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose - response analyses. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1586-1594.
- DeCS. 2016. Descriptores en Ciencias de la Salud [WWW Document]. *BIREME (Biblioteca Virtual en Salud)*.
- Demas GE. 2004. The energetics of immunity: A neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Horm. Behav.* 45, 173-180.
- Demas GE, Adamo SA, French SS. 2011a. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Funct. Ecol.* 25, 29-39.
- Demas GE, Chefer V, Talan MI, Nelson RJ. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 42, R1631-R1637.
- Demas GE, Johnson C, Polacek KM. 2004. Social interactions differentially affect reproductive and immune responses of Siberian hamsters. *Physiol. Behav.* 83, 73-79.

- Demas GE, Zysling DA, Beechler BR, Muehlenbein MP, French SS. 2011b. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J. Anim. Ecol.* 80, 710-730.
- Derting TL, 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 TL, Virk MK. 2005. Positive effects of testosterone and immunochallenge on energy allocation to reproductive organs. *J. Comp. Physiol. B.* 175, 543-556.
- Desantis LM, Delehanty B, Weir JT, Boonstra R. 2013. Mediating free glucocorticoid levels in the blood of vertebrates: are corticosteroid-binding proteins always necessary?. *Funct. Ecol.* 27, 107-119.
- Dhabhar FS. 2000. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 876-893.
- Dhabhar FS. 2008. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection versus immunopathology. *Allergy, Asthma, Clin. Immunol.* 4, 2-11.
- Dhabhar FS. 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* 58, 193-210.
- Dhabhar FS, McEwen BS. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain. Behav. Immun.* 11, 286-306.
- Dhabhar FS, McEwen BS. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1059-1064.
- Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. 1995. Effects of stress on immune cell distribution - Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511-5527.
- Dickens MJ, Romero LM. 2013. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 177-189.
- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Van De Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15-23.

- Downs CJ, Brown JL, Wone BWM, Donovan ER, Hayes JP. 2016. Speeding up growth: selection for mass-independent maximal metabolic rate alters growth rates. *Am. Nat.* 187, 295-307.
- Downs CJ, Stewart KM, Dick BL. 2015. Investment in constitutive immune function by North American Elk experimentally maintained at two different population densities. *PLoS One* 10, e0125586.
- Easterbrook JD, Kaplan JB, Glass GE, Watson J, Klein SL. 2008. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild-caught Norway rats: a potential threat to laboratory rodent colonies. *Lab. Anim.* 42, 92-98.
- Eberhardt AT, Costa SA, Marini MR, Racca A, Baldi C, Robles MR, Moreno PG, Beldomenico PM. 2013. Parasitism and physiological trade-offs in stressed capybaras. *PLoS One* 8, e70382.
- Eberhardt AT, Ruiz MF, Beldomenico PM, Racca A. 2015. Dynamics of health of wild capybaras: biochemical and physiologic parameters. *Mammalia* 80, 413-423.
- Edwards EA, Rahe RH, Stephens PM, Henry JP. 1980. Antibody response to bovine serum albumin in mice: the effects of psychosocial environmental change. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164, 478-481.
- Engler H, Bailey MT, Engler A, Sheridan JF. 2004. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *J. Neuroimmunol.* 148, 106-115.
- English S, Bateman AW, Clutton-Brock TH. 2012. Lifetime growth in wild meerkats: Incorporating life history and environmental factors into a standard growth model. *Oecologia* 169, 143-153.
- Ferrari N, Cattadori IM, Nespereira J, Rizzoli A, Hudson PJ. 2003. The role of host sex in parasite dynamics: field experiments on the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Ecol. Lett.* 7, 88-94.
- Fleshner M, Laudenslager ML, Simons L, Maier SF. 1989. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *Physiol. Behav.* 45, 1183-1187.
- Flies AS, Mansfield LS, Grant CK, Weldele ML, Holekamp KE. 2015. Markedly elevated antibody responses in wild versus captive spotted hyenas show that environmental and ecological factors are important modulators of immunity. *PLoS One* 10, 1-18.

- Forbes KM, Henttonen H, Hirvela V, Kipar A, Mappes T, Stuart P, Huitu O. 2015. Food provisioning alters infection dynamics in populations of a wild rodent. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282, 20151939.
- Franch A, Castellote C, Pelegrí C, Tolosa E, Castell M. 1993. Blood B, T, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in female Wistar rats. *Ann. Hematol.* 67, 115-118.
- French SS, Denardo DF, Moore MC. 2007a. Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction?. *Am. Nat.* 170, 79-89.
- French SS, Johnston GIH, Moore MC. 2007b. Immune activity suppresses reproduction in food-limited female tree lizards *Urosaurus ornatus*. *Funct. Ecol.* 21, 1115-1122.
- Gervasi SS, Civitello DJ, Kilvitis HJ, Martin LB. 2015. The context of host competence: a role for plasticity in host-parasite dynamics. *Trends Parasitol.* 31, 419-425.
- Gilot-Fromont E, Jégo M, Bonenfant C, Gibert P, Rannou B, Klein F, Gaillard JM. 2012. Immune phenotype and body condition in Roe Deer: individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PLoS One* 7, e45576.
- Glatz M, Means T, Haas J, Steere AC, Müllegger RR. 2016. Characterization of the early local immune response to *Ixodes ricinus* tick bites in human skin. *Exp. Dermatol.*
- Gómez Villafañe IE, Miño M, Cavia R, Hodara K, Courtalón P, Suárez O, Busch M. 2005. Roedores. Guía de la provincia de Buenos Aires. L.O.L.A., Buenos Aires.
- Graham AL, Shuker DM, Pollitt LC, Auld SKJR, Wilson AJ, Little TJ. 2011. Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct. Ecol.* 25, 5-17.
- Graham RI, Deacutis JM, Simpson SJ, Wilson K. 2015. Body condition constrains immune function in field populations of female Australian plague locust *Chortoicetes terminifera*. *Parasite Immunol.* 37, 233-241.
- Griffiths AD, Brook BW. 2005. Body size and growth in tropical small mammals: examining variation using non-linear mixed effects models. *J. Zool.* 267, 211-220.
- Grissom N, Bhatnagar S. 2009. Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 215-224.
- Grueber CE, Nakagawa S, Laws RJ, Jamieson IG. 2011. Multimodel inference in ecology

and evolution: challenges and solutions. *J. Evol. Biol.* 24, 699-711.

Grzybek M, Bajer A, Behnke-Borowczyk J, Al-Sarraf M, Behnke JM. 2014. Female host sex-biased parasitism with the rodent stomach nematode *Mastophorus muris* in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *Parasitol. Res.* 114, 523-533.

Guerreiro Martins NB, Robles M del R, Navone GT. 2014. Distribución geográfica de cestodes Hymenolepididae de *Oxymycterus rufus* (Rodentia - Cricetidae) en Argentina. *Rev. Argentina Parasitol.* 2, 14-22.

Habig B, Archie EA. 2015. Social status, immune response and parasitism in males: a meta-analysis. *Philos. Trans. R. Soc. B* 370, 20140109.

Han BA, Kramer AM, Drake JM. 2016. Global patterns of zoonotic disease in mammals. *Trends Parasitol.* 32, 565-577.

Hangalapura BN, Nieuwland MGB, Reilingh GDV, Buyse J, Brand H Van Den, Kemp B, Parmentier HK. 2005. Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult. Sci.* 84, 1520-1529.

Hanssen SA, Hasselquist D, Folstad I, Erikstad KE. 2004. Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, 925-930.

Himsworth CG, Parsons KL, Jardine C, Patrick DM. 2013. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 349-359.

Horrocks NPC, Hegemann A, Ostrowski S, Ndithia H, Shobrak M, Williams JB, Matson KD, Tieleman BI. 2015. Environmental proxies of antigen exposure explain variation in immune investment better than indices of pace of life. *Oecologia* 177, 281-290.

Houston AI, McNamara JM, Barta Z, Klasing KC. 2007. The effect of energy reserves and food availability on optimal immune defence. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 2835-2842.

Hubert M-F, Laroque P, Gillet J-P, Keenan KP. 2000. The effects of diet, *ad libitum* feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 207, 195-207.

- Huitu O, Jokinen I, Korpimäki E, Koskela E, Mappes T. 2007. Phase dependence in winter physiological condition of cyclic voles. *Oikos* 116, 565-577.
- ILAR. 2010. Guide for the care and use of laboratory animals, 7.^a ed. National Academy Press, Washington, D.C.
- IPPC. 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 16, 343-353.
- Jackson JA, Hall AJ, Friberg IM, Ralli C, Lowe A, Zawadzka M, Turner AK, Stewart A, Birtles RJ, Paterson S, Bradley JE, Begon M. 2014. An immunological marker of tolerance to infection in wild rodents. *PLoS Biol.* 12, e1001901.
- Jackson TP, Van Aarde RJ. 2003. Sex- and species-specific growth patterns in cryptic African rodents, *Mastomys natalensis* and *M. coucha*. *J. Mammal.* 84, 851-860.
- Jahn GA, Moya G, Jammes H, Rosato RR. 1995. Effect of chronic thyroid hormone treatment on cycling, ovulation, serum reproductive hormones and ovarian LH and prolactin receptors in rats. *Endocrine* 3, 121-127.
- Jasnow AM, Drazen DL, Huhman KL, Nelson RJ, Demas GE. 2001. Acute and chronic social defeat suppresses humoral immunity of male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Horm. Behav.* 433, 428-433.
- Johnson JB, Omland KS. 2004. Model selection in ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 19, 101-108.
- Johnson PTJ, de Roode JC, Fenton A. 2015. Why infectious disease research needs community ecology. *Science* (80-.). 349, 1259504.
- Johnstone CP, Lill A, Reina RD. 2015. Use of erythrocyte indicators of health and condition in vertebrate ecophysiology: A review and appraisal. *Biol. Rev.*
- Johnstone CP, Reina RD, Lill A. 2012. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 861-879.
- Jolles AE, Ezenwa VO, Etienne RS, Turner WC, Olf H. 2008. Interaction between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African

buffalo. *Ecology* 89, 2239-2250.

Kahm M, Hasenbrink G, Lichtenberg-Fraté H, Ludwig J, Kschischo M. 2010. grofit: fitting biological growth curves with R. *J. Stat. Softw.* 33, 1-21.

Karp JD, Moynihan JA, Ader R. 1993. Effects of differential housing on the primary and secondary antibody responses of male C57BL/6 and BALB/c mice. *Brain. Behav. Immun.* 7, 326-333.

Kitaysky AS, Piatt JF, Hatch SA, Kitaiskaia E V., Benowitz-Fredericks ZM, Shultz MT, Wingfield JC. 2010. Food availability and population processes: severity of nutritional stress during reproduction predicts survival of long-lived seabirds. *Funct. Ecol.* 24, 625-637.

Klein F, Lemaire V, Sandi C, Vitiello S, Van der Logt J, Laurent PE, Neveu P, Le Moal M, Mormède P. 1992. Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. *Life Sci.* 50, 723-731.

Klein SL. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* 26, 247-264.

Klemme I, Soulsbury CD, Henttonen H. 2014. Contrasting effects of large density changes on relative testes size in fluctuating populations of sympatric vole species. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20141291.

Kolaczowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159-175.

Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291-1301.

Kowalski K, Bogdziewicz M, Eichert U, Rychlik L. 2015. Sex differences in flea infections among rodent hosts: is there a male bias?. *Parasitol. Res.* 114, 337-341.

Krasnov B, Khokhlova I, Shenbrot G. 2002. The effect of host density on ectoparasite distribution: An example of a rodent parasitized by fleas. *Ecology* 83, 164-175.

Kriengwatana B, Wada H, Macmillan A, MacDougall-Shackleton SA. 2013. Juvenile nutritional stress affects growth rate, adult organ mass, and innate immune function in

- Zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Physiol. Biochem. Zool.* 86, 769-781.
- Kristan DM. 2007. Chronic calorie restriction increases susceptibility of laboratory mice (*Mus musculus*) to a primary intestinal parasite infection. *Aging Cell* 6, 817-825.
- Kristan DM. 2008. Calorie restriction and susceptibility to intact pathogens. *Age (Omaha)*. 30, 147-156.
- Książek A, Czerniecki J, Konarzewski M. 2009. Phenotypic flexibility of traits related to energy acquisition in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *J. Exp. Biol.* 212, 808-814.
- Książek A, Konarzewski M. 2012. Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiol. Biochem. Zool.* 85, 51-61.
- Labocha MK, Schutz H, Hayes JP. 2014. Which body condition index is best?. *Oikos* 123, 111-119.
- Lareschi M. 2004. Ectoparásitos asociados a machos y hembras de *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Muridae): estudio comparativo en la Selva Marginal del río de La Plata, Argentina. *Rev. la Soc. Entomológica Argentina* 63, 39-44.
- Lareschi M. 2006. The relationship of sex and ectoparasite infestation in the water rat *Scapteromys aquaticus* (Rodentia: Cricetidae) in La Plata, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 54, 673-679.
- Lareschi M, Krasnov BR. 2010. Determinants of ectoparasite assemblage structure on rodent hosts from South American marshlands: the effect of host species, locality and season. *Med. Vet. Entomol.* 24, 284-292.
- Lareschi M, Notarnicola J, Nava S, Navone G. 2007. Parasite community (arthropods and filarioids) associated with wild rodents from the marshes of La Plata River, Argentina. *Comp. Parasitol.* 74, 141-147.
- Lareschi M, Notarnicola J, Navone G, Linardi PM. 2003. Arthropod and filarioid parasites associated with wild rodents in the northeast marshes of Buenos Aires, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 673-677.
- Lee DE, Bettaso JB, Bond ML, Bradley RW, Tietz JR, Warzybok PM. 2012. Growth, age at maturity, and age-specific survival of the arboreal salamander (*Aneides lugubris*) on

- Southeast Farallon Island, California. *J. Herpetol.* 46, 64-71.
- Lee KA. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1000-1015.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?. *Oikos* 88, 87-98.
- Loffler SG, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, Romero G, Brihuega B. 2014. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 163-167.
- Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, Mills JN, Timonin ME, Willis CKR, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JLN, Webb CT. 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20122753.
- MacColl ADC. 2011. The ecological causes of evolution. *Trends Ecol. Evol.* 26, 514-522.
- Maniam J, Morris MJ. 2012. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63, 97-110.
- Manzoli DE, Antoniazzi LR, Saravia MJ, Silvestri L, Rorhmann D, Beldomenico PM. 2013. Multi-level determinants of parasitic fly infection in forest passerines. *PLoS One* 8, e67104.
- Martí O, Martí J, Armario A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol. Behav.* 55, 747-753.
- Martin LB. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 70-76.
- Martin LB, Hopkins WA, Mydlarz LD, Rohr JR. 2010. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1195, 129-148.
- Martin LB, Navara KJ, Bailey MT, Hutch CR, Powell ND, Sheridan JF, Nelson RJ. 2008. Food restriction compromises immune memory in Deer mice (*Peromyscus maniculatus*) by reducing spleen-derived antibody-producing B cell numbers. *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 366-372.

- Martin LB, Navara KJ, Weil ZM, Nelson RJ. 2007a. Immunological memory is compromised by food restriction in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, 316-320.
- Martin LB, Scheuerlein A, Wikelski M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs?. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 153-158.
- Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. 2007b. Immune defense and reproductive pace of life in *Peromyscus* mice. *Ecology* 88, 2516-2528.
- Martinez VP, Bellomo CM, Cacace ML, Suárez P, Bogni L, Padula PJ. 2010. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina, 1995-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1853-1860.
- Masopust D, Schenkel JM. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 309-320.
- Matson KD, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 275-286.
- May RM, Anderson RM. 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280, 455-461.
- McCue MD. 2010. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 156, 1-18.
- McDade TW, Georgiev A V, Kuzawa CW. 2016. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. *Evol. Med. Public Heal.* 2016, 1-16.
- McEwen BS. 2007. Homeostasis, *en: Fink, G. (Ed.), Encyclopedia of Stress*. Elsevier, pp. 347-348.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2-15.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2010. What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* 57, 1-16.
- McKay DM. 2009. The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 137, 385-394.
- Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for

- public health. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 221-270.
- Merkling T, Leclaire S, Danchin E, Lhuillier E, Wagner RH, White J, Hatch SA, Blanchard P. 2012. Food availability and offspring sex in a monogamous seabird: Insights from an experimental approach. *Behav. Ecol.* 23, 751-758.
- Meserve PL, Milstead WB, Gutiérrez J. 2001. Results of a food addition experiment in a north-central Chile small mammal assemblage: evidence for the role of «bottom-up» factors. *Oikos* 94, 548-556.
- Mócsai A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210, 1283-1299.
- Morrone JJ. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region, *Zootaxa*. Magnolia Press.
- Müller C, Jenni-Eiermann S, 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.
- Mumby HS, Chapman SN, Crawley JAH, Mar KU, Htut W, Thura Soe A, Aung HH, Lummaa V. 2015. Distinguishing between determinate and indeterminate growth in a long-lived mammal. *BMC Evol. Biol.* 15, 214.
- Muñoz A, Bonal R. 2008. Are you strong enough to carry that seed? Seed size/body size ratios influence seed choices by rodents. *Anim. Behav.* 76, 709-715.
- Muraille E. 2016. The unspecific side of acquired immunity against infectious disease: causes and consequences. *Front. Microbiol.* 6, 1-11.
- Murphy KP. 2012. Janeway's Immunobiology, 8.^a ed. Garland Science, New York, United States.
- Navone GT, Notarnicola J, Nava S, Robles MDR, Galliari C, Lareschi M. 2009. Arthropods and helminths assemblage in sigmodontine rodents from wetlands of the Río de la Plata, Argentina. *Mastozoología Neotrop.* 16, 121-134.
- Naya DE, Karasov WH, Bozinovic F. 2007. Phenotypic plasticity in laboratory mice and rats: a meta-analysis of current ideas on gut size flexibility. *Evol. Ecol. Res.* 9, 1363-1374.
- Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JWM. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355-361.

- Neuman-Lee LA, Fokidis HB, Spence AR, Van der Walt M, Smith GD, Durham S, French SS. 2015. Food restriction and chronic stress alter energy use and affect immunity in an infrequent feeder. *Funct. Ecol.* 29, 1453-1462.
- Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. 2015. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 22, 6-19.
- Nunn CL, Jordan F, McCabe CM, Verdolin JL, Fewell JH. 2015. Infectious disease and group size: more than just a numbers game. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140111.
- Nussey DH, Watt KA, Clark A, Pilkington JG, Pemberton JM, Graham AL, Mcneilly TN. 2014. Multivariate immune defences and fitness in the wild: complex but ecologically important associations among plasma antibodies, health and survival. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132931.
- Ochsenbein AF, Zinkernagel RM. 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol. Today* 21, 624-630.
- Okie JG, Boyer AG, Brown JH, Costa DP, Ernest SKM, Evans AR, Fortelius M, Gittleman JL, Hamilton MJ, Harding LE, Lintulaakso K, Lyons SK, Saarinen JJ, Smith FA, Stephens PR, Theodor J, Uhen MD, Sibly RM. 2013. Effects of allometry, productivity and lifestyle on rates and limits of body size evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20131007.
- Oli MK. 1999. The Chitty effect: a consequence of dynamic energy allocation in a fluctuating environment. *Theor. Popul. Biol.* 56, 293-300.
- Orozco MM, Piccinali R V., Mora MS, Enriquez GF, Cardinal MV, Gürtler RE. 2014. The role of sigmodontine rodents as sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* in the Argentinean Chaco. *Infect. Genet. Evol.* 22, 12-22.
- Owen JP, Nelson AC, Clayton DH. 2010. Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends Parasitol.* 26, 530-539.
- Owen JP, Waite JL, Holden KZ, Clayton DH. 2014. Does antibody binding to diverse antigens predict future infection?. *Parasite Immunol.* 36, 573-584.
- Owens IPF, Wilson K. 1999. Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring?. *Trends Ecol. Evol.* 14, 170-172.

- Palacios MG, Cunnick JE, Winkler DW, Vleck CM. 2012. Interrelations among immune defense indexes reflect major components of the immune system in a free-living vertebrate. *Physiol. Biochem. Zool.* 85, 1-10.
- Palma RE, Polop JJ, Owen RD, Mills JN. 2012. Ecology of rodent-associated hantaviruses in the southern cone of South America: Argentina, Chile, Paraguay and Uruguay. *J. Wildl. Dis.* 48, 267-281.
- Panda S, Ding JL. 2015. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 194, 13-20.
- Paull SH, Song S, McClure KM, Sackett LC, Kilpatrick AM, Johnson PTJ. 2012. From superspreaders to disease hotspots: linking transmission across hosts and space. *Front. Ecol. Environ.* 10, 75-82.
- Pedersen AB, Babayan SA. 2011. Wild immunology. *Mol. Ecol.* 20, 872-880.
- Pekow C. 2005. Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 44, 41-45.
- Polop J, Calderón G, Feuillade MR, García J, Enria D, Sabattini M. 2007. Spatial variation in abundance of the Junin virus hosts in endemic and nonendemic Argentine haemorrhagic fever zones. *Austral Ecol.* 32, 245-253.
- Porter FH, Costa F, Rodrigues G, Farias H, Cunha M, Glass GE, Reis MG, Ko AI, Childs JE. 2015. Morphometric and demographic differences between tropical and temperate Norway rats (*Rattus norvegicus*). *J. Mammal.* 96, 317-323.
- Poulin R. 1996. Sexual inequalities of helminth infections: a cost of being a male?. *Am. Nat.* 147, 287-295.
- Pravosudov V V, Smulders T V. 2010. Integrating ecology, psychology and neurobiology within a food-hoarding paradigm. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 859-867.
- Preisser EL, Orrock JL. 2012. The allometry of fear: interspecific relationships between body size and response to predation risk. *Ecosphere* 3, art77.
- Previtali MA, Ostfeld RS, Keesing F, Jolles AE, Hanselmann R, Martin LB. 2012. Relationship between pace of life and immune responses in wild rodents. *Oikos* 121, 1483-1492.
- Priotto JW, Steinmann AR. 1999. Factors affecting home range size and overlap in

- Akodon azarae* (Muridae: Sigmodontinae) in natural pasture of Argentina. *Acta Theriol. (Warsz)*. 44, 37-44.
- Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Shah M, Caligiuri M, Padgett DA, Marucha PT, Sheridan JF. 2001. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *J. Neuroimmunol.* 115, 36-45.
- Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, Jacobs L, Jansen T, Kullberg B-J, Wijmenga C, Joosten LAB, Xavier RJ, Van Der Meer JWM, Stunnenberg HG, Netea MG. 2013. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 12, 223-232.
- Råberg L. 2014. How to live with the enemy: understanding tolerance to parasites. *PLoS Biol.* 12, e1001989.
- Racca AL, Eberhardt AT, Moreno PG, Baldi C, Beldomenico PM. 2014. Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Vet. J.* 199, 308-309.
- Raffel TR, Martin LB, Rohr JR. 2008. Parasites as predators: unifying natural enemy ecology. *Trends Ecol. Evol.* 23, 610-618.
- Refsnider JM, Palacios MG, Reding DM, Bronikowski AM. 2015. Effects of a novel climate on stress response and immune function in painted turtles (*Chrysemys picta*). *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 323, 160-168.
- Rivera A, Siracusa MC, Yap GS, Gause WC. 2016. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nat. Immunol.* 17, 356-363.
- Rivera-Aguilar V, Querejeta E, Jarillo-Luna RA, Reyna-Garfias H, Ponce-Franco D, Milliar-García A, Quiñones-Cárdenas AR, Pacheco-Yepez J, Campos-Rodríguez R. 2008. Role of the striatum in the humoral immune response to thymus-independent and thymus-dependent antigens in rats. *Immunol. Lett.* 120, 20-28.
- Rocha JS, Bordoni LS, França LR. 2012. Effects of mild calorie restriction on reproductive parameters of pubertal and sexually mature male Wistar rats. *Anim. Reprod.* 9, 93-102.
- Romano MC, Rodas AZ, Valdez RA, Hernández SE, Galindo F, Canales D, Brousset DM. 2010. Stress in wildlife species: noninvasive monitoring of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 17, 209-212.

- Romero LM. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249-255.
- Romero LM, Dickens MJ, Cyr NE. 2009. The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm. Behav.* 55, 375-389.
- Romero LM, Platts SH, Schoech SJ, Wada H, Crespi E, Martin LB, Buck CL. 2015. Understanding stress in the healthy animal - potential paths for progress. *Stress* 18, 491-497.
- Rynkiewicz EC, Hawlena H, Durden LA, Hastriter MW, Demas GE, Clay K. 2013. Associations between innate immune function and ectoparasites in wild rodent hosts. *Parasitol. Res.* 112, 1763-1770.
- Sagonas K, Rota IA, Tsitsilonis OE, Pafilis P, Valakos ED. 2016. Infection risk dictates immunological divergence among populations in a Mediterranean lizard. *J. Evol. Biol.*
- Salvante KG. 2006. Techniques for studying integrated immune function in birds. *Auk* 123, 575-586.
- Sandmeier FC, Tracy CR, Dupré S, Hunter K. 2012. A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease. *Biol. Open* 0, 1-5.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7, 284-301.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating premissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.
- Schmidt KL, Macdougall-Shackleton EA, Macdougall-Shackleton SA. 2012. Developmental stress has sex-specific effects on nestling growth and adult metabolic rates but no effect on adult body size or body composition in song sparrows. *J. Exp. Biol.* 215, 3207-3217.
- Schoech SJ, Romero LM, Moore IT, Bonier F. 2013. Constraints, concerns and considerations about the necessity of estimating free glucocorticoid concentrations for field endocrine studies. *Funct. Ecol.* 27, 1100-1106.
- Schulte-Hostedde AI, Bowman J, Nituch LA. 2012. Dynamic spleen mass in wild and

- domestic American mink. *Biol. J. Linn. Soc.* 107, 624-631.
- Schultner J, Kitaysky AS, Welcker J, Hatch S. 2013. Fat or lean: adjustment of endogenous energy stores to predictable and unpredictable changes in allostatic load. *Funct. Ecol.* 27, 45-55.
- Sequeira G, Vanasco G, Enria D, Calderon G, Canal A. 2003. Distribución de pequeños mamíferos en la ciudad de Santa Fe, Argentina. *Rev. FAVE-Ciencias Vet.* 2, 7-17.
- Sequeira GJ, Zbrun M V., Soto LP, Astesana DM, Blajman JE, Rosmini MR, Frizzo LS, Signorini ML. 2016. Quantitative risk assessment of human trichinellosis caused by consumption of pork meat sausages in Argentina. *Zoonoses Public Health* 63, 167-176.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166, 869-887.
- Sheriff MJ, Krebs CJ, Boonstra R. 2010. Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story?. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 614-619.
- Singh SK, Ruzed D. 2016. Viral Hemorrhagic Fevers, 1.^a ed. CRC Press, Inc.
- Sorci G. 2013. Immunity, resistance and tolerance in bird-parasite interactions. *Parasite Immunol.* 35, 350-361.
- Spencer RL, Miller AH, Moday H, McEwen BS, Blanchard RJ, Sakai RR. 1996. Chronic social stress produces reduction in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology* 21, 95-109.
- Sponchiado J, Melo GL, Landulfo GA, Jacinavicius FC, Barros-Battesti DM, Nilton C. Cáceres. 2015. Interaction of ectoparasites (Mesostigmata, Phthiraptera and Siphonaptera) with small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 66, 369-381.
- Springer A, Fichtel C, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH, Kappeler PM. 2015. Hemoparasites in a wild primate: Infection patterns suggest interaction of *Plasmodium* and *Babesia* in a lemur species. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 385-395.
- Stefanski V. 2000. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology* 25, 389-406.
- Stefanski V. 2001. Effects of psychosocial stress or food restriction on body mass and

- blood cellular immunity in laboratory rats. *Stress Heal.* 17, 133-140.
- Stefanski V, Engler H. 1999. Social stress , dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroendocrinol.* 94, 144-152.
- Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, Müller MB, Schmidt M V. 2008. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. *Horm. Behav.* 53, 386-394.
- Svagej WS, Magdalena Trivellini M, Quintana F. 2012. Parental investment theory and nest defence by Imperial Shags: effects of offspring number, offspring age, laying date and parent sex. *Ethology* 118, 251-259.
- Sykes A. 1987. Endoparasites and herbivore nutrition, *en: Hacker, J., Ternouth, J. (Eds.), Nutrition of Herbivores.* Academic Press, Australia, pp. 211-232.
- Thompson RCA. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int. J. Parasitol.* 43, 1079-1088.
- Tompkins DM, Dunn AM, Smith MJ, Telfer S. 2011. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *J. Anim. Ecol.* 80, 19-38.
- Turner AK, Beldomenico PM, Bown K, Burthe SJ, Jackson JA, Lambin X, Begon M. 2014. Host-parasite biology in the real world: the field voles of Kielder. *Parasitology* 141, 997-1017.
- Ujvari B, Madsen T. 2011. Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons?. *Funct. Ecol.* 25, 813-817.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 291, 965-973.
- Vadell M V., Bellomo C, San Martín A, Padula P, Gómez Villafaña I. 2011. Hantavirus ecology in rodent populations in three protected areas of Argentina. *Trop. Med. Int. Heal.* 16, 1342-1352.
- Vadell MV, Gómez Villafaña IE. 2016. Environmental variables associated with Hantavirus reservoirs and other small rodent species in two National Parks in the Paraná Delta, Argentina: implications for disease prevention. *Ecohealth.*
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio

- DA, Herman JP. 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 289, E823-E828.
- Valdez SR, Bonafede MM, Carreño NB, Deis RP, Jahn GA. 2012. Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague Dawley rats. *Stress* 15, 361-377.
- Vallès A, Martí O, García A, Armario A. 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1138-R1144.
- Valtonen TM, Kleino A, Rämetsä M, Rantala MJ. 2010. Starvation reveals maintenance cost of humoral immunity. *Evol. Biol.* 37, 49-57.
- Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. 2003. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 60, 227-235.
- Vera F, Zenuto RR, Antenucci CD. 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* 151, 232-238.
- Viney M, Lazarou L, Abolins SR. 2015. The laboratory mouse and wild immunology. *Parasite Immunol.* 37, 267-273.
- Viney ME, Riley EM, Buchanan KL. 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* 20, 665-669.
- Warburton EM, Pearl CA, Vonhof MJ. 2016. Relationships between host body condition and immunocompetence, not host sex, best predict parasite burden in a bat-helminth system. *Parasitol. Res.* 1-10.
- Webster JP, Gower CM, Knowles SCL, Molyneux DH, Fenton A. 2016. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol. Appl.* 9, 313-333.
- Weil ZM, Martin LB, Workman JL, Nelson RJ. 2006. Immune challenge retards seasonal reproductive regression in rodents: evidence for terminal investment. *Biol. Lett.* 2, 393-396.
- Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Wiley

Blackwell.

Wingfield JC. 2005. The concept of allostasis: coping with a capricious environment. *J. Mammal.* 86, 248-254.

Wingfield JC. 2013. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Funct. Ecol.* 27, 37-44.

Wingfield JC, Kelley JP, Angelier F. 2011. What are extreme environmental conditions and how do organisms cope with them?. *Curr. Zool.* 57, 363-374.

Wolford ST, Schroer RA, Gallo PP, Gohs FX, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R. 1987. Age-related changes in serum chemistry and hematology values in normal sprague-dawley rats. *Toxicol. Sci.* 8, 80-88.

Xu D-L, Liu X-Y, Wang D-H. 2011. Food restriction and refeeding have no effect on cellular and humoral immunity in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 87-98.

Yan C, Xu T, Cao X, Wang F, Wang S, Hao S, Yang H, Li H, Zhang Z. 2014. Temporal change in body mass of two sympatric hamster species and implications for population dynamics. *Can. J. Zool.* 92, 389-395.

Young HS, Dirzo R, Helgen KM, McCauley DJ, Nunn CL, Snyder P, Veblen KE, Zhao S, Ezenwa VO. 2015a. Large wildlife removal drives immune defence increases in rodents. *Funct. Ecol.* 30, 799-807.

Young HS, Dirzo R, McCauley DJ, Agwanda B, Cattaneo L, Dittmar K, Eckerlin RP, Fleischer RC, Helgen LE, Hintz A, Montinieri J, Zhao S, Helgen KM. 2015b. Drivers of intensity and prevalence of flea parasitism on small mammals in East African savanna ecosystems. *J. Parasitol.* 101, 327-335.

Zhu W-L, Mu Y, Zhang H, Zhang L, Wang Z-K. 2013. Effects of food restriction on body mass, thermogenesis and serum leptin level in *Apodemus chevrieri* (Mammalia: Rodentia: Muridae). *Ital. J. Zool.* 80, 337-344.

Zullinger EM, Ricklefs RE, Redford KH, Mace GM. 1984. Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves. *J. Mammal.* 65, 607-636.

Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer.

Zysling DA, Garst AD, Demas GE. 2009. Photoperiod and food restriction differentially affect reproductive and immune responses in Siberian hamsters *Phodopus sungorus*. *Funct. Ecol.* 23, 979-988.

ANEXO I

Glosario

Ad libitum: a gusto, a voluntad (según la Real Academia Española).

Afinidad: la fortaleza de la unión entre una molécula y otra en un sitio determinado, por ejemplo, entre un determinante antigénico (epítopo) y el punto de unión de un anticuerpo (paratopo) (Murphy, 2012).

Alostasis: proceso de lograr la estabilidad a través del cambio, anticipándose a los requerimientos fisiológicos (Koolhaas y col., 2011).

Avidez: la suma total de la fuerza de unión entre dos moléculas o células en múltiples sitios. Diferente de afinidad, que es la fuerza de unión en un único sitio (Murphy, 2012).

Conespecífico: *-biología-* cuando dos o más individuos, poblaciones o taxones pertenecen a la misma especie.

Esfuerzo somático: la energía que un organismo destina para el crecimiento y mantenimiento de lo relacionado al cuerpo (Barrows, 2011).

Especificidad: capacidad del anticuerpo para distinguir un antígeno en particular de otros antígenos. La unión dada por la especificidad es muy precisa y permite distinguir entre grupos químicos con diferencias mínimas a pesar de su similitud (Murphy, 2012).

Fagocitos: células capaces de engullir y degradar partículas extrañas, microorganismos, y células que están muertas, moribundas o infectadas (DeCS, 2016).

Fitness: *-biología-* aptitud, adecuación o eficacia biológica física, rendimiento

Hipermutación somática de inmunoglobulina: proceso de mutación programada por el cual se introducen cambios a la secuencia de nucleótidos del ADN de genes de inmunoglobulina durante el desarrollo (Descriptores en Ciencias de la Salud).

Homeostasis: habilidad de un organismo para mantener el medio interno dentro de límites compatibles con la vida (McEwen y Wingfield, 2003; McEwen, 2007). Aplica fundamentalmente para procesos como pH, temperatura corporal, balance de fluidos, niveles de glucosa y tensión de oxígeno; los cuales son esenciales para la vida y por tanto son regulados constantemente dentro de un rango óptimo (McEwen y Wingfield, 2003; McEwen, 2007).

Leucocitosis / leucopenia: incremento/disminución en el número de leucocitos en un fluido corporal (DeCS, 2016).

Parásito o Patógeno: en ecología de enfermedades, un organismo (virus, bacteria, protozoo, helminto, etc.) que parasita a un hospedador. Aquí, “parásito” y “patógeno” se utilizan indistintamente (Beldomenico y Begon, 2010). Adicionalmente, son clasificados como microparásitos (aquellos de reproducción rápida, dentro del hospedador, incluyendo virus, bacterias, hongos y protozoos) y macroparásitos (aquellos en que la reproducción depende de la transmisión de estadios de vida libre, como helmintos y artrópodos) (Tompkins y col., 2011).

PMN: leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

Trade-off: entendido como intercambios entre compartimentos/sistemas que suponen un compromiso en la disponibilidad de recursos

ANEXO II

Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico de libre acceso “R”, versión 3.0.2 (R Development Core Team 2013). En líneas generales, salvo que se indique lo contrario, los análisis se realizaron aplicando modelos lineales mixtos. De esta manera fue posible tener en cuenta y corregir la ausencia de independencia presentada por tratarse de animales alojados en una misma jaula, o de medidas repetidas correspondientes al mismo animal. Los modelos se ejecutaron mediante el uso de los paquetes *lme4* y *lmerTest*.

Las variables respuesta consideradas en cada caso fueron las variables de interés analizadas e informadas en cada uno de los capítulos. Tratándose en su mayoría de modelos lineales mixtos, se verificó que los residuos de cada modelo cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Cuando esto no fue así, se aplicó la transformación que fuese necesaria, determinándose mediante la función *boxcox* del paquete *MASS* (en cuyo caso, se informa en el capítulo correspondiente). En aquellos casos en que la transformación no fuese posible o conveniente, se aplicaron modelos mixtos generalizados.

Se ejecutaron tres tipos diferentes de análisis: de punto final, longitudinales, y “pre/post” inmunización. Todos ellos incluyeron como variables independientes a los tratamientos aplicados y su interacción (RA×CS), pero difirieron en la inclusión de otros efectos fijos y factores al azar.

Variabes independientes	Factores al azar
<i>Análisis de Punto Final</i>	
RA×CS	Jaula
<i>Análisis Longitudinales</i>	
RA×CS×Sem + RA×CS×Sem ²	Jaula / Individuo
<i>Análisis Pre/Post</i>	
RA×CS×pre.post×desafío	Jaula / Individuo

En los análisis de punto final no se incluyó ninguna otra variable independiente, pero se incorporó “Jaula” como factor al azar, para considerar un potencial efecto enmascarador dado por la pertenencia a una misma jaula. En el caso de las variables longitudinales, para incorporar en el modelo el paso de las semanas se incluyó el término “Sem” (lineal y cuadrático), en triple interacción con los tratamientos (RA×CS×Semana y RA×CS×Semana²); incluyéndose además el término anidado “Jaula / Individuo” de manera de considerar la dependencia de los datos del mismo individuo y de la misma jaula. Finalmente, los análisis pre/post inmunización consideran como respuesta a la variable de interés, aunque expresada como la diferencia entre semanas (semana actual - semana previa), e incluyen como efecto la interacción de los tratamientos con dos variables “dummy”: “pre.post” (0/1) para indicar el antes y después de cada inmunización, y “desafío” (1/2/3) para indicar el número de inmunización correspondiente, quedando la interacción cuádruple conformada como “RA×CS×pre.post×desafío”. En este último análisis también se consideró el término anidado “Jaula / Individuo”.

La selección de los modelos más adecuados en cada caso se realizó aplicando el criterio de selección de Akaike de segundo orden (AICc), que es de utilidad ante muestras de número reducido (Arnold, 2010; Burnham y col., 2011; Johnson y Omland, 2004). La inclusión de una interacción debía reducir el valor de AICc en dos unidades o más ($\Delta AICc < 2$), caso contrario la misma se consideró no influyente y fue retirada del modelo. Los efectos principales se mantuvieron, independientemente de su contribución. El proceso de selección se realizó mediante el uso simultáneo de las funciones *drop1* y *AICc* de los paquetes *lmer* y *MUMIn* respectivamente.

Tablas de los modelos estadísticos aplicados

CAPÍTULO II

Tabla A1. Modelo lineal mixto describiendo la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de corticosterona plasmática total (CORT)

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>CORT: lmer(CORT~CS+RA×Sem+RA×Sem²+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	56,15	28,02	2,00	0,056	
CS	4,51	21,25	0,21	0,840	-2,3
RA	15,01	34,90	0,43	0,670	
Sem	-1,28	8,31	-0,15	0,878	
Sem ²	1,35	0,61	2,21	0,029	
RA×Sem	52,69	11,89	4,43	< 0,001	16,5
RA×Sem ²	-3,50	0,89	-3,92	< 0,001	12,9

Tabla A2. Modelos lineales mixtos describiendo la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre parámetros de la histo-arquitectura de la glándula adrenal.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>Masa absoluta de la corteza adrenal: lmer(cort.adren.abs~CS+RA+(1 Jaula))</i>					
Intercepto	0,58	0,06	8,96	< 0,001	
CS	0,01	0,06	0,14	0,889	-3,1
RA	-0,02	0,07	-0,26	0,795	-3,2
<i>Masa relativa de la corteza adrenal: lmer(cort.adren.rel~CS+RA+(1 Jaula))</i>					
Intercepto	8,38e-05	7,03e-06	11,92	< 0,001	
CS	7,69e-07	7,98e-06	0,10	0,924	-3,4
RA	2,30e-05	7,88e-06	2,92	0,009	4,5

Masa absoluta de la zona fascicular: lmer(fasc.abs~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	0,38	0,05	7,43	< 0,001	
CS	-0,02	0,05	-0,29	0,783	-3,1
RA	0,02	0,05	0,40	0,705	-3

Masa relativa de la zona fascicular: lmer(fasc.rel~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	5,32e-05	6,23e-06	8,54	< 0,001	
CS	9,18e-07	7,02e-06	0,13	0,897	-3,4
RA	1,76e-05	6,86e-06	2,56	0,019	3,2

Masa absoluta de la zona glomerulosa: lmer(glom.abs~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	0,09	0,01	9,51	< 0,001	
CS	-0,03	0,01	-2,50	0,021	0,4
RA	0,01	0,01	1,18	0,252	2,4

Masa relativa de la zona glomerulosa: lmer(glom.rel~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	1,48e-05	2,14e-06	6,91	< 0,001	
CS	-4,51e-06	2,37e-06	-1,90	0,073	2,9
RA	5,38e-06	2,23e-06	2,41	0,027	-1,7

Masa absoluta de la zona reticularis: lmer(ret.abs~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	0,11	0,04	3,08	0,006	
CS	0,02	0,04	0,62	0,543	-2,8
RA	-0,02	0,04	-0,64	0,526	-2,8

Masa relativa de la zona reticularis: lmer(ret.rel~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	1,52e-05	2,87e-06	5,31	< 0,001	
CS	4,84e-06	3,17e-06	1,53	0,271	-0,9
RA	5,39e-07	2,99e-06	0,18	0,874	-3,5

Tabla A3. Modelos lineales mixtos describiendo la influencia de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre parámetros de consumo de alimento.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>Consumo acumulado per cápita: $lm(cons.acum \sim CS \times RA)$</i>					
Intercepto	2104,90	9,25	227,46	< 0,001	
CS	-198,12	13,09	-15,14	< 0,001	
RA	-791,95	13,09	-60,51	< 0,001	
CS×RA	207,21	18,51	11,20	< 0,001	25,8
<i>Consumo por kg-rata: $lm(cons.kg-rata \sim CS + RA)$</i>					
Intercepto	0,51	0,01	66,05	< 0,001	
CS	-0,04	0,01	-4,62	0,006	11,3
RA	-0,05	0,01	-5,42	0,003	13,4

CAPÍTULO III

Tabla A4. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre parámetros de crecimiento seleccionados (μ , A).

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>Tasa máxima de crecimiento μ: lmer($\mu \sim CS \times RA + (1 Jaula)$)</i>					
Intercepto	38,61	1,70	22,67	< 0,001	
CS	-6,09	2,09	-2,92	0,008	
RA	-25,83	2,41	-10,72	< 0,001	
CS \times RA	6,98	2,95	2,36	0,028	2,3
<i>Crecimiento máximo A: lmer($A \sim CS + RA + (1 Jaula)$)</i>					
Intercepto	390,13	23,28	16,76	< 0,001	
CS	11,50	24,83	0,46	0,648	-2,6
RA	-38,56	23,67	-1,63	0,119	-2,5

Tabla A5. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre medidas longitudinales de inversión somática y condición corporal.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>Peso Corporal: lmer($peso.corp \sim CS \times RA \times Sem + CS \times Sem^2 + RA \times Sem^2 + (1 Jaula/Individuo)$)</i>					
Intercepto	150,88	7,65	19,73	< 0,001	
CS	-1,12	9,32	-0,12	0,905	
RA	-15,94	10,71	-1,49	0,138	
Sem	38,75	1,08	35,94	< 0,001	
Sem ²	-1,67	0,10	-16,37	< 0,001	
CS \times RA	10,57	12,98	0,81	0,424	

CS×Sem	-4,14	1,16	-3,56	< 0,001	
RA×Sem	-24,48	1,13	-21,60	< 0,001	
CS×Sem ²	0,26	0,11	2,39	< 0,018	3,6
RA×Sem ²	1,28	0,10	12,53	< 0,001	121,5
CS×RA×Sem	1,65	0,60	2,73	0,007	5,3
<i>Ganancia de Peso Corporal: lmer(peso.corp~CS+Sem+RA×Sem²+(1 Jaula/Individuo)</i>					
Intercepto	39,73	1,41	28,13	< 0,001	
CS	-0,64	0,92	-0,69	0,491	-1,7
RA	-15,67	1,27	-12,31	< 0,001	
Sem	-4,07	0,51	-7,95	< 0,001	55,7
Sem ²	0,11	0,05	2,15	0,033	
RA×Sem ²	0,15	0,03	5,58	< 0,001	28
<i>Índice de Masa Corporal: lmer(masa.corp^{0,1}~CS+Sem+RA×Sem²+(1 Jaula/Individuo)</i>					
Intercepto	1,06e+00	4,86e-04	2176,89	< 0,001	
CS	-2,00e-04	4,09e-04	-0,49	0,630	-1,9
RA	-4,94e-04	5,69e-04	-0,87	0,388	
Sem	1,40e-03	1,50e-04	9,34	< 0,001	
Sem ²	-6,43e-05	1,44e-05	-4,45	< 0,001	
RA×Sem	-1,29e-03	2,12e-04	-6,09	< 0,001	32,9
RA×Sem ²	1,04e-04	2,04e-05	5,07	< 0,001	22,7

Tabla A6. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre medidas finales de inversión somática y condición corporal (en Sem_{10} y Sem_{13}).

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<u>Peso Corporal (Sem_{10}): $lmer(peso.sem10 \sim CS+RA+(1 Jaula)$</u>					
Intercepto	365,21	8,55	42,71	< 0,001	
CS	-4,56	9,07	-0,50	0,620	-2,9
RA	-119,17	8,55	-13,94	< 0,001	27
<u>Peso Corporal (Sem_{13}): $lmer(peso.fin \sim CS+RA+(1 Jaula)$</u>					
Intercepto	392,29	8,30	47,27	< 0,001	
CS	-3,19	8,80	-0,36	0,721	-3,1
RA	-124,83	8,30	-15,04	< 0,001	29,4
<u>Ganancia de Peso Corporal (Sem_{10}): $lmer(ganancia.sem10 \sim CS+RA+(1 Jaula)$</u>					
Intercepto	221,25	7,43	29,77	< 0,001	
CS	-9,50	7,88	-1,20	0,242	-1,6
RA	-117	7,43	-15,74	< 0,001	28,4
<u>Ganancia de Peso Corporal (Sem_{13}): $lmer(ganancia.fin \sim CS+RA+(1 Jaula)$</u>					
Intercepto	282,93	10,75	26,33	< 0,001	
CS	-5,62	11,63	-0,48	0,643	-2,9
RA	-121,87	11,30	-10,79	< 0,001	22,8
<u>Índice de Masa Corporal (Sem_{10}): $lmer(masa.corp.sem10 \sim CS+RA+(1 Jaula)$</u>					
Intercepto	1,90	0,01	179,33	< 0,001	
CS	-0,01	0,01	-0,53	0,6	-2,9
RA	-0,06	0,01	-5,90	< 0,001	13,6

<u>Índice de Masa Corporal (Sem₁₃): lmer(masa.corp.fin~CS+RA+(I Jaula)</u>					
Intercepto	1,91	0,01	195,45	< 0,001	
CS	< 0,01	0,01	0,33	0,746	-3,1
RA	-0,06	0,01	-5,96	< 0,001	13,5

Tabla A7. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los pesos absoluto y relativo de órganos seleccionados.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	ΔAICc
<u>Corazón (absoluto): lmer(corazón~CS+RA+(I Jaula)</u>					
Intercepto	1,03	0,04	26,50	< 0,001	
CS	0,01	0,04	0,29	0,778	-3,1
RA	-0,20	0,04	-5,17	< 0,001	11,8
<u>Corazón (relativo): lmer(corazón/peso.fin~CS+RA+(I Jaula)</u>					
Intercepto	2,61e-03	9,99e-05	26,12	< 0,001	
CS	6,67e-05	1,06e-04	0,63	0,536	-2,8
RA	4,89e-04	9,99e-05	4,89	0,001	11,3
<u>Pulmones (absoluto): lmer(pulmones~CS+RA+(I Jaula)</u>					
Intercepto	1,43	0,08	18,55	< 0,001	
CS	0,20	0,08	2,42	0,025	2,7
RA	-0,42	0,08	-5,44	< 0,001	11,8
<u>Pulmones (relativo): lmer(pulmones/peso.fin~CS+RA+(I Jaula)</u>					
Intercepto	3,62e-03	2,39e-04	15,13	< 0,001	
CS	6,07e-04	2,54e-04	2,39	0,026	2,6
RA	2,96e-04	2,39e-04	1,24	0,229	-1,5

<u>Bazo (absoluto): lmer(bazo~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	0,51	0,02	21,48	< 0,001	
CS	0,05	0,02	2,20	0,039	1,7
RA	-0,12	0,02	-5,27	< 0,001	10,7
<u>Bazo (relativo): lmer(bazo/peso.fin~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	1,28e-03	7,87e-05	16,29	< 0,001	
CS	1,71e-04	8,66e-05	1,97	0,062	1,3
RA	1,96e-04	8,54e-05	2,30	0,032	2,5
<u>Hígado (absoluto): lmer(hígado~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	12,65	0,38	33,60	< 0,001	
CS	-0,05	0,40	-0,13	0,898	-3,2
RA	-5,19	0,39	-13,40	< 0,001	25,9
<u>Hígado (relativo): lmer(hígado/peso.fin~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	3,22e-02	1,04e-03	31,02	< 0,001	
CS	2,44e-04	1,17e-03	0,21	0,843	-3,2
RA	-4,41e-03	1,17e-03	-3,76	0,012	7,5
<u>Riñones (absoluto): lmer(riñones~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	2,58	0,05	46,58	< 0,001	
CS	-0,02	0,06	-0,26	0,804	-3,1
RA	-0,89	0,06	-15,70	< 0,001	28
<u>Riñones (relativo): lmer(riñones/peso.fin~CS+RA+(1 Jaula)</u>					
Intercepto	6,56e-03	1,39e-04	47,16	<0,001	
CS	1,40e-04	1,48e-04	0,94	0,374	-2,2
RA	-2,34e-04	1,40e-04	-1,67	0,153	-0,2

Glándulas adrenales (absoluto): lmer(adrenal~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	4,67e-02	2,97e-03	15,67	< 0,001	
CS	-1,96e-03	3,36e-03	-0,59	0,59	-3,1
RA	-5,90e-03	3,30e-03	-1,79	0,146	0,6

Glándulas adrenales (relativo): lmer(adrenal/peso.fin~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	1,16e-04	7,44e-06	15,64	< 0,001	
CS	9,29e-07	8,22e-06	0,11	0,910	-3,5
RA	3,12e-05	7,76e-06	4,02	< 0,001	7,1

Testículos (absoluto): lmer(testículos~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	2,84	0,08	35,41	< 0,001	
CS	-0,11	0,09	-1,27	0,246	-1,1
RA	-0,11	0,08	-1,29	0,248	-1,1

Testículos (relativo): lmer(testículos/peso.fin~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	7,32e-03	2,60e-04	28,15	< 0,001	
CS	-3,42e-04	2,83e-04	-1,21	0,270	-1,3
RA	2,95e-03	2,78e-04	10,62	< 0,001	22,4

Epidídimos (absoluto): lmer(epidídimos~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	1,18	0,06	18,76	< 0,001	
CS	-0,04	0,07	-0,64	0,552	-2,8
RA	-0,19	0,06	-2,99	0,049	4,4

Epidídimos (relativo): lmer(epidídimos/peso.fin~CS+RA+(1|Jaula)

Intercepto	3,02e-03	2,12e-04	14,24	< 0,001	
CS	-1,26e-04	2,31e-04	-0,55	0,611	-2,8
RA	6,59e-04	2,26e-04	2,91	0,049	4,6

CAPÍTULO IV

Tabla A8. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de leucocitos.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	$\Delta AICc$
<i>Fase de inducción de estrés: $lmer((leuco \times 10^3)^{-0,7} \sim CS + RA + Sem + (1 Jaula/Individuo))$</i>					
Intercepto	1,57e-03	5,51e-05	28,52	< 0,001	
CS	7,56e-05	4,63e-05	1,63	0,105	0,5
RA	-2,38e-05	4,33e-05	-0,55	0,584	-1,9
Sem	-2,24e-05	1,03e-05	-2,18	0,031	2,6
<i>Fase de inmunización + estrés: $lmer((leuco \times 10^3)^{-0,7} \sim CS + RA + Sem + Sem^2 + (1 Jaula/Individuo))$</i>					
Intercepto	2,49e-03	3,60e-04	6,91	< 0,001	
CS	-2,27e-05	4,40e-05	-0,51	0,611	-1,9
RA	-5,27e-06	4,13e-05	-0,13	0,900	-2,2
Sem	-2,33e-04	7,86e-05	-2,96	0,003	6,5
Sem ²	1,30e-05	4,12e-06	3,15	0,002	7,6

Tabla A9. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los conteos de leucocitos antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de <i>T</i>	Valor de <i>P</i>	Δ AICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(leuco~RA+CS×inmun×pre.post+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	-2,76	1,80	-1,53	0,129	
CS	1,92	2,09	0,92	0,358	
RA	-1,28	0,76	-1,68	0,096	1,1
desafío.2	3,29	2,40	1,37	0,173	
desafío.3	5,85	2,49	2,35	0,021	
pre.post	3,49	2,40	1,45	0,148	
CS×desafío.2	-1,25	2,89	-0,43	0,665	
CS×desafío.3	-6,25	2,96	-2,11	0,037	
CS×pre.post	-1,03	2,87	-0,36	0,720	
desafío.2×pre.post	-1,46	3,33	-0,44	0,661	
desafío.3×pre.post	-8,21	3,40	-2,42	0,017	
CS×desafío.2×pre.post	-2,56	4,01	-0,64	0,525	
CS×desafío.3×pre.post	8,41	4,07	2,06	0,041	4,65

Tabla A10. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de linfocitos.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Fase de inducción de estrés: lmer((linfo$\times 10^3$)^{-0,36}~CS+RA+Sem+Sem²+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	4,01e-02	8,49e-04	47,20	< 0,001	
CS	1,02e-03	6,41e-04	1,59	0,115	0,3
RA	-2,58e-04	6,00e-04	-0,43	0,668	-2,1
Sem	-1,68e-03	5,27e-04	-3,19	0,002	7,9
Sem ²	2,56e-04	8,60e-05	2,97	0,003	6,6
<i>Fase de inmunización + estrés: lmer((linfo$\times 10^3$)^{-0,36}~CS+RA+Sem+Sem²+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	5,50e-02	5,05e-03	10,89	< 0,001	
CS	-4,23e-04	6,89e-04	-0,61	0,556	-1,7
RA	3,26e-04	6,57e-04	0,50	0,639	-1,9
Sem	-3,68e-03	1,10e-03	-3,35	0,001	8,7
Sem ²	2,07e-04	5,77e-05	3,58	< 0,001	10,3

Tabla A11. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los conteos de linfocitos antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(linfo~RA+CS+inmun<pre>.post+(1 Jaula/Individuo))</pre></i>					
Intercepto	-1,55	0,89	-1,74	0,084	
CS	-0,06	0,63	-0,09	0,926	-2,4
RA	-0,91	0,58	-1,56	0,122	0,2
desafío.2	2,27	1,02	2,22	0,028	
desafío.3	1,92	1,03	1,86	0,065	
pre.post	2,27	1,01	2,25	0,026	
desafío.2 <pre>.post</pre>	-3,26	1,42	-2,30	0,023	
desafío.3 <pre>.post</pre>	-3,81	1,44	-2,66	0,009	3,8

Tabla A12. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de neutrófilos.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Fase de inducción de estrés: lmer((neutro$\times 10^3$)^{-0,31}~CS+RA+Sem+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	9,93e-02	2,35e-03	42,19	< 0,001	
CS	1,24e-03	2,10e-03	0,59	0,571	-1,8
RA	-2,41e-03	1,99e-03	-1,21	0,275	-0,3
Sem	-1,05e-03	4,00e-04	-2,65	0,009	4,8
<i>Fase de inmunización + estrés: lmer((neutro$\times 10^3$)^{-0,31}~CS+RA+Sem+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	8,80e-02	3,66e-03	24,05	< 0,001	

CS	-8,49e-04	1,71e-03	-0,50	0,619	-1,9
RA	-1,49e-03	1,60e-03	-0,93	0,352	-1,3
Sem	2,44e-05	3,50e-04	0,07	0,944	-2,2

Tabla A13. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los conteos de neutrófilos antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(neutro~RA+CS+inmun+pre.post+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	-4,09e-03	0,38	-0,01	0,991	
CS	-9,73e-02	0,31	-0,32	0,752	-2,2
RA	-0,23	0,28	-0,81	0,421	-1,6
desafío.2	0,16	0,35	0,45	0,650	
desafío.3	0,13	0,35	0,38	0,706	-4,3
pre.post	0,82	0,28	2,87	0,005	6,1

Tabla A14. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de monocitos.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Fase de inducción de estrés: lmer((mono$\times 10^3$)^{0,52}~CS+RA+Sem+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	16,18	1,55	10,45	< 0,001	
CS	-1,24	1,42	-0,87	0,415	-1,3
RA	-2,00	1,34	-1,49	0,209	0,2
Sem	0,36	0,24	1,53	0,129	0,1

<i>Fase de inmunización + estrés: lmer((mono×10³)^{0,57}~CS×RA+Sem+ (1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	31,95	2,65	12,07	< 0,001	
CS	-5,95	1,66	-3,58	0,017	
RA	-5,39	1,95	-2,75	0,023	
Sem	-0,50	0,24	-2,08	0,040	2,2
CS×RA	5,75	2,38	2,41	0,060	3,6

Tabla A15. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los conteos de monocitos antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	ΔAICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(mono~RA+CS+inmun×pre.post+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	8,18e-02	5,55-e02	1,47	0,143	
CS	-3,00e-02	3,94-e02	-0,76	0,448	-1,8
RA	-2,68e-02	3,65-e02	-0,73	0,465	-1,8
desafío.2	-9,59e-02	6,39-e02	-1,50	0,136	
desafío.3	-1,38e-02	6,46-e02	-2,14	0,035	
pre.post	-5,92e-02	6,31-e02	-0,94	0,350	
desafío.2×pre.post	1,17e-01	8,88-e02	1,32	0,188	
desafío.3×pre.post	2,65e-01	8,98-e02	2,96	0,004	4,3

Tabla A16. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los conteos semanales de eosinófilos.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Fase de inducción de estrés: lmer((eosi\times10³)^{-0,73}~CS+RA+Sem+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	4,68e-02	3,38e-03	13,88	< 0,001	
CS	3,68e-03	2,84e-03	1,29	0,198	-0,5
RA	-9,76e-04	2,66e-03	-0,37	0,714	-2,1
Sem	-1,08e-03	6,29e-04	-1,72	0,088	0,8
<i>Fase de inmunización + estrés: lmer((eosi\times10³)^{-0,40}~CS\timesRA+Sem+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	0,19	1,35e-02	14,15	< 0,001	
CS	1,20e-02	8,80e-03	1,36	0,189	
RA	2,01e-02	1,04e-02	1,94	0,066	
Sem	-3,61e-03	1,21e-03	-2,99	0,003	6,6
CS \times RA	-2,59e-02	1,26e-02	-2,05	0,054	2,4

Tabla A17. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los conteos de eosinófilos antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(eosi~CS+RA\timespre.post+inmun+(1 Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	1,78e-02	3,18e-02	0,56	0,578	
CS	-1,30e-02	2,40e-02	-0,54	0,590	-2,0
RA	-8,83e-02	3,20e-02	-2,76	0,007	
desafío.2	2,69e-02	2,70e-02	1,00	0,320	
desafío.3	5,60e-02	2,73e-02	2,05	0,042	-0,3

pre.post	-3,73e-02	3,10e-02	-1,20	0,232	
RA×pre.post	1,49e-01	4,44e-02	3,36	0,001	9,1

Tabla A18. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la razón N:L.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	ΔAICc
<i>Fase de inducción de estrés: lmer((eosi×10³)^{-0,73}~CS+RA+Sem+(I Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	2,58e-01	2,18e-02	11,83		
CS	6,42e-03	1,83e-02	0,35	0,736	-2,06
RA	9,75e-03	1,78e-02	0,55	0,604	-1,75
Sem	-4,42e-0	1,23e-02	-3,60	< 0,001	10,12
Sem ²	8,72e-03	2,01e-03	4,34	< 0,001	15,42
<i>Fase de inmunización + estrés: lmer((eosi×10³)^{-0,40}~CS×RA+Sem+(I Jaula/Individuo))</i>					
Intercepto	8,79e-01	1,11e-02	79,02		
CS	1,32e-03	5,16e-03	0,26	0,799	-2,09
RA	5,10e-03	4,85e-03	1,05	0,294	-1,03
Sem	1,73e-03	1,05e-03	1,64	0,103	0,57

CAPÍTULO V

Tabla A19. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) obtenidos por la técnica de hemaglutinación.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<u>AcNs (Hemaglutinación): $lmer(AcNs^{2.7} \sim CS + RA + Sem + (1 Jaula/Individuo) + (1 Placa)$</u>					
Intercepto	139,82	8,43	16,58	< 0,001	
CS	-3,73	8,27	-0,45	0,657	-2,03
RA	-6,08	7,81	-0,78	0,445	-1,56
Sem	-4,06	0,52	-7,73	< 0,001	42,7

Tabla A20. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) obtenidos por la técnica de ELISA.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<u>Fase de inducción de estrés: $lmer(AcNs \sim CS \times RA \times Sem + (1 Jaula/Individuo) + (1 Placa)$</u>					
Intercepto	0,25	0,17	1,48	0,170	
CS	0,05	0,21	0,22	0,834	
RA	-0,07	0,24	-0,27	0,790	
Sem	0,10	0,02	5,89	< 0,001	
CS×RA	0,21	0,30	0,71	0,503	
CS×Sem	-0,02	0,02	-1,00	0,317	
RA×Sem	-0,03	0,02	-1,08	0,283	
CS×RA×Sem	0,07	0,03	2,31	0,023	3,1

<i>Fase de inmunización + estrés: lmer(AcNs~CS×RA+Sem+Sem²+(1 Jaula/Individuo)+(1 Placa)</i>					
Intercepto	-0,68	0,37	-1,84	0,067	
CS	-0,06	0,21	-0,31	0,758	
RA	-0,20	0,24	-0,83	0,415	
Sem	0,33	0,07	4,63	< 0,001	18,1
Sem ²	-0,01	< 0,01	-3,82	< 0,001	12
CS×RA	0,64	0,30	2,17	0,042	2,3

Tabla A21. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre la diferencia de los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) antes y después de cada inmunización.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	ΔAICc
<i>Pre/post inmunización: lmer(dif.AcNs~CS+RA+desafío+pre.post+(1 Jaula/Individuo)+(1 Placa)</i>					
Intercepto	0,01	0,07	0,12	0,907	
CS	0,03	0,05	0,53	0,599	-2,1
RA	0,02	0,05	0,34	0,734	-2,3
desafío.2	-0,01	0,08	-0,10	0,922	
desafío.3	0,03	0,08	0,35	0,724	
pre.post	0,14	0,08	1,63	0,104	
desafío.2×pre.post	-0,09	0,12	-0,77	0,441	
desafío.3×pre.post	-0,45	0,12	-3,72	< 0,001	10,7

Tabla A22. Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción alimentaria (RA) y el conflicto social (CS) sobre los niveles de anticuerpos anti-ASB (IgM e IgG) obtenidos por la técnica de ELISA.

Variable	Coefficiente	Error estándar	Valor de T	Valor de P	Δ AICc
<u>IgM anti-ASB: $lmer(IgM \sim CS \times RA \times Sem + Sem^2 + (1 Jaula/Individuo) + (1 Placa)$</u>					
Intercepto	-3,31	0,38	-8,72	< 0,001	
CS	-0,27	0,18	-1,52	0,130	
RA	-0,35	0,21	-1,70	0,091	
Sem	0,71	0,07	9,42	< 0,001	
Sem ²	-0,03	< 0,01	-7,85	< 0,001	52,1
CS×RA	0,48	0,26	1,89	0,060	
CS×Sem	0,05	0,02	3,10	0,002	
RA×Sem	0,06	0,02	2,95	0,004	
CS×RA×Sem	-0,07	0,02	-2,94	0,004	5,9
<u>IgG anti-ASB: $lmer(IgG \sim CS \times RA \times Sem + Sem^2 + Sem^3 + (1 Jaula/Individuo) + (1 Placa)$</u>					
Intercepto	-18,69	1,22	-15,31	< 0,001	
CS	-0,11	0,09	-1,13	0,258	
RA	-0,14	0,11	-1,26	0,208	
Sem	5,43	0,38	14,24	< 0,001	
Sem ²	-0,50	0,04	-12,77	< 0,001	98,1
Sem ³	0,01	< 0,01	11,58	< 0,001	86,1
CS×RA	0,20	0,13	1,48	0,140	
CS×Sem	0,02	< 0,01	2,62	0,010	
RA×Sem	0,02	0,01	2,34	0,021	
CS×RA×Sem	-0,03	0,01	-2,63	0,009	4,7

CAPÍTULO VI

Tabla A23. Resumen de la selección de modelos que describen la influencia de la suplementación de alimento sobre la condición corporal.*

Modelos seleccionados		k	AICc	Δ AICc	w_i
<i>Cond. corp.: lmer(CC^{0.2}~Tto+Dens+EST+Año+SP+SX+GCs+(I grilla)+(I campaña)+(I RIA)</i>					
1	EST+Año	8	-460,19	0	0,945
2	EST+Año+SP	9	-453,13	7,06	0,028
3	EST+Año+SX	9	-452,89	7,30	0,025
4	EST+Año+Dens	9	-447,39	12,80	0,02
5	EST+Año+SP+SX	10	-445,91	14,28	< 0,001
6	EST+Año+SP+Tto	10	-443,98	16,21	< 0,001
7	EST+Año+SP+SX+Tto	11	-436,96	23,23	< 0,001

Tabla A24. Estimación de parámetros asociados con la condición corporal (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		1,42	1,93e-02	1,38	1,46
EST: Primavera	1	-5,12e-02	1,99e-02	-9,04e-02	-1,21e-02
EST: Verano	1	-5,98e-02	2,17e-02	-1,02e-01	-1,73e-02
EST: Otoño	1	-7,61e-02	2,44e-02	-1,24e-01	-2,82e-02
Año: 2	1	-1,66e-01	1,66e-02	-1,98e-01	-1,34e-01
SP: <i>Calomys</i>	0,028	-4,47e-04	3,08e-03	-6,48e-03	5,58e-03

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

SX: Macho	0,025	3,72e-04	2,75e-03	-5,02e-03	5,76e-03
Dens	< 0,001	-1,89e-06	7,08e-05	-1,41e-04	1,37e-04
Tto: Sí	< 0,001	1,52e-06	2,16e-04	-4,21e-04	4,24e-04

Tabla A25. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con la razón neutrófilo:linfocito (N:L).*

Modelos seleccionados		k	AICc	Δ AICc	w_i
<i>Razón N:L:lmer(N:L^{0.33}~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)</i>					
<i>+(I campana)</i>					
1	CC+Dens	6	49,51	0	0,536
2	CC+Dens+SP	7	51	1,48	0,255
3	CC+Dens+Año	7	51,40	1,89	0,208

Tabla A26. Estimación de parámetros asociados con la razón neutrófilo:linfocito (N:L) (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		7,42e-01	7,92e-02	5,87e-01	8,97e-01
CC	1	-4,71e-02	1,59e-02	-7,83e-02	-1,60e-02
Dens	1	1,37e-02	5,91e-03	2,10e-03	2,53e-02
Año: 2	0,208	1,81e-03	1,80e-02	-3,35e-02	3,71e-02
SP: <i>Calomys</i>	0,255	1,53e-03	1,17e-02	-2,15e-02	2,46e-02

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A27. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los indicadores seleccionados de inmunidad.*

Modelos seleccionados		<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<u>Leucocitos totales: $lmer(leuco^{0.1} \sim Tto + Dens + ST + EST + Año + SP + SX + CC +$</u>					
<u>(I grilla)+(I campana)</u>					
1	EST+ST+Dens	9	-253,37	0	0,162
2	ST	5	-253,23	0,14	0,151
3	ST+Dens	6	-253,00	0,36	0,135
4	ST+CC+Año	7	-252,47	0,90	0,103
5	EST+ST	8	-252,14	1,23	0,088
6	EST+ST+Dens+CC	10	-251,96	1,41	0,080
7	Nulo	4	-251,83	1,53	0,075
8	ST+Dens+CC+Año	8	-251,71	1,66	0,071
9	ST+CC	6	-251,62	1,75	0,068
10	ST+Año	6	-251,59	1,78	0,067
<u>Linfocitos: $lmer(linfo^{-0.02} \sim Tto + Dens + ST + EST + Año + SP + SX + CC +$</u>					
<u>(I grilla)+(I campana)</u>					
1	ST+Año	6	-1277,02	0,00	0,236
2	Año	5	-1276,25	0,77	0,159
3	ST+Año+EST	9	-1275,98	1,04	0,139
4	Año+EST	8	-1275,92	1,10	0,135
5	ST+Año+SP	7	-1275,77	1,26	0,126

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

6	Año+SP	6	-1275,59	1,43	0,114
7	ST+Año+Tto	7	-1275,24	1,79	0,096
<i>Neutrófilos: lmer(neutro^{0.38}~Tto×Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campana)</i>					
1	CC+Dens	6	1285,79	0	0,545
2	CC+Dens+ST	7	1287,49	1,70	0,232
3	CC+Dens+SX	7	1287,58	1,79	0,223
<i>Monocitos: glmmadmb(mono~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campana)</i>					
1	Año	6	2976,90	0	0,208
2	Año+SP	7	2977,25	0,35	0,174
3	Año+SP+Dens	8	2977,46	0,56	0,157
4	Año+Dens+ST	8	2977,90	1,00	0,126
5	Año+Dens+SX	8	2977,94	1,04	0,123
6	Año+EST+Tto	10	2978,16	1,26	0,111
7	Año+SP+EST	10	2978,36	1,46	0,100
<i>Eosinófilos: glmmadmb(eosi~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campana)</i>					
1	ST+Año	7	2792,75	0	0,289
2	Año	6	2793,4	0,65	0,209
3	ST+Año+Tto	8	2794,00	1,25	0,155
4	ST+Año+SX	8	2794,40	1,65	0,127
5	ST+Año+Dens	8	2794,66	1,91	0,111
6	ST+Año+CC	8	2794,70	1,95	0,109

Tabla A28. Estimación de parámetros asociados con el conteo total de leucocitos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		2,50e-01	7,45e-01	-1,21	1,71
ST: La Picada	0,925	-5,56e-03	1,90e-02	-4,28e-02	3,17e-02
Año: 2	0,241	-3,26e-05	1,22e-03	-2,43e-03	2,37e-03
CC	0,322	-4,10e-06	2,52e-04	-4,98e-04	4,90e-04
Dens	0,448	1,09e-06	7,65e-05	-1,49e-04	1,51e-04
EST: Primavera	0,330	-7,43e-08	8,87e-05	-1,74e-04	1,74e-04
EST: Verano		1,23e-07	1,04e-04	-2,04e-04	2,05e-04
EST: Otoño		6,04e-07	2,11e-04	-4,13e-04	4,14e-04

Tabla A29. Estimación de parámetros asociados con el conteo de linfocitos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		8,42e-01	1,49e-03	8,39e-01	8,45e-01
Año: 2	1	4,37e-03	1,96e-03	5,19e-04	8,21e-03
ST: La Picada	0,597	1,51e-05	2,37e-04	-4,49e-04	4,79e-04
SP: <i>Calomys</i>	0,24	5,20e-06	1,26e-04	-2,43e-04	2,53e-04
EST: Primavera	0,274	3,47e-10	1,43e-06	-2,81e-06	2,81e-06

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

EST: Verano		2,81e-10	1,26e-06	-2,47e-06	2,47e-06
EST: Otoño		7,23e-11	8,54e-07	-1,67e-06	1,67e-06
Tto	0,096	8,81e-09	6,30e-06	-1,23e-05	1,24e-05

Tabla A30. Estimación de parámetros asociados con el conteo de monocitos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		5,91	0,36	5,19	6,62
Año: 2	0,999	9,56e-01	0,35	0,26	1,64
SP: <i>Calomys</i>	0,431	5,01e-02	0,09	-1,32e-01	2,32e-01
Dens	0,406	1,10e-02	0,02	-2,27e-02	4,48e-02
ST: La Picada	0,126	-3,47e-03	0,05	-9,44e-02	8,75e-02
SX: Macho	0,123	-1,08e-03	0,04	-715e-02	6,93e-02
EST: Primavera	0,211	5,53e-02	0,16	-2,67e-01	3,78e-02
EST: Verano		1,36e-01	0,30	-4,48e-01	7,20e-02
EST: Otoño		1,67e-01	0,36	-5,41e-01	8,76e-02
Tto	0,111	1,77e-02	0,07	-1,14e-01	1,49e-02

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A31. Estimación de parámetros asociados con el conteo de eosinófilos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		6,51	2,44e-01	6,03	6,99
ST: La Picada	0,791	-3,82e-01	3,06e-01	-9,82e-01	2,17e-01
Año: 2	1	-4,55e-01	1,60e-01	-7,68e-01	-1,42e-01
Tto	0,155	-3,61e-02	1,28e-01	-2,87e-01	2,15e-01
SX: Macho	0,127	-1,17e-02	5,46e-02	-1,19e-01	9,52e-02
Dens	0,111	-1,06e-03	6,93e-03	-1,46e-02	1,25e-02
CC	0,109	-3,26e-03	2,30e-02	-4,83e-02	4,17e-02

Tabla A32. Estimación de parámetros asociados con el conteo de neutrófilos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0)*.

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		16,81	1,57	13,73	19,90
CC	1	-1,02	0,30	-1,60	-0,44
ST: La Picada	0,232	-0,31	1,03	-2,32	1,70
Dens	1	0,38	0,13	0,13	0,62
SX: Macho	0,223	-0,14	0,53	-1,19	0,90

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A33. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los niveles de AcNs.*

Modelos seleccionados		<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<i>AcNs</i> : $lmer(AcNs^{0.7} \sim Tto + Dens + ST + EST + Año + SP + SX + CC + (I grilla) + (I campana))$					
1	SP+SX+ST+Año+EST+Tto	13	7,36	0	0,502
2	SP+SX+ST+Año+EST+Dens	13	7,37	0,02	0,498

Tabla A34. Estimación de parámetros asociados con los niveles de AcNs (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		8,54e-01	7,99e-02	0,70	1,01
SP: <i>Calomys</i>	1	-1,67e-02	6,47e-02	-0,14	0,11
SX: Macho	1	-1,05e-01	6,44e-02	-0,23	2,16e-02
ST: La Picada	1	-2,74e-01	8,36e-02	-0,44	-0,11
Tto	0,712	-8,53e-02	8,13e-02	-0,24	7,40e-02
Año: 2	1	-1,89e-01	7,98e-02	-0,35	-3,30e-02
EST: Primavera	1	-5,77e-02	8,60e-02	-0,23	0,11
EST: Verano		2,59e-02	1,18e-01	-0,21	0,26
EST: Otoño		-2,28e-01	1,18e-01	-0,46	1,86e-03
Dens	0,288	-1,95e-02	5,01e-02	-0,12	7,87e-02

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A35. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de factores ambientales e individuales con los tipos parasitarios analizados.*

Modelos seleccionados	<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<i>Nematodos: glmmadmb(nematodos~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campaña)</i>				
1 CC+SP+EST+SX	11	1788,48	0	0,496
2 CC+SP+EST+SX+Dens	12	1789,73	1,24	0,266
3 CC+EST+SX	10	1789,95	1,47	0,238
<i>Cestodos: glmmadmb(cestodos~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campaña)</i>				
1 SP+EST	9	274,12	0	0,556
2 SP+EST+ST	10	275,82	1,70	0,237
3 SP+EST+Año	10	276,09	1,97	0,207
<i>Garrapatas: glmmadmb(garrapatas~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+(I grilla)+(I campaña)</i>				
1 SP+EST+SX+Año	11	888,08	0	0,214
2 SP+EST+SX+Año+ST	12	888,33	0,24	0,190
3 SP+EST+Año	10	888,48	0,40	0,176
4 SP+EST+Año+ST	11	888,58	0,50	0,167
5 SP+ESTSX+Año+Tto	12	889,77	1,69	0,092
6 SP+EST+SX+Año+ST+Tto	13	890,02	1,94	0,081
7 SP+EST+Año+Tto	11	890,07	1,98	0,079

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Ácaros: $g\text{lm}m\text{admb}(\acute{a}\text{c}\text{a}\text{r}\text{o}\text{s}\sim\text{Tto}+\text{Dens}+\text{ST}+\text{EST}+\text{A}\acute{\text{n}}\text{o}+\text{SP}+\text{SX}+\text{CC}+(I|grilla)+(I|campan\acute{a}))$

1	SP+SX	7	1439,67	0	0,167
2	SP+SX+ST	8	1440,00	0,34	0,141
3	SP+SX+CC	8	1440,30	0,63	0,121
4	SP+SX+Tto	8	1440,77	1,10	0,096
5	SP+SX+ST+CC	9	1440,84	1,18	0,093
6	SP+SX+ST+tto	9	1440,90	1,23	0,090
7	SP+SX+CC+Año	9	1441,12	1,46	0,080
8	SP+SX+ST+CC+Año	10	1441,20	1,53	0,078
9	SP+SX+CC+Tto	9	1441,44	1,77	0,069
10	SP+SX+Dens	8	1441,54	1,87	0,065

Pulgas: $g\text{lm}m\text{admb}(\text{p}\text{u}\text{l}\text{g}\text{a}\text{s}\sim\text{Tto}+\text{Dens}+\text{ST}+\text{EST}+\text{A}\acute{\text{n}}\text{o}+\text{SP}+\text{SX}+\text{CC}+(I|grilla)+(I|campan\acute{a}))$

1	CC+SP+SX+Dens	9	506,23	0	0,227
2	CC+SP+SX+Dens+Tto	10	506,93	0,70	0,160
3	SP+SX+Dens	8	507,01	0,78	0,154
4	SP+SX+Dens+Año	9	507,29	1,06	0,134
5	SP+SX+Dens+Tto+Año	10	507,61	1,38	0,114
6	SP+SX+Dens+Tto	9	507,69	1,46	0,109
7	SP+SX+Dens+ST	10	507,85	1,62	0,101

*

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Piojos: glmmadmb(piojos~Tto+Dens+ST+EST+Año+SP+SX+CC+
(I|grilla)+(I|campana)

1	CC+SP+EST+SX	12	859,77	0	0,366
2	CC+SP+SX+tto	9	860,60	0,83	0,241
3	CC+SP+SX+Año	9	860,63	0,86	0,238
4	CC+SP+EST	11	861,49	1,72	0,155

Tabla A36. Estimación de parámetros asociados con la carga de nematodos gastrointestinales (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		3,08	4,93e-01	2,12	4,05
CC	1	-1,69e-01	0,74e-01	-3,14e-01	-2,51e-02
SP: <i>Calomys</i>	0,762	-4,28e-01	3,48e-01	-1,11	2,54e-01
EST: Primavera	1	7,69e-01	3,43e-01	9,74e-02	1,44
EST: Verano		1,33	3,98e-01	5,54e-01	2,12
EST: Otoño		2,01e-01	4,26e-01	-6,34e-01	1,04
SX: Macho	1	8,34e-01	2,12e-01	4,19e-01	1,25
Dens	0,266	0,10e-01	0,24e-01	-3,82e-02	5,73e-02

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A37. Estimación de parámetros asociados con la carga de cestodos gastrointestinales (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,08	0,66	-2,37	0,21
SP: <i>Calomys</i>	1	-1,87	0,49	-2,83	-0,91
EST: Primavera	1	0,98	0,64	-0,26	2,23
EST: Verano		2,38	0,70	1,01	3,75
EST: Otoño		1,65	0,70	0,27	3,03
ST: La Picada	0,237	-8,31e-02	0,28	-0,64	0,47
Año: 2	0,207	4,60e-02	0,22	-0,39	0,48

Tabla A38. Estimación de parámetros asociados con la carga de garrapatas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-2,37	1,11	-4,54	-0,20
SP: <i>Calomys</i>	1	0,84	0,29	0,27	1,42
EST: Primavera	1	1,37	0,46	0,47	2,27
EST: Verano		2,10	0,49	1,13	3,07
EST: Otoño		2,67	0,56	1,58	3,77
SX: Macho	0,577	0,23	0,27	-0,30	0,76

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Año: 2	1	0,99	0,32	0,35	1,62
ST: La Picada	0,438	-0,86	1,35	-3,51	1,79
Tto	0,253	-0,27	0,82	-1,88	1,33

Tabla A39. Estimación de parámetros asociados con la carga de ácaros (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		6,56e-01	0,42	-1,66e-01	1,48
SP: <i>Calomys</i>	1	1,73	0,17	1,39	2,07
SX: Macho	1	1,16	0,16	8,43e-01	1,47
ST: La Picada	0,401	1,20e-01	0,19	-2,53e-01	0,49
CC	0,441	4,30e-02	6,96e-02	-9,35e-02	0,18
Tto	0,255	-6,20e-02	0,14	-3,42e-01	0,22
Año: 2	0,158	6,07e-02	0,18	-3,01e-01	0,42
Dens	0,065	-1,08e-03	8,99e-03	-1,87e-02	1,65e-02

Tabla A40. Estimación de parámetros asociados con la carga de pulgas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-2,83	0,77	-4,34	-1,31
CC	0,489	-1,04e-01	0,13	-3,65e-01	1,58e-01
SP: <i>Calomys</i>	1	2,67	0,42	1,84	3,50

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

SX: Macho	1	1,01	0,29	4,38e-01	1,58
Dens	1	9,98e-02	0,04	1,41e-02	1,85e-01
Tto	0,383	-2,27e-01	0,38	-9,77e-01	5,24e-01
Año: 2	0,248	1,56e-01	0,34	-5,09e-01	8,21e-01
ST: La Picada	0,101	4,42e-02	0,22	-3,83e-01	4,72e-01

Tabla A41. Estimación de parámetros asociados con la carga de piojos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,40	1,70	-4,73	1,93
CC	1	-0,46	0,26	-0,97	5,42e-02
SP: <i>Calomys</i>	1	4,63	0,71	3,23	6,02
EST: Primavera	0,521	0,11	0,56	-0,98	1,21
EST: Verano		0,75	0,95	-1,11	2,61
EST: Otoño		-0,33	0,73	-1,76	1,10
SX: Macho	0,845	0,95	0,59	-0,22	2,12
Año: 2	0,604	-0,24	0,73	-1,66	1,19
Tto	0,241	6,73e-02	0,84	-1,58	1,72
Dens	0,155	-1,52e-02	4,72e-02	-0,11	7,74e-02

Tabla A42. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación entre la razón N:L y parásitos presentes en roedores de vida libre.*

Modelos seleccionados	<i>k</i>	AICc	Δ AICc	w_i
<u>Nematodos:</u> $glmmadmb(nematodos \sim N:L+SX+CC+Dens+EST+(I grilla)+(I campana))$				
1 CC+N:L+SX	8	1781,60	0	0,725
2 CC+N:L+SX+EST	11	1783,54	1,94	0,275
<u>Cestodos:</u> $glmmadmb(cestodos \sim N:L+SP+EST+Año+(I grilla)+(I campana))$				
1 SP+EST	9	267,84	0	0,544
2 SP+EST+N:L	10	269,44	1,59	0,245
3 SP+EST+Año	10	269,74	1,89	0,211
<u>Garrapatas:</u> $glmmadmb(garrapatas \sim N:L+SP+CC+Dens+EST+Año+(I grilla)+(I campana))$				
1 SP+N:L+EST+Año	11	879,16	0	0,700
2 SP+N:L+EST+Año+Dens	12	880,86	1,70	0,300
<u>Ácaros:</u> $glmmadmb(acaros \sim N:L+SP+SX+CC+Dens+(I grilla)+(I campana))$				
1 CC+SP+N:L+SX	9	1481,38	0	0,650
2 CC+SP+SX	8	1482,62	1,24	0,350
<u>Pulgas:</u> $glmmadmb(pulgas \sim N:L+SP+SX+CC+Dens+(I grilla)+(I campana))$				
1 CC+SP+N:L+SX+Dens	10	494,43	0	1

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “N:L”, razón neutrófilo:linfocito; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

<i>Piojos: glmmdmb(piojos~N:L+SP+CC+Dens+(I grilla)+(I campana)</i>					
1	SP+N:L+Dens	8	824,66	0	0,372
2	SP+N:L	7	825,33	0,67	0,266
3	SP+Dens	7	825,72	1,06	0,219
4	SP+N:L+Dens+CC	9	826,58	1,92	0,143

Tabla A43. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de nematodos gastrointestinales (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		3,46	3,58e-01	2,76	4,16
CC	1	-1,33e-01	6,80e-02	-0,27	1,26e-04
N:L	1	5,44e-01	1,04e-01	0,34	0,75
SX: Macho	1	5,54e-01	1,56e-01	0,25	0,86
EST: Primavera	0,275	2,57e-02	1,47e-01	-0,26	0,32
EST: Verano		1,27e-01	2,57e-01	-0,38	0,63
EST: Otoño		-5,33e-02	1,95e-01	-0,44	0,33

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “N:L”, razón neutrófilo:linfocito; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A44. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de garrapatas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,38	0,63	-2,62	-1,49e-01
SP: <i>Calomys</i>	1	5,99e-01	0,23	1,45e-01	1,05
N:L	1	2,98e-01	0,11	7,38e-02	5,21e-01
EST: Primavera	1	5,07e-01	0,32	-1,14e-01	1,13
EST: Verano		1,54	0,35	8,55e-01	2,22
EST: Otoño		1,61	0,36	9,00e-01	2,31
Año: 2	1	1,07	0,20	6,75e-01	1,47
Dens	0,300	6,34e-03	1,82e-02	-2,94e-02	4,20e-02

Tabla A45. Estimación de la asociación entre la razón N:L y otros parámetros con la carga de pulgas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,68	5,11e-01	-2,69	-6,84e-01
N:L	1	3,34e-01	1,31e-01	7,81e-01	5,91e-01
Dens	1	9,70e-02	2,33e-02	5,13e-02	1,43e-01
SX: Macho	1	9,27e-01	2,32e-01	4,72e-01	1,38
SP: <i>Calomys</i>	1	2,11	3,83e-01	1,36	2,87
CC	1	-3,08e-01	8,16e-02	-4,68e-01	-1,48e-01

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “N:L”, razón neutrófilo:linfocito; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A46. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de nematodos gastrointestinales.*

Modelos seleccionados	<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>	
<u>Leucocitos totales:</u> $glmmadmb(nematodos \sim Leuco + EST + SX + CC + ST + (I grilla) + (I campana))$					
1	CC+SX	7	1799,59	0	0,515
2	CC+SX+EST	10	1801	1,40	0,255
3	CC+SX+ST	8	1801,21	1,62	0,230
<u>Linfocitos:</u> $glmmadmb(nematodos \sim Linfo + EST + SX + CC + ST + (I grilla) + (I campana))$					
1	CC+Linfo+SX	8	1799,34	0	0,238
2	CC+SX	7	1799,59	0,26	0,210
3	CC+Linfo+SX+EST	11	1800,48	1,14	0,134
4	CC+Linfo+SX+Año	9	1800,62	1,28	0,125
5	CC+SX+EST	10	1801	1,66	0,104
6	CC+SX+Año	8	1801,07	1,73	0,100
7	CC+Linfo+SX+EST+Año	12	1801,32	1,98	0,088
<u>Monocitos:</u> $glmmadmb(nematodos \sim Mono + EST + SX + CC + ST + (I grilla) + (I campana))$					
1	CC+Mono+SX	8	1797,86	0	0,446
2	CC+Mono+SX+EST	11	1798,25	0,39	0,367
3	CC+SX	7	1799,59	1,73	0,187
<u>Neutrófilos:</u> $glmmadmb(nematodos \sim Neutro + EST + SX + CC + ST + (I grilla) + (I campana))$					
1	CC+Neutro+SX	8	1785,36	0	1

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “N:L”, razón neutrófilo:linfocito; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Eosinófilos: glmmadmb(nematodos~Eosi+EST+SX+CC+ST+(I|grilla)+(I|campaña)

1	CC+SX	7	1799,59	0	0,507
2	CC+SX+EST	10	1801	1,40	0,251
3	CC+SX+Año	8	1801,07	1,48	0,242

Anticuerpos naturales: glmmadmb(nematodos~AcNs+EST+SX+CC+ST+(I|grilla)+(I|campaña)

1	EST+SX+Año	10	1150,50	0	0,266
2	EST+Año	9	1150,82	0,31	0,228
3	EST+SX+Año+CC	11	1151,19	0,69	0,189
4	SX+Año	7	1152,32	1,82	0,107
5	Año	6	1152,36	1,85	0,105
6	EST+Año+CC	10	1152,39	1,88	0,104

Tabla A47. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de nematodos gastrointestinales (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		3,51	3,48e-01	2,83	4,19
CC	1	-1,52e-01	7,09e-02	-2,91e-01	-1,27e-02
Neutro	1	1,6e-04	3,3e-05	9,56e-05	2,25e-04
SX: Macho	1	5,87e-01	1,56e-01	2,81e-01	8,92e-01

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A48. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de cestodos gastrointestinales.*

Modelos seleccionados		<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<u>Leucocitos totales:</u> $glmmadmb(cestodos \sim Leuco + SP + EST + (1 grilla) + (1 campana))$					
1	SP+EST	9	267,84	0	0,727
2	SP+EST+Leuco	10	269,81	1,96	0,273
<u>Linfocitos:</u> $glmmadmb(cestodos \sim Linfo + SP + EST + Año + (1 grilla) + (1 campana))$					
1	SP+EST	9	267,84	0	0,721
2	SP+EST+Año	10	269,74	1,89	0,279
<u>Monocitos:</u> $glmmadmb(cestodos \sim Mono + SP + EST + Año + (1 grilla) + (1 campana))$					
1	SP+EST	9	267,84	0	0,721
2	SP+EST+Año	10	269,74	1,89	0,279
<u>Neutrófilos:</u> $glmmadmb(cestodos \sim Neutro + SP + CC + Dens + EST + (1 grilla) + (1 campana))$					
1	SP+EST	9	267,84	0	0,721
2	SP+EST+Año	10	269,74	1,89	0,279
<u>Eosinófilos:</u> $glmmadmb(cestodos \sim Eosi + SP + EST + Año + (1 grilla) + (1 campana))$					
1	SP+EST	9	267,84	0	0,506
2	SP+EST+Eosi	10	268,90	1,05	0,298
3	SP+EST+Año	10	269,74	1,89	0,196

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Anticuerpos naturales: $glmmadmb(\text{cestodos} \sim \text{AcNs} + \text{SP} + \text{ST} + \text{EST} + \text{Año} + (I|\text{grilla}) + (I|\text{campaña}))$

1	SP+EST	9	205,23	0	0,671
2	SP+EST+ST	10	206,66	1,42	0,329

Tabla A49. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de garrapatas.*

Modelos seleccionados		k	AICc	ΔAICc	w_i
<u>Leucocitos totales:</u> $glmmadmb(\text{garrapatas} \sim \text{Leuco} + \text{SP} + \text{EST} + \text{Año} + (I \text{grilla}) + (I \text{campaña}))$					
1	SP+EST+Año	10	882,81	0	0,514
2	SP+EST+Año+Leuco	11	882,92	0,11	0,486
<u>Linfocitos:</u> $glmmadmb(\text{garrapatas} \sim \text{Linfo} + \text{SP} + \text{EST} + \text{Año} + (I \text{grilla}) + (I \text{campaña}))$					
1	SP+EST+Año	10	882,81	0	0,715
2	SP+EST+Año+Linfo	11	884,65	1,84	0,285
<u>Monocitos:</u> $glmmadmb(\text{garrapatas} \sim \text{Mono} + \text{SP} + \text{EST} + \text{Año} + (I \text{grilla}) + (I \text{campaña}))$					
1	SP+Mono+EST+Año	11	881,30	0	0,680
2	SP+EST+Año	10	882,81	1,51	0,320
<u>Neutrófilos:</u> $glmmadmb(\text{garrapatas} \sim \text{Neutro} + \text{SP} + \text{CC} + \text{Dens} + \text{EST} + \text{Año} + (I \text{grilla}) + (I \text{campaña}))$					
1	SP+Neutro+EST+Año	11	869,69	0	0,659
2	SP+Neutro+EST+Año+CC	12	871,01	1,32	0,341

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Eosinófilos: glmmadmb(garrapatas~Eosi+SP+EST+Año+(1|grilla)+

(1|campaña)

1	SP+EST+Año	10	882,81	0	1
---	------------	----	--------	---	---

Anticuerpos naturales: glmmadmb(garrapatas~AcNs+SP+ST+EST+Año+(1|grilla)+

(1|campaña)

1	SP+EST+Año	10	513,31	0	0,449
---	------------	----	--------	---	-------

2	SP+EST+Año+ST	11	513,61	0,30	0,386
---	---------------	----	--------	------	-------

3	SP	6	515,31	2	0,165
---	----	---	--------	---	-------

Tabla A50. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de garrapatas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,75	0,79	-3,31	-1,96e-01
SP: <i>Calomys</i>	1	6,57e-01	0,23	2,11	1,10
Neutro	1	1,46e-04	3,16e-05	8,41	2,08e-04
EST: Primavera	1	4,98e-01	0,32	-1,28	1,12
EST: Verano		1,55	0,35	8,72	2,24
EST: Otoño		1,64	0,36	9,37	2,35
Año: 2	1	1,13	0,27	6,11	1,66
CC	0,341	3,53e-02	7,85e-02	-1,19	1,89e-01

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A51. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de ácaros.*

Modelos seleccionados		<i>k</i>	AICc	Δ AICc	w_i
<u>Leucocitos totales:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim Leuco + SP + SX + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	SP+SX	7	1484,71	0	0,718
2	SP+SX+Leuco	8	1486,58	1,87	0,282
<u>Linfocitos:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim Linfo + SX + SP + A\tilde{n}o + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	SP+SX	7	1484,71	0	0,664
2	SP+SX+Linfo	8	1486,07	1,36	0,336
<u>Monocitos:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim Mono + SX + SP + A\tilde{n}o + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	SP+SX	7	1484,71	0	0,586
2	SP+SX+Mono	8	1485,41	0,70	0,414
<u>Neutrófilos:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim Neutro + SX + CC + SP + Dens + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	CC+SP+Neutro+SX	9	1476,69	0	1
<u>Eosinófilos:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim Eosi + SX + SP + A\tilde{n}o + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	SP+SX	7	1484,71	0	0,595
2	SP+SX+Eosi	8	1485,49	0,77	0,405
<u>Anticuerpos naturales:</u> $glmmadmb(\acute{a}caros \sim AcNs + SX + SP + ST + A\tilde{n}o + (I grilla) + (I campan\tilde{a}))$					
1	SP+SX+AcNs	8	981,67	0	0,542
2	SP+SX	7	982,01	0,34	0,458

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A52. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de ácaros (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		5,07e-01	3,74e-01	-2,25e-01	1,24
CC	1	1,70e-01	6,17e-02	4,91e-02	2,91e-01
SP: <i>Calomys</i>	1	1,26	1,62e-01	9,46e-01	1,58
Neutro	1	9,97e-05	3,15e-05	3,79e-05	1,61e-04
SX: Macho	1	1,06	1,51e-01	7,62e-01	1,35

Tabla A53. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de pulgas.*

Modelos seleccionados	<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<u>Leucocitos totales:</u> <i>glmmadmb(pulgas~Leuco+SP+SX+Dens+(1 grilla)+(1 campana))</i>				
1 SP+SX+Dens	8	504,11	0	0,711
2 SP+SX+Dens+Leuco	9	505,91	1,80	0,289
<u>Linfocitos:</u> <i>glmmadmb(pulgas~Linfo+SX+SP+Dens+Año+(1 grilla)+(1 campana))</i>				
1 SP+Linfo+SX+Dens+Año	10	501	0	0,544
2 SP+SX+Dens+Año	9	501,35	0,35	0,456
<u>Monocitos:</u> <i>glmmadmb(pulgas~Mono+SX+SP+Dens+Año+(1 grilla)+(1 campana))</i>				
1 SP+SX+Dens+Año	9	501,35	0	1
<u>Neutrófilos:</u> <i>glmmadmb(pulgas~Neutro+SX+CC+SP+Dens+(1 grilla)+(1 campana))</i>				
1 CC+SP+Neutro+SX+Dens	10	495,63	0	1

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

<i>Eosinófilos: glmmadmb(pulgas~Eosi+SX+SP+Dens+Año+(I grilla)+(I campaña)</i>					
1	Eosi+ SP + SX +Dens+Año	10	501,03	0	0,540
2	SP + SX +Dens+Año	9	501,35	0,32	0,460
<i>Anticuerpos naturales: glmmadmb(pulgas~AcNs+SX+SP+Dens+ST+(I grilla)+(I campaña)</i>					
1	SP	6	293,07	0	0,354
2	SP + ST	7	293,08	0,001	0,353
3	SP + ST +AcNs+ SX +Dens	10	293,45	0,38	0,293

Tabla A54. Estimación de la asociación de los neutrófilos y otros parámetros con la carga de pulgas (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		-1,68	5,45e-01	-2,75	-6,16e-01
CC	1	-3,03e-01	8,88e-02	-4,77e-01	-1,29e-01
SP: <i>Calomys</i>	1	2,12	3,84e-01	1,37	2,87
Neutro	1	8,67e-05	3,96e-05	9,01e-06	1,64e-04
Dens	1	9,27e-02	2,44e-02	4,49e-02	1,41e-01
SX: Macho	1	9,39e-01	2,37e-01	4,74e-01	1,40

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A55. Resumen de la selección de modelos que describen la asociación de la función inmune y otros factores con la carga de piojos.

Modelos seleccionados		<i>k</i>	AICc	Δ AICc	<i>w_i</i>
<u>Leucocitos totales: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{Leuco} + \text{SP} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP	6	826,95	0	0,522
2	SP+Leuco	7	827,13	0,18	0,478
<u>Linfocitos: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{Linfo} + \text{SP} + \text{Año} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP+Linfo	7	823,29	0	1
<u>Monocitos: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{Mono} + \text{SP} + \text{Año} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP	6	826,95	0	0,635
2	SP+Mono	7	828,06	1,10	0,365
<u>Neutrófilos: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{Neutro} + \text{SX} + \text{CC} + \text{SP} + \text{Año} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP	6	826,95	0	0,607
2	SP+Neutro	7	827,82	0,87	0,393
<u>Eosinófilos: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{Eosi} + \text{SP} + \text{Año} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP	6	826,95	0	1
<u>Anticuerpos naturales: $glmmadmb(\text{piojos} \sim \text{AcNs} + \text{SP} + \text{ST} + \text{Año} + (1 \text{grilla}) + (1 \text{campana}))$</u>					
1	SP	6	498,66	0	0,666
2	SP+AcNs	7	500,04	1,38	0,334

*

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

Tabla A56. Estimación de la asociación de los linfocitos y otros parámetros con la carga de piojos (en negrita, las variables con IC que excluyen el 0).*

Variable	Verosimilitud	Coeficiente	EE	IC 95%	
				Inferior	Superior
Intercepto		4,80e-01	6,25e-01	-7,45e-01	1,70
Linfo	1	-1,15e-04	5,08e-05	-2,14e-04	-1,50e-05
SP: <i>Calomys</i>	1	2,71	4,81e-01	1,76	3,65

* **Referencias:** “EE”, error estándar; “IC”, Intervalo de Confianza; “Leuco”, leucocitos totales; “Linfo”, linfocitos; “Mono”, monocitos; “Neutro”, neutrófilos; “Eosi”, eosinófilos; “AcNs”, anticuerpos naturales; “Tto”, tratamiento; “Dens”, capturas por especie; “ST”, sitio de muestreo; “EST”, estación del año; “Año”, año de captura; “SP”, especie; “SX”, sexo; “CC”, condición corporal.

ANEXO III

Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral

Cuervo, P.F., Racca, A.L., Beldomenico, P.M., 2016. Growth patterns in male rats exposed to concurrent long-term environmental challenges. *Rev. FAVE - Ciencias Vet* 15, 14-20.