



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias Doctorado en
Ciencias Veterinarias

Tesis presentada para optar por el grado académico
de Doctorado en Ciencias Veterinarias

“Inversión inmunológica del yacaré overo (*Caiman
latirostris*) ante situaciones de estrés”

Autor: Lic. María Soledad Moleón Bersani

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología de Enfermedades (ICIVET- Litoral,
UNL-CONICET), Proyecto yacaré-Laboratorio de Zoología aplicada-UNL.

Director: Dr. Pablo A. Siroski

Co-Director: Dr. Pablo M. Beldomenico

Año 2019

Agradecimientos

A mis padres, Juan y Liliana por que gracias a ellos soy lo que soy.

A mis hermanos y sobrinos por ayudarme y alentarme siempre.

A Mauricio, por acompañarme y compartir este camino.

A mi director, Dr. Pablo A. Siroski por confiar en mi para la realización de esta tesis, por incentivarme y contribuir en mi formación.

A mi co-director, Dr. Pablo M. Beldoménico por brindarme su experiencia y compartir sus conocimientos.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Dra. Evelyn López González y Dra. Agustina Latorre por sus aportes, colaboración y por compartir tantos buenos momentos.

Al Dr. Pablo Cuervo y a la Lic. Cecilia Fantozzi por el tiempo que me dedicaron, su predisposición para ayudarme siempre, por alojarme en su casa y por compartir muchas aventuras.

A las doctoras Ma. Virginia Parachú Marcó y Gisela Poletta por su colaboración en todo momento.

A la Lic. Lucia Fernandez por sus consejos, generosidad y predisposición.

A la Lic. Alba Imhof y al Med. Vet. Alejandro Larriera por permitirme llevar a cabo esta tesis en las instalaciones del Proyecto yacaré y por su apoyo.

A todos los integrantes del Proyecto yacaré que de alguna manera u otra participaron de este trabajo.

A la Lic. Elisa Pietrobon y Dra. Graciela Jahn del Imbecu-Conicet-Mendoza por rebirme en su laboratorio y por su buena onda siempre.

A todos los chicos del Laboratorio de Biología molecular del ICIVET por su generosidad, colaboración y por compartir las instalaciones.

A Gonzalo, Quique, Leandro del ICIVET y a Guillermo de la FCV por su contribución para el desarrollo de las técnicas de laboratorio.

A todos los integrantes del LECeN por el espacio que me brindaron y lo que me enseñaron a lo largo de esta investigación.

Al CONICET por otorgarme la beca y hacer posible la ejecución de esta investigación y a la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNL.

RESUMEN

Los cocodrilos son representantes de un antiguo linaje de archosaurios con importancia evolutiva, ecológica y económica. *Caiman latirostris* (yacaré overo) es una de las dos especies del género *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae) que habitan en Argentina. En la naturaleza, se enfrentan a numerosos factores estresantes de largo y corto plazo de duración, como los factores climáticos, la exposición a sustancias tóxicas e infecciones, pudiendo afectar los procesos fisiológicos con consecuencias sobre su estado físico y su supervivencia. En este contexto, se realizaron dos ensayos de laboratorio (crónico y agudo) utilizando diferentes factores de estrés ambiental y un estudio a campo incluyendo los factores antrópicos, para medir los efectos sobre los parámetros inmunológicos seleccionados, índices genéricos de condición fisiológica y glucocorticoides en sangre. Se encontró que en el estudio de estrés crónico, la privación de alimentos causó efectos negativos sobre los parámetros de crecimiento, pero desencadenó una inversión en la generación de NAb. El tratamiento donde los animales estuvieron expuestos a temperaturas elevadas resultó ser beneficioso, donde se detectó un mayor crecimiento, además de tener mejores condiciones corporales, niveles más altos de NAb y niveles más bajos de corticosterona. En el ensayo de estrés agudo, los individuos bajo restricción física de movimiento incrementaron los niveles de corticosterona e indujeron una redistribución leucocitaria para aumentar la vigilancia inmune en los órganos. En el estudio a campo, se presentan resultados preliminares. Los pichones tuvieron mayor longitud, altos títulos de NAb y menor actividad del complemento. Estos hallazgos proponen una mirada integral del problema y generan nuevos interrogantes acerca de la interrelación estrés-función inmune-ambiente que expandirá nuestra comprensión.

ABSTRACT

Crocodylians are an ancient lineage of archosaurs with evolutionary, economic, and ecological importance. *Caiman latirostris* (broad snouted-caiman) is one of the two species of the genus *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae) that occur in Argentina. In the wild, crocodylians face numerous stressors such as climatic factors, toxicant exposure, and infection that may affect the physiological processes, with consequences on its fitness and survival. In this context, two laboratory assays (chronic and acute) using different stress factors and an observational field study were conducted to measure the effects on the selected immunological parameters, generic indices of physiological condition and glucocorticoids in blood. It was found that in the chronic stress study, food deprivation caused negative effects on growth parameters, but triggered an investment in the generation of NAb. While the treatment temperature was beneficial, in which caimans grew more, had better body conditions, higher levels of NAb and lower levels of corticosterone. In the acute stress assay, individuals under restriction of movement increased corticosterone levels and induced a leukocyte redistribution to increase immune protection in the organs. In the field study, hatchlings had longer length, higher NAb titers and lower complement activity. These findings propose a comprehensive view of the problem and elicit new questions about the stress/immune functions-environment interaction that will expand our understanding.

INDICE GENERAL

<i>Agradecimientos</i>	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
INDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	XII
Capítulo 1-Introducción general	1
1.1 Generalidades del Orden crocodilia	2
1.2 Yacaré overo (<i>Caiman latirostris</i>)	5
1.3 Programa de conservación de uso sustentable de la especie	
“Proyecto yacaré”	8
1.3.1 Estatus poblacional en la actualidad	11
1.4 Mecanismos fisiológicos de estrés	12
1.4.1 Factores generadores de estrés	12
1.4.2 Definición de estrés y respuesta al estrés	13
1.5 Sistema inmune	16
1.6 Sistema inmune en cocodrilianos	18
1.7 Sistema del Complemento	20
1.8 Células Sanguíneas	22
1.9 Anticuerpos	25
1.10 Interacción entre la respuesta al estrés y la respuesta inmune	27
1.11 Hipótesis y objetivos	29
1.11.1 Hipótesis	29
1.11.2 Objetivo General	29
1.11.3 Objetivos Específicos	29
Capítulo 2- Exposición crónica de juveniles de <i>Caiman latirostris</i> ante situaciones de estrés	
.....	30
2.1 Introducción	31
2.2 Materiales y métodos	33
2.2.1 Animales	33
2.2.2 Diseño experimental	33
2.2.3 Toma de muestras	35
2.2.4 Medición de los niveles de corticosterona	35
2.2.5 Medición de los índices inmunológicos	36

2.2.5.1	<i>Recuento total de glóbulos blancos (TWBC)</i>	36
2.2.5.2	<i>Análisis de las subpoblaciones de glóbulos blancos</i>	36
2.2.5.3	<i>Ensayo de anticuerpos naturales (NABs)</i>	36
2.2.5.4	<i>Actividad del sistema del complemento</i>	37
2.2.6	<u>Medición de parámetros bioquímicos</u>	37
2.2.6.1	<i>Determinación de proteínas totales, albuminas y Glicemia enzimática</i>	37
2.2.7	<u>Análisis estadístico</u>	38
2.3	Resultados	39
2.3.1	<u>Comparaciones de base</u>	39
2.3.2	<u>Evaluación del crecimiento</u>	39
2.3.3	<u>Medición de los niveles de corticosterona</u>	41
2.3.4	<u>Índices inmunológicos</u>	42
2.3.5	<u>Medición de parámetros bioquímicos</u>	44
2.4	Discusión	46
Capítulo 3- <u>Evaluación de la respuesta inmediata al estrés físico y químico en <i>Caiman latirostris</i></u>		
		51
3.1	Introducción	52
3.2	Materiales y métodos	54
3.2.1	<u>Animales utilizados</u>	54
3.2.2	<u>Diseño experimental</u>	54
3.2.3	<u>Toma de muestras</u>	56
3.2.4	<u>Medición de los niveles de corticosterona</u>	56
3.2.5	<u>Índices inmunológicos</u>	56
3.2.6	<u>Análisis estadístico</u>	57
3.3	Resultados	57
3.3.1	<u>Comparaciones iniciales</u>	57
3.3.2	<u>Niveles de Corticosterona</u>	60
3.3.3	<u>Efectos de los tratamientos sobre los índices inmunológicos</u>	61
3.3.3.1	<i>Recuento total de Leucocitos (TWBC)</i>	61
3.3.3.2	<i>Recuento de los distintos tipos leucocitarios</i>	63
3.4	Discusión	68
Capítulo 4- <u>Determinación de los niveles de corticosterona y parámetros inmunológicos en poblaciones silvestres de <i>C. latirostris</i></u>		
		73
4.1	Introducción	74
4.2	Materiales y Métodos	75

4.2.1 <u>Sitios de muestreo</u>	75
4.2.2 <u>Captura y manipulación de los animales</u>	76
4.2.3 <u>Obtención de las muestras</u>	78
4.2.4 <u>Variables ambientales</u>	79
4.2.5 <u>Medición de los niveles de corticosterona</u>	79
4.2.6 <u>Índices inmunológicos</u>	79
4.2.7 <u>Análisis estadístico</u>	79
4.3 Resultados	80
4.4 Discusión	83
Capítulo 5- <u>Discusión general y conclusiones finales</u>	85
5.1 Discusión general	86
5.2 Conclusiones finales	90
BIBLIOGRAFÍA CITADA	91
PUBLICACIONES	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Valores medios, mínimos y máximos para el crecimiento, Bc (condición corporal), CORT (corticoesterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), PPT (proteínas plasmáticas totales), A (Albúmina) y GLI (Glicemia enzimática) medidos en <i>C. latirostris</i> en cada tratamiento de estrés.....	39
Tabla 2.2 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre los parámetros somáticos.....	40
Tabla 2.3 Modelo lineal mixto que evalúa el efecto de los tratamientos en el recuento total y en los diferentes tipos de glóbulos blancos.....	43
Tabla 2.4 Modelos lineales mixtos generalizados que describen el efecto de los tratamientos sobre los títulos de anticuerpos naturales.....	43
Tabla 2.5 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre las concentraciones de glucosa.....	45
Tabla 2.6 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre la concentración de albúmina	45
Tabla 3.7 Valores medios, mínimos y máximos del tamaño de los individuos de <i>C. latirostris</i> , TL (longitud total), LHC (longitud hocico-cloaca), P (peso) en cada uno de los tratamientos de estrés.....	58
Tabla 3.8 Valores medios, mínimos y máximos para CORT (corticoesterona), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en <i>C. latirostris</i> en el tratamiento de estrés agudo con restricción física	58
Tabla 3.9 Valores medios, mínimos y máximos para CORT (corticoesterona), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en <i>C. latirostris</i> en el tratamiento de estrés agudo con inyección de adrenocorticotropina	59
Tabla 3.10 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre las concentraciones de corticoesterona	60
Tabla 3.11 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección con adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre las concentraciones de corticoesterona	61
Tabla 3.12 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento total de leucocitos.....	62
Tabla 3.13 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección con adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento total de leucocitos	63

Tabla 3.14 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Linfocitos	64
Tabla 3.15 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Linfocitos	64
Tabla 3.16 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Heterófilos	65
Tabla 3.17 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Heterófilos.....	66
Tabla 3.18 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Eosinófilos	66
Tabla 3.19 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Eosinófilos	66
Tabla 3.20 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Monocitos	67
Tabla 3.21 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Monocitos	67
Tabla 4.22 Valores de los parámetros medidos en <i>C. latirostris</i> adultos CORT (corticosterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos)	81
Tabla 4.23 Valores medios, desvío estándar (SD), mínimos y máximos para el tamaño LT (longitud total), LHC (longitud hocico-cloaca), Peso, CORT (corticosterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en pichones de <i>C. latirostris</i>	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Diferenciación de ambas especies <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacaré</i>	3
Figura 1.2. Área de distribución de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Caiman yacare</i> en Sudamérica y en Argentina	4
Figura 1.3. Ejemplar adulto de <i>C. latirostris</i>	6
Figura 1.4 Pichón de <i>C. latirostris</i> naciendo	7
Figura 1.5 Nido de <i>Caiman latirostris</i> y cosecha de huevos en un ambiente natural	9
Figura 1.6 Acondicionamiento de los huevos respetando posición de huevos y material de nido al momento de la cosecha y sala de incubación artificial en las instalaciones del Proyecto Yacaré	10
Figura 1.7 Individualización por marcación de verticilos y recintos donde se alojan para su crianza	10
Figura 1.8 Esquema del eje H-P-A/I en vertebrados	15
Figura 1.9 Componentes de la inmunidad innata y adaptativa	17
Figura 1.10 Las tres vías de activación del sistema del complemento: vía clásica, vía de la lectina y la vía alternativa.....	22
Figura 1.11 Tipos celulares observados en extendidos sanguíneos de <i>Caiman latirostris</i> utilizando la tinción de May Grunwald-Giemsa.....	24
Figura 1.12 Esquema de la estructura molecular de un anticuerpo	27
Figura 2.13 Diagrama de la disposición de las bateas donde se encontraban alojados los grupos experimentales durante la exposición	34
Figura 2.14 Toma de muestra de sangre de la vena espinal de un individuo juvenil de <i>Caiman latirostris</i>	35
Figura 2.15 Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes sobre el peso, SVL y condición corporal	40
Figura 2.16 Efecto de los tratamientos sobre los niveles plasmáticos de corticosterona. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes sobre los niveles plasmáticos de corticosterona.....	42
Figura 2.17 Efecto de los tratamientos sobre los títulos de anticuerpos naturales. Diagramas	

de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes sobre los títulos de anticuerpos naturales..... 44

Figura 2.18 Efecto de los tratamientos sobre los valores de glicemia enzimática (A) y Albúmina (B). Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes sobre los valores de glicemia y Albúmina, expresados en mg/dl y g/L respectivamente..... 45

Figura 3.19 Inducción de estrés por inyección de ACTH sobre juveniles de *Caiman latirostris* 55

Figura 3.20 Toma de muestra de sangre de la vena espinal de un individuo subadulto de *Caiman latirostris* 56

Figura 3.21 Efecto de la restricción física (EF) sobre los niveles de corticosterona plasmática 60

Figura 3.22 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre los niveles de corticosterona plasmática 61

Figura 3.23 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento total de leucocitos..... 62

Figura 3.24 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento total de leucocitos 62

Figura 3.25 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Linfocitos 63

Figura 3.26 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Linfocitos 64

Figura 3.27 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Heterófilos..... 65

Figura 4.28 Localización geográfica de los sitios de captura de *C. latirostris* en ambientes naturales de la provincia de Santa Fe 76

Figura 4.29 Hembra de *C. latirostris* defendiendo el nido 77

Figura 4.30 Captura diurna de una hembra encontrada en un tanque australiano de recolección de agua 78

Figura 4.31 Extracción de sangre a una hembra de *C. latirostris* en ambiente silvestre 78

Figura 4.32 Promedio mensual de temperaturas y precipitaciones registradas durante las temporadas de recolección de muestras en ambientes naturales 80

Figura 4.33 Diagramas de caja que muestran las diferencias observadas en los anticuerpos naturales (a) y la actividad del complemento (b) en los pichones de los sitios de muestreo. 82

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A: Albúminas

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

CFB: Factor B del complemento

CFI: Factor I del complemento

CRH: Hormona corticotropina

CTL: Tratamiento control

CTLF: Tratamiento control restricción física

E: Eosinófilos

FR: Tratamiento restricción de alimento

GALT: Tejido asociado al intestino

GC: Glucocorticoides

GLI: Glicemia enzimática

GLMM: Modelos lineales generalizados

GR: Receptor de glucocorticoides

H: Heterófilos

HPA/I: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal/interrenal

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

L: Linfocitos

LMM: Modelos lineales mixtos

LPS: Lipopolisacáridos

LTA: Ácido lipoteichoico

M: Monocitos

MAC: Complejo de ataque de la membrana

MASP: Serino proteasas asociadas a MBL

MBL: Lectina de unión a manosa

MR: Receptor mineralocorticoide

NAb: Anticuerpos naturales

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PG: Peptidoglicano

PPT: Proteínas totales

RRBC: Glóbulos rojos de conejo

SAM: Sistema simpático-adrenal-medular

SI: Sistema inmune

TMP: Tratamiento alta temperatura

TNF: Factor de necrosis tumoral

WR: Tratamiento reducción de agua

Capítulo 1

Introducción general



1.1 Generalidades del Orden crocodylia

Los Crocodylia son un pequeño orden dentro de la clase Reptilia junto con otros cuatro órdenes: Sphenodontia (tuatara), Squamata (lagartos y serpientes), Testudines (tortugas) y Galliformes (aves). Al igual que las aves, los cocodrilos, son los únicos representantes vivientes del linaje antiguo *Archosauria* (grupo de vertebrados tetrápodos terrestres muy exitoso que dominó las comunidades animales durante la era Mesozoica) (Seijas, 2011). Los Crocodylia aparecieron sobre la tierra en el Triásico tardío, aproximadamente 220 millones de años, vieron aparecer y desaparecer a los dinosaurios, y según descubrimientos paleontológicos recientes, hasta se han alimentado de algunos de ellos (Piña et al., 2004). Este grupo de animales, fueron usados para propósitos medicinales y religiosos por los Aztecas y los Mayas en América y por los Egipcios en África. Las culturas más recientes han cazado a los cocodrilos por su piel. Como resultado, en la década de 1970, todas las especies de cocodrílidos se incluyeron en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas, con la consiguiente prohibición de su comercio internacional (Piña et al., 2015).

Dentro del orden, estas especies se encuentran clasificadas en tres familias separadas: Crocodylidae (cocodrilos verdaderos), Alligatoridae (alligators y caimanes) y Gavialidae (Huchzermeyer, 2002; Seijas, 2011). Sudamérica puede ser considerada como el continente de los Crocodylia, debido a que alberga la mayor diversidad de especies de este grupo.

A lo largo de su evolución, los cocodrilos han ocupado generalmente ambientes cálidos y acuáticos. Dentro de esos ecosistemas, son depredadores por excelencia, utilizando sus poderosas mandíbulas para capturar presas grandes y pequeñas (Brochu, 2003; van Hoek, 2014). Similares a todos los reptiles no aviares, los cocodrílidos son animales ectotérmicos y, por lo tanto, carecen de la tasa metabólica y el aislamiento necesarios para la endotermia (Coulson y Herbert, 1981). Como tal, la temperatura tiene efectos sustanciales sobre su rendimiento, comportamiento y los procesos fisiológicos, incluida la función inmune, la alimentación y la asimilación, la reproducción, el crecimiento y el desarrollo. Por lo tanto, para el desarrollo óptimo de sus procesos fisiológicos, los cocodrílidos deben regular su temperatura corporal a través de medios conductuales: tomar sol para elevar y/o sumergirse en el agua para disminuir su temperatura corporal (Angilletta et al., 2002; Lance, 2003; Basetti et al., 2014).

Estos animales ponen huevos con membranas amnióticas y, tanto el desarrollo embrionario como el sexo, están influenciados por la temperatura de incubación. Durante un período de

tiempo de la incubación denominado “Período Termosensible”, el embrión se diferencia en macho o en hembra (Lang, 1994; Elf, 2003; van Hoek, 2014). Sólo una de las especies Argentinas (*Caiman latirostris*) ha sido estudiada en detalle, en donde la temperatura de incubación constante a 33° C produce 100% machos, a temperaturas menores (31° y 29° C) y elevadas (34,5° C) se producen hembras pero la mortandad durante la incubación a esta última es alta (Parachú Marcó et al., 2017).

En la República Argentina están presentes dos especies de la Familia Alligatoridae: *Caiman latirostris* (Daudin 1802), vulgarmente conocido como yacaré overo o ñato, y *Caiman yacare* (Daudin 1802), conocido como yacaré negro. Las dos especies se pueden diferenciar con facilidad basándose en las estructuras craneanas y escutelares (Fig. 1.1) entre otras características morfológicas y comportamentales (Medem, 1983). Ambas especies se distribuyen en el centro-norte del país, pero *C. latirostris* llega más al sur que *C. yacare* (Larriera et al., 2011). Al parecer, la distribución más amplia de *C. latirostris* se debe a que esta especie posee una mayor tolerancia climática (Waller y Micucci, 1992). Por este motivo y por haber tenido una presión de caza mayor debido a la calidad de su piel, se ha reportado que las poblaciones de *C. latirostris* habían disminuido más que las de la otra especie. Sin embargo, actualmente en las provincias de Santa Fe, Corrientes y Formosa se conocen poblaciones suficientemente abundantes como para permitir la explotación comercial (Larriera e Imhof, 2006).



Figura 1.1 Yacaré overo, *Caiman latirostris* (izquierda) y yacaré negro *Caiman yacaré* (derecha).



Figura 1.2 Área de distribución de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* en Sudamérica (A) y en Argentina (B).

Los cocodrilos, al igual que otros reptiles, son modelos de vertebrados utilizados en el estudio de la mayoría de los campos de investigación, incluidos la genética, la inmunología y la toxicología. Constituyen un grupo “antiguo” que presentan una fisiología y comportamiento único e intrincado, crecimiento indefinido y fecundidad creciente a lo largo de la vida adulta. En virtud de ello, genera motivación el estudio de cómo la fisiología a nivel mecánico, la historia de vida a nivel de organismo y la selección natural en la escala evolutiva definen la vida en este grupo taxonómico. Sumado a esto, poseen adaptaciones particulares que probablemente explican el éxito evolutivo de este grupo a lo largo de millones de años, como así también su diversidad resultante y su distribución (Poletta et al., 2013).

Muchos miembros del orden Crocodylia son animales territoriales que se lastiman con frecuencia como consecuencia de disputas o peleas sociales intraespecíficas como agresiones interespecíficas. Estas disputas pueden llevar a serias heridas, desgarros y a menudo con pérdida de extremidades. Sin embargo a pesar de que viven en ambientes hostiles, ricos en microorganismos potencialmente patógenos, estas heridas generalmente sanan sin producirse algún tipo de infección. Así, varias especies de cocodrilos han demostrado ser resistentes a ciertas enfermedades (Webb y Manolis, 1983; Merchant et al., 2006).

El estudio de la inmunología de cocodrílidos aún se encuentra en sus comienzos, a pesar que numerosas investigaciones revelan cuán poderoso es el sistema inmune de estos animales a diferencia del sistema inmune humano, por lo que se requiere especial atención en el estudio de la inmunología en este antiguo grupo (Shaharabany et al., 1999; Merchant

et al., 2005; Finger, 2014). Merchant et al., (2003, 2004, 2005 y 2006) describen la eficacia antimicrobiana del suero de cocodrilo hacia bacterias, virus y amebas y la efectividad del sistema de complemento de los alligators en la destrucción de bacterias. Además, reportaron el amplio espectro de las propiedades antibióticas sobre bacterias, hongos y virus que mostró el extracto leucocitario, como también los efectos de lipopolisacáridos bacterianos sobre los leucocitos periféricos investigados en la misma especie (*Alligator mississippiensis*).

En *Caiman latirostris*, se han realizado importantes hallazgos sobre su sistema inmune en los que Siroski et al., (2009) reportan la actividad antimicrobiana del plasma de esta especie frente a *Escherichia coli*, así como también los efectos producidos por las altas temperaturas y la exposición artificial a UV por largos períodos de tiempo sobre la actividad hemolítica del sistema del complemento (Siroski et al., 2010 y 2011). Por estos motivos y por encontrarse dentro de un programa de conservación de suma importancia para la región, el yacaré overo es un representante icónico de nuestros ecosistemas. Los ambientes con elevada riqueza de especies, donde se distribuye *C. latirostris* en la provincia de Santa Fe, convergen con el desarrollo de numerosas actividades antrópicas, por lo que se convierte en un modelo interesante de estudio con el fin de proporcionar información sobre el funcionamiento del sistema inmune en un contexto ecológico.

1.2 Yacaré overo (*Caiman latirostris*)

La existencia del yacaré está indefectiblemente asociada al agua, aunque a diferencia de la mayoría de los Crocodylia, no frecuentan grandes espejos o cursos de aguas limpias. El yacaré overo prefiere ambientes acuáticos, en general de poca profundidad y casi siempre fuertemente vegetados, lugares que suelen ser de muy difícil acceso para la mayoría de los predadores, incluido para el ser humano, pero con una gran abundancia de alimento (Larriera et al., 2008). Posee una dieta generalizada, con los alimentos más importantes como caracoles, camarones, peces y aves. Su tamaño es mediano. Aunque su tamaño máximo reportado es de 3.16 m (Siroski et al., 2014), los animales de más de 2.0 m son actualmente raros en la naturaleza (Verdade et al., 2010; Mussart et al., 2006).

Estos animales presentan su cuerpo comprimido en forma dorsoventral y como su nombre común lo indica, tienen proporcionalmente el hocico más ancho de cualquier cocodrilo. La cola es musculosa y afilada lateralmente, más una piel prácticamente impermeable y con manchas de camuflaje, los transforman en nadadores muy bien adaptados a lugares ricos

en vegetación donde, gracias a sus ojos y narinas de ubicación dorsal, pueden pasar inadvertidos tanto para potenciales presas como para predadores (Larriera e Imhof, 2006).



Figura 1.3 Ejemplar adulto de *C. latirostris* (Amavet, 2009)

Debido a que los yacarés dependen de la temperatura exterior para desarrollar sus actividades, durante el invierno su vida se limita a unos pocos movimientos para exponerse al sol o sumergirse. Cuando llega la primavera y los primeros calores, comienzan a alimentarse hasta llegar al pico máximo de actividad en la temporada reproductiva. Los apareamientos se producen siempre en el agua, luego de que el macho, tras una persecución de duración variable, logra atrapar y cubrir a la hembra. Una vez fecundadas, las hembras se alejan hacia lugares apartados, en algunos casos a muchos kilómetros de los ambientes de residencia habitual en aguas permanentes, para iniciar la construcción del nido (Yanosky, 1990).

Las hembras, utilizan diferentes hábitats para anidar en la naturaleza. En los años lluviosos, las inundaciones pueden afectar la disponibilidad de sitios de anidación de *C. latirostris* (Larriera, 1995). Además, durante las temporadas de incubación en seco, la depredación del nido aumenta, posiblemente debido a un aumento en el acceso al nido por los depredadores (Montini et al., 2006). Los nidos son montículos de materia vegetal, tierra, arena, ramas y deyecciones, que actúan como incubadoras naturales, por el calor del sol y la fermentación producen una temperatura interior casi uniforme durante todo el ciclo, que dura unos 70 días. Las posturas (entre 18 y 50 huevos) se producen entre principios de diciembre y mediados de enero y, dependiendo del lugar y el carácter de la hembra, pueden observarse actitudes de defensa del nido, que se manifiestan con marcada agresividad para con cualquier intruso que se aproxime (Larriera, 1993; Montini et al., 2006; Verdade et al., 2010).

Larriera e Imhof, 2006 reportaron que en condiciones naturales, aproximadamente, eclosiona entre el 30 y el 50% de los huevos puestos en la temporada y que esta elevada mortandad embrionaria puede deberse a factores ambientales directos, como las inundaciones o las sequías extremas, aunque también tienen gran influencia algunos indirectos, como la depredación de huevos que se produce en años relativamente secos.

Los pichones al nacer pesan unos 40 gramos y miden 22 centímetros; y son sumamente vulnerables tanto a depredadores como a factores climáticos. Los recién nacidos, con su pequeña masa corporal, quedan expuestos a garzas, cigüeñas, zorros, iguanas, caranchos y toda clase de carnívoros del humedal. Además, las primeras heladas en las poblaciones más sureñas sorprenden a los pichones con un peso inferior a los 70 g, por lo que si no encuentran un lugar apto para refugiarse, difícilmente superen el primer invierno, constituyendo este, el estadio más susceptible de la especie (Larriera et al., 2008).



Figura 1.4 Pichón de *C. latirostris* naciendo (Siroski, 2014)

Actualmente, al igual que otros animales, las poblaciones de yacarés se ven afectadas por numerosas tensiones ambientales que a menudo actúan de forma compleja. La pérdida y degradación de sus ecosistemas en la provincia de Santa Fe es preocupante ya que continúa vigente la práctica de algunos productores de realizar canalizaciones, a lo que se agrega el desmonte masivo para uso en cultivos. Sumado a esto, en los lugares que esta especie habita deben hacer frente continuamente a una gama de condiciones ambientales adversas, como la contaminación ambiental, las modificaciones climáticas, la exposición a organismos potencialmente patógenos, etc. Un momento crítico que atraviesan los yacarés, son los períodos de bajas en los niveles hidrométricos. En estos casos, se detectan aumentos de las densidades en los escasos lugares con agua, con las consecuencias que eso acarrea: hacinamiento, restricción del contacto con el agua para la termorregulación,

limitación de alimento, exposición a elevadas temperaturas, etc. Bajo estas situaciones extremas, pueden verse afectados importantes aspectos de la vida de estos animales como su crecimiento, su comportamiento y repercutir de esta manera en su ciclo reproductivo, así como en la salud.

También, la capacidad de montar una respuesta inmune efectiva por parte de los yacarés, en un ambiente rodeado de patógenos como en el que viven, puede verse alterada y regulada por estos factores ambientales extremos (Demas et al., 2011; Finger et al., 2013). Es por todo esto que frecuentemente surge la pregunta de ¿Cómo adaptan los yacarés su sistema inmune durante estos períodos potencialmente estresantes? La respuesta a esta pregunta tiene implicancias de consideración tanto para la conservación de la especie como para la inmunología comparada. Además, *Caiman latirostris* es una especie clave de nuestra región por el gran valor económico como recurso natural que representa, por lo que las investigaciones de los factores estresantes y su impacto sobre la función inmune contribuyen de manera directa al programa de conservación de la especie y los ecosistemas.

1.3 Programa de conservación de uso sustentable de la especie “Proyecto yacaré”

Las poblaciones de yacaré overo, como las de yacaré negro, estuvieron fuertemente afectadas por la caza furtiva (principalmente para la obtención de cuero), con la consecuente reducción del número de individuos hasta la década de 1980 (Barboza et al., 2008). Sin embargo, la prohibición del aprovechamiento junto con acciones directas de conservación y, posteriormente, la implementación de planes de manejo basados en metodologías biológicamente sustentables, contribuyeron a modificar sustancialmente la situación de las poblaciones silvestres de la especie (Prado, 2012).

En el año 1990, se inicia en la provincia de Santa Fe, Argentina, un programa de manejo del yacaré overo conocido con el nombre de “Programa de Monitoreo y Autorepoblamiento de *Caiman latirostris*” con fines de Manejo (luego -Proyecto Yacaré-PY- Convenio Gob. de Santa Fe/MUPCN; Larriera, 1990), para la preservación de la especie y la explotación racional de productos de interés comercial.

Este programa, se basa en la técnica de ranqueo que consiste en la obtención de los huevos en la naturaleza para su incubación artificial y crianza de los pichones en un ambiente controlado. La metodología de manejo se fundamenta en el hecho de que el factor crítico para la supervivencia de los *Crocodylia* es la gran mortalidad embrionaria y la depredación

durante el primer año de vida, a lo que se suman las enfermedades del estrés por frío (debido a lo reducido de su masa corporal) en el primer invierno y, excepcionalmente, las inundaciones de los nidos. Como resultado del ranqueo, una proporción equivalente o mayor de animales de la que hubiera sobrevivido en condiciones naturales es reintroducida al ecosistema de origen. El excedente es destinado a la obtención de cuero y carne con un enfoque de producción económica ambientalmente sustentable (Larriera, 1998).

Los nidos son identificados y la cosecha de los huevos se realiza a caballo, a pie o desde pequeñas embarcaciones por los pobladores locales, gauchos o pescadores. Aproximadamente el 80% de los huevos se cosechan durante su primera semana de desarrollo embrionario y los mismos son marcados, pero además se registra la fecha, cantidad de huevos y geoposicionamiento del nido. Las marcas se realizan en la parte superior de la cáscara, a fin de no alterar la posición en la que fueron puestos para no producir daño al embrión, ya que el mismo se fija a la parte superior de la membrana dentro de las 24 hs después de la postura. Los huevos, son alojados en recipientes de plástico portátiles y protegidos con su respectivo material de nido, para así ser transportados hasta la estación de crianza (Larriera, 1991).



Figura 1.5 Nido de *Caiman latirostris* (Izquierda) y cosecha de huevos en un ambiente natural (derecha).

La incubación terminal de los huevos y crianza controlada de los pichones se concreta en las instalaciones del proyecto yacaré. Se reciben los huevos cosechados y se colocan en la sala de incubación a una temperatura de $30 \pm 1^\circ \text{C}$, con una humedad del 95% (Larriera e Imhof, 2006).



Figura 1.6 Acondicionamiento de los huevos respetando posición de huevos y material de nido al momento de la cosecha (izquierda) y sala de incubación artificial (derecha) en las instalaciones del Proyecto Yacaré.

Al nacer, los animales de un mismo nido son marcados por el sistema de corte de verticilos caudales, luego se alojan en piletones de 4,5 x 5m con un sistema de calefacción por losa radiante, con la mitad de la superficie cubierta por agua. La alimentación se provee seis veces por semanas ad libitum y consiste en un balanceado húmedo formado por 50% de cabezas de pollo y el 50% restante es un alimento balanceado seco, hoy disponible en la Argentina a partir de una formulación original.



Figura 1.7 Individualización por marcación de verticilos (izquierda) y recintos donde se alojan para su crianza.

A los diez meses de edad, un porcentaje de los animales nacidos en ese año es devuelto a la naturaleza, que se determina en función de la situación de la población a partir de la cual se cosechan los huevos. Se libera un número mayor de individuos en las áreas donde la densidad poblacional es relativamente más baja o en sitios de cosecha recientes, como medida precautoria, hasta que se recabe la información poblacional del sitio. Para la liberación, se respeta el origen de los nidos: cada año los individuos son liberados en el mismo lugar que fueron recolectados y, si por causa de sequías no hubiera agua, en el lugar más cercano a la postura. Esta actividad también es realizada en colaboración con los pobladores locales como parte de la actividad de conservación. Estos programas involucran

activamente a los pobladores locales en la conservación del recurso, ya que conviven con estas especies. Ellos intervienen en las diferentes tareas de desarrollo del programa como: el relevamiento de datos sobre las poblaciones naturales, en la identificación de los nidos, la cosecha de huevos, y la reintroducción de los animales en sus ambientes naturales. Todas estas actividades son compensadas a través de un incentivo económico, por lo que el desarrollo de estos programas no sólo representa un importante aporte a la economía regional sino que además, impacta positivamente sobre la concientización y el compromiso de los pobladores locales en la preservación del recurso y del ecosistema que los contiene (Larriera et al., 2008).

1.3.1 Estatus poblacional en la actualidad

En la actualidad la situación de los yacarés, como para la mayoría de los cocodrilos, se encuentra en estado de recuperación gracias a los controles internacionales y al estímulo brindado a los programas de utilización comercial conservacionista o programas de uso sostenible. A pesar de todo, persisten algunos aspectos preocupantes con respecto al futuro de ambas especies, que curiosamente no están relacionados con la caza furtiva ni con la utilización comercial, sino con la pérdida de hábitat como consecuencia de la intervención agrícola (Larriera e imhof, 2006).

El desmonte masivo en favor del monocultivo de soja, las extensas áreas ocupadas para agricultura y ganadería para abastecer las necesidades crecientes de la población humana, sumado a esto el uso de plaguicidas en las áreas donde esta especie desarrolla su ciclo de vida, podría impactar negativamente, a largo plazo sobre la supervivencia y la dinámica de las poblaciones silvestres de yacaré (Siroski et al., 2016).

Es necesaria la regulación inmediata de estas prácticas poco sostenibles para mitigar el deterioro de los ecosistemas y preservar los recursos naturales disponibles. El impacto sobre la tasa reproductiva de estas especies podría poner en juego no sólo los múltiples aspectos positivos logrados sobre los pobladores locales hasta el momento sino también generarían un retroceso/desestabilización poblacional de aquellas y su entorno.

La evaluación de los efectos producidos por la intervención antrópica y sus consecuencias sobre la biodiversidad contribuye al conocimiento que permite desarrollar estrategias sobre el uso sostenible de los recursos naturales basados principalmente en controlar los factores que puedan perjudicarlos.

1.4 Mecanismos fisiológicos de estrés

1.4.1 Factores generadores de estrés

La presencia de un estresor puede alterar la relación entre los rasgos fisiológicos y el comportamiento específico en un individuo, así como estimular una respuesta al estrés. Un factor estresante puede definirse como cualquier factor interno o externo que desafíe a los individuos, alterando el estado de homeostasis y los obligue a ajustar el comportamiento o la fisiología para enfrentarlos, por lo tanto, ya sea exigiendo un mayor rendimiento o limitando la expresión de los rasgos (Killen et al., 2013). Los factores internos incluyen compensaciones en la distribución de recursos entre los rasgos de la historia de vida (crecimiento, reproducción y esquemas de supervivencia específicos de la edad) delimitados por la variación genética dentro de la filogenia de un organismo. Los factores externos son los procesos demográficos ambientales, ecológicos y posteriores que crean fuerzas de selección que actúan sobre procesos internos (Crespi et al., 2013). Estos factores estresantes pueden ser abióticos tales como, baja disponibilidad de oxígeno o cambios de temperatura; o bióticos, como la presencia de depredadores o una mayor competencia con los co-específicos, etc. Además, hay que diferenciar que algunos estresores pueden ser repentinos e incontrolables, pero en general son factores lábiles (eventualmente desaparecen); mientras que los estresores antropogénicos, que incluyen factores estresantes bióticos y abióticos, tienden a ser permanentes y de crecimiento continuo. Así, en este último caso, podría verse afectada la salud de la fauna silvestre, con potenciales implicancias dramáticas para la conservación biológica (Wingfield, 2013).

Dichos cambios globales antropogénicos actuales suponen disturbios dramáticos que actúan como estresores y aumentan la exposición de las especies a cambios ambientales impredecibles. Entre las actividades humanas que demandan adaptaciones ecológicas y evolutivas se encuentran la degradación del hábitat, la contaminación, la extracción irracional de recursos naturales, la translocación de especies (que conducen a invasiones), y el cambio climático. Estos estresores pueden interactuar con estresores naturales o con otros estresores antropogénicos, resultando en efectos aditivos o sinérgicos (Parmesan et al., 2013; Josserand et al., 2017).

En vertebrados se ha demostrado que diferentes estresores activan diferentes biomarcadores de estrés y diferentes regiones en el cerebro (Pacak y Palkovits, 2001). Los mecanismos por los cuales los organismos perciben el cambio ambiental y luego transforman esa información en respuestas neurales y hormonales son fundamentalmente diferentes frente a eventos ambientales predecibles o impredecibles, como así también, si los factores estresantes son abióticos o bióticos (Wingfield, 2013). A su vez, estas

respuestas pueden diferir si los efectos que ejercen los factores estresantes sobre el organismo son de corta (estrés agudo) o de larga duración (estrés crónico). El estrés agudo se caracteriza por una duración que va de minutos a horas y el factor estresante generalmente no se repite; mientras que el estrés crónico, se caracteriza por una duración que va de días a meses e incluye el estrés repetido y persistente (McCormick et al., 2015).

En general, los cambios fisiológicos asociados con la respuesta aguda al estrés resultan en la preparación para la lucha o huida, dirigida por el sistema simpático-adrenal-medular (SAM). No obstante, si el estresor persiste, la producción de glucocorticoides reorganiza la economía fisiológica, induciendo el catabolismo para proveer al cuerpo de energía y restringiendo al sistema inmune, previniendo de esa manera efectos deletéreos de los factores inflamatorios. La exposición continua al agente perjudicial puede resultar en habituación y en una disminución gradual de la respuesta, o en el agotamiento y eventualmente en la muerte (Beldomenico y Begon, 2016).

1.4.2 Definición de estrés y respuesta al estrés

Hans Selye, fue uno de los fundadores del campo de la fisiología del estrés y concibió originalmente que los glucocorticoides tenían un rol estimulante directo para enfrentar con éxito un factor estresante (Romero, 2004). En 1936, describió un síndrome que seguía a la exposición de diversos agentes nocivos y que estaba caracterizado por la alarma, resistencia y agotamiento (Selye, 1936). Él denominó a este fenómeno como “Síndrome general de adaptación”, pero convenientemente utilizó el término “estrés” para describir sus manifestaciones, y lo definió como “la respuesta inespecífica del organismo a cualquier demanda” (Selye, 1975). En el trabajo que prosiguió reconoció que la ruta al estrés consiste en tres elementos: 1) la exposición a la condición o estímulo (Ej. un “estresor”), 2) la percepción y procesamiento de esa exposición, y 3) la respuesta comportamental y fisiológica (Ej. la “respuesta al estrés”) (Sapolsky et al., 2000).

En investigación biomédica, es de interés diferenciar las respuestas fisiológicas y comportamentales exitosas a estímulos nocivos (eustrés) de las demandas que exceden la capacidad regulatoria de los organismos (distrés). Pero además se ha sugerido que el término estrés debería ser reservado para los casos en que haya una percepción cognitiva de las condiciones que son impredecibles (no acompañadas por una respuesta anticipatoria) e incontrolables (seguidas por una recuperación retardada o muerte) (Beldomenico y Begon, 2016). Así, el estrés es igualado con “distrés”, como se definió anteriormente, y “eustrés”, es un término en desuso. Siguiendo esta línea de razonamiento, el estrés es definido en un

contexto biomédico como “la respuesta fisiológica y comportamental a demandas impredecibles y/o incontrolables que exceden la capacidad regulatoria de un organismo” (Koolhaas et al., 2011).

El cerebro es el órgano central de respuesta al estrés, que percibe el estímulo y se comunica recíprocamente con el resto del cuerpo (McEwen, 2017). Dicha respuesta, regulada por el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) en mamíferos y aves, y por el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) en peces, anfibios y reptiles (Figura 3) (Sopinka et al., 2015), se inicia con un aumento en la secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) del sistema nervioso simpático, a continuación las neuronas hipotalámicas parvocelulares liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) después de la estimulación en el sistema portal hipofisario. Posteriormente, la CRH induce la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de las células corticotroficas de la hipófisis anterior, promoviendo la producción y secreción de los glucocorticoides (GC) de la corteza suprarrenal. Seguidamente, la secreción de GC aumenta la lipólisis y la proteólisis en las células diana, proporcionando precursores gluconeogénicos para el alivio del estresor. Junto con un mayor flujo de sangre a los órganos necesarios (Ej, cerebro), broncodilatación (Ej, aumento de la ingesta de oxígeno) y otros efectos fisiológicos (Ej, reducción del flujo sanguíneo o catabolismo de proteínas en órganos no esenciales), estos precursores pueden convertirse en glucosa en el hígado y, posteriormente, dirigirlos por todo el cuerpo para ayudar a mitigar los factores estresantes (Finger, 2014).

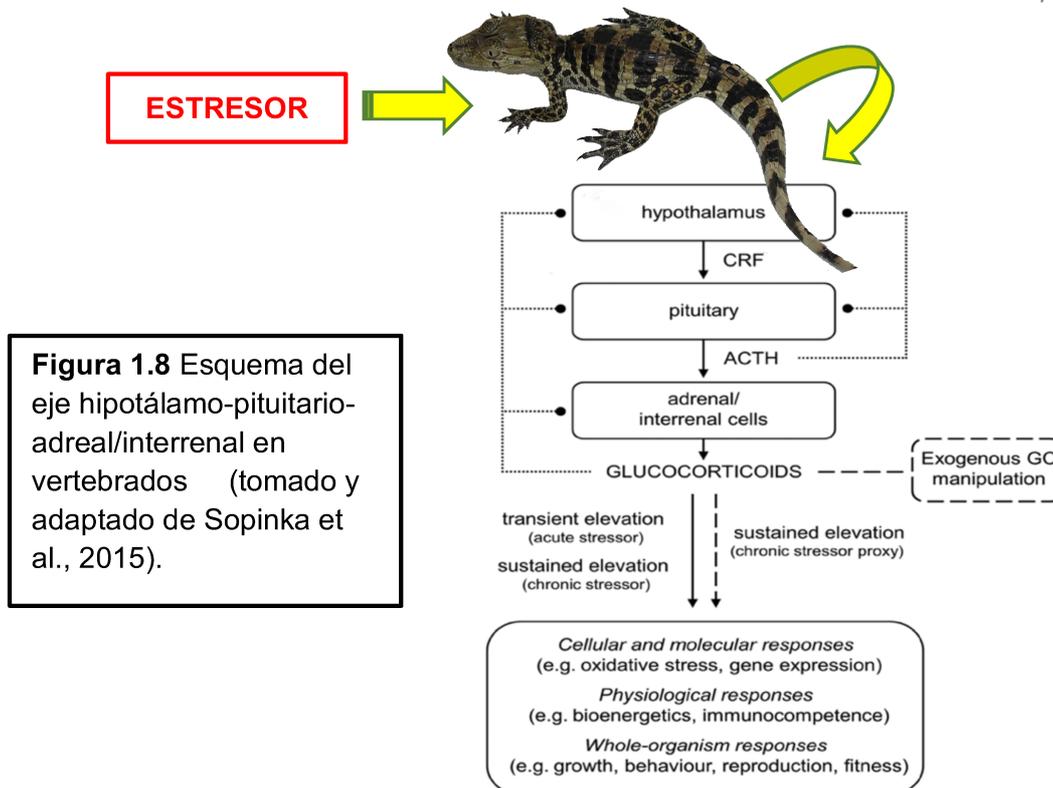


Figura 1.8 Esquema del eje hipotálamo-pituitario-adrenal/interrenal en vertebrados (tomado y adaptado de Sopinka et al., 2015).

Los glucocorticoides, involucrados en modular la respuesta al estrés y activar esta cascada de respuestas fisiológicas y conductuales, son hormonas esteroides que se sintetizan en las células animales a partir de colesterol. Para poder ejercer su acción, penetran en la célula y se asocian en el citoplasma con un receptor de proteína específico, formando un complejo hormona-receptor que migra al núcleo celular donde interacciona con el ADN de una manera específica e induce la transcripción de ciertos genes involucrados directamente en su acción en la célula blanco (Blanco, 2000; Romero, 2004). Estos receptores pueden ser de Tipo I ó MR, se unen primero y se cree que actúan principalmente en el cerebro para regular la variación circadiana de los GC. Mientras que los receptores de Tipo II ó GR, sólo están unidos después de que los receptores de Tipo I están saturados, es decir, sólo se unen cuando las concentraciones de GC son altas. Se cree que regulan las funciones clásicas de GC y se encuentran en todo el cerebro y el cuerpo (Sapolsky et al., 2000; Romero et al., 2004).

La liberación de GC como una medida de la respuesta al estrés es actualmente una herramienta ampliamente utilizada en estudios sobre ecología y biología de la conservación para identificar mecanismos del cambio poblacional, cuantificar indirectamente la calidad del hábitat y examinar los efectos a nivel de la población las variables ambientales, como la actividad de los depredadores o la abundancia de alimentos. La corticosterona (dominante en roedores, aves y reptiles) y el cortisol (dominante en peces y la mayoría de los

mamíferos) son los principales GC secretados frente a perturbaciones en vertebrados (Jhonstone et al., 2012).

Los niveles de corticosterona en reptiles pueden variar según sean machos o hembras. Elsey et al. (1990) reportaron que los cocodrilos machos adultos (*Alligator mississippiensis*) tienen niveles de corticosterona significativamente más altos que las hembras adultas en poblaciones tanto cautivas como silvestres. Lo mismo ha sido reportado por Lance et al. (2001) en las tortugas. Sin embargo, estas diferencias no se encontraron cuando se compararon tortugas marinas juveniles machos y hembras de la especie *Caretta caretta* en Florida (Gregory, 1994). Asimismo, los niveles de corticosterona en plasma pueden variar según el grado de dominancia del individuo. Por ejemplo en los animales subordinados, los niveles plasmáticos de corticosterona son significativamente más altos que en sus cohortes dominantes. Además, se ha informado sobre la presencia de ciclos diarios y de estacionalidad de los niveles plasmáticos de corticosterona en reptiles, registrándose el máximo cuando los animales están más activos durante un ciclo de 24 horas (Silvestre, 2014).

Los niveles de corticosterona elevados pueden ser importantes en algunos procesos, por ejemplo durante la reproducción, los cuales representan el "estrés" de la reproducción. Pero no todas las elevaciones de corticosterona significan estrés, sino solo cuando los organismos experimentan situaciones impredecibles (o incontrolables) que amenazan la aptitud física. Si un estímulo aversivo es insignificante para la aptitud, los individuos tratarán de ignorarlo o tolerarlo e invertir en procesos más importantes (Martin, 2009).

1.5 Sistema inmune

El sistema inmune (SI) es una red integrada y compleja de células, moléculas y órganos en el que cada componente depende del resto para funcionar correctamente. Este sistema evolucionó para proteger a los organismos multicelulares de los patógenos. Esta diversidad de patógenos potenciales requiere una gama de mecanismos de reconocimiento y destrucción para que coincida con la multitud de invasores (Sompayrac, 2012). El sistema inmune surge como una función esencial para la vida, en un medio donde coexisten agentes patógenos y hospedadores con el objetivo de Reconocer lo "propio", Destruir lo "no propio" y Recordar al "enemigo".

El SI evoluciona en el reconocimiento de componentes de los microorganismos como por ejemplo: lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteichoico (LTA), peptidoglicanos (PG),

lipoproteínas (LP), proteínas flagelares, ciertas secuencias ADN no metiladas, entre otros, y que son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, llamados PAMP. Estos pueden generar rápidamente una respuesta inmune no específica (inmunidad innata), como también poseen la capacidad de estimular las células inmunes específicas que reconocen discretamente las características individuales de los agentes patógenos y desarrollan una respuesta inmune específica, eficaz, duradera y protectora (inmunidad adaptativa) (Medzhitov y Janeway, 2002).

Tanto los mecanismos de la inmunidad innata como los de la inmunidad adaptativa poseen componentes humorales y celulares. Los mecanismos innatos (respuesta inmune innata) 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) (Kumar et al., 2011). De igual manera, los mecanismos adaptativos (respuesta inmune adaptativa) 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) (Zuk y Stoehr, 2002).

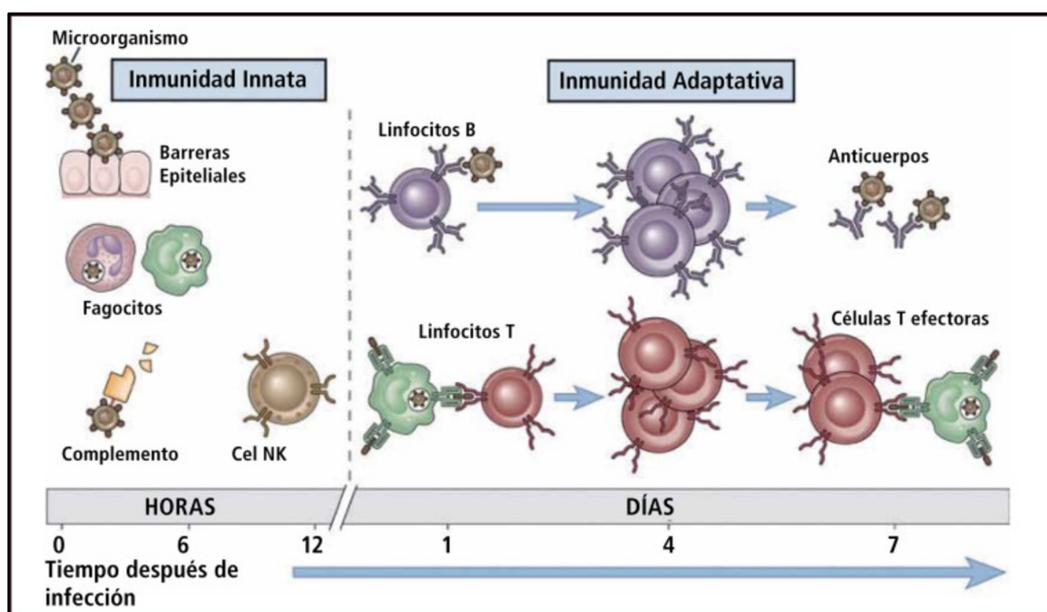


Figura 1.9 Componentes de la inmunidad innata y adaptativa (Abbas y Litchman, 2005)

En un momento u otro, casi todos los organismos se enfrentarán a la infección por patógenos. A pesar de esta casi universalidad, las respuestas inmunes varían notablemente entre individuos, sexos, poblaciones y especies. Pero además, como cualquier proceso fisiológico, la puesta en funcionamiento y el mantenimiento de la defensa inmunitaria requiere costos, incluida la utilización de recursos limitados y el potencial de dañar el propio hospedador (Martin et al., 2014). De acuerdo con estudios previos, un sistema inmunitario competente es un proceso nutricionalmente exigente que requiere decisiones de compensación entre las demandas competitivas de nutrientes para el crecimiento, la reproducción, la temperatura, el trabajo y la inmunidad (Lochmiller y Deerenberg, 2000). Por ejemplo, las bajas temperaturas y la falta de alimentos reducen la actividad inmunológica en aves silvestres y en aves domésticas (Martin et al., 2009). El conocimiento del sistema inmune en los reptiles es limitado, ya que los estudios se han centrado principalmente en mamíferos, aves y peces teleósteos (Magadán-Mompó et al., 2013).

1.6 Sistema inmune en cocodrilianos

Como en todos los vertebrados con mandíbula, el sistema inmune en cocodrilos es dicotómico, ya que está compuesto por una porción innata y una adaptativa (adquirida). Las funciones innatas están presentes desde el nacimiento (codificación de la línea germinal), actúan rápidamente como una defensa inicial contra los patógenos, no requieren estimulación previa y son inespecíficas, mientras que las funciones adaptativas son de naturaleza específica, no codificadas en la línea germinal (surgen por recombinación somática), pueden tardar varios días o semanas en activarse completamente y requieren estimulación previa con subsiguientes infecciones / exposiciones que aumentan la eficacia. Se cree que la rama innata del sistema inmune ha evolucionado antes de la rama adaptativa (Medzhitov y Janeway 2000; Finger, 2014).

En cocodrilianos, como en otros reptiles, los principales tejidos inmunológicos son los tejidos linfoides que incluyen el timo, el bazo y el tejido asociado al intestino (GALT) y la médula ósea. Los reptiles no tienen ganglios linfáticos y no forman centros germinales (Guillette et al., 1995), pero comparten con los mamíferos en que el timo es el sitio de la maduración de las células T y el bazo que tiene pulpa roja y blanca, con una zona marginal a través de la cual pueden pasar las células. Debido a la falta de ganglios linfáticos y centros germinales, se cree que el bazo, puede jugar un papel muy importante en la defensa inmune. El complejo GALT puede atrapar y concentrar antígenos, que luego interactuarán con los linfocitos presentes en el tejido. La médula ósea es el sitio donde se desarrolla la hematopoyesis (Rooney et al., 2003; Zimmerman, 2009).

Los tejidos linfoides se clasifican en tejidos linfoides primarios y periféricos. Los tejidos linfoides primarios son sitios de producción de linfocitos, mientras que los periféricos facilitan la interacción innata y adaptativa, y promueven la eliminación de patógenos. Como en la mayoría de los vertebrados, excluidas las aves, el timo y la médula ósea funcionan como tejidos primarios en cocodrilos, de los cuales las células maduras se dispersan e interactúan con los patógenos en los tejidos periféricos.

Durante el desarrollo embrionario de los reptiles, la hematopoyesis ocurre principalmente en el saco vitelino, mientras que al eclosionar, la médula ósea sirve como el sitio primario de la hematopoyesis (Abbas, 2009; Finger y Isberg, 2012). Sin embargo, otros órganos, como el timo, el bazo y el hígado, también pueden desempeñar un papel importante en la hematopoyesis. Los progenitores de células T inmaduras migran fuera de la médula ósea y terminan la maduración en el timo, mientras que la maduración de las células B continúa en la médula ósea. Es a partir de estos tejidos primarios que los linfocitos se dispersan y comprometen a los patógenos en los tejidos linfoides periféricos, poniéndose en marcha y progresando las respuestas de defensa (Fainboim, 2011).

La estructura de los tejidos linfoides en los reptiles varía con las estaciones. Durante la estación invernal y también en la reproductiva, estos tejidos exhiben involución. Dada esta variabilidad, determinar la funcionalidad de los órganos linfoides y la inmunocompetencia en general agrega una complejidad adicional (Guillette, 1995). Por ejemplo, Turton et al., (1997) han demostrado que la temperatura afecta los valores hematológicos de *Crocodylus porosus* en cautiverio, aunque curiosamente no hubo ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de inmunoglobulina. Gran parte de esta estacionalidad en los parámetros inmunes puede deberse a los niveles hormonales, ya que algunos estudios han demostrado cambios cuantitativos en el número de leucocitos y la involución linfoide asociados con cambios en los niveles circulantes de glucocorticoides y esteroides sexuales (Morici et al., 1997).

El sistema inmune innato incluye péptidos antimicrobianos, lisozimas, las vías del complemento y leucocitos no específicos (Zimmerman, 2009). En este trabajo se realizará una descripción detallada de algunos de los componentes mencionados del sistema inmune innato por tratarse de interés como uno de los objetivos del presente estudio.

1.7 Sistema del Complemento

Un componente clave de la inmunidad innata es el sistema del complemento. En los vertebrados, implica más de 35 proteínas humorales y de membrana celular que existen en el plasma y matan a las bacterias invasoras ya sea a través del proceso de opsonización o por lisis. En la opsonización, las proteínas cubren la membrana bacteriana permitiendo que las bacterias sean reconocidas por los macrófagos, que luego envuelven a las bacterias a través de la fagocitosis. En la lisis, las proteínas del complemento rompen la membrana bacteriana y matan a las bacterias invasoras directamente (Gadjeva, 2014). Las proteínas componentes del sistema del complemento se clasifican en seis familias: C3/C4/C5, CFB/C2, MASP-1/MASP-2/C1r/C1s, C6/C7/C8a/C8b/C9, C1q/MBP/ficolin y CFI (Nonaka y Kimura, 2006).

La cascada del complemento se organiza por medio de tres vías diferentes: vías clásica, alternativa y de la lectina. La vía clásica fue la última de las tres vías en evolucionar, y se activa por medio de inmunoglobulinas IgG e IgM. La ruta alternativa es activada mediante el reconocimiento directo de ciertas estructuras de la superficie microbiana y no requiere anticuerpos. Se denomina ruta alternativa solo porque la vía clásica se descubrió primero. La ruta de la lectina se activa por residuos de manosa de proteínas que se encuentran en la superficie de las bacterias (Ricklin et al., 2010; Zhang y Cui, 2014). Se ha confirmado la presencia de vías alternativas y clásicas en reptiles, y aunque no se ha encontrado evidencia directa para la vía de lectina, se cree que los reptiles también tienen esta vía debido a que está presente en peces sin mandíbula, tiburones, teleósteos, anfibios y aves.

Aunque el mecanismo de inducción difiere entre estas tres vías, de manera similar convergen funcionalmente en la formación de los productos de la proteína C3 del complemento, C3a y C3b. Importante como inductor de la inflamación, C3a actúa como una anafilatoxina, mientras que C3b funciona como un componente de C5 convertasa, la siguiente enzima en la cascada. La proteína C5 complementaria sirve como sustrato para convertasa C5, produciendo C5a y C5b. Mientras que C5a promueve la inflamación, la interacción de C5b con las proteínas C6, C7 y C8 en las superficies de las membranas microbianas induce la polimerización y posterior ingesta de múltiples moléculas de C9 en las membranas microbianas (MAC), lo que desencadena la lisis osmótica (Siroski, 2011).

La activación de la vía clásica consiste en la proteína del complemento C1q que se une al receptor Fc del complejo anticuerpo-antígeno o proteínas C-reativas. C1q luego interactúa con otras proteínas del complejo C1, C1s y C1r, que poseen serino proteasas asociadas.

Posteriormente, estas proteínas se escinden secuencialmente C4 en C4a y C4b y C2 en C2a y C2b . Los residuos de manosa presentes en los microbios funcionan como ligandos, reconocidos por la lectina de unión a manosa (MBL) (Gadjeva, 2014). La vía de lectina se inicia cuando la MBL o las ficolinas se unen a patrones de carbohidratos o grupos acetilo en la superficie de protozoos, virus, hongos o bacterias. Estos patrones se encuentran en tres pares de complejos de serino proteasas, a saber, serino proteasa asociada a lectina de unión a manosa (MASP) tales como MASP-1, MASP-2, MASP-3. Cuando las moléculas de reconocimiento se unen a un patrón, los MASP se activan. MASP (MASP-1 y -2) se escinde a los componentes C2 y C4. El fragmento e C4b (producto de la escisión C4) se une a la superficie del patógeno y se asocia con C2a para formar la convertasa C3 (C4b2a, similar a la C3-convertasa de la vía clásica) (Evans-Osses et al., 2012).

La activación de la vía alternativa se logra a través de la escisión espontánea de un enlace tioéster interno en la molécula C3; la producción e interacción de C3b con el Factor B, un homólogo de C2, y la posterior escisión del Factor B forma la C3bBb C3. La producción amplificada del producto de escisión C3b permite la asociación con C3bBb, formando C5 convertasa C3bBbC3b.

La eficacia del sistema del complemento reptiliano fue reportada por Merchant et al., (2003), quienes compararon la efectividad antibacteriana del suero del cocodrilo americano (*Alligator mississippiensis*) con la del suero humano. Encontraron que a diferencia del suero humano, el de cocodrilo era eficaz contra varias cepas de bacterias Gram positivas, indicando un amplio espectro para la actividad antimicrobiana. Por otro lado, el calentamiento del suero de caimán a 56 ° C durante 30 min redujo la actividad hemolítica del complemento y lo mismo sucedió a temperaturas bajas, observándose la mayor actividad entre 20 y 35 ° C. Hallazgos similares se observaron en cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), yacaré overo (*Caiman latirostris*), cocodrilo de agua dulce (*Crocodylus johnstoni*) y *C. porosus* (Merchant et al., 2005; 2006; 2010; Siroski et al., 2010).

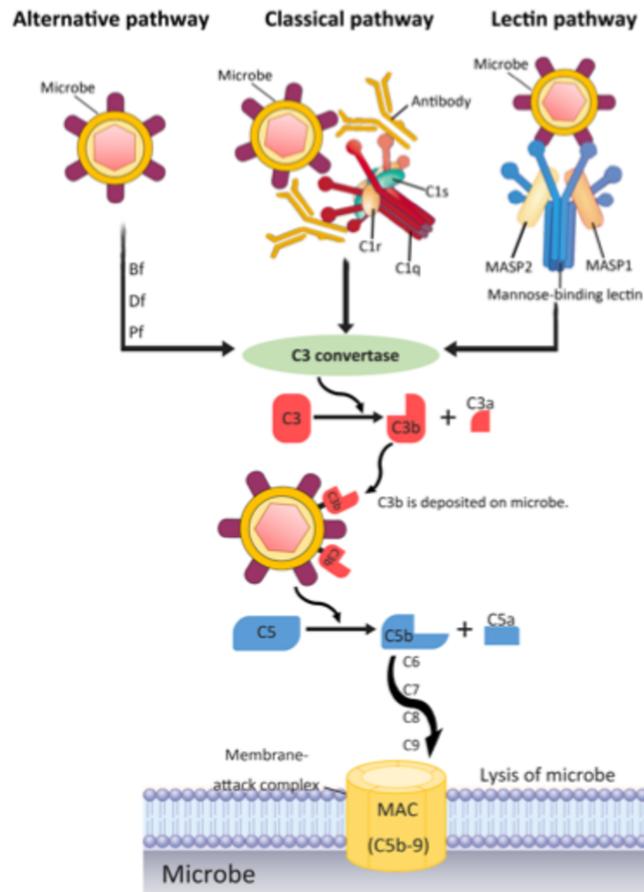


Figura 1.10 Las tres vías de activación del sistema del complemento: vía clásica, vía de la lectina y la vía alternativa. Estas tres vías se fusionan en un paso para la formación de complejos de proteasa inestables, denominados C3-convertasas (C3bBb en la ruta alternativa y C4bC2a en las vías clásica / lectina) (tomado de Zhang y Cui, 2014).

1.8 Células sanguíneas

Los leucocitos presentes en los reptiles, al igual que en los mamíferos, se pueden dividir morfológicamente en granulocitos (Heterófilos, Eosinófilos y Basófilos) y no granulocitos (Linfocitos y Monocitos) (Zimmerman et al., 2009). Los heterófilos y linfocitos constituyen la mayoría (casi el 80% combinado) de glóbulos blancos en los reptiles (Davis et al., 2008).

Los granulocitos de reptiles son predominantemente heterófilos. Son funcionalmente equivalentes a los neutrófilos de mamíferos, ayudan a suprimir la invasión microbiana y también participan en la respuesta inflamatoria. Los gránulos suelen ser redondos, en forma

de varilla o fusiformes, según la especie. Pueden verse refráctiles y de color naranja brillante a rojizo (Davis et al., 2008). Además, su tamaño puede variar ampliamente entre especies. Los núcleos heterófilos son excéntricos y varían de redondos a lobulados, con un patrón denso de cromatina. El citoplasma de estas células es generalmente incoloro y contiene gránulos (Fainbom, 2011). En *Alligator mississippiensis* los heterófilos comprenden más del 50% de los leucocitos circulantes aunque pueden surgir diferencias cuantitativas debido a otros factores, como infección, estacionalidad o edad (Finger y Isberg, 2012).

Los eosinófilos y los basófilos constituyen aproximadamente el 10 y el 12% de los leucocitos circulantes en cocodrilos, respectivamente (Finger y Isberg, 2012). Los eosinófilos son granulocitos con un núcleo redondo a ovalado que es ligeramente excéntrico. Algunas especies de lagartos tienen eosinófilos con núcleos lobulados. El patrón de cromatina suele ser denso. A diferencia de los heterófilos, los eosinófilos tienen un citoplasma azul claro en el que la mayoría de los gránulos tienden a ser redondos. El color del gránulo varía según la especie. Los basófilos tienen la forma redonda típica y son más pequeños que los heterófilos y los eosinófilos. El núcleo generalmente es redondo, con un patrón denso de cromatina. Es difícil ver el núcleo debido a la abundancia de gránulos en el citoplasma. Algunos basófilos se distorsionan fácilmente en una mancha, revelando claramente el núcleo. Estas células contienen inmunoglobulinas específicas de antígeno en sus superficies, unidas a través de receptores. Cuando se activan por un antígeno, los basófilos se degranulan y liberan histamina, pero esta liberación depende de la concentración y la temperatura del antígeno (Perez, 2012).

Los linfocitos están involucrados en una variedad de funciones inmunológicas tales como la producción de inmunoglobulinas y la modulación de la inmunidad. Pueden ser los glóbulos blancos predominantes en algunas especies, como en iguanas y en caimanes (Zayas et al., 2011). Los linfocitos maduros son redondos y tienen un núcleo excéntrico con un patrón de cromatina que es oscuro, agrupado y denso. El citoplasma de los linfocitos es azul pálido pero más oscuro que el de los trombocitos. Los linfocitos tienen una relación núcleo-citoplasma mayor que la de los trombocitos; por lo tanto, el núcleo de los linfocitos ocupa la mayor parte de la célula. Los linfocitos y los trombocitos pueden tener ocasionalmente un gránulo azurófilo (Perez, 2012). Los monocitos y macrófagos son células fagocíticas que procesan y presentan antígenos y también liberan citocinas. Los monocitos tienden a ser los más grandes. La forma nuclear suele ser lobulada, pero puede parecer redonda. El patrón de cromatina nuclear es más claro y lacrado que el de los linfocitos. El citoplasma es típicamente gris oscuro y puede contener vacuolas (Mussart et al., 2006).

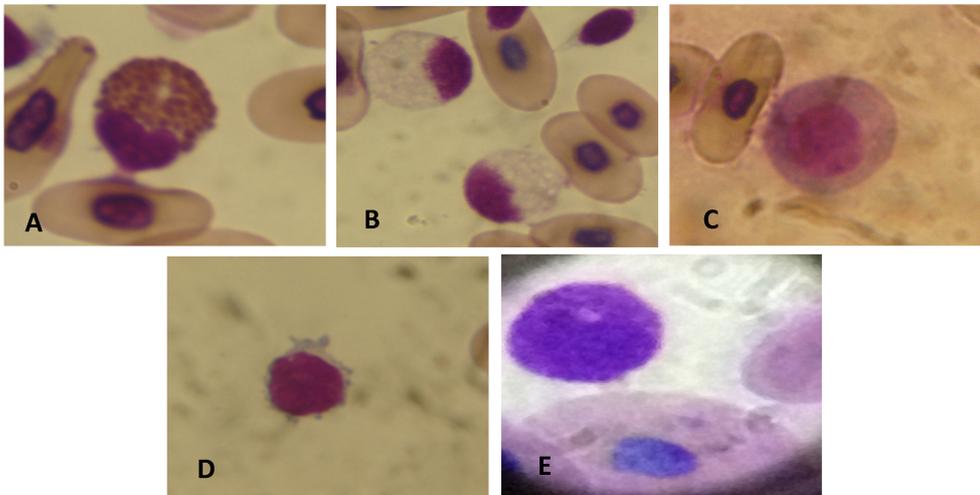


Figura 1.11 Tipos celulares observados (100x) en extendidos sanguíneos de *Caiman latirostris* utilizando la tinción de May Grünwald-Giemsa. Eosinófilo (A), Heterófilo (B), Monocito (C), Linfocito (D) y Basófilo (E). (Latorre et al., 2016; Moleón et al., 2017).

Las células sanguíneas circulan continuamente desde la sangre, a través de diversos órganos, y regresan a la sangre. Esta circulación es esencial para mantener una red de defensa inmune efectiva. Los números y proporciones de los leucocitos en la sangre proporcionan una importante representación de la distribución de leucocitos en el cuerpo y del estado de activación del sistema inmunológico (Dhabhar, 2002). Estos valores, constituyen herramientas necesarias para detectar por ejemplo, los efectos del estrés ambiental, infeccioso, parasitario o toxicológico (Zayas et al., 2011), como así también representan buenos indicadores de la inversión inmunológica por parte de los organismos (Beldomenico et al., 2008).

Se ha demostrado que los factores estresantes y la corticosterona elevada pueden alterar las características de los componentes leucocitarios del sistema inmune y es posible cuantificarlos (Seddon et al., 2012). En ocasiones, frente a una situación de estrés agudo, se induce un cambio bifásico en el número de leucocitos, en el cual durante los primeros minutos de estrés el número de leucocitos se incrementa, pero al continuar con el factor estresante comienzan a disminuir y permanecen bajos en el período de duración del factor de estrés (Davis et al., 2008). Curiosamente, uno de los efectos más conocidos y conservados evolutivamente del estrés es una reducción en el número de leucocitos en la sangre que ha sido informado en la mayoría de los vertebrados. Aunque inicialmente se

pensó que esta disminución reflejaba la destrucción de los leucocitos, estudios recientes proponen que representa una respuesta adaptativa que puede aumentar la vigilancia / respuestas inmunes en los órganos a los que los leucocitos transitan durante el estrés (Dhabhar, 2002).

En *Caiman latirostris*, se evaluaron los efectos en los juveniles expuestos a Roundup, en donde encontraron que este pesticida indujo un aumento en los porcentajes de heterófilos (Latorre et al., 2013). Otro estudio realizado en esta misma especie reveló que la exposición de los juveniles de yacaré overo a cipermetrina produjo una disminución en los linfocitos y un aumento en los números de heterófilos y monocito, mientras que la exposición a endosulfán indujo una disminución en los porcentajes de linfocitos y un aumento en los monocitos (Latorre et al., 2016). Así mismo, no existen estudios previos en nuestra especie de interés en los que reporten los posibles efectos de los niveles de corticosterona sobre los conteos leucocitarios.

1.9 Anticuerpos

La inmunidad humoral involucra otra clase de linfocitos, los linfocitos B, que producen anticuerpos cuando son estimulados por un antígeno. A diferencia de las células T, las células B pueden reconocer un antígeno en su estado natural y no requieren que el antígeno sea procesado por una célula intermedia (Zimmerman et al., 2009). Las respuestas humorales de reptiles son más lentas y a menudo no aumentan en el título tras una segunda exposición (Zimmerman et al., 2012).

Los anticuerpos son moléculas, específicamente glicoproteínas, que el sistema inmune elabora en respuesta a distintos antígenos, favoreciendo su eliminación mediante distintos mecanismos efectores. La estructura de una molécula de anticuerpo está formada por 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas idénticas (H) y 2 cadenas livianas idénticas (L). Existen cinco cadenas H que se denominan γ , α , μ , δ , ϵ mientras que sólo hay dos cadenas L que reciben los nombres λ , κ . Los puentes disulfuro intercatenarios unen cada cadena H a una cadena L, formando heterodímeros (Abbas et al., 2012).

Los anticuerpos naturales (NAb) son un componente de la inmunidad humoral y en comparación con otras inmunoglobulinas, su producción es constitutiva y no requiere exposición previa a un antígeno particular (Racca et al., 2014). Debido a que los NAb son estables en el tiempo, tienen el potencial de ser utilizados como indicadores de las

inmunocompetencias en los animales silvestres. Aunque estos anticuerpos se han identificado en una variedad de taxones, incluidos los reptiles, la mayoría de la información disponible proviene de estudios de mamíferos. Los anticuerpos naturales son producidos por un subconjunto de células B conocidas como células B-1 y pueden producirse constitutivamente a bajos niveles en ausencia de antígeno o pueden inducirse en respuesta a ciertos antígenos, incluidos componentes microbianos como lipopolisacárido (LPS) y fosfocolina (Baumgarth et al., 2005; Yang et al., 2007), aunque el anticuerpo producido en respuesta a la estimulación con antígeno es de menor afinidad que el producido por las células B-2. Los anticuerpos naturales son polirreactivos a componentes evolutivamente conservados de patógenos, tienen bajas afinidades de unión y desempeñan papeles activos en el desencadenamiento de la inmunidad tanto innata como adaptativa (Zimmerman et al., 2012).

Los reptiles sintetizan al menos dos clases de inmunoglobulinas (Ig): una Ig de alto peso molecular (IgM) que al igual que en mamíferos y aves luego de una exposición aparece primero; y una Ig similar a la IgG de mamíferos, denominada IgY, de menor peso molecular y que se desarrolla varias semanas después de la exposición (Jacobson y Origgi, 2002). Aunque se han investigado pocas especies hasta la fecha, los datos disponibles sugieren que las Igs varían ampliamente entre los reptiles; por ejemplo, las secuencias genómicas de la tortuga pintada (*Pelodiscus sinensis*) revelaron la presencia de genes IGM, IGD e IGY, similares a los encontrados previamente en Squamata (Megadán-Mompó et al., 2013). En cocodrilo americano (*Alligator mississippiensis*), dos cadenas livianas distintas, 19S y 7S Igs, fueron identificadas después de la inmunización con Salmonella. También reportaron la presencia dos cadenas H distintas (Jacobson y Origgi, 2002).

La inmunidad humoral en los reptiles puede depender de varios factores, como la temperatura, la etapa de desarrollo, el estado reproductivo, la estacionalidad, la disponibilidad de alimento y el tipo de antígeno. Si bien son escasos los trabajos publicados hasta el momento en los que evalúan la variación de la respuesta humoral frente a diferentes factores, en las tortugas del desierto (*Gopherus agassizii*) Sandenmeier et al. (2012) reportaron altos títulos de anticuerpos naturales frente a la inoculación de los animales con ovoalbúmina para evaluar la respuesta humoral. En cocodrilo de agua salada (*Crocodylus porosus*); Turton et al. (1997) hallaron una relación negativa entre la concentración de inmunoglobulinas y el peso corporal. Los cocodrilos más grandes no mostraron una respuesta humoral más efectiva que aquellos que tenían menores pesos y una condición más empobrecida.

Gran parte de la investigación básica sobre la inmunidad de los reptiles y las células inmunes aún está en sus comienzos.

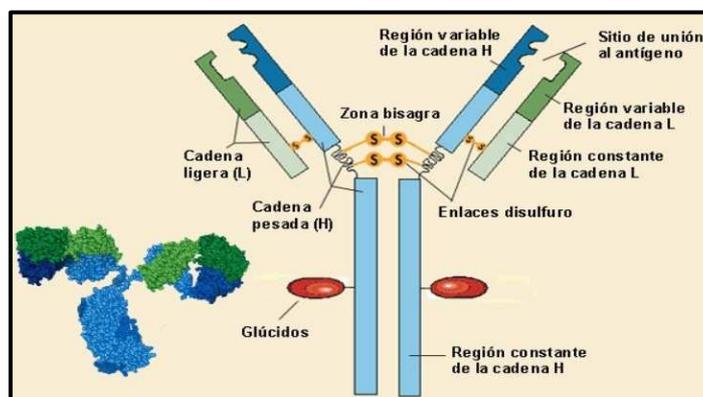


Figura 1.12 Esquema de la estructura molecular de un anticuerpo (Abbas et al., 2012).

1.10 Interacción entre la respuesta al estrés y la respuesta inmune

Las interacciones entre la respuesta al estrés y las funciones del sistema inmune son complejas. Históricamente, se pensó que las interacciones entre el eje HPA/I y el sistema inmune eran negativas e inmunosupresoras (Sapolsky et al., 2000); sin embargo, una visión moderna admite una explicación más matizada. Actualmente, se piensa que el eje HPA/I modula la respuesta inmune en dos formas importantes, y no necesariamente negativas: (1) la inmunomodulación durante la respuesta al estrés para prevenir episodios inflamatorios inapropiados y, a menudo, fatales y (2) inmunomodulación por "tráfico" inmune, mediante el cual los agentes inmunes se desplazan de la circulación a los sitios de necesidad (Ej, piel) y, por lo tanto, parecen estar sufriendo inmunosupresión (Graham et al., 2012).

Algunos estudios realizados tanto en invertebrados como en vertebrados sugieren que cuando el estrés afecta la función inmune es porque la respuesta al estrés requiere una reorganización de los recursos. Para minimizar los efectos del acceso alterado del sistema inmune a los recursos, las hormonas del estrés pueden reconfigurar el sistema inmune para mantener la funcionalidad máxima bajo diferentes condiciones fisiológicas (Demas et al., 2011). Los glucocorticoides pueden ejercer un efecto en la maduración, diferenciación y proliferación de todas las células inmunes y desencadenar apoptosis en células T y B inmaduras y células T maduras (Sapolsky et al., 2000). Los glucocorticoides también pueden

suprimir la transcripción, traducción y secreción de las interleukinas (como la IL-1) y desestabilizar el ARNm en leucocitos, reducir rápidamente la quimiotaxis de linfocitos, monocitos y granulocitos y reducir el número de linfocitos circulantes así como eosinófilos, basófilos, macrófagos y monocitos (Martin et al., 2009).

Cualquiera sea la interacción en sentido positivo ó negativo, se sospecha que las conexiones entre la respuesta al estrés y la respuesta inmune es crucial para la supervivencia (Adamo, 2014). Por ejemplo, la reproducción y las actividades del sistema inmune son costosas y, por lo tanto, incompatibles; lo que puede resultar en inmunidad comprometida, pero con éxito reproductivo e incluso la supervivencia. Sin embargo, las fluctuaciones en las condiciones ambientales, también pueden afectar la inmunidad. Las temperaturas frías (Dabbert et al., 1997; Hangalapura et al., 2003; Lifjeld et al., 2002) y la falta de alimentos (Bourgeon et al., 2006; Hangalapura et al., 2005; Raber et al., 2003) reducen la actividad inmune en aves. El cautiverio también puede reducir la respuesta inmune (Berzins et al., 2008; Ewenson et al., 2003), aunque la magnitud de estos efectos es específica de la especie (Matson et al., 2006).

Los glucocorticoides también tienen efectos potenciadores generalizados sobre los procesos inmunes. Los ejemplos más fuertes de GC como promotores de la función inmune provienen del trabajo de Dhabhar et al. (1996). En respuesta a un estresor agudo (restricción física) tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa se pueden potenciar en ratones (Dhabhar, 2002). La actividad inmune elevada en respuesta a GC es especialmente obvia en áreas donde ha ocurrido una herida. Las respuestas inmunitarias mediadas por células en la piel se potencian mucho si se impone el estrés de restricción durante unas pocas horas antes de la inducción de la respuesta inmune. Esta mejora está coordinada por el interferon inmunitario ó interferon gamma de tipo II (IFN γ) IFN γ y aumenta la actividad de neutrófilos, macrófagos y células T en el sitio (Dhabhar et al., 2000). Sin embargo, la presentación de antígenos y la fagocitosis por los macrófagos también se incrementan por los glucocorticoides (Martin et al., 2009).

Estos hallazgos demuestran vínculos entre el estrés y las actividades del sistema inmune en animales silvestres, pero dada la variada naturaleza de los factores estresantes anteriores, es difícil hacer generalizaciones sobre las interacciones inmunes y el estrés. Si los organismos pueden predecir las condiciones aversivas y compensar preventivamente las demandas elevadas, las condiciones pueden no representar factores estresantes verdaderos. Los animales usan muchas señales ambientales para modificar sus fenotipos en preparación para desafíos ambientales recurrentes. El fotoperíodo o la duración del día

es una indicación especialmente útil. Los ajustes estacionales de la inmunidad ocurren y les permite a los individuos superar condiciones que en otras épocas del año serían realmente estresantes. Por ejemplo, la mayoría de las aves mejoran las actividades y procesos que promueven la supervivencia en invierno. En particular, la actividad inmunitaria tiende a elevarse en esta época del año, posiblemente para mejorar la probabilidad de supervivencia hasta la próxima temporada de reproducción. De manera similar, los cambios en la abundancia y distribución de las células inmunitarias sobre una base estacional son comunes, y las densidades celulares circulantes tienden a ser mayores en los meses de invierno (Martin et al. 2008).

Por otro lado, la intensidad o la duración de los factores estresantes varían, lo que dificulta aún más la identificación de las generalidades sobre las interacciones entre estrés e inmunidad.

1.11 Hipótesis y Objetivos

1.11.1 Hipótesis

Ante situaciones de estrés se modifican determinadas características en el comportamiento del sistema inmune del yacaré overo (*Caiman latirostris*).

1.11.2 Objetivo General

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar el comportamiento de determinados componentes del sistema inmune del yacaré overo (*Caiman latirostris*) ante situaciones de estrés.

1.11.3 Objetivos específicos

1-Utilizar una selección de parámetros inmunológicos previamente testeados y comúnmente utilizados en otros reptiles, para caracterizar el sistema inmune del yacaré overo.

2-Someter experimentalmente a yacaré a estrés crónico y agudo para medir el efecto sobre los parámetros inmunológicos seleccionados, índices genéricos de condición fisiológica y glucocorticoides en sangre.

3-Evaluar la variabilidad de los parámetros inmunológicos seleccionados en poblaciones naturales de yacaré, estableciendo asociaciones con variables ambientales y antrópicas.

Capítulo 2

Exposición crónica de juveniles de *Caiman latirostris* ante situaciones de estrés



2.1 Introducción

Todos los organismos se integran con su entorno al responder a las condiciones ambientales naturales fluctuantes a través de adaptaciones fisiológicas y de comportamiento (Wingfield, 2013). En los reptiles, esta integración involucra la respuesta tanto del sistema endocrino como del sistema inmune a los cambios de los factores ambientales bióticos (nutrición, edad, sexo e interacciones sociales) y abióticos (temperatura, fotoperíodo, precipitación y pH) (Rooney, 1998). Por ejemplo, las rutinas diarias de algunos animales incluyen insumos nutricionales para mantener las actividades normales y anticipar requisitos adicionales (criar, aclimatarse al frío y al calor, etc.) durante el ciclo día-noche y las estaciones (Mc Ewen y Wingfield, 2003).

En reiteradas oportunidades, perturbaciones ambientales cortas o prolongadas como cambios climáticos, tormentas, altas temperaturas, sequías, frío, inundaciones, etc. están asociadas a factores causantes de estrés crónico, que se caracteriza por una duración larga (días a meses) e incluye el estrés repetido, persistente o frecuente (Mc Cormick et al., 2015). Estas situaciones, pueden provocar que un individuo se vea obligado a abandonar su etapa normal de historia de vida, alterando la reproducción y en última instancia afectando a la dinámica de la población, debido a la reducción de los recursos o al acceso restringido a recursos tales como alimentos, refugio, etc. (Wingfield, 2013).

La respuesta por parte de los individuos para hacer frente a estos eventos de estrés, implica la ejecución de una serie de respuestas inespecíficas, mediadas por reacciones comportamentales y por la activación de la cascada endócrina (pág. 13; Capítulo 1). La cascada se inicia cuando el estresor es percibido por el organismo y culmina en la liberación de corticosterona (Meyland et al., 2012). Esta respuesta está dirigida a mantener o restaurar la homeostasis, mecanismo por el cual el eje HPA/I, a través de la secreción de glucocorticoides regula la utilización de energía, pone en marcha procesos catabólicos y suprime aquellas funciones fisiológicas innecesarias para restar los efectos del estresor, colaborando con la supervivencia del animal (Rich y Romero, 2005; Boonstra et al., 2014). Algunas evidencias, sugieren que los períodos prolongados de secreción elevada de corticosterona pueden inducir el catabolismo del tejido muscular, un balance de nitrógeno negativo y pueden suprimir la reproducción y la inmunocompetencia (Josserand, 2017). Las consecuencias de una respuesta al estrés prolongado sobre el sistema inmune han sido ampliamente reportadas en aves. Por ejemplo, Hangalapura et al., (2005) en sus estudios con aves domésticas, demostraron que en condiciones de restricción alimentaria prolongada, los elevados niveles de corticosterona causaron efectos de supresión sobre la inmunidad

celular. Por otra parte, Nazar et al., (2010) comprobaron que el estrés por restricción física a largo plazo en las codornices produjo inmunosupresión de la respuesta humoral.

Sin embargo, aunque generalmente se conoce que la inmunidad está regulada negativamente durante las respuestas de estrés crónico, los datos de los roedores han demostrado lo contrario. Los capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) expuestos a estrés prolongado (doce semanas de restricción alimenticia o restricción física) mostraron conteos elevados de eosinófilos, y los animales con restricción de alimento tenían niveles más altos de anticuerpos naturales (Eberhardt et al., 2013). Esto demuestra que no existe un patrón general en relación al efecto del estrés crónico sobre la función inmune, y sugiere fuertemente que este efecto puede depender de la historia natural de una especie determinada. Existen rasgos relevantes de una especie, como el comportamiento y la función inmunitaria, altamente dependientes de las condiciones ambientales. Por lo tanto, cualquier modificación podría determinar directa o indirectamente su nivel de exposición a patógenos (Wolinska y King, 2009; Beldomomenico y Begon, 2015). Por ejemplo, estudios realizados en passeriformes mostraron que los niveles de glucocorticoides varían en relación a los gradientes de urbanización y que las poblaciones de este grupo de aves en áreas urbanas tienden a tener una mayor prevalencia de enfermedades que las que habitan las áreas rurales (Bonier et al., 2006; Bradley et al., 2008).

Los cocodrilos tienen comportamientos complejos que implican interacciones violentas, que resultan en heridas graves, incluida la pérdida de extremidades enteras. Sin embargo, no muestran signos de infección, a pesar de que estos animales viven continuamente en contacto con agentes potencialmente patógenos en su hábitat (Siroski et al., 2009; Siroski, 2011). Como fue mencionado, varios estudios han indicado que los cocodrilos exhiben capacidades inmunes potentes que les permiten superar tales condiciones. La actividad antimicrobiana de la sangre de los cocodrilos fue descrita por Merchant et al., (2003, 2004); Merchant y Britton, (2006) en suero de *Alligator mississippiensis*; y Siroski et al., (2009) informaron que la actividad antibacteriana en el suero de *Caiman latirostris* es más alta que la de la gallina y el plasma humano.

Hasta el momento, no se conocen los mecanismos responsables de la inmunocompetencia antibacteriana de los cocodrilos pero se sospecha que podría verse afectada en determinadas condiciones, como la exposición a factores estresantes durante tiempos prolongados. La información relacionada con el efecto de los factores de estrés sobre la fisiología de los cocodrilos se limita a unos pocos estudios que examinaron el impacto del método de captura, el hacinamiento y otras formas de estrés sobre el crecimiento (Elsey et al., 1990a; Morici et al., 1997), valores hematológicos (Turton et al., 1997) e inmunidad

(Finger et al., 2015). En este capítulo, examinamos el efecto de una exposición a factores estresantes ambientales más comúnmente enfrentados (restricción de agua, restricción de alimentos y temperatura elevada; Moore y Jessop, 2003; Johnstone et al., 2012) sobre el crecimiento, la inversión inmunológica y otros parámetros fisiológicos de juveniles de *C. latirostris*.

2.2 Materiales y métodos

Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética y seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) (N ° 301/15) y se encuadra en las bases de la 'Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en investigación y enseñanza agrícola (https://www.aaalac.org/about/Ag_Guide_3rd_ed.pdf).

2.2.1 Animales

Los huevos de *Caiman latirostris* fueron cosechados en la Reserva Natural "El Fisco", un área libre de actividades agrícolas y urbanas (30 ° 110 260 S, 61 ° 00 270 O; San Cristóbal, Santa Fe, Argentina; Ley Provincial 12.930 / 2008). Después de la recolección, los huevos fueron trasladados a las instalaciones del Proyecto Yacaré (PY), e incubados a 31 ± 1 °C en una incubadora artificial ubicada en el Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC - UNL / MMA, Santa Fe). Inmediatamente después de la eclosión y teniendo en cuenta estudios previos realizados, seleccionamos 192 caimanes juveniles provenientes de ocho nidos, los cuales fueron identificados por medio de cortes de verticilos y alojados en 16 bateas plásticas (40,4 cm de ancho y 78,5 cm de largo). Las bateas estaban inclinadas de manera tal de ofrecerles a los animales un área seca y otra húmeda. Los animales fueron alimentados ad libitum con cabeza de pollo picada. El cambio del agua se realizó cada 2 días alternando con los días de alimentación. La temperatura de la batea se mantuvo a 30 ± 1 °C y se monitoreó con los termómetros registradores de datos Hobo™ (Onset Computer Corp., Pocasset, MA, EE. UU.).

2.2.2 Diseño experimental

Antes del comienzo del experimento los animales fueron pesados con balanza eléctrica de 0,1 gr de precisión (OHAUS® *Compact scale* CS200), medidos con cinta métrica de 0,1 cm de precisión (LT = longitud total, LHC = longitud hocico-cloaca) y distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de tratamientos por duplicado, 24 animales por tratamiento, distribuyendo los nidos homogéneamente. El comienzo de la exposición a los tratamientos de estrés se inició aproximadamente a los 60 días de edad de los animales. Los tratamientos de los grupos fueron los siguientes: (1) control (CTL): animales mantenidos en las mismas condiciones

que precedieron a los tratamientos experimentales; (2) restricción de agua (WR): reducción del 50% del nivel de agua de la batea. Este tratamiento intentó simular una sequía de moderada gravedad (Lance et al., 2010); (3) restricción de alimentos (FR): los animales no recibieron alimentos durante el experimento (Cote et al., 2010); y (4) temperatura alta (TMP): la batea estuvo expuesta a períodos de 8 h cada día donde la temperatura se mantuvo a 37 ± 1 ° C, las 16 hs restantes, la temperatura fue igual al resto de los tratamientos. La temperatura se obtuvo por medio de lámparas halógenas de 70 watts de color negra y monitoreando diariamente con los registradores de datos Hobo™ (Onset Computer Corp., Pocasset, MA, EE. UU.). La selección de esta temperatura fue en función de las predicciones del calentamiento global (Killen et al., 2013) y por las temperaturas registradas en las áreas donde habitan las poblaciones de *Caiman latirostris*.

Después de la exposición a estos factores estresantes durante 4 semanas, pesamos, medimos y calculamos la condición corporal ($Bc = \text{peso} / \text{LHC}$). El tiempo de exposición fue seleccionado en función al tiempo mínimo en que los animales pueden estar expuestos cuando se enfrentan en la naturaleza a estos factores de estrés. Por ejemplo, en el área de estudio las temperaturas que oscilan entre 32-42 °C al mediodía se registran principalmente en enero, siendo menos frecuentes en el mes anterior y posterior (<http://siga2.inta.gov.ar>).

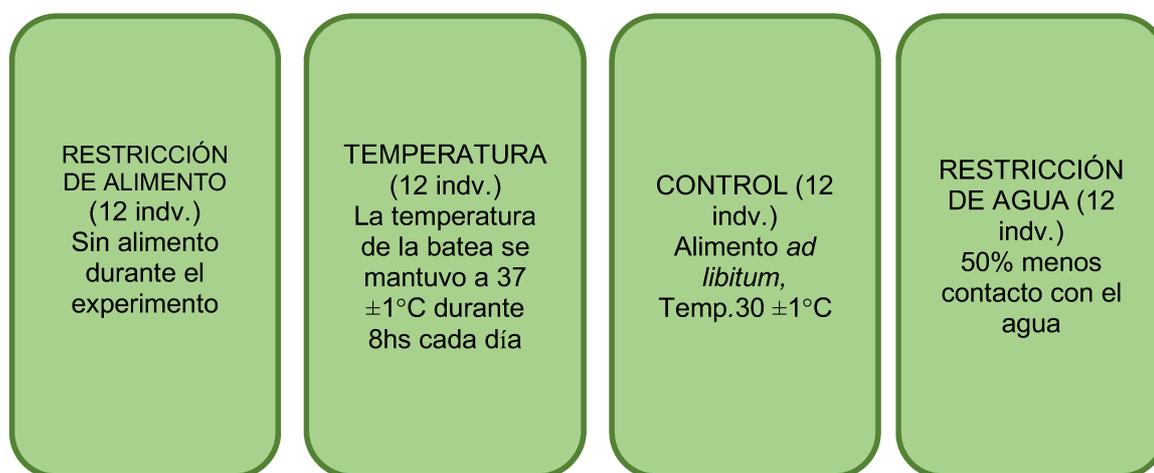


Figura 2.13 Diagrama de las bateas, con los respectivos tratamientos, donde se encontraban alojados los grupos experimentales durante la exposición.

2.2.3 Toma de muestras

Una vez finalizado el período de exposición de los caimanes a los factores de estrés, se efectuó la colecta de sangre de los individuos. La extracción se realizó, a partir de la vena espinal utilizando jeringas estériles, heparinizadas y equipadas con aguja de 25-G para analizar los recuentos totales de glóbulos blancos (TWBC) y estimar la proporción de cada subpoblación de leucocitos. A continuación, la sangre fue centrifugada con el fin de separar el plasma para realizar análisis adicionales. El plasma se almacenó a -80°C hasta que se lo sometió a los diferentes ensayos.



Figura 2.14 Toma de muestra de sangre de la vena espinal de un individuo de *Caiman latirostris*.

2.2.4 Medición de los niveles de corticosterona

Con el fin de evaluar si los tratamientos indujeron un estrés medible en los caimanes, se midieron las concentraciones de corticosterona en plasma mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) después de la extracción con dietiléter como fue descrito previamente por Jahn et al., (1995) y modificado para *C. latirostris* por Parachú Marco et al., (2014). Las muestras se analizaron por triplicado.

Todas las extracciones de corticosterona se realizaron tomando las medidas de seguridad necesarias. Para este paso, se usaron 250 μl de plasma de yacaré overo con el agregado de 1000 μl de dietiléter. Esta mezcla se vortexió durante 1 minuto y se colocó en freezer a -80°C durante 5 minutos. A continuación, se volcó el sobrenadante (dietiléter+hormona) en un tubo khan de vidrio. Este último paso se repitió, haciendo una segunda extracción. Finalmente cada tubo de vidrio se dejó bajo campana hasta el día siguiente, para que se

evapore el dietiléter, quedando la hormona adherida al vidrio del tubo. Se les colcó a cada tubo una pequeña cantidad de nitrógeno gaseoso y se los tapó con parafilm. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de reproducción y lactancia CRICYT-CONICET de la ciudad de Mendoza-Argentina para realizar las mediciones.

2.2.5 Medición de los índices inmunológicos

2.2.5.1 *Recuento total de glóbulos blancos (TWBC)*

Se utilizó una cámara de Neubauer para determinar el número total de leucocitos después de diluir una alícuota de sangre entera con una solución de NaCl al 0,6% en una proporción de 1: 200. El análisis se realizó usando un microscopio óptico en 400X y el resultado fue expresado como células totales/ μ L de sangre (Lewis et al., 2008).

2.2.5.2 *Análisis de las subpoblaciones de glóbulos blancos*

El cálculo del recuento diferencial de leucocitos se efectuó haciendo 2 extendidos sanguíneos por animal fijados con etanol, y luego se tiñeron con solución de May Grunwald-Giemsa y se observaron bajo un microscopio óptico en 1000X. Se examinaron los extendidos sanguíneos y se contó cada tipo de leucocito (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) para establecer un porcentaje. Estos valores y el conteo de TWBC se usaron luego para estimar la concentración de cada tipo de leucocito en la sangre (células/ μ L). Codificamos cada preparación para lograr la máxima objetividad en el análisis.

2.2.5.3 *Ensayo de anticuerpos naturales (NAbs)*

Para evaluar la inmunidad constitutiva, medimos los títulos de anticuerpos naturales (NAbs) en sangre usando el método de hemaglutinación descrito por Matson et al. (2005) con algunas modificaciones. Este método, se basa en la interacción antígeno-anticuerpo entre los NAbs y los glóbulos rojos de conejo (RRBC). La lisis refleja la interacción del complemento y NAbs, mientras que la aglutinación resulta de NAbs solamente (Matson et al., 2005). La sangre de conejo fue lavada de 2-3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) hasta que el sobrenadante se visualizó transparente, y luego se preparó una solución al 1% con los RRBC (v / v). Se realizó una dilución seriada del plasma de yacaré (25 μ l) en microplacas de 96 pocillos con fondo en U (Cromoplate®) seguido de un volumen igual de RRBC en NaCl (0,15 M) (RRBC 1%). Se cubrieron las placas con parafilm después de la homogeneización y se las dejó incubar a temperatura ambiente (25 \pm 2 °C) durante 2 hs. Luego determinamos visualmente la aglutinación, observando la placa en ángulo de 45° aproximadamente y frente a una fuente de luz para una mejor

visualización. Esta determinación fue realizada por duplicado y los títulos se expresaron como el recíproco transformado \log_2 de la dilución más alta de plasma que muestra hemaglutinación.

Los NABs tienen una alta reacción cruzada y ligan con baja afinidad a estructuras de carbohidratos compartidos por una gran variedad de patógenos y células de mamíferos (Murphy, 2011). Por este motivo fue necesario obtener una suspensión de glóbulos rojos (GR) de una especie que exprese altos niveles de α -N acetil-galactosamina (Cotter et al., 2005) como los de conejo.

2.2.5.4 Actividad del sistema del complemento

De acuerdo a lo propuesto por Siroski et al. (2010), se llevo a cabo el ensayo para detectar la actividad del sistema del complemento llamado análisis de hemólisis de los glóbulos rojos de oveja (SRBC) que se basa en la alteración hemolítica de los SRBC mediante proteínas inmunológicas séricas. La recolección de sangre total heparinizada de la vena yugular de ovejas Merino (*Ovis aries*) proporcionó SRBC frescos necesarios para nuestro experimento. La sangre de oveja fue lavada de 2-3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) hasta que el sobrenadante quedó transparente, y luego preparamos una solución al 2% de SRBC (v / v).

Las pruebas se realizaron en el laboratorio a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) colocando 200 μ l de plasma de yacaré overo junto con 200 μ l de solución de SRBC al 2% (v / v) en eppendorf esterilizado. Después de 30 min de incubación, la mezcla se centrifugó y se usaron 300 μ l de sobrenadante para cargar la placa y obtener las lecturas a través del lector de microplacas. Como control positivo para la hemólisis se utilizó la solución de SRBC al 1% con el agregado de Triton X-100 al 1% (v / v) y la preparación se cargó también en microplaca. Medimos la densidad óptica del sobrenadante en un lector de microplacas a 540 nm, y calculamos la máxima hemólisis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de hemólisis máxima (% MH).

2.2.6 Medición de parámetros bioquímicos

2.2.6.1 *Determinación de proteínas totales, albuminas y glicemia*

Para la realización de los parámetros bioquímicos, se determinaron las concentraciones de proteínas plasmáticas totales (PPT) y albúmina (A) de los yacarés provenientes de cada uno de los tratamientos experimentales. Se utilizó un ensayo colorimétrico por medio de un kits (Proti2, Wiener lab., 2000 Rosario, Argentina) que proporciona los reactivos para ambas

determinaciones. Además, se llevó a cabo la medición de glicemia enzimática (GLI), la cual se determinó usando un método colorimétrico enzimático a través de un Kits específico para esta determinación (Wiener lab., 2000 Rosario, Argentina). Las lecturas se efectuaron a una absorbancia de 540nm para PPT, 625 nm para A y 505 nm para GLI en espectrofotómetro (BMG Labtech).

2.2.7 Análisis estadístico

Antes de la exposición a cada uno de los tratamientos realizamos comparaciones iniciales para verificar que los animales no difirieran entre sí. Mediante el test del análisis de la varianza ($p \leq 0.01$) se constataron los valores de peso, longitud (TL y SVL) y condición corporal (Bc).

El conjunto principal de datos experimentales se analizó utilizando Modelos Lineales Mixtos (LMM) y Modelos Lineales Mixtos Generalizados (GLMM), por medio de los paquetes lme4, languageR y lmerTest del software estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Agregamos el intercepto aleatorio 'ID de la batea' y 'año' para tener en cuenta la falta de independencia de las observaciones de la misma batea. Usamos un GLMM con una respuesta binomial negativa para analizar los títulos de anticuerpos naturales. Para los parámetros restantes, se usaron LMM. Las variables independientes fueron 'tratamiento' (4 niveles) y 'nido'; este último para tener en cuenta el efecto 'nido'.

El término “*efecto nido*” ha sido definido por Verdade (1997) como la influencia de la carga genética y fenotípica transmitida por los reproductores al embrión y al contenido del huevo, asociado también a la influencia del entorno de incubación de los huevos; y constituye una de las principales causas de variabilidad ampliamente estudiada en parámetros analizados, principalmente sobre el crecimiento, en especies de cocodrilianos. De este manera, las crías procedentes de distintos nidos de origen pueden mostrar posteriormente, diferencias en la respuesta frente a la exposición de condiciones ambientales variables (Verdade, 1997).

2.3 Resultados

2.3.1 Comparaciones de base

Las comparaciones iniciales mostraron que los animales experimentales no difirieron significativamente en términos de peso ($p = 0.160$), longitud ($p = 0.464$) y condición corporal ($p = 0.473$) antes de aplicar los tratamientos. La estadística descriptiva de todos los parámetros medidos al final del experimento se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Valores medios, mínimos y máximos para el crecimiento, Bc (condición corporal), CORT (corticosterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), PPT (proteínas plasmáticas totales), A (Albumina) y GLI (Glicemia enzimática) medidos en *C. latirostris* en cada tratamiento de estrés. CTL (Control), WR (restricción de agua), FR (restricción de alimentos), TMP (temperatura).

Parámetros\Tratamientos	CTL Media (min, max)	WR Media (min, max)	FR Media (min, max)	TMP Media (min, max)
Peso(g)	112 (54; 189)	104,7 (43; 172)	76,3 (45; 149)*	161,9 (104; 265) *
SVL(cm)	15,5 (13; 18,5)	14,9 (11,3; 17)	14,4 (13; 18) *	16,6 (15; 20) *
Bc (g/cm)	7,08 (4,15; 10,22)	6,88 (3,80; 10,12)	5,23 (3,46; 8,58)*	9,68 (5,59; 13,25) *
CORT(ng/ml)	188 (3,6; 1730)	193 (5,3; 1566)	195,8 (7; 1424)	94,8 (0,3; 288,6) *
Log2 títulos NAb	8,2 (6; 18)	8,2 (6; 12)	9,5 (7; 17) *	10,3 (7; 22) *
CS (MH%)	27,35 (0,35; 161,6)	27,5 (0,19; 151,7)	29,1 (0,05; 163,9)	38,7 (2,2; 162,4)
TWBC (células/ μ l)	18900 (3250; 49500)	23140 (10500; 67250)	20160 (9250; 56500)	20820 (8000; 56000)
H (células/ μ l)	6253 (796; 16340)	6970 (1242; 17850)	7099 (111; 22750)	7828 (77; 23520)
L (células/ μ l)	11490 (2129; 37600)	13490 (4725; 44720)	11460 (2590; 37570)	10430 (2972; 30800)
E (células/ μ l)	1287 (ND; 9555)	2652 (ND; 13540)	1566 (ND; 9048)	2428 (120; 17760)
M (células/ μ l)	93,3 (ND; 1270)	222 (ND; 1210)	15 (ND; 202)	130,2 (ND; 793)
PPT (g/dl)	3,4 (2,4; 7,2)	3,4 (2,2; 7,3)	3 (2; 3,7)	3,9 (2,7; 7,4)
A (g/dl)	1,6 (0,93; 2,6)	1,6 (1,2; 2,2)	1,1 (0,7; 1,6)	1,5 (0,5; 2,04)
GLI (mg/dl)	60,8 (26,5; 124)	64,9 (19,6; 123)	42,6 (23,8; 62,4)	93,9 (64,9; 162)

* Indica diferencia significativa

ND (indica no detectado)

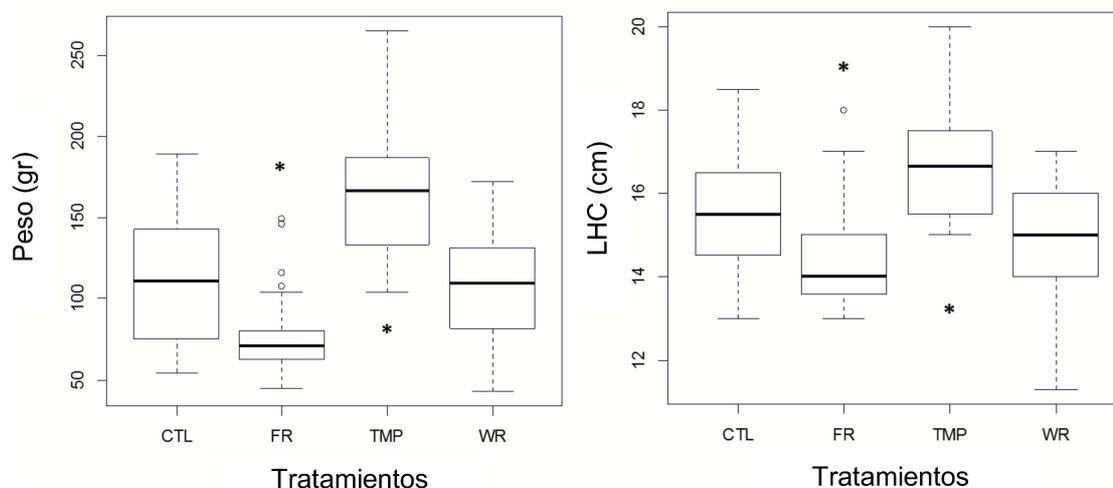
2.3.2 Evaluación del crecimiento

Los tratamientos de estrés tuvieron efectos disímiles sobre el peso, el SVL y la condición corporal (peso / SVL) (Figura 2.15, Tabla 2.2). Mientras que los individuos en el grupo WR parecían pesar menos que los controles, esta diferencia no fue estadísticamente diferente ($p = 0,6400$). Los animales expuestos a estrés por temperatura pesaron en promedio 50% más que los controles ($p < 0,0001$), mientras que aquellos en el grupo de restricción de alimentos

pesaron 36% menos ($p < 0,0001$). Los individuos de WR y FR tuvieron significativamente menor longitud que los controles (0,5 cm y 1,1 cm en promedio, respectivamente), mientras que aquellos expuestos a temperaturas más altas crecieron en promedio 1,2 cm más que los controles. La condición corporal de los caimanes del grupo WR no difirió en comparación con los controles ($p = 0,8244$), sin embargo, el estado corporal de los animales del tratamiento FR fue en promedio un 26,5% menor que los controles ($p < 0,0001$). A su vez, los individuos en los grupos de TMP tenían índices de condición corporal 36,5% más altos ($p < 0,0001$) que los controles.

Tabla 2.2 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre los parámetros somáticos. FR (restricción alimentaria), TMP (temperatura) y WR (restricción de agua). * indica una diferencia significativa.

	Peso			SVL			Condición corporal		
	Coefficientes	Error estándar	Valores-p	Coefficientes	Error estándar	Valores-p	Coefficientes	Error estándar	Valores-p
Intercepto	112,09	15,85	0,00	15,47	0,64	0,00	7,09	0,71	0,00
FR	-36,38	12,96	0,00*	-1,10	0,44	0,01*	-1,8	0,66	0,00*
TMP	50,96	12,96	0,00*	1,24	0,44	0,00*	2,63	0,66	0,00*
WR	-6,07	12,97	0,64	-0,52	0,44	0,23	-0,14	0,66	0,82



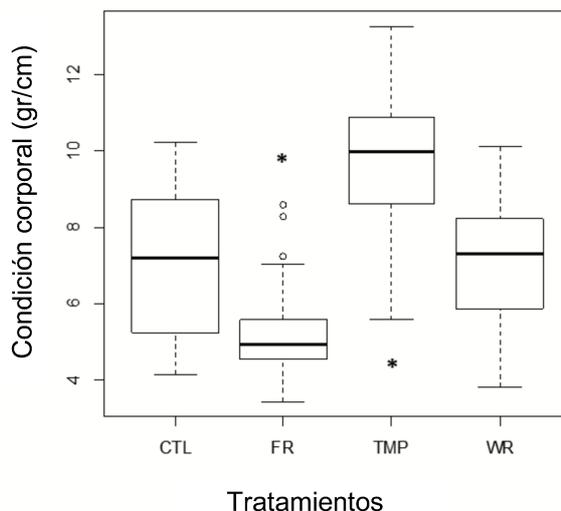


Figura 2.15 Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes FR (restricción de alimentos), TMP (temperatura), WR (restricción de agua) y CTL (control) sobre el peso (a), SVL (b) y condición corporal (c). Los diagramas de caja representan la mediana (barra en negrita), cuartiles del 25-75% (caja), cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos) del 10-90%.

* Indica una diferencia significativa.

2.3.3 Medición de los niveles de corticosterona

Encontramos que los tratamientos de estrés no aumentaron los niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml) al final de la etapa experimental de exposición a los tratamientos (Figura 2.16). Los individuos de WR y FR no difirieron de los controles ($p= 0,6577$ y $p = 0,5248$, respectivamente). Por el contrario, los caimanes expuestos a altas temperaturas mostraron un 49,5% menores niveles de corticosterona que los controles ($p < 0,0029$).

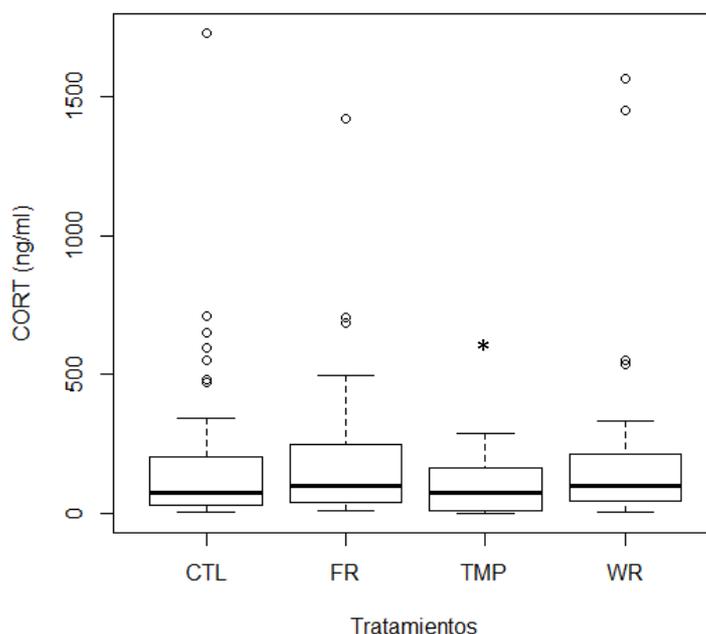


Figura 2.16 Efecto de los tratamientos sobre los niveles plasmáticos de corticosterona. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes FR (restricción de alimentos), TMP (temperatura), WR (restricción de agua) y CTL (control) en los niveles plasmáticos de corticosterona. Los diagramas de caja representan la mediana (barra en negrita), cuartiles del 25-75% (caja), cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos) del 10-90%. * Indica una diferencia significativa.

2.3.4 Índices inmunológicos

No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con respecto al recuentos de glóbulos blancos total (TWBC) o diferencial (Tabla 2.3). Además, no se encontraron diferencias significativas en la actividad del sistema del complemento (% MH-porcentaje de máxima hemólisis). Por el contrario, el efecto de los tratamientos sobre los títulos de anticuerpos naturales fue diferente (Figura 2.17, Tabla 2.4). Los individuos de los grupos TMP y FR mostraron títulos de anticuerpos naturales significativamente más altos que los controles ($p < 0,00177$ y $p < 0,04419$, respectivamente). Los niveles de anticuerpos naturales no difirieron entre los animales de tratamiento WR y controles.

De la misma manera, no se encontraron diferencias en la relación de heterófilos/linfocitos (relación H/L) en los tratamientos de estrés (WR = 0,5504, FR = 0,9547 y TMP = 0,3960).

Tabla 2.3 Modelo lineal mixto que evalúa el efecto de los tratamientos en el recuento total y en los diferentes tipos de glóbulos blancos. TWBC (recuento total de glóbulos blancos, H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos) y M (monocitos).

	Intercepto			WR			FR			TMP		
	Coeficientes	Error estándar	Valor-p									
TWBC	18787,9	5204,8	0,06	4299,2	4739,7	0,24	1192	4740,4	0,5494	2306,8	4740,4	0,42
H	6243,6	992,8	0,003	703,3	1406,5	0,61	855	1404	0,54	1529,6	1404	0,27
L	11328	3438,4	0,09	2053,8	2912	0,48	-5,31	2909,7	0,99	-712,7	2909	0,80
E	1246,5	1591,6	0,53	1333,5	1179	0,25	276	1178	0,81	1348	1178	0,25
M	89,42	108	0,52	131	69	0,06	-76	108	0,27	46	69	0,50

Tabla 2.4 Modelos lineales mixtos generalizados que describen el efecto de los tratamientos sobre los títulos de anticuerpos naturales. FR (restricción alimentaria), TMP (temperatura) y WR (restricción de agua). * indica una diferencia significativa.

Tratamientos	Coeficientes	Error estándar	Valor-p
Intercepto	8,15612	1,57732	0,10525
FR	1,26427	0,55745	0,04419 *
TMP	2,27533	0,55755	0,0017 *
WR	0,06453	0,55929	0,91017

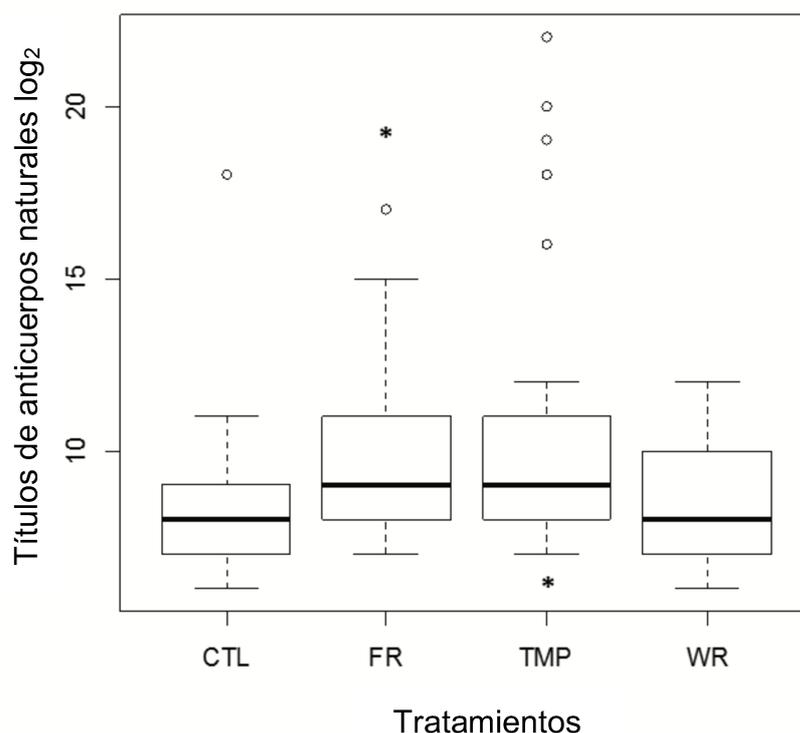


Figura 2.17 Efecto de los tratamientos sobre los títulos de anticuerpos naturales. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes FR (restricción alimenticia), TMP (temperatura), WR (restricción de agua) y CTL (control) sobre los títulos de anticuerpos naturales, expresados como la última dilución de suero o plasma que muestra evidencia clara de aglutinación. Los diagramas de caja representan la mediana (barra en negra), cuartiles del 25-75% (caja), 10-90% cuantiles (bigotes) y valores atípicos (puntos). * Indica una diferencia significativa.

2.3.5 Medición de parámetros bioquímicos

Los tratamientos causaron diferentes efectos sobre los parámetros bioquímicos sanguíneos en los yacarés. Las concentraciones de glucosa (Figura 2.18 A, Tabla 2.5) en los yacarés del grupo temperatura fueron 33% más elevadas en comparación con los individuos del grupo control ($p < 0,0372$). Por el contrario, las concentraciones de albumina del grupo con restricción de alimento (Figura 2.18 B, Tabla 2.6) fueron 32% menores a las del grupo control ($p < 0,0141$). No se encontraron diferencias entre los tratamientos con respecto a las proteínas plasmáticas totales.

Tabla 2.5 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre las concentraciones de glucosa. FR (restricción alimentaria), TMP (temperatura) y WR (restricción de agua). * indica una diferencia significativa.

Tratamientos	Coefficientes	Error estandar	Valor-p
Intercepto	60,75	16,32	0,01
FR	18,08	13,84	0,21
TMP	32,78	13,83	0,03 *
WR	4,15	13,85	0,82

Tabla 2.6 Modelos lineales mixtos que describen el efecto de los tratamientos sobre la concentración de albúmina. FR (restricción alimentaria), TMP (temperatura) y WR (restricción de agua). * indica una diferencia significativa.

Tratamientos	Coefficientes	Error estandar	Valor-p
Intercepto	1,63	0,12	2,93e-08
FR	-0,52	0,18	0,01 *
TMP	-0,14	0,18	0,44
WR	-0,06	-0,34	0,73

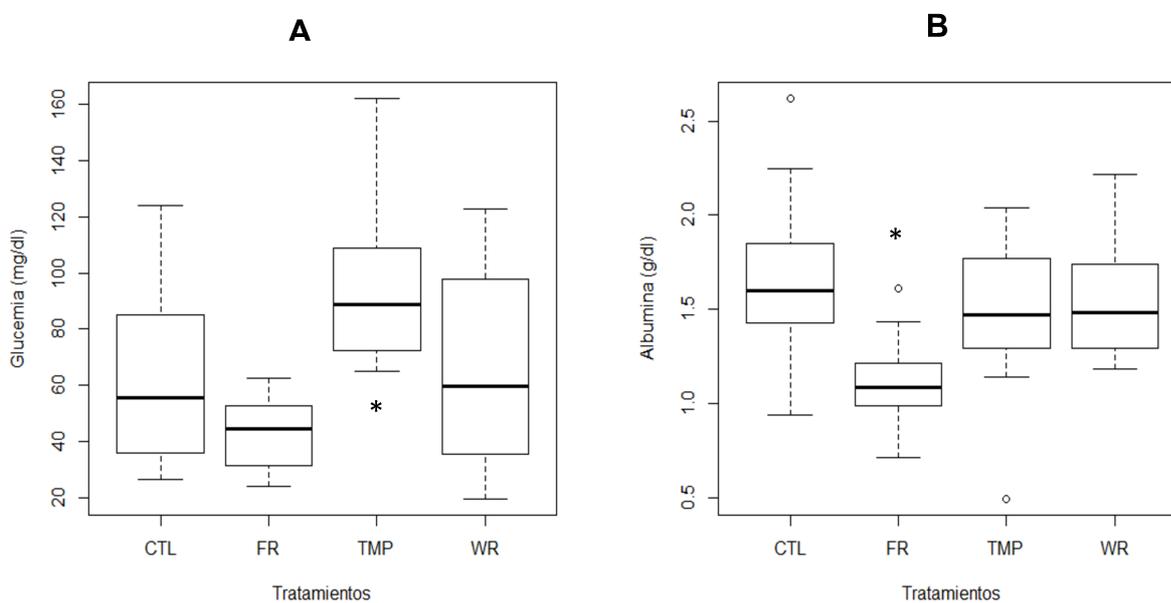


Figura 2.18 Efecto de los tratamientos sobre los valores de glicemia enzimática (A) y Albúmina (B). Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos diferentes FR (restricción alimenticia), TMP (temperatura), WR (restricción de agua) y CTL (control) sobre los valores de glicemia y Albúmina, expresados en mg/dl y g/L respectivamente. Los diagramas de caja representan la mediana (barra en negrita), cuartiles del 25-75% (caja), 10-90% cuantiles (bigotes) y valores atípicos (puntos). * Indica una diferencia significativa.

2.4 Discusión

Los glucocorticoides han sido medidos como una indicación de respuesta al estrés en una amplia gama de taxones, peces (Fast et al., 2008; Morandini et al., 2014), aves (Martin et al., 2005; Liebl y Martin, 2013), reptiles (Cote et al., 2010; Meylan et al., 2010) y roedores (Bartolomucci, 2007; Cuervo, 2017). Estos estudios han evaluado diferentes tipos de factores estresantes (naturales o antropogénicos), encontrando diversos efectos. Por ejemplo, en reptiles, Cote et al., (2010) informaron que los lagartos comunes (*Lacerta vivipara*) bajo restricción alimenticia tenían altos niveles de corticosterona, pero esto no alteró su comportamiento normal. La temperatura extrema, un estresor de especial interés para los ectotermos, fue evaluada por Dupoué et al., (2013) en serpientes constrictoras (*Antaresia childreni*), demostrando que las pitones expuestas a temperaturas frías (17°C) tenían concentraciones de corticosterona más altas en comparación con aquellas expuestas a temperaturas cálidas (35°C). Los valores de corticosterona encontrados en este trabajo estuvieron dentro de los rangos reportados para juveniles en los estudios citados anteriormente por Turton et al., (1997) (2,2 a 140,5 ng/ml) en *C. porosus* y Morici et al., (1997) en *A. mississippiensis* (3,8 a 42,8 ng/ml). Sin embargo, los valores promedio fueron significativamente más altos en todos los tratamientos que los descritos por Finger et al., (2015) (1,8 ng/ml) en *C. porosus* y Parachú Marcó et al., (2015) para embriones de *C. latirostris* (0,01 ng/ml a 7 ng/ml).

Nuestro conocimiento actual sobre el efecto del estrés en la fisiología de los cocodrilos se limita a sólo unos pocos estudios experimentales que evaluaron la temperatura, las prácticas aplicadas en los criaderos, el hacinamiento y los implantes de corticosterona a largo plazo. Diferente a los resultados obtenidos para *C. latirostris* en este trabajo, un estudio realizado por Turton et al., (1997) en *Crocodylus porosus* informó que los animales expuestos a alta temperatura del agua (36°C) mostraron niveles aumentados de corticosterona y crecimiento reducido, en comparación con los controles (32°C). Otro estudio en *A. mississippiensis* produjo evidencia del efecto estresante del hacinamiento, ya que los alligators mantenidos con la densidad de población más baja (0.18 m²/Alligator) crecieron significativamente más rápido que aquellos mantenidos con altas densidades de población (0.12 m²/ Alligator). Además, las densidades poblacionales se correlacionaron directamente con los niveles de corticosterona (Else y et al., 1990a). Del mismo modo, Morici et al., (1997) llevaron a cabo un experimento utilizando implantes de corticosterona en caimanes y encontraron que los animales que recibieron corticosterona experimentaron una reducción en el crecimiento y tuvieron porcentajes disminuidos de linfocitos, eosinófilos y basófilos. Por el contrario, Finger

et al., (2015) mostraron que los niveles de corticosterona obtenidos en juveniles de *C. porosus* bajo las prácticas normales de crianza no logró afectar el crecimiento, la inmunidad innata y la inmunidad celular. Siendo los valores de las concentraciones de corticosterona detectados por Morici et al. (1997) y Finger et al. (2015) más bajos de los que reportamos en el presente estudio también en juveniles de *C. latirostris*. Según estos autores, la diferencia de edad podría influir sobre las variaciones en los niveles de corticosterona, pero en los trabajos citados como en nuestros reportes, se utilizaron animales de edades similares. Por esta razón, una explicación estaría dada por las diferencias en las habilidades de los individuos para adaptarse a los distintos entornos en los que se llevaron a cabo los experimentales.

En nuestro estudio, los únicos efectos negativos sobre los animales fueron causados por la privación del alimento. La longitud hocico-cloaca, el peso y la condición corporal fueron significativamente menores en los grupos FR en comparación con otros grupos. Este efecto del estrés nutricional sobre los parámetros de crecimiento era esperado y ha sido documentado en varios taxa (Kitaysky et al., 2003; Cote et al., 2010). A pesar de los niveles de corticosterona encontrados, el marcado efecto en el crecimiento y la condición corporal no se reflejó de la misma manera en la falta de diferencias observadas en los niveles de corticosterona entre los caimanes del grupo FR y los controles. Esto nos permite suponer que el período al cual estuvieron expuestos a este tratamiento, no sería suficiente para que se manifiesten diferencias en los niveles de corticosterona. Así mismo, sugiere que podrían tolerar la falta de alimento por un período de tiempo mayor para considerar la privación de alimento como un estresor tal que estimule la liberación de corticosterona en esta especie.

Se sabe que las altas temperaturas son estresantes en ectotermos y, por lo tanto, pueden provocar una activación del eje HPA (Lourdais et al., 2008). Sin embargo, en nuestro experimento, el efecto de la temperatura pareció ser beneficioso en varias de las variables medidas. Los individuos expuestos al tratamiento térmico ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) crecieron más y tuvieron una mejor condición corporal, y niveles más altos de NAbs. Sumado a esto, no encontramos evidencia de una respuesta al estrés en aquellos mantenidos en este tratamiento, por el contrario, los niveles de corticosterona fueron significativamente más bajos que los de los caimanes en todos los otros grupos. De manera similar, las pitones expuestas al estrés agudo por calor (35°C durante 48 hs), inesperadamente presentaron niveles más bajos de corticosterona en comparación con los niveles de corticosterona basales antes de la exposición al calor. Por el contrario, en las lagartijas del occidente (*Sceloporus occidentalis*), las temperaturas elevadas causaron un efecto negativo sobre la condición corporal (Dunlap y Wingfield, 1995). Se debe tener en cuenta que la temperatura

ambiental es importante para la ingesta de alimentos, el comportamiento y los procesos digestivos en los cocodrilos. En *A. mississippiensis* y *C. acutus*, el rango óptimo de temperatura para la alimentación se considera entre 25 y 35°C (Lang, 1979; Turton et al., 1997). El rango óptimo de temperatura para *C. latirostris* está entre 23°C y 35°C (Basetti et al., 2014), pero los resultados informados sugieren que los caimanes tuvieron un mejor crecimiento, a temperaturas más altas. Otros autores informaron un crecimiento mejorado en *C. latirostris* a altas temperaturas. Parachú Marcó et al., (2010) comprobaron que la temperatura de crianza tuvo un profundo efecto en el crecimiento de las crías. Los animales mantenidos a 33°C habían crecido más que los mantenidos a 29°C. El apetito depende de la disponibilidad de temperaturas cálidas para digerir y asimilar los alimentos (Lang, 1987). La digestión se ve directamente afectada por la temperatura; el aumento de las temperaturas provoca un aumento en la demanda de alimento, mayor frecuencia y amplitud de contracción gástrica y actividad péptica. Por un lado, los niveles más bajos de corticosterona en caimanes expuestos a 37°C podría deberse a que la temperatura a la que estuvieron expuestas en este tratamiento no fue un factor estresante como se supuso originalmente y, por lo tanto, estos animales estarían perfectamente adaptados para tolerar estas situaciones. Por otro lado, la sensibilidad de la función adrenocortical puede depender de la condición corporal de los cocodrilos (en este caso, los animales sometidos a estrés térmico tenían una mejor condición corporal). Esto ha sido sugerido por Jessop et al., (2003), quienes documentaron que los cocodrilos australianos de agua dulce (*Crocodylus johnstoni*) bajo estrés de captura tenían niveles diferenciales de corticosterona dependiendo de su condición corporal: siendo la respuesta al estrés menor cuanto mejor era la condición corporal.

El agua superficial también es un recurso importante en la historia de la vida de los cocodrilos porque está involucrada en muchos procesos fisiológicos. La evaporación aumenta cuando la temperatura aumenta, sugiriendo una interacción potencial entre la termorregulación y el balance hídrico en ectotermos (Lorenzon et al., 1999). Los lagartos y serpientes sometidos a restricción total de agua durante un mes experimentaron una pérdida significativa de peso corporal y aumentos en la corticosterona plasmática (Lorenzon et al., 1999; Dupoué et al., 2013). Se esperaba que los niveles de corticosterona fueran más altos en los juveniles de *C. latirostris* bajo tratamiento de restricción hídrica como resultado del estrés hídrico, pero la diferencia observada no fue estadísticamente diferente. Tampoco se detectó ningún efecto en los parámetros fisiológicos evaluados, lo que probablemente ilustra que la restricción del 50% de agua no fue suficiente como para desencadenar una respuesta al estrés. Esta reducción del nivel de agua, se seleccionó con la intención de simular una situación lo más cercana posible a la realidad. A su vez, se tuvo en cuenta que estas

circunstancias no generen un sufrimiento o daño para los animales a pesar de que en su hábitat natural las condiciones son más severas (Larriera e Imhof, 2006).

Estudios previos realizados sobre cocodrilos y otros reptiles mostraron una asociación entre los niveles altos de corticosterona y la depresión de la función inmune (Morici et al., 1997; Berger et al., 2005; Martin, 2009). En nuestro estudio, los índices de la función inmune variaron significativamente entre los individuos, aunque no observamos mecanismos inmunológicos disminuidos. Además, el tratamiento de estrés por calor y la restricción de alimentos causaron aumento en los niveles de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos naturales (NAbs) son parte del sistema inmune constitutivo (innato) y son únicos entre las moléculas de inmunoglobulinas porque su presencia no requiere exposición previa a un antígeno particular (Martin, 2009). Los anticuerpos naturales reaccionan con diversas afinidades a una amplia variedad de epítomos en antígenos macromoleculares y particulados, incluidos glóbulos rojos (RBC), bacterias, virus y toxinas extrañas, y deben ser menos sensibles a las variaciones a corto plazo en las condiciones ambientales, estado nutricional, o niveles de estrés (Matson et al., 2005). Curiosamente, en el grupo FR que fue el único grupo en el que la condición corporal y el crecimiento de los caimanes se vió afectada, se observó un efecto similar al que mostraron los carpinchos, un roedor que vive en simpatria con los caimanes. Los capibaras expuestos a una restricción alimentaria prolongada crecieron menos y presentaban una condición corporal muy pobre, pero tenían títulos de NAbs más altos que los individuos alimentados ad libitum (Eberhardt et al., 2013). Las ratas de laboratorio también mostraron una condición corporal deficiente y mayores títulos de NAbs cuando se les privó de alimentos con la adición o combinación de conflictos sociales (Cuervo, 2017). Esta respuesta inmune en momentos en que hay una falta de recursos sugiere que en estas especies la restricción nutricional crónica induce una mejora de algunos compartimentos de la función inmune. Esto podría interpretarse como una profilaxis inducida por la privación de alimento. En la historia de vida de algunas especies, la limitación crónica de los alimentos podría estar asociada con un mayor riesgo de infección (Beldomenico y Begon, 2015), por lo que priorizar en algunos componentes del sistema inmunitario durante estos períodos podría ser una buena estrategia para maximizar las probabilidades de supervivencia.

En cuanto a los aumentos en los niveles de NAbs en individuos mantenidos a temperaturas más altas, esto podría interpretarse como una inversión en el sistema inmune durante un período crítico. Varios autores mencionaron herida y lesiones en algunas especies de cocodrilos como consecuencia de graves disputas (Siroski et al., 2009; Isberg y Shilton, 2013). Este comportamiento social se vuelve más conspicuo en las temporadas de

reproducción, que ocurren en paralelo con los períodos de temperaturas más altas, y una mayor exposición a los patógenos donde *C. latirostris* vive. Lo mismo se aplica a la restricción de alimentos: el aumento de la competencia por recursos limitados puede dar lugar a una mayor incidencia de lesiones y, por lo tanto, el aumento de los niveles de NAbS como respuesta a la limitación alimentaria también sería una estrategia favorable.

La bioquímica de la sangre representa una valiosa herramienta de diagnóstico adicional para evaluar la salud general de los organismos (Aguirre y Balasz, 2000). Los valores obtenidos en este estudio para cada una de las determinaciones bioquímicas estuvieron dentro de los reportados para la especie y mostraron gran variabilidad. Esto último puede deberse a diversos factores intrínsecos y extrínsecos, como la calidad del ambiente acuático, variaciones genéticas, sexo, estado de crianza y dieta (Zayas et al., 2011). Las altas concentraciones de glucosa encontradas en los caimanes del grupo TMP y las bajas concentraciones de albúminas en el grupo FR, parecen explicar los aumentos y disminución de peso registrados respectivamente en cada uno de estos grupos. Esto se debe a que en los reptiles, una elevación de temperatura está asociado al incremento en el catabolismo de la glucosa que se traduce en el aumento de la glucosa sanguínea (Silvestre et al., 2011). Por otro lado, la albúmina representa la proporción mayoritaria del proteinograma y está sujeta a variaciones específicas. Una hipoproteinemia en reptiles es consecuencia de problemas de malnutrición crónica, malabsorción y mala digestión (Frey et al., 1991; Silvestre et al., 2013). El contenido de proteínas plasmáticas totales en los animales durante la exposición a los tratamientos no mostró cambios, lo que sugiere que el catabolismo proteico pudo mantenerse bajo control en las condiciones experimentales de los individuos.

Este es el primer estudio que explora el efecto de los factores de estrés seleccionados sobre la aptitud de *C. latirostris*. Nuestros hallazgos contribuyen al conocimiento de la historia natural de esta especie y de los cocodrilianos en general. Sugieren además que los juveniles de *C. latirostris*, considerado una clase etaria vulnerable de esta especie, toleraron la exposición a los factores ambientales utilizados en nuestra investigación. En particular, se benefició de las altas temperaturas en condiciones controladas, permitiéndonos suponer sobre que componentes inmunológicos invertirían en el caso de enfrentar un período estival normal. Teniendo evaluados los factores ambientales individualmente, sería conveniente profundizar en el estudio, para conocer el efecto de la interacción entre estos mismos factores ambientales sobre la interacción estrés-sistema inmune de los caimanes. De esta manera, comparar la inversión inmunológica ante otras situaciones más próximas a las reales.

Capítulo 3

Evaluación de la respuesta inmediata al estrés físico y químico en *Caiman latirostris*



3.1 Introducción

Se han descrito una gran cantidad de eventos impredecibles y nocivos a los que los reptiles deben hacer frente en los ambientes que se distribuyen, muchos de los cuales no sólo tienen el potencial de ser estresantes, sino que también pueden dar lugar a altas tasas de mortalidad (Romero et al., 2004; Lance et al., 2010; Olsson y Phalen, 2013). Estos eventos, denominados lábiles o transitorios, que son de corta duración e incluyen la pérdida del nido y la destrucción de sus ambientes debido a tormentas severas cortas (como el granizo), incendios (localizado), terremotos, tsunamis, etc. (Blaustein et al., 2010; Wingfield, 2013) pueden ser críticos para las poblaciones en su hábitat natural, ya que redirigen al individuo de una etapa normal de la historia de vida a una estrategia de supervivencia (Wingfield y Romero, 2001).

La respuesta inicial (de lucha o huida) de los animales frente a alguno de los eventos ambientales impredecibles es rápida (Cirule et al., 2012) y fue denominada por Hans Selye (1975) como “la etapa de alarma”, que generalmente se representa como la respuesta al estrés agudo (a corto plazo). Las características de esta etapa se basan en una serie de síntomas que incluyen cambios fisiológicos, regulados por el eje Simpático-Adreno-Medular (SAM), aumentos en la presión arterial, frecuencia respiratoria, tono muscular e incremento de glucocorticoides circulantes (Cirule et al., 2012). En este último caso, Selye concibió que los glucocorticoides tenían un rol estimulante directo para enfrentar con éxito un factor estresante agudo (Selye, 1975; Boonstra et al., 2014).

En el corto plazo (estrés agudo), se debe proporcionar alerta y energía para que el animal pueda contrarrestar los efectos del estresor y mantenga la homeostasis (Fast et al., 2008). Este mecanismo implica la activación del sistema nervioso autónomo central y la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) en la hipófisis anterior. La ACTH actúa principalmente sobre la corteza suprarrenal, promoviendo la síntesis y secreción de corticosterona (principal glucocorticoide en algunas especies de mamíferos y en todos los reptiles) (Wingfield y Romero, 2001). El aumento de los glucocorticoides, a causa de una situación estresante, provoca que la glucosa esté fácilmente disponible como una fuente de energía. Los niveles elevados de glucocorticoides también pueden demandar la ingesta de alimentos, inhibir el comportamiento reproductivo y activar el sistema inmunológico (Wingfield y Romero, 2001). De hecho, se ha propuesto que los factores estresantes agudos, o estímulos que causan interrupciones de corta duración a la homeostasis, mejoran ciertas respuestas inmunes (Dhabhar, 2014). Entre ellas, el inmunoascenso, en lugar de la inmunodepresión, en el componente leucocitario constituye uno de la cascada de eventos adaptativos durante este

período (Sapolsky et al., 2000; Dhabhar y Viswanathan, 2005; Davis et al., 2008) para lograr el mantenimiento de la homeostasis.

Estudios previos han demostrado que existe una gran variedad de métodos que permiten inducir una respuesta de la corticosterona. Entre los más comunes, que se emplean en reptiles, para evaluar una respuesta al estrés agudo se encuentran la captura, la restricción de movimiento (inmovilización corporal), la estimulación de la secreción de corticosterona mediante inyección de ACTH (introduciendo en el organismo una dosis determinada) o la administración de implantes de corticosterona exógena (Wingfield y Romero, 2001). La diferencia de estos métodos radica en la forma en que modularán la respuesta en los animales y en los diferentes cambios fisiológicos que generen. Aumentos en la concentración de corticosterona, se han indicado en los estorninos europeos (*Sturnus vulgaris*) en respuesta a la administración de tres dosis diferentes de ACTH exógena y restricción física (Rich y Romero, 2005). De manera similar, los salmones del Atlántico (*Salmo salar*) exhibieron niveles significativamente elevados de cortisol después de haber sido expuestos a estrés por manipulación (Fast et al., 2008). Por otro lado, en relación a los efectos ocasionados por los niveles elevados de corticosterona sobre algunos componentes del sistema inmune, se han reportado diferentes respuestas de la inmunidad celular. Minutos después de la captura, en passeriformes (*Parus major*), Cirule et al. (2012) encontraron aumentos significativos en los conteos de heterófilos y una disminución en los conteos de linfocitos. Mientras que en roedores se demostró que la actividad inmunitaria tiende a ser elevada, observando aumentos en los conteos tanto de linfocitos como de heterófilos (Martin et al., 2009). Esto comprueba que los efectos de los factores de estrés agudos sobre la modulación en las concentraciones de corticosterona y la relación de estos cambios sobre la alteración del sistema inmune están bastante caracterizados en los mamíferos, aves y peces, pero poco estudiado en reptiles (Guillette et al., 1995; Meylan et al., 2010).

Particularmente, en los cocodrilianos existen estudios que evalúan la respuesta al estrés agudo utilizando los métodos tradicionales anteriormente descritos (captura, inmovilización del movimiento, corticosterona exógena). En los machos de *Alligator mississippiensis* se ha demostrado que el estrés de captura resulta en aumentos en la corticosterona plasmática y en la disminución de la testosterona plasmática (Lance y Elsey, 1986). De manera similar, los machos de esta misma especie han respondido a una inyección de ACTH con niveles plasmáticos elevados de corticosterona, pero sin cambios en la testosterona plasmática (Lance y Laurence, 1984; Mahmoud et al., 1996). Estos trabajos son realizados con el objetivo puesto en evaluar los protocolos de procedimiento en los criaderos y el efecto de los factores de estrés agudo sobre las hormonas involucradas en la reproducción, que

indirectamente podría afectar a la industria de las granjas de cría. Sin embargo, son escasos los estudios donde se proporciona una relación entre estos posibles métodos de evaluar el estrés, la concentraciones de corticosterona y de que manera la variación de esta, podría modular la repuesta inmune de los animales.

Es por ello que el objetivo de este capítulo propone evaluar la respuesta al estrés a corto plazo utilizando un método artificial de inducción de corticosterona, previamente reportado en otras especies de cocodrilianos (respuesta forzada) y un método de restricción física (respuesta dependiente de la percepción del animal), con el propósito de establecer, si los métodos usados provocan cambios sobre los niveles de corticosterona y si estos niveles generan alteraciones sobre los parámetros inmunológicos en individuos de *C. latirostris*.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Animales utilizados

Para llevar a cabo este estudio experimental, se utilizaron 40 individuos de *Caiman latirostris* de 1 año de edad provenientes del plantel de animales que se encuentra en las instalaciones del “Proyecto yacaré”, Santa Fe, Argentina. Allí se crían y se mantienen para su destino comercial y liberación. Se seleccionaron individuos de esta edad, debido a que la extracción de sangre de manera repetida y en un período de tiempo corto podría ser perjudicial para los pichones e incluso causarles la muerte, ya que constituye una etapa muy vulnerable para ellos.

Los caimanes dentro del criadero, se encuentran alojados en piletones de 4,5 m x 5 m y bajo condiciones de luz natural. Cada una de estas piletas cuenta con un área seca y un área húmeda. Los animales son alimentados *ad libitum* con cabezas de pollo molidas y un balanceado diseñado para la especie. El cambio del agua se realiza cada 2 días alternando con los días de alimentación.

3.2.2 Diseño experimental

Los animales seleccionados fueron pesados con una balanza eléctrica (Dixie-Kretz), medidos con cinta métrica (LT = longitud total, LHC = longitud hocico-cloaca) y marcados para su posterior identificación. Durante toda la fase experimental permanecieron alojados individualmente en bateas plásticas de 40,4 cm de ancho y 78,5 cm de largo.

Al comienzo del experimento se realizó la extracción de sangre al tiempo 0 minutos de cada uno de los individuos y se los asignó a cada uno de los dos métodos de evaluación

seleccionados con sus controles. La extracción de sangre al tiempo 0 fue efectuada dentro de los 3 min posteriores a la captura ya que es el tiempo reportado en publicaciones previas en aves y reptiles, con el propósito de no causar un efecto de estrés adicional (Rich y Romero, 2005; Finger et al., 2015). Además, aunque los protocolos de respuesta al estrés agudo pueden extenderse más allá de las dos horas (particularmente en reptiles), seleccionamos los tiempos 30, 60 y 120 minutos que son los puntos más comunes usados para evaluar la respuesta fisiológica al estrés en vertebrados (Cirule et al., 2012; Jessop et al., 2013). Se distribuyeron 10 animales en cada uno de los siguientes tratamientos con sus respectivos controles: 1) Inducción artificial de estrés mediante inyección con adrenocorticotropina (ACTH). A continuación de la extracción de sangre al tiempo 0, los animales fueron inyectados de manera intramuscular con una solución de 0.6 ml de ACTH porcina (Acthelea, a partir de un preparado sólido liofilizado) siguiendo el protocolo publicado por Lance et al., (1984) para *Alligator mississippiensis*. Seguido a esto, se realizaron extracciones de sangre a los 30, 60 y 120 minutos. 2) Control ACTH (CTL): luego de la extracción de sangre al tiempo 0, se les inyectó 0.6 ml de solución fisiológica y se efectuaron las sucesivas extracciones como en el tratamiento 1). 3) Inducción de estrés por restricción física (EF). Una vez realizada la extracción de sangre al tiempo 0, los animales fueron restringidos de movimiento por un período de dos horas, por medio de la inmovilización de sus extremidades. Luego, se realizaron extracciones de sangre a los tiempos 30, 60 y 120 minutos. 4) Control estrés Físico (CTLF). A este grupo de individuos seguido de la extracción de sangre al tiempo 0 minutos, no se les realizó ningún tratamiento particular, sólo estuvieron alojados en las mismas condiciones que aquellos que se encontraban en los otros tratatamientos y se les realizó extracción de sangre a los 30, 60 y 120 minutos.



Figura 3.19 Inducción de estrés por inyección de ACTH sobre juveniles de *Caiman latirostris*.

3.2.3 Toma de muestras

Se recolectaron muestras de sangre al final del experimento a partir de la vena espinal utilizando jeringas estériles, heparinizadas y equipadas con aguja 25/8 para analizar los recuentos totales de glóbulos blancos (TWBC) y la estimación de la proporción de los subtipos de leucocitos. Luego, se centrifugó la sangre con el fin de separar el plasma, que se almacenó a -80°C para realizar la determinación de los niveles de corticosterona.



Figura 3.20 Toma de muestra de sangre de la vena espinal de un individuo subadulto de *Caiman latirostris*.

3.2.4 Medición de los niveles de corticosterona

Con el fin de evaluar si los tratamientos indujeron un estrés medible en los caimanes, se midieron las concentraciones de corticosterona en plasma mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), siguiendo el mismo procedimiento explicado en el capítulo 2.

3.2.5 Índices inmunológicos

Debido al diseño del experimento, en el cual se evaluaron ambas formas de inducción de estrés durante un período de dos horas de exposición a los tratamientos, los parámetros inmunológicos que se midieron y los cuales nos podían otorgar información sobre la respuesta del sistema inmune dentro de ese corto lapso de tiempo fueron los siguientes: Recuento total de Leucocitos y recuento de los diferentes tipos leucocitarios (linfocitos, heterófilos, eosinófilos y monocitos). La metodología aplicada para llevar a cabo estas determinaciones fue la misma que se explicó en el capítulo 2.

3.2.6 Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones iniciales para confirmar que los grupos experimentales no difirieran en términos de peso (P), longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC) antes de asignarlos a un tratamiento. Estas comparaciones se realizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Estableciéndose un valor de $p \leq 0,01$.

El conjunto principal de datos experimentales se analizó utilizando Modelos Lineales Mixtos (MLM), por medio de los paquetes lme4, languageR y lmerTest del software estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Se llevó a cabo un análisis longitudinal, para evaluar el efecto de los tratamientos (inyección de ACTH y estrés por restricción física) sobre los niveles de corticosterona y del perfil leucocitario. Como variables respuesta se consideraron las medidas repetidas de los niveles de corticosterona, el conteo total de glóbulos blancos y el conteo de cuatro de los tipos leucocitarios (linfocitos, heterófilos, eosinófilos y monocitos) en relación al tiempo. Como variables aleatorias se consideraron el "ID" de los individuos y el "año".

Para el análisis de ambos experimentos (inyección de ACTH y estrés por restricción física), se construyó un modelo inicial que incluyó los términos "Tiempo" (y su expresión cuadrática "Tiempo²"), "Tratamiento" y la interacción entre estos. El término "Tiempo²" se incluyó de manera de considerar que la relación entre el paso del tiempo y la variable respuesta no fue lineal. A continuación, se realizó la eliminación paso a paso de los términos que no fuesen relevantes para el modelo usando el criterio de información de Akaike (AICc). El término no se retenía en el modelo si su inclusión no reducía el AICc por al menos 2 unidades.

3.3 Resultados

3.3.1 Comparaciones iniciales

Las comparaciones iniciales mostraron que los animales no difirieron significativamente en términos de longitud total ($p = 0,827$), longitud hocico-cloaca ($p = 0,667$) y peso ($p = 0,721$) antes de aplicar los tratamientos (Tabla 3.7). La estadística descriptiva de todos los parámetros medidos para cada uno de los experimentos, se muestran en las tablas 3.8 y 3.9.

Tabla 3.7 Valores medios, mínimos y máximos del tamaño de los individuos de *C. latirostris*, LT (longitud total), LHC (longitud hocico-cloaca), P (peso) en cada uno de los tratamientos de estrés.

TRATAMIENTO	PARÁMETRO		
	LT (cm)	LHC (cm)	P (gr)
	Media (min; máx)	Media (min; máx)	Media (min; máx)
CTL	92 (85; 98)	43,7 (40; 48)	3,4 (2,5; 3,9)
ACTH	89,9 (72,5; 95)	43,5 (35,5; 46)	3,3 (1,4; 4)
EF	93,6 (83; 110)	45,7 (38; 55)	3,6 (2,6; 4,6)
CTLF	89 (78; 100)	42,6 (37; 48)	3,2 (2,2; 3,9)

Tabla 3.8 Valores medios, mínimos y máximos para CORT (corticosterona), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en *C. latirostris* en el tratamiento de estrés agudo con restricción física (EF) y control restricción física (CTLF).

Parámetro	Tiempo	0 min		30 min		60 min		120 min	
		Media	(min, max)	Media	(min, max)	Media	(min, max)	Media	(min, max)
CORT (ng/ml)	EF	31	(5,5; 77)	231	(90; 783)	284	(152; 416)	396	(239; 609)
	CTLF	36,5	(8,2; 73,9)	59	(40,3; 78)	80,5	(69; 95)	90	(67; 122)
TWBC (células/ul)	EF	24675	(15500; 32500)	17635	(9250; 22750)	11585	(7250; 16150)	22300	(16750; 33500)
	CTLF	12042	(4000; 20000)	5958	(5500; 7500)	9667	(5250; 14000)	9125	(6000; 11250)
L (Células/ul)	EF	15773	(10540; 21780)	11540	(6568; 16125)	8311	(5072; 12758)	14724	(10385; 21123)
	CTLF	7812	(2440; 12400)	3632	(1782; 5850)	6207	(2678; 9240)	5646	(3540; 7700)
H (Células/ul)	EF	7490	(3325; 16575)	4871	(2035; 9460)	2092	(1350; 3312)	6176	(3182; 13400)
	CTLF	3442	(1320; 5400)	1810	(920; 3105)	2760	(2025; 3640)	2648	(1100; 4840)
E (Células/ul)	EF	1322	(175; 2722)	990	(102; 2200)	967	(225; 2765)	1296	(228; 3350)
	CTLF	686	(200; 1800)	516	(58; 880)	652	(185; 980)	758	(240; 1125)
M (Células/ul)	EF	90,3	(ND; 530)	55	(0; 345)	15.2	(ND; 152.5)	103	(ND; 405)

CTLF	100 (ND, 400)	ND	47,5 (ND; 140)	73(ND; 112,5)
------	---------------	----	----------------	---------------

ND (indica no detectado)

Tabla 3.9 Valores medios, mínimos y máximos para CORT (corticoesterona), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en *C. latirostris* en el tratamiento de estrés agudo con inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y control ACTH(CTL).

Parámetro	Tiempo	0 min		30 min		60 min		120 min	
	Tratamiento	Media	(min; max)	Media	(min; max)	Media	(min; max)	Media	(min; max)
CORT (ng/ml)	ACTH	25,6	(6,4; 99,04)	145,9	(79,4; 231,3)	210,97	(88,12; 437,8)	261,7	(173,4; 462,9)
	CTL	91,6	(8,9; 324,7)	221,4	(97,9; 567,8)	266,2	(150,6; 412,2)	361,8	(259,9; 467,6)
TWBC (cells/ul)	ACTH	25550	(17250; 33500)	26975	(14750; 37750)	26425	(16500; 55500)	24150	(15750; 31000)
	CTL	23958	(15250; 39500)	39042	(27500; 49500)	29083	(15750; 35500)	32958	(20500; 44500)
L (Cells/ul)	ACTH	16945	(9750; 23063)	16423	(7375; 27180)	13559	(7600; 25800)	13327	(8690; 19620)
	CTL	15119	(7930; 20228)	25695	(15675; 33660)	18160	(11182; 27335)	18427	(6150; 27513)
H (Cells/ul)	ACTH	7326	(5002; 9540)	8909	(4728; 17050)	10864	(5160; 39960)	9020	(4715; 15428)
	CTL	6765	(2625; 16985)	10881	(7508; 15840)	9386	(4410; 16470)	12087	(5000; 20115)
E (Cells/ul)	ACTH	1279	(440; 2675)	1643	(457; 5200)	1970	(455; 4995)	2318	(1550; 3250)
	CTL	2007	(232; 4345)	2319	(ND; 3960)	1537	(ND; 5160)	2318	(1550; 3250)
M (Cells/ul)	ACTH	ND		ND		32,2	(ND; 322,5)	79,2	(ND; 315)
	CTL	66	(ND; 395)	147	(ND; 880)	ND		238	(ND; 445)

ND (indica no detectado)

3.3.2 Niveles de Corticosterona

Durante la fase de estrés, los individuos del tratamiento estrés físico evidenciaron aumentos significativos en los niveles de corticosterona en función del tiempo respecto al tratamiento control. Sin embargo, este aumento se efectuó de manera no lineal, ya que por cada unidad de tiempo el aumento era menor (Figura 3.21, Tabla 3.10).

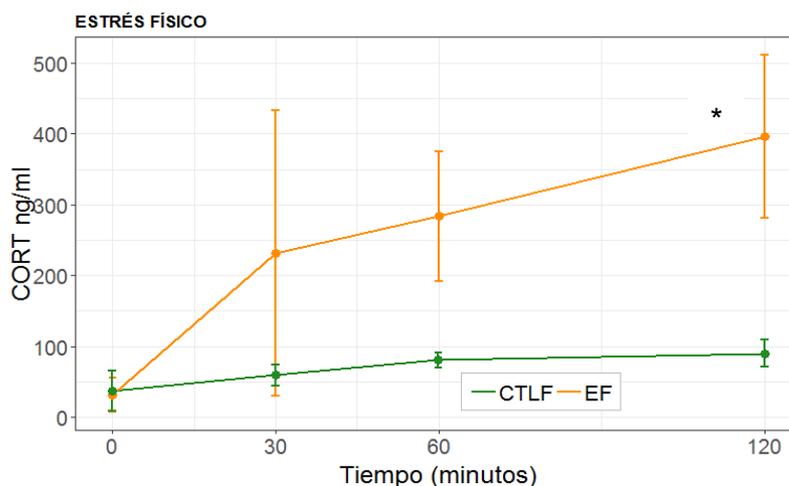


Figura 3.21 Efecto de la restricción física (EF) sobre los niveles de corticosterona plasmática total (CORT) por un período de 2h. * Indica diferencia significativa

Tabla 3.10 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre las concentraciones de corticosterona.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	0,6025	2,3659	0,8026
Tratamiento EF	12,2490	2,4016	0,0022 *
Tiempo	0,3865	0,0700	9,88e-07 *
I(Tiempo^2)	-0,0018	0,0005	0,0011 *
TRATAMIENTO:TIEMPO	0,4017	0,1182	0,0013 *
TRATAMIENTO:I(TIEMPO^2)	-0,0019	0,0009	0,0396 *

Por el contrario, no hubo diferencias en los niveles de corticosterona entre los individuos del tratamiento con inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y su control (CTL). Sin embargo se observó que al igual que el tratamiento con estrés físico, los niveles de corticosterona aumentaron en relación al tiempo de manera no lineal (Figura 3.22, Tabla 3.11).

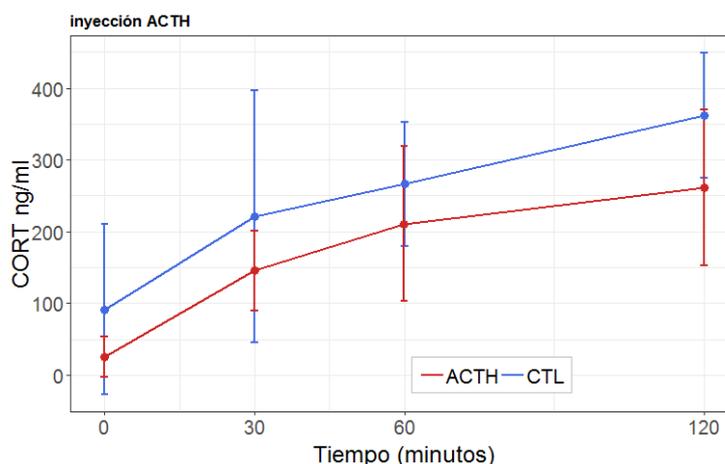


Figura 3.22 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre los niveles de corticosterona plasmática (CORT) por un período de 2h.

Tabla 3.11 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección con adrenocorticotripina (ACTH) y el control (CTL) sobre las concentraciones de corticosterona.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	13,52	3,41	0,00
Tratamiento ACTH	-6,63	4,24	0,14
Tiempo	0,36	0,09	0,00 *
I(Tiempo^2)	-0,001	0,00	0,02 *
Tratamiento:Tiempo	0,08	0,11	0,45
Tratamiento:I(Tiempo^2)	-0,00	0,00	0,43

3.3.3 Efectos de los tratamientos sobre los índices inmunológicos

3.3.3.1 Recuento total de Leucocitos (TWBC)

El conteo de glóbulos blancos de los individuos del grupo con estrés físico disminuyó a lo largo del tiempo, sin embargo en este tratamiento los leucocitos fueron significativamente mayor en el tiempo 0 en comparación con los del grupo control. Se observó que los conteos de glóbulos blancos del grupo con estrés físico disminuyeron entre el tiempo 0-60 minutos y luego fue aumentando entre los 60-120 minutos, casi al valor inicial. (Figura 3.23, Tabla 3.12).

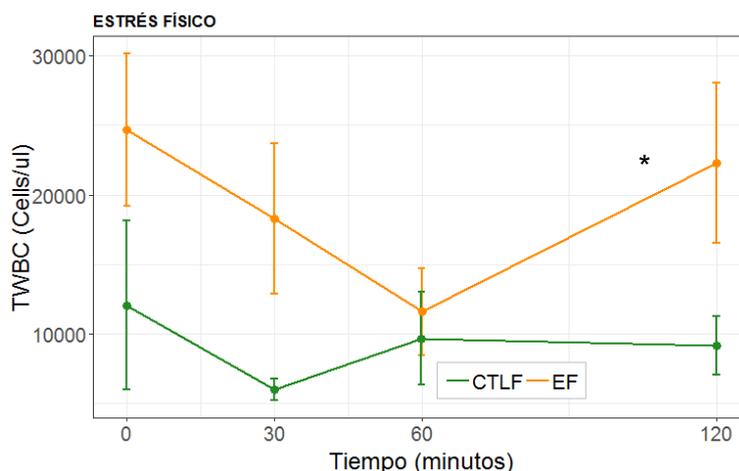


Figura 3.23 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento total de leucocitos por un período de 2h. * Indica diferencia significativa

Tabla 3.12 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento total de leucocitos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	11023,48	1927,87	1,65e-06
Tratamiento EF	14332,37	2438,58	1,01e-06 *
Tiempo	-100,11	77,61	0,20
I(Tiempo^2)	0,72	0,59	0,23
TratamientoEF:Tiempo	-286,16	98,18	0,00 *
TratamientoEF:I(TIEMPO^2)	2,26	0,75	0,00 *

Por el contrario, se observó que los individuos del grupo con inyección de ACTH tuvieron conteos de glóbulos blancos significativamente menores que los del grupo control, pero no se detectaron modificaciones de los conteos con el paso del tiempo (Figura 3.24, Tabla 3.13).

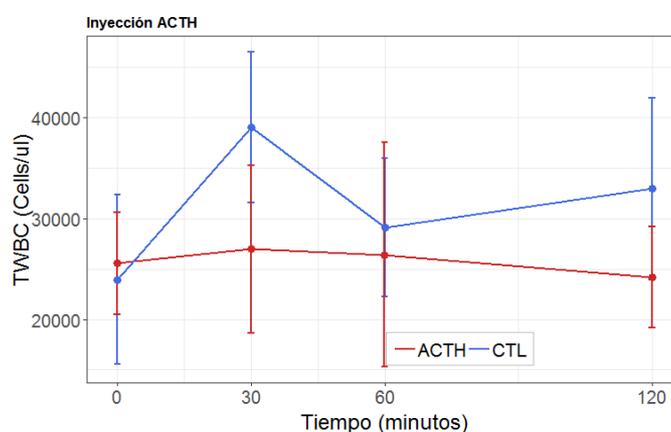


Figura 3.24 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento total de leucocitos por un período de 2h.

Tabla 3.13 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección con adrenocorticotropina y el control (CTL) sobre el recuento total de leucocitos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	26656	3095	<2,7e-16
Tratamiento ACTH	-976,5	3915	0,804
Tiempo	216	131	0,104
l(Tiempo^2)	-1,422	1	0,165
Tratamiento ACTH:Tiempo	-169,1	166	0,311
Tratamiento ACTH:l(Tiempo^2)	0,925	1,28	0,473

3.3.3.2 Recuento de los distintos tipos leucocitarios

- *Linfocitos*

De manera similar a lo ocurrido con el conteo total de glóbulos blancos, se detectó que los individuos del grupo con estrés físico tuvieron conteos de linfocitos significativamente mayores que los del grupo control en el tiempo 0 y también disminuyeron con el correr del tiempo. Se observó que los conteos de linfocitos del grupo con estrés físico disminuyeron entre los 0-60 minutos pero que esto no ocurrió de manera lineal, ya que mostraron un incremento en el intervalo de tiempo desde los 60 minutos hasta los 120 minutos (Figura 3.25, Tabla 3.14).

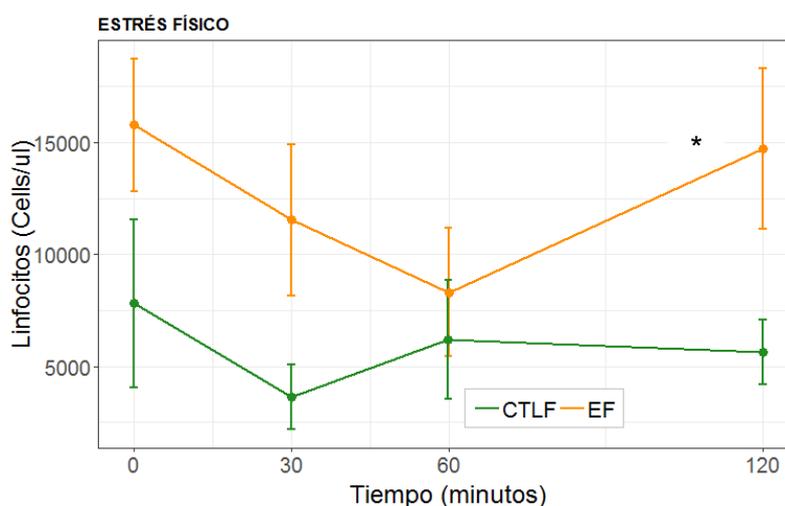


Figura 3.25 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Linfocitos por un período de 2h. * Indica diferencia significativa

Tabla 3.14 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Linfocitos.* indica diferencia significativa

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	7104,03	1267,96	4,29e-06
Tratamiento EF	8938,00	1603,86	4,66e-06 *
Tiempo	-66,94	48,78	0,17
l(Tiempo^2)	0,47	0,37	0,21
TratamientoEF:Tiempo	-161,08	61,70	0,01 *
TratamientoEF:l(Tiempo^2)	1,32	0,47	0,00 *

Los individuos del grupo tratado con inyección de ACTH tuvieron menores recuentos de linfocitos en comparación con el grupo control, pero estos valores no manifestaron modificaciones significativas en el tiempo (Figura 3.26, Tabla 3.15).

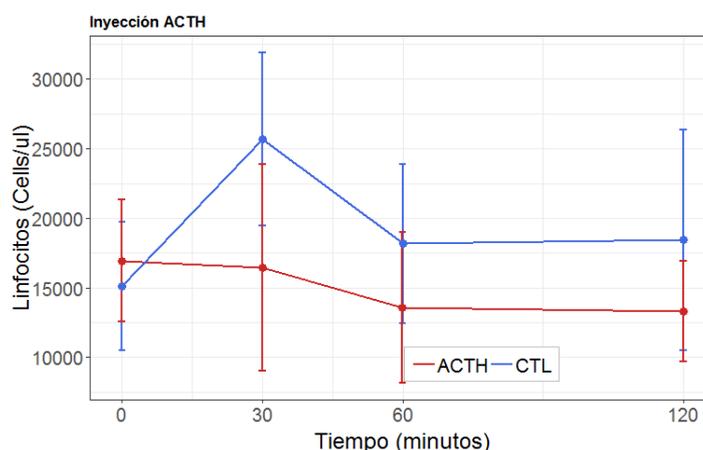


Figura 3.26 Efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Linfocitos por un período de 2h.

Tabla 3.15 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Linfocitos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	17019,15	2360	1,28e-09
Tratamiento ACTH	267,07	2984	0,929
Tiempo	158,24	99,82	0,118
l(Tiempo^2)	-1,26	0,77	0,107
Tratamiento ACTH:Tiempo	-225,77	126,26	0,079
Tratamiento ACTH:l(Tiempo^2)	1,54	0,97	0,119

- *Heterófilos*

En el caso de los heterófilos, de manera similar a lo que sucedió con el conteo de linfocitos, se encontró que los individuos del grupo bajo tratamiento con estrés físico tuvieron conteos de heterófilos significativamente mayores en el tiempo 0 que los del grupo control. Además, se detectó que el conteo de heterófilos disminuyó con el paso del tiempo, entre 0-60 minutos para luego incrementar su conteo en el torrente sanguíneo entre los 60-120 minutos (Figura 3.27, Tabla 3.16).

De manera contraria, el tratamiento de inyección con ACTH no mostró ningún impacto sobre el conteo de heterófilos (Tabla 3.17).

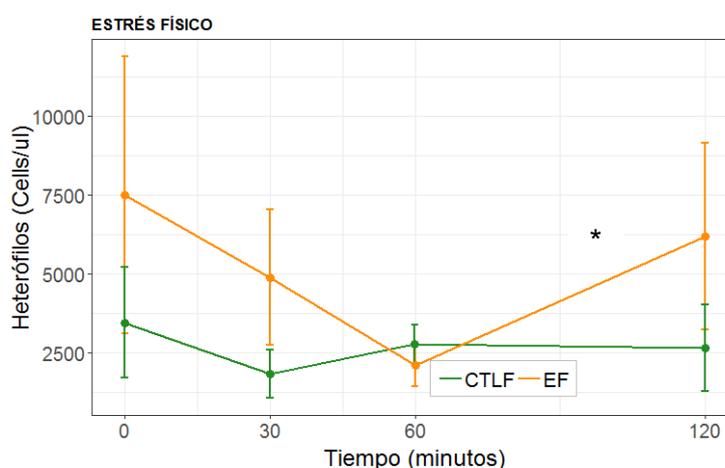


Figura 3.27 Efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Heterófilos por un período de 2h. * Indica diferencia significativa

Tabla 3.16 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Heterófilos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	3175,86	951,47	0,00
Tratamiento EF	4589,83	1203,52	0,00 *
Tiempo	-27,93	40,26	0,49
I(Tiempo^2)	0,20	0,31	0,51
TratamientoEF:Tiempo	-128,77	50,92	0,01 *
TratamientoEF:I(Tiempo^2)	0,98	0,39	0,01 *

Tabla 3.17 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Heterófilos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	7379,74	2158,39	0,00
Tratamiento ACTH	-240,89	2657,92	0,92
Tiempo	70,30	88,91	0,43
I(Tiempo²)	-0,27	0,68	0,69
TratamientoACTH:Tiempo	25,18	112,46	0,82
TratamientoACTH:I(Tiempo²)	-0,38	0,86	0,65

- *Eosinófilos*

A pesar que los individuos del grupo bajo tratamiento por estrés físico tuvieron mayores conteos de eosinófilos que los del grupo control, durante la fase de estrés, estos no evidenciaron ningún impacto por parte del estresor, como tampoco algún efecto debido al paso del tiempo (Tabla 3.18).

Similarmente tampoco se observaron diferencias significativas en los conteos de eosinófilos entre los animales tratados con inyección de ACTH en comparación con el control (Tabla 3.19).

Tabla 3.18 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Eosinófilos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	656,78	270,47	0,02
Tratamiento EF	650,06	342,13	0,07
Tiempo	-3,06	11,35	0,78
I(Tiempo²)	0,03	0,09	0,70
TratamientoEF:Tiempo	-9,24	14,36	0,52
TratamientoEF:I(Tiempo²)	0,07	0,11	0,54

Tabla 3.19 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Eosinófilos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	2161,24	491,82	4,79e-05
Tratamiento ACTH	-903,66	622,11	0,15
Tiempo	-11,44	20,81	0,58
I(Tiempo²)	0,10	0,16	0,52
Tratamiento ACTH:Tiempo	29,81	26,32	0,26
Tratamiento ACTH:I(Tiempo²)	-0,22	0,20	0,27

- *Monocitos*

En ninguno de los dos métodos de inducción de estrés agudo utilizados se detectó un efecto sobre el conteo de monocitos en comparación con sus respectivos controles, así como tampoco se observaron cambios en el conteo de estos con el correr del tiempo (Tabla 3.20 y 3.21).

Tabla 3.20 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la restricción física (EF) y el control (CTLF) sobre el recuento de Monocitos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	86,80	45,10	0,06
Tratamiento EF	1,74	57,05	0,97
Tiempo	-2,17	1,90	0,26
I(Tiempo²)	0,02	0,01	0,24
TratamientoEF:Tiempo	-0,52	2,41	0,83
TratamientoEF:I(Tiempo²)	0,00	0,020	0,74

Tabla 3.21 Modelo lineal mixto que describe el efecto de la inyección de adrenocorticotropina (ACTH) y el control (CTL) sobre el recuento de Monocitos.* indica diferencia significativa.

Término	Coefficientes	Error estándar	Valor de p
Intercepto	95,91	59,26	0,11
Tratamiento ACTH	99,02	73,59	0,18
Tiempo	-1,36	2,46	0,58
I(Tiempo²)	0,013	0,019	0,50
Tratamiento ACTH:Tiempo	1,64	3,11	0,60
Tratamiento ACTH:I(Tiempo²)	-0,009	0,024	0,70

3.4 Discusión

La importancia de los estudios del efecto de la respuesta de estrés a corto plazo sobre la fisiología de los caimanes reside en que generan aportes de interés para dos áreas de nuestro conocimiento. Por un lado, proporcionan información sobre la evolución temporal de la síntesis y el control de los glucocorticoides; mientras que por otra parte realizan aportes a la biología y conservación de las especies en relación a los mecanismos que podrían desencadenar los individuos frente a eventos impredecibles en sus ambientes naturales.

Los resultados de este estudio muestran que los yacarés de un año de edad criados en cautiverio respondieron de manera diferente frente a los dos métodos de inducción de la liberación de corticosterona a corto plazo que fueron utilizados. La respuesta que desencadenó *C. latirostris* minutos después de la restricción física fue elevar los niveles de corticosterona con el correr del tiempo. Mientras que en los animales provenientes del ensayo con inyección de adrenocorticotropina, los aumentos en los niveles de corticosterona observados no estuvieron asociados al método de inducción utilizado.

La respuesta de los caimanes al estrés por restricción física demostró un incremento significativo en los niveles de corticosterona en el tiempo. El factor de estrés utilizado, percibido por los individuos, generó rápidamente un cambio en los niveles normales de hormonas circulantes en un período corto de tiempo. El aumento de los valores de glucocorticoides en el grupo experimental pudo ser desencadenado por la activación del eje pituitario-interrenal. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, durante las dos horas de haber mantenido los caimanes bajo un factor físico de estrés se habría inducido la liberación de ACTH endógena que activó la esteroidogénesis en la glándula suprarrenal. De manera similar, estudios previos realizados en los estorninos europeos (*Sturnus vulgaris*) por Rich y Romero, (2005) reportaron una respuesta de la CORT a los efectos del estrés por restricción del movimiento. Igualmente, en los trabajos realizados en *A. mississippiensis* por Lance y Elsey, (1999); y como los de Franklin et al., (2003) en *C. porosus* encontraron aumentos en las concentraciones de corticosterona en los individuos bajo estrés por la captura o por restricción física en un intervalo de tiempo similar al de nuestro estudio. Estas similitudes en las respuestas a un mismo estresor, confirma la acción del factor estresante como modulador de los glucocorticoides para el mantenimiento de la homeostasis en estos grupos filogenéticamente cercanos. De la misma manera, respalda la idea de que los mecanismos de respuesta son similares al de otras especies del mismo y de diferentes órdenes, proporcionando evidencia de que la función y regulación del eje endócrino se encuentra conservada entre los vertebrados (Castañeda et al., 2014).

Asimismo, nuestros resultados demuestran que la dosis de ACTH porcina empleada no fue efectiva para estimular e inducir la síntesis de corticosterona en el grupo experimental donde se administró la hormona. Contrario a los incrementos en los niveles de corticosterona que mostraron los ejemplares de *Alligator mississippiensis* (5 ng/ml a 30 ng/ml) luego de la inyección de ACTH y que fueron reportados significativamente diferentes frente a los del grupo tratado con solución fisiológica (Lance y Lauren, 1984), en *Caiman latirostris* no se observó una respuesta significativamente diferente en la concentración de corticosterona entre los individuos tratados con inyección de ACTH. La falta de acción de la ACTH porcina inyectada ha sido previamente reportada en trabajos realizados en otras especies dentro del grupo de los Crocodylia, cómo los publicados por Gist, Kaplan y de Roos, (1966 y 1976) en *A. mississippiensis* y *Caiman crocodilus*. Existen numerosas explicaciones, en la bibliografía publicada, con respecto a la causa en la diferencia de reacción frente a la ACTH de mamífero para activar la esteroidogénesis en algunas especies de reptiles. Algunos autores postulan que este hecho puede deberse a la destrucción de la ACTH de mamífero por parte de las enzimas proteolíticas liberadas por el tejido adrenal y por la diferencia química entre la hormona de los reptiles y la ACTH de mamíferos (Phillips et al., 1962). Aunque esta posibilidad no se descarta, otros reportes de trabajos realizados en aves, anfibios, peces y otros reptiles en donde el uso de la ACTH de mamíferos bajo las mismas condiciones ha sido efectiva, muestran lo contrario (Rich y Romero, 2004; Graham et al. 2013). Por otro lado, se podría suponer que la falta de actividad de la ACTH podría deberse a la dosis utilizada en este estudio. Sin embargo, el trabajo reportado por Gist et al., (1976) en *Caiman crocodilus* sugiere que los incrementos en los niveles de corticosterona hallados no estuvieron relacionados con las tres diferentes dosis probadas (0.3, 3 y 30 UI/kg), sino que el efecto de las diferentes dosis estuvo relacionado con la duración en el tiempo de los niveles elevados de CORT. A pesar de que la dosis empleada en este trabajo llevado a cabo en *Caiman latirostris* fue la misma que la utilizada en *Alligator mississippiensis* por Lance et al., (1984), ambas especies pertenecientes a la misma familia (Familia Alligatoridae), la falta de respuesta a la inyección de ACTH porcina sugeriría que las diferentes especies tengan diferente capacidad suprarrenal para el reconocimiento de la ACTH exógena proveniente de mamífero como para desencadenar una respuesta. Esta capacidad suprarrenal, se define como la sensibilidad de las células interrenales/adrenocorticales a la ACTH para secretar corticosterona. De igual manera, la sensibilidad podría estar íntimamente relacionada con los factores externos del animal, tales como el ambiente, estación del año, temperatura, etc. (Klukowski, 2011). Esta hipótesis también ha sido propuesta para las distintas respuestas encontradas por Fast et al., (2008) en las especies de peces a los que se le administró cortisol exógeno por medio de la dieta. Adicionalmente, debe considerarse que estos resultados pudieron haber sido generados por el propio mecanismo de retroalimentación

hormonal. La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es un potente estimulante de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que estimula la síntesis y secreción de corticosterona en vertebrados (Castañeda et al., 2014). Por lo tanto, la falta de acción de la dosis utilizada en este trabajo podría deberse a que la ACTH desencadenó en el mecanismo una inhibición por retroalimentación hormonal del eje HPI (Romero y Wigfield, 1999) conocido como retroalimentación negativa; donde los incrementos extremadamente altos de ACTH en los caimanes inyectados generaron esta falta de diferencia observada con los individuos del grupo control.

Lo que pudimos detectar en este estudio y que coincide con lo que fue previamente publicado en *A. mississippiensis* y *Crocodylus niloticus* por Mahmoud et al., (1996) y Ganswindt et al., (2014) respectivamente, es que tanto en el grupo ACTH como en el grupo control los niveles de corticosterona aumentaron con el paso del tiempo. Esto posiblemente sugiere que la elevación de la corticosterona a los 30, 60 y 120 minutos en ambos grupos ocurrió debido al estrés causado por las sucesivas extracciones y el manejo de los animales durante un período de dos horas. Indicando que estos factores por si solos podrían actuar como estresores en *C. latirostris*.

La posterior reducción de los aumentos de corticosterona plasmática que fue observada en los intervalos de tiempo puede explicarse por medio del mecanismo de retroalimentación negativa. Según Romero, 2004 el cese de la liberación de glucocorticoides está bajo el control de los propios glucocorticoides a través de este mecanismo. Las concentraciones elevadas interactúan con los receptores en el cerebro para desactivar los pasos iniciales del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA), es por ello que los niveles de glucocorticoides primero aumentan y luego comienzan a desacelerar su incremento con el transcurso del tiempo, incluso si el factor estresante continúa. Las funciones de los receptores de mineralocorticoides (MR) y de glucocorticoides (GR) cuando están ocupados por corticosteroides determinan los límites superior e inferior, respectivamente, de la secreción y concentraciones de corticosteroides en plasma. Los mineralocorticoides están íntimamente involucrados en el control central de la actividad en el eje hipotálamo-pituitario/interrenal, mientras que el GR también funciona en los sitios neuronales y pituitarios centrales para controlar la actividad en el eje HPA/I (Dallman y Bhatnagar 2001). Según Ericson et al., (2003) el mal funcionamiento de la retroalimentación negativa puede ser un factor importante en los problemas asociados con el estado subordinado en muchas especies.

Las concentraciones elevadas de corticosterona en el grupo experimental bajo restricción física aportan evidencia de que la inmovilización del movimiento ejerció efectos sobre la

respuesta inmunológica celular que encontramos en los individuos de este mismo tratamiento. Debido a que los conteos de leucocitos en la sangre proporcionan una representación importante de la distribución de leucocitos en el cuerpo y del estado de activación del sistema inmune algunas evidencias sugieren que las variaciones en los niveles de corticosterona podrían ejercer alguna influencia y modificar los conteos leucocitarios (Maxwell, 1993; Seddon y Klukowski, 2012). En los yacares bajo restricción física se encontró que los conteos totales de glóbulos blancos, así como los conteos de linfocitos y de heterófilos mostraron un perfil bifásico. Como se muestra en las figuras 3.23, 3.25 y 3.27 el perfil de estos tres parámetros inmunológicos celulares disminuyeron en la primera etapa de estrés (primera hora), para luego incrementar sus niveles en el tiempo cercano al momento en que fue retirado el estresor. Estos resultados coinciden con aquellos reportados en aves silvestres (Davis, 2005; Cirule et al., 2012; Kuhlman et al., 2010) y en alligators (Lance y Elsey 1999). La respuesta inmune celular que mostraron los yacares bajo condiciones de estrés agudo en el tratamiento de restricción física, se fundamentaría en una disminución inducida por el estrés en los números de leucocitos en sangre hacia puntos periféricos que representa una respuesta adaptativa para aumentar la vigilancia inmune en los órganos durante el estrés (Dhabhar, 2002; Davis, 2008). Por lo tanto, las disminuciones inducidas por estrés físico en el número de leucocitos circulantes no se deberían a la destrucción de células a gran escala, sino a una redistribución de estos desde la sangre a otros compartimentos corporales causadas por los glucocorticoides. No es casual que esta respuesta observada en los yacarés se haya presentado tanto en los conteos de linfocitos como en los de heterófilos y no en los de eosinófilos y monocitos. Tanto los linfocitos como los heterófilos constituyen la mayoría (casi el 80%) de los glóbulos blancos en los reptiles (Davis, 2008). Los heterófilos son los leucocitos fagocitos primarios y proliferan en circulación como respuesta a infecciones, inflamación y estrés, mientras que los linfocitos están involucrados en una variedad de funciones inmunológicas, como la producción de inmunoglobulinas y la modulación de la defensa inmune (Campbell, 1995).

Debido a la rápida pérdida de la biodiversidad de nuestro planeta, existe un creciente interés por comprender la fisiología (incluidos los mecanismos reguladores endocrinos) y factores de estrés que afectan la supervivencia de las especies (Ganswindt et al., 2012). Este estudio otorga nuevas pruebas al conocimiento de cómo los yacarés responderían a eventos impredecibles en sus ambientes naturales. Los resultados obtenidos, provenientes de animales con buenas condiciones físicas (peso y tamaño), permite deducir e interpretar de que manera los factores externos e internos contribuyen a la capacidad de montar una respuesta efectiva. Así también, genera aportes de gran valor mostrando los mecanismos endócrinos que se originaron y cómo estos pudieron activar una redistribución leucocitaria

para hacer frente a las fluctuaciones y mantener la homeostasis. Esto último, contribuye al conocimiento de las adaptaciones evolutivas de interés para los estudios comparativos.

Capítulo 4

Determinación de los niveles de corticosterona y
parámetros inmunológicos en poblaciones silvestres de
C. latirostris



4.1 Introducción

Las perturbaciones de origen antropogénico modifican las condiciones ambientales de forma permanente e impredecible para la mayoría de los organismos (Almasi et al., 2015). Estas incluyen la urbanización, degradación y destrucción del hábitat de algunas especies, contaminación de diferentes tipos, el uso desmedido de muchos productos químicos, actividades agrícolas, etc. (Meyland et al., 2017). Algunos estudios postulan que a medida que las actividades humanas invaden los hábitats nativos, la capacidad de los animales para adaptarse a estos nuevos entornos se convertirá en un factor cada vez más importante para su persistencia a largo plazo (French et al., 2008).

Además de los eventos naturales con los que *Caiman latirostris* debe enfrentarse en los ambientes donde habita (variaciones de temperatura, sequías e inundaciones, precipitaciones y tormentas), los cambios antropogénicos podrían aumentar su exposición a cambios ambientales impredecibles y tener un impacto dramático en las estrategias de vida, produciendo en última instancia, efectos en la dinámica de sus poblaciones (Meyland et al., 2017). En este sentido, la supervivencia de las crías de cocodrilidos no solo está relacionada con el tamaño corporal sino también con la calidad del hábitat de anidación. En los años lluviosos, las inundaciones pueden afectar la disponibilidad de sitios de anidación para *C. latirostris*. Como así también, el incremento de la depredación que aumenta en las temporadas de sequía, posiblemente debido a la facilidad en el acceso al nido por los depredadores y la escasez de comida (Montini et al., 2006).

Por otra parte, en la provincia de Santa Fe como consecuencia de la expansión de la frontera agrícola a lo largo de los años, muchas áreas de la distribución geográfica de *C. latirostris* se han visto afectadas (Siroski, 2004). Esto trae como consecuencia el impacto de las transformaciones de los ambientes para los cultivos, y la prolongada exposición a muchas de las sustancias químicas que se usan en estas prácticas. Todos estos disturbios representan nuevos estresores para las poblaciones silvestres. Estudios previos en los yacarés han demostrado algunas variaciones en los conteos leucocitarios en aquellos individuos bajo tratamiento con insecticidas (cipermetrina y endosulfán) de uso frecuente en las áreas de cultivo (Latorre et al., 2016). También, se ha reportado que en *A. mississippiensis* la exposición a contaminantes químicos disminuye significativamente la capacidad del animal para resistir enfermedades infecciosas como consecuencia de la supresión de algún mecanismo del sistema inmune y que esta supresión del sistema inmune podría ser causada por los aumentos de la secreción de glucocorticoides detectados (Rooney, 1998). Del mismo modo, un estudio en lagartijas arbóreas (*Urosaurus ornatus*) presentes en un sitio urbanizado mostraron diferencias significativas en los niveles de CORT

y en la respuesta inmunológica celular en comparación con aquellas presentes en un sitio natural (French et al., 2008).

Las hipótesis que se desprenden de los trabajos desarrollados en reptiles y otros vertebrados frente a los cambios de origen atropogénico, postulan que la exposición a estos nuevos estresores ambientales puede ser energéticamente más costosa. Esto se debe a que imponen demandas a los animales por encima de las que normalmente se requieren para mantener la vida. Pudiendo obtener como resultado de estos eventos la muerte o aclimatación/adaptación de los individuos en muchos aspectos del ciclo de vida que les permitirá sobrevivir (Martin et al., 2010; Wingfield, 2013).

En este contexto, es muy importante para el conocimiento de la biología y conservación de las poblaciones silvestres de *C. latirostris* como también para el ecosistema donde esta especie se desarrolla, determinar el impacto de los factores de estrés asociados a las actividades humanas y sus mecanismos de acción.

4.2 Materiales y métodos

Este estudio fue llevado a cabo a partir de muestras colectadas durante los trabajos de monitoreo de las poblaciones silvestres de *Caiman latirostris* que se realizan anualmente por el Proyecto yacaré. Las campañas de muestreo se inician aproximadamente a mediados de diciembre y culminan en el mes de marzo. Las visitas se efectúan semanalmente en varios sitios de la provincia de Santa Fe.

Para llevar a cabo este objetivo, se seleccionaron dos de estos sitios, por presentar diferentes características de interés que a continuación serán descriptas. Uno de ellos la Reserva Natural Manejada “El fisco” (30° 15' S, 60° 50' O) fue utilizado como sitio control, mientras que el otro Estancia “El Lucero” (29°54' 25" S, 60°50' 23" O) fue utilizado como sitio con perturbaciones antrópicas. Ambos puntos de muestreo se encuentran en el Departamento San Cristobal, Provincia de Santa Fe a una distancia de 68,49 Km.

4.2.1 Sitios de muestreo

La Reserva Natural “El Fisco”, carece de actividades agrícolas ni áreas urbanizadas en las cercanías, de manera que los animales no están en contacto con plaguicidas, contaminantes, ni otras actividades antrópicas. En cambio, el sitio denominado “El lucero” presenta un paisaje completamente modificado por la presencia de cultivos, canales de riegos, uso de compuestos químicos, actividades ganaderas y extensas áreas desmontadas para la realización de estas prácticas.

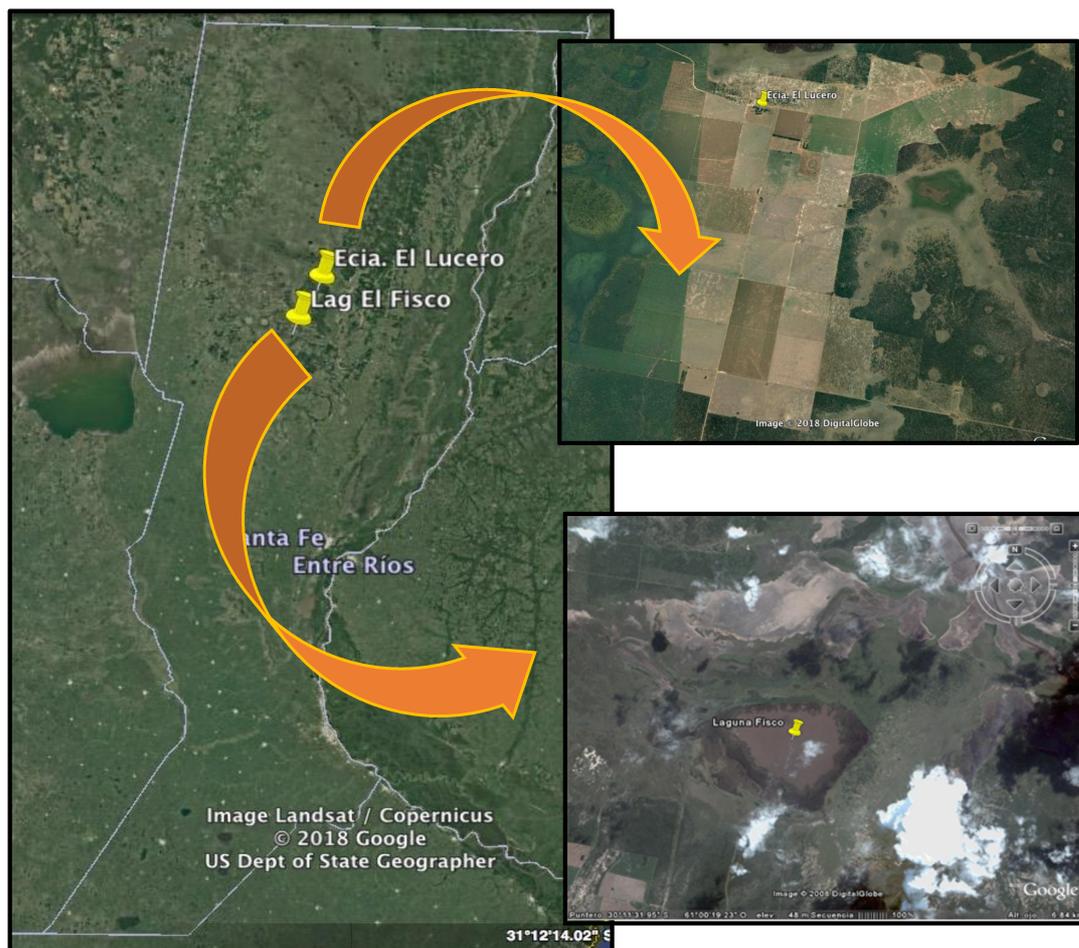


Figura 4.28 Localización geográfica de los sitios de captura de *C. latirostris* en ambientes naturales de la provincia de Santa Fe. a) Área de captura altamente modificada, b) Área de captura sin modificaciones.

4.2.2 Captura y manipulación de los animales

Los muestreos de las poblaciones naturales de *C. latirostris* fueron realizados durante las estaciones primavera-verano y coincidieron con una de las actividades que se desarrolla dentro del proyecto yacaré como es la cosecha de huevos. Esto permite un mayor acceso a las capturas de los animales adultos. Los pobladores locales identifican los nidos y mientras se realiza la colecta de huevos existe la posibilidad de que las hembras manifiesten el comportamiento de defensa del nido, constituyendo un momento clave para la captura y posterior toma de muestra.



Figura 4.29 Hembra de *C. latirostris* defendiendo el nido
(Foto: Pablo Siroski, 2017)

Otro momento en donde fueron efectuadas las capturas ocurrió durante la noche, ya que estos animales presentan una mayor actividad nocturna. Esta técnica es precisa y ampliamente utilizada para los censos poblacionales. El tapetum lucidum reflectante de los ojos de los cocodrilos se refleja de color rojo en un foco y se pueden ver a una distancia considerable (Sarkis-Goncalves et al., 2004). Además, en el caso de la estancia El Lucero se visitaron áreas donde se encuentra el ganado y en las cercanías a zonas de cultivos ya que los yacarés pueden albergarse en los tanques australianos, represas, pozos de agua, etc.

Los individuos fueron capturados a través de distintos métodos. Los animales chicos que estaban al alcance fueron capturados manualmente, mientras que para los animales medianos y adultos se usaron lazos especiales construidos con cable de acero. En cada una de las capturas se tomaron muestras de sangre y además por medio de una cinta métrica, se obtuvieron medidas de tamaño, como longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC). También, se examinaron los individuos capturados para chequear el estado en el que se encontraban, se sexaron por identificación de genitales a través de la cloaca, se marcaron mediante cortes en los verticilos caudales y finalmente fueron liberados en el mismo sitio de captura.



Figura 4.30 Captura diurna de una hembra encontrada en un tanque australiano de recolección de agua (Foto: Evelyn López Gonzáles, 2016)

4.2.3 Obtención de las muestras

Una vez capturado el individuo se procedió a realizar la extracción de sangre mediante la sujeción manual adecuada y en un tiempo no superior a los 5 min. La velocidad es esencial cuando se estudian las respuestas al estrés, ya que las concentraciones de corticosterona aumentan rápidamente en respuesta a la captura y al manejo (Romero y Romero, 2005). Para la toma de las muestras se utilizaron jeringas de 3, 5 y 10 ml previamente heparinizadas y equipadas con distintas agujas en relación al tamaño del animal. Las muestras de sangre fueron transferidas a tubos eppendorf rotulados y almacenadas en una heladera eléctrica para vehículos. Al llegar a las instalaciones del proyecto yacaré se continuó con el procesado de las muestras para cada una de las determinaciones a realizar.



Figura 4.31 Extracción de sangre a una hembra de *C. latirostris* en ambiente silvestre (Foto: Evelyn López Gonzáles, 2017)

4.2.4 Variables ambientales

Para la localidad de los sitios de muestreo, se obtuvieron los datos correspondientes a las temperaturas y precipitaciones promedios mensuales. Los mismos fueron proporcionados por la estación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) San Cristobal (www.inta.gob.ar/sancristobal).

4.2.5 Medición de los niveles de corticosterona

Con el fin de evaluar diferencias en los glucocorticoides de los yacarés capturados en ambos sitios de muestreo se midieron las concentraciones de corticosterona en plasma mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), siguiendo el mismo procedimiento explicado en el capítulo 2.

4.2.6 Índices inmunológicos

Para comparar si existe algún tipo de variación en los parámetros inmunológicos seleccionados entre los individuos capturados en dos sitios con características diferentes, se determinaron los recuentos totales de leucocitos y recuento de los diferentes tipos leucocitarios (linfocitos, heterófilos, eosinófilos y monocitos). Además, se determinaron los títulos de anticuerpos naturales y la actividad del complemento. Las técnicas aplicadas para llevar a cabo estas determinaciones fueron las explicadas en el capítulo 2.

4.2.7 Análisis estadístico

Con el objetivo de incluir las diferentes “edades” de los animales capturados en el análisis estadístico de los parámetros medidos, los yacarés fueron asignados a una categoría en relación a su tamaño de acuerdo a lo publicado por Ross y Godshalk, (2003). Para ello se clasificaron, en base a su largo total en: pichones (I < 50 cm), juveniles (II, entre 50 y 139,9 cm), subadultos (III, entre 140 y 180) y adultos (IV, mayores a 180 cm). A causa del bajo número de individuos de las clases “juveniles” y “adultos”, estas no se contemplaron en el análisis y se trabajó con los individuos de la clase “pichones”. Usamos un modelo no paramétrico-Mann Whitney para comparar los niveles de corticosterona y los parámetros inmunológicos entre los pichones provenientes de dos de los nidos cosechados, uno correspondiente al sitio El fisco y el otro al sitio El Lucero. Tampoco se pudo incluir en el análisis la temporada de muestreo por la escasa representatividad de las muestras de cada sitio relevadas. Los datos se analizaron usando el software estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, [http:// www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

4.3 Resultados

Se capturaron un total de 27 *C. latirostris* de los ambientes naturales durante las temporadas 2016/2017 y 2017/2018, 9 ejemplares del sitio El Fisco y 18 del sitio El Lucero. Del total de animales capturados 22 correspondieron a la clase pichones, 3 a la clase juveniles y 2 a la clase adultos. Los animales juveniles y adultos tuvieron una longitud total (LT) entre 72-174 cm y una longitud hocico-cloaca (LHC) entre 32-84 cm. Las medidas de los pichones se muestran en la tabla 4.19. Las variables ambientales registradas en estas dos temporadas se muestran en la Figura 4.32. Durante este estudio no se detectaron situaciones climáticas extremas, como sequías o inundaciones excepcionales, salvo algunas precipitaciones que impidieron en reiteradas oportunidades el acceso a los sitios de muestreo.

En el caso de los individuos adultos fue posible registrar el sexo.

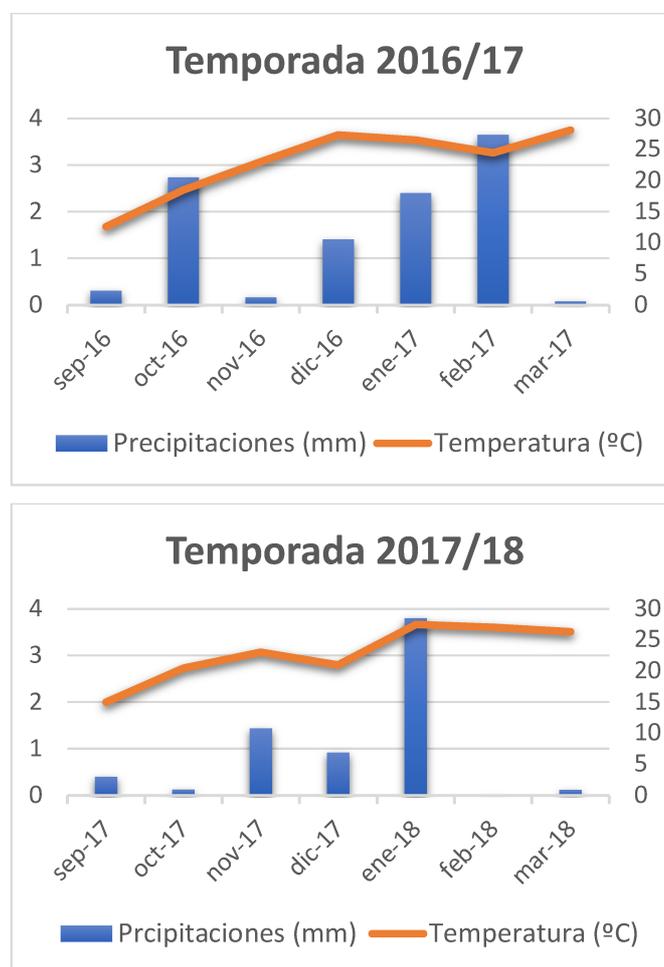


Figura 4.32 Promedio mensual de temperaturas y precipitaciones registradas durante las dos temporadas en las que recolectamos muestras de *C. latirostris* en ambientes naturales.

Tabla 4.22 Valores de los parámetros medidos en *C. latirostris* juveniles y adultos CORT (corticosterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos). ND (no detectadas).

Clase	ID	SITIO	CORT (ng/ml)	Nab	SC (%MH)	RTGB (cél/ul)	H (cél/ul)	L (cél/ul)	E (cél/ul)	M (cél/ul)
Adulto	S8	Fisco	84,3	7	3,2	17500	5425	8575	3500	ND
Adulto	L9	Lucero	123,9	9	18,3	17250	7072,5	6037,5	4140	ND
Juvenil	L7	Lucero	231,6	8	40,4	17000	2380	13260	1360	ND
Juvenil	L10	Lucero	126	7	4,5	29500	10915	17995	590	ND
Juvenil	L11	Lucero	120,2	8	8,2	34250	10960	22605	685	ND

Tabla 4.23 Valores medios, desvío estandar (SD), mínimos y máximos para el tamaño TL (longitud total), SVL (longitud hocico-cloaca), Peso, CORT (corticosterona), NAb (anticuerpos naturales) y CS (sistema de complemento), TWBC (recuento total de glóbulos blancos), H (heterófilos), L (linfocitos), E (eosinófilos), M (monocitos), medidos en pichones de *C. latirostris* en cada uno de los sitios de muestreo. ND (no detectadas).

Parámetros\Tratamientos	Sitio “El Fisco”		Sitio “El Lucero”	
	Media± SD	Min, Máx	Media± SD	Min, Máx
TL (cm)	21,94± 0,94	(20,5; 23)	23,2± 0,7	(22; 24)
SVL (cm)	10,5± 0,3	(10; 11)	11,8± 0,4	(10,5; 12)
Peso (gr)	41,7± 3,5	(38; 49)	42,8± 6,7	(39; 47)
CORT(ng/ml)	84,9 ± 23,2	(47,7; 131,4)	122,5± 61,9	(35; 249)
Log2 títulos NAb	4,22± 1,3	(3; 7)	6 ± 1,6	(3; 9)
SC (MH%)	39,5± 22,9	(3,2; 63,9)	30,6± 23,9	(4,5; 86,6)
TWBC (células/ul)	39800± 26881,58	(6720; 74500)	45740± 34246,03	(14750; 124500)
H (células/ul)	20340± 15811	(3763; 51400)	28670± 24787	(2380; 82170)
L (células/ul)	17800± 12904,78	(2805; 39820)	15360± 10223,83	(3900; 41080)
E (células/ul)	1684,0± 1573,021	(ND; 4050)	1684,0± 1846,32	(197,5; 6412,0)
M (células/ul)	ND	-	ND	-

Al comparar el tamaño de los pichones, observamos que aquellos provenientes del sitio El Lucero tuvieron una longitud total y una longitud hocico-cloaca significativamente mayor ($p < 0.001$) y ($p < 0.001$) respectivamente, en comparación con los del sitio El Fisco. No se encontraron diferencias significativas para la medida peso ($p = 0.2857$). Similarmente, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de corticosterona de los pichones entre sitios.

Se encontró que los pichones del nido recolectado en El Lucero tuvieron mayores títulos de anticuerpos naturales ($p < 0.001$) y menor actividad del complemento ($p < 0.001$) en comparación con los pichones del sitio El Fisco (Figura 4.33-a y b). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los sitios con respecto al recuentos de glóbulos blancos, todos combinados ($p = 0.8676$) o por tipo de leucocitos: Linfocitos ($p = 0.6163$), Heterófilos ($p = 0.365$), Eosinófilos ($p = 0.7639$).

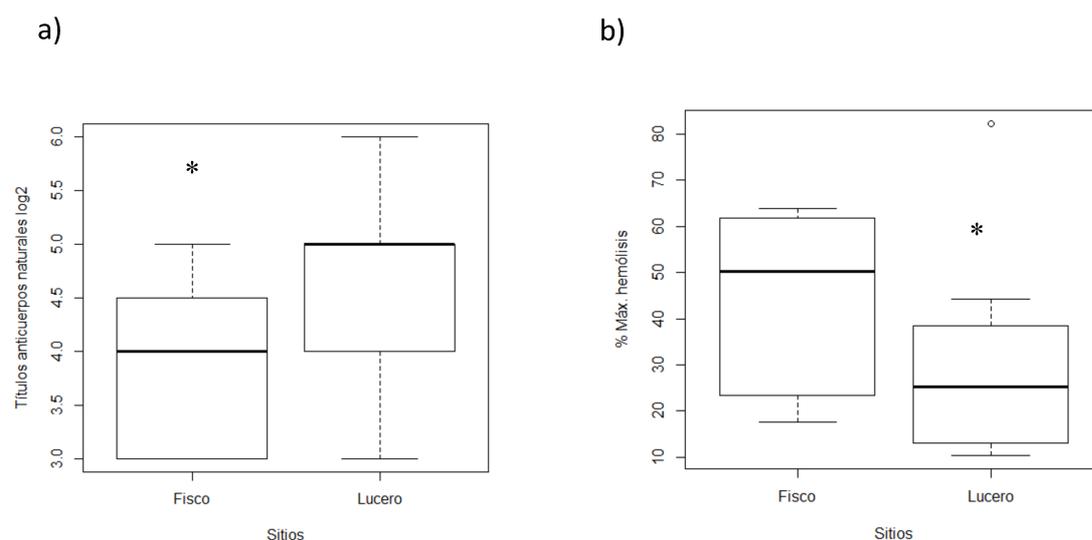


Figura 4.33 Diagramas de caja que muestran las diferencias observadas en los anticuerpos naturales (a) y la actividad del complemento (b) en los pichones de los dos sitios de muestreo. Los diagramas de caja representan la mediana (barra en negrita), cuartiles del 25-75% (caja), cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos) del 10-90%.

* Indica una diferencia significativa.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo no constituyen evidencias de los efectos que pudieran desencadenar las actividades antrópicas, sobre los niveles de corticosterona y su influencia sobre la función inmune. La complejidad de estos mecanismos reside mayormente en la multitud de factores e interacciones que podrían asociarse entre los que se pueden mencionar a la variabilidad genética e historia de vida de cada individuo, las características de los ambientes en que se encuentran estos animales, etc. Los individuos dentro de una población a menudo varían considerablemente en atributos físicos tales como: condición corporal, salud, tamaño y edad (Moore y Jessop, 2013). Varios estudios en reptiles han abordado cómo las diferencias de los rasgos físicos interactúan con la sensibilidad de la respuesta adrenocortical de un individuo a los factores de estrés. Por ejemplo, una relación recíproca entre la condición corporal y la magnitud de la respuesta al estrés ha sido descrita por Jessop et al., (2003) en cocodrilos de agua dulce (*Crocodylus johnstoni*).

La comparación que realizamos basándonos solamente en dos de los nidos recolectados de ambos sitios de muestreo constituye un análisis preliminar de las variaciones en los parámetros fisiológicos medidos en los yacarés de estos ambientes naturales. De igual manera, está claro que es necesario contar con un número mayor de individuos, de diferentes nidos a causa de la variabilidad genética que podría existir en las poblaciones naturales y que aumentaría la confiabilidad de nuestros resultados. Además, se enriquecerían los resultados mediante la incorporación de análisis más complejos, estableciendo interacciones con covariables, tales como edad, sexo, temperatura, precipitaciones, estacionalidad etc. que podrían ayudarnos a entender tales variaciones.

Un rasgo físico como la edad, también se ha asociado con diferencias en la respuesta de estrés. La edad se correlaciona significativamente con el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona después de la exposición al estrés. Como se expresó en la sección “Análisis estadístico”, no tuvimos información suficiente para considerar esta relación y poder compararla con los trabajos publicados en otras especies. Trabajos previos en tortugas marinas (*Caretta caretta*) y en cocodrilo de agua dulce (*C. johnstoni*) encontraron que los individuos inmaduros o de menor edad exhibieron respuestas adrenocortical mayores en comparación con animales adultos (Gregory et al., 1996; Jessop, 2000). Sin embargo, pudimos detectar en otro parámetro medido, como los títulos de anticuerpos naturales, que los pichones tuvieron menores títulos a los encontrados en los yacarés adultos (tabla 4.18 y 4.19). Estos resultados que reportamos en nuestro modelo de estudio, se relacionan con una característica propia de este componente del sistema inmune, que ya

ha sido descrito por algunos autores. Existe un amplio número de estudios en una variedad de taxones de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves y reptiles en los que han descubierto que la inmunidad humoral específica y no específica se encuentra asociada con la edad. Los anticuerpos específicos disminuyen con la edad, mientras que los anticuerpos naturales aumentan con la edad (Parmentier et al., 2004; Frasca et al., 2008; Ujvari y Madsen 2011; Zimmerman et al., 2012).

La incorporación de variables climáticas podría representar otra fuente importante de varianza que actúan sobre las medidas de respuesta al estrés y parámetros inmunológicos en el estudio de los individuos en condiciones silvestres. Si bien las variables climáticas de ambos sitios serían similares debido a la cercanía entre ellos, éstas posiblemente ejercerían un impacto diferente en el sitio El Lucero, que además presenta alteraciones antrópicas. En este estudio, fué posible registrar las temperaturas y precipitaciones promedios mensuales a lo largo de dos temporadas de muestreo. Sin embargo, debido a que ambas temporadas no fueron bien representadas por las muestras obtenidas, no pudieron ser incluidas en los análisis. De todos modos, seguiremos registrando estas variables en los próximos muestreos para completar este trabajo.

Finalmente, es importante mencionar las complicaciones que se presentaron a lo largo de los muestreos realizados sobre las poblaciones naturales de *C. latirostris*. Por un lado, la dependencia que mencionamos a las variables climáticas que hacen en ocasiones postergar los muestreos debido a que la especie *C. latirostris* prefiere ambientes mas densamente vegetados y de difícil acceso y se asolea sobre vegetación flotante o embalsados (Siroski, 2004). En este sentido, se dificulta, sobretudo en los casos en que la situación climática no es favorable, la accesibilidad a los sitios donde se encuentran los animales. Por otro lado, los comportamientos de huida, evasión, camuflaje de los yacares que pudimos percibir al momento del acercamiento influyeron en la captura efectiva.

Para el programa de conservación de *C. latirostris* en el cual se enmarcan estas actividades, esta información es de mucho valor en lo que respecta al seguimiento de sus poblaciones naturales, como así también para la preservación de sus ambientes. Si bien no se alcanzó a obtener la cantidad de muestras previstas, se pretende continuar con los muestreos sobre las poblaciones silvestres para completar este trabajo.

CAPÍTULO 5

Discusión general y conclusiones finales

5.1 Discusión general

A lo largo de esta tesis se ha reportado que los animales en la naturaleza se enfrentan a perturbaciones ambientales, sociales, físicas y otros factores claves de la historia de vida, como por ejemplo la inmunocompetencia, la reproducción, etc., que pueden poner en peligro su supervivencia (Moore y Jessop, 2003). Además, deben enfrentar cambios permanentes y en mayores escalas, que los seres humanos están provocando sobre los ecosistemas naturales. Del mismo modo, en respuesta a estos entornos cambiantes, los animales deben mantener un estado fisiológico constante, la homeostasis. Es así que los cambios en las concentraciones de glucocorticoides son un componente crítico de la vida diaria de un organismo y proporcionan un mecanismo para aumentar la supervivencia al suprimir temporalmente algunas funciones no esenciales para maximizar los recursos (Hamilton et al., 2018).

Los cocodrilos son representantes de un antiguo linaje de archosaurios compuesto por al menos 25 especies diferentes dispersas a nivel mundial en climas templados y tropicales. Estos carnívoros tróficos superiores de larga vida son importantes desde el punto de vista evolutivo, ecológico y económico (Seijas, 2011). Son considerados componentes muy valiosos de los humedales tropicales, son especies claves ya que mantienen la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales con sus actividades de predación selectiva, el reciclado de nutrientes, y la manutención de refugios húmedos durante las sequías (Ross, 1998). Además, debido a su longevidad y territorialidad, hace que puedan ser utilizados en diferentes estadios de vida como indicadores importantes de la calidad ambiental (Mitchelmore et al., 2005).

En la actualidad, la preocupante situación que atraviesan las poblaciones naturales de yacaré overo en nuestro país no está relacionada con la caza furtiva ni con su utilización comercial, sino con la pérdida de su hábitat como resultado de actividades antrópicas (Larriera et al., 2008). Sumado a esto, la elevada exposición a patógenos, sustancias tóxicas, factores climáticos, disputas jerárquicas, etc. constituyen algunas situaciones estresantes a los que las poblaciones de yacaré deben hacer frente.

Una de las situaciones mas críticas que atraviesan los yacarés, son las sequías; en estos casos, se produce una serie de conflictos generados por los aumentos en las densidades, entre los que se destacan el hacinamiento, la escasez de alimento, la exposición a altas temperaturas, entre otros. Por otro lado, los yacarés exhiben comportamientos sociales bien definidos y, como consecuencia de estas disputas jerárquicas, se pueden detectar serias heridas e incluso la pérdida de algún miembro (Siroski et al., 2009). A pesar de la gravedad

de estas heridas, comúnmente no se detectan signos de infección. Una pregunta reiterada es cómo pueden sobrevivir con serias heridas sin demostrar signos de septicemia ni infección local, máxime si tenemos en cuenta que viven en ambientes que contienen una diversidad de microorganismos potencialmente patógenos.

En este contexto, se llevaron a cabo los estudios para evaluar los efectos de la problemática planteada, considerando la importancia que reviste la especie *Caiman latirostris* como modelo de estudio y objeto de un programa de conservación. Los datos relevados permitieron por un lado, ampliar el conocimiento de la biología de la especie para una mejor comprensión. Por otro lado, proporcionaron nuevos aportes de las diferentes respuestas de los yacarés frente a factores estresantes y sus efectos sobre la condición física y mecanismos inmunológicos. De este modo, se plantearon dos experimentales bajo condiciones controladas de laboratorio (Capítulos 2 y 3). Con los datos recolectados de los mismos, se caracterizó el sistema inmune del yacaré overo e intervino experimentalmente a un grupo de animales mediante generación de un estrés crónico (a largo plazo) y agudo (a corto plazo), para medir el efecto sobre los parámetros inmunológicos seleccionados, los índices genéricos de condición fisiológica y glucocorticoides en sangre. Adicionalmente, se llevo a cabo un estudio observacional a campo (Capítulo 4). Estos trabajos nos otorgaron la posibilidad de formular una interpretación de cómo estarían actuando los mecanismos fisiológicos en esta especie ante diferentes situaciones de estrés, a partir de los cuales se dispararon varios interrogantes.

Los parámetros inmunológicos seleccionados en esta investigación, para evaluar la inversión inmunológica de *C. latirostris* frente a los cambios en los niveles de corticosterona, resultaron efectivos. Las técnicas que hemos utilizado para medir los índices inmunológicos y los niveles de corticosterona son las que generalmente se emplean en los trabajos publicados en ecoinmunología de reptiles. Los índices que empleamos para medir inmunidad celular (recuento total de glóbulos blancos y recuento de los diferentes tipos de leucocitos) fueron usados en ambos experimentos de laboratorios como en los yacares silvestres. A pesar de que estas técnicas aportan valiosa información, se deben desarrollar y poner a punto técnicas nuevas. Sobre todo identificar nuevos componentes del sistema inmune, actualmente desconocidos en cocorilianos, que complementen la información del sistema inmune del yacaré. A su vez podrían servir como biomarcadores y contribuir a un mayor entendimiento de esta intrincada red de mecanismos. Por ejemplo, el conocimiento de la expresión de algunos genes de los componentes del sistema inmune evaluados, que podrían alterarse a causa de los estresores propuestos.

Por otra parte, la facilidad en la obtención de las muestras de sangre periférica en estos animales desde el momento de su nacimiento, para el desarrollo de las técnicas planteadas, representan ventajas considerables para la realización de estudios en condiciones controladas en estos organismos, evitando el sacrificio de los individuos de experimentación. Esta ventaja es aún de mayor importancia en trabajos de monitoreo en condiciones ambientales, con el objetivo de evitar cualquier tipo de perjuicio a las poblaciones naturales.

El estudio de estrés crónico, permitió conocer los mecanismos fisiológicos que los animales pusieron en marcha bajo estas diferentes condiciones de estrés. Los únicos efectos negativos que encontramos fueron causados por la privación de alimento sobre los parámetros de crecimiento. Sin embargo, sospechamos que el tiempo de exposición de los individuos, no fue suficiente para observar una repuesta al estrés nutricional (reflejado en la falta de diferencia significativa encontrada en los niveles de CORT). Sorprendentemente, este tratamiento desencadenó una profilaxis, demostrada por una inversión en la generación de anticuerpos naturales. Esta respuesta inmune sugiere que en los momentos en que hay una falta de recursos, los yacarés podrían estar expuestos a un mayor riesgo de infección, por lo cual, ciertos mecanismos de defensa son considerados como prioritarios para incrementar la supervivencia. Los individuos expuestos a altas temperaturas tuvieron una mejor condición corporal, niveles menores de corticosterona e invirtieron más en la generación de anticuerpos naturales. A diferencia de lo que reportaron algunos autores sobre el efecto perjudicial de las altas temperaturas en los ectotermos, el efecto del tratamiento temperatura en nuestro experimento, resultó ser beneficioso. Los elevados títulos de Nabs encontrados demuestran una habilidad inmunológica útil durante este período crítico. En las poblaciones naturales de *C. latirostris* los momentos de mayores disputas sociales, presencia de heridas y lesiones se observan durante las temporadas reproductivas, etapa que coincide con la exposición a temperaturas altas y mayor exposición a patógenos. En este sentido, la importancia que reviste para los ectotermos los mecanismos de termorregulación, esperábamos que los niveles de corticosterona fueran más altos en los juveniles de *C. latirostris* bajo restricción hídrica. Pero no se observó que una reducción del 50% de contacto con el agua sea un factor estresante, ni tampoco se encontraron variaciones en los parámetros de crecimiento e inmunológicos evaluados. Tal vez, se podría suponer que esta especie conservara algún tipo de adaptación a esta situación y por lo tanto podrían soportar condiciones más severas.

El ensayo a corto plazo realizado con la utilización de dos métodos permitió evaluar, cómo en los yacares funcionaría el eje HPI ante eventos naturales impredecibles y de que manera estos animales invirtieron en los parámetros inmunológicos medidos (Capítulo 3). Se

observó una respuesta diferente por parte de los animales frente a los dos estresores propuestos, y se generaron numerosos interrogantes que podrían plantearse para estudios futuros. La respuesta de los caimanes a la restricción física de movimiento fue incrementar los niveles de corticosterona en el transcurso del tiempo. Similar a los estudios previos publicados en grupos filogenéticamente cercanos, evidenciando que la función y regulación del eje se encontraría conservada entre estos vertebrados. Al mismo tiempo, consideramos que el aumento de la CORT observado en los animales de este tratamiento, haya desencadenado una redistribución leucocitaria a otros compartimentos corporales, con el propósito de aumentar la vigilancia inmune en los órganos.

En relación al estudio de estimulación de GC mediante la inyección de ACTH, se generaron resultados interesantes para los cuales se propusieron varias fundamentaciones que resultan sumamente útiles e interesantes al momento de desarrollar futuros estudios. Por un lado se podría atribuir, la falta de efecto de la inyección de ACTH para estimular la liberación de GC, a una diferencia especie específica en la sensibilidad por parte de las células interrenales/adrenocorticales a la ACTH de mamífero para secretar corticosterona. Pero por otro, deducimos que posiblemente se haya ejecutado una inhibición del mecanismo de retroalimentación hormonal del eje HPI en los caimanes, como producto de niveles elevados de corticosterona causados por la ACTH exógena.

El estudio observacional realizado con poblaciones naturales de yacarés contribuyó a obtener una primera aproximación a la compleja interrelación entre el estrés, la función inmune y el ambiente (Capítulo 4). Los análisis preliminares que se efectuaron lograron mostrar algunas variaciones, posiblemente por el impacto de las modificaciones antropogénicas u otros factores que estarían alterando el funcionamiento de este mecanismo, para lo cual son necesarios otro tipo de estudios.

La aplicación de ensayos con un grado distinto de control y realidad propone una mirada integral del problema. Por medio de los ensayos de laboratorio se pudo constatar que los estresores poseen un impacto diferencial sobre los distintos componentes del sistema inmune. Los resultados que obtuvimos evidenciaron respuestas disímiles de relevancia por parte de los yacarés para su supervivencia. El estudio a campo sólo permitió una visión preliminar de la asociación estrés-Inmunidad-ambiente. No obstante, se plantea profundizar este trabajo y tener en cuenta como herramientas para la interpretación de los datos de los ambientes naturales.

Debido al rol que desempeña esta especie en nuestra provincia, como producto económico de importancia regional y por su rol ecológico como importante modificador del hábitat e

indicador ambiental esta información resulta de gran utilidad para el programa de conservación, aumentando el conocimiento de la biología de la especie y del estado de sus ambientes.

5.2 Conclusiones finales

Teniendo en cuenta los objetivos planteados para el presente trabajo de Tesis Doctoral y los resultados obtenidos se puede abordar las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado el efecto de los principales estresores ambientales: restricción de alimento, reducción hídrica y alta temperatura, sobre la respuesta al estrés e inversión inmunológica de *C. latirostris* bajo condiciones controladas a largo plazo.
- El tiempo de exposición a los factores de restricción de alimento y reducción hídrica posiblemente no hayan sido suficiente para observarse una respuesta al estrés. Sugiriendo que esta especie posee importantes adaptaciones para enfrentar ambientes con escasez de recursos y situaciones extremas.
- Se incorporó y evaluó la respuesta de *C. latirostris* a posibles eventos estresantes agudos bajo condiciones controladas. Se encontraron respuestas disímiles frente a los dos métodos utilizados, planteando nuevas hipótesis que sería interesante poner a prueba en experimentos futuros.
- Los parámetros inmunológicos y fisiológicos utilizados en esta tesis demostraron ser sumamente variables, pero a pesar de ello permitieron responder nuestros interrogantes y corroborar su aplicabilidad en *C. latirostris*.
- Fue posible observar variaciones de los parámetros immuno-fisiológicos utilizados para este trabajo de tesis en los yacarés muestreados en los ambientes naturales. Pero se requiere continuar con los muestreos para instaurar mayores interrelaciones y abordar conclusiones más confiables.
- En base a los datos relevados en este trabajo, es necesario continuar con la evaluación del impacto de estos y otros nuevos estresores, como también incorporar nuevos marcadores inmunológicos para aumentar la interpretación del funcionamiento de estos sistemas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abbas Abul K, Litchman A. 2005. General Propieties of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology. 5^a ed. Elsevier Sci Biology, USA. p. 608.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and molecular immunology. 7^a ed. Elsevier Health Sciences, USA. p.545.

Adamo SA. 2014. The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior. Integr. Comp. Biol. 1-8.

Agencia de extension rural San Cristobal. INTA. www.inta.gob.ar/sancristobal

Aguirre AA, Balazs GH. 2000. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. Comp. Haematol. Int. 10: 132-137.

Almasi B, Béziérs P, Roulin A, Jenni L. 2015. Agricultural land use and human presence around breeding sites increase stress-hormone levels and decrease body mass in barn owl nestlings. Oecologia, 179: 89-101.

Angilleta, MJ Jr. 2001. Thermal and physiological constraints on energy assimilation in a widespread lizard (*Sceloporus undulates*). Ecology. 82: 3044-3056.

Barboza NN, Mussart NB, Coppo JA, Fioranelli SA, Koza GA. 2008. El medio interno de Caiman latirostris en cautiverio. Influencia del sexo, crecimiento y estación del año. Revista Veterinaria, 19: 33-41.

Bartolomucci A. 2007. Social stress, immune functions and disease in rodents. Front. Neuroendocrinol. 28: 28-49.

Basetti LA, Marques TS, Malvasio A, Piña CI, Verdade L. 2014. Thermoregulation in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Zool. Stud. 53: 9.

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 P, Begon M. 2015. Interacciones entre el estres, el parasito y el hospedador: ¿un triangulo vicioso? (version en español). FAVE Seccion Ciencias Veterinarias 14: 42-56.

Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008. The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective. J. Anim. Ecol. 77: 984-997.

Berger S, Martin LB, Wikelski M, Romero LM, Kalko EK, Vitousek MN, Rödl T. 2005. Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. Horm. Behav. 47: 419.

Berzins LL, Tilman-Schindel E, Burness G. 2008. Sex-specific effects of handling time on an index of immune activity in zebra finches. Physiol. Biochem. Zool. 81: 383-387.

Blanco A. 2000. Química biológica. El Ateneo, Buenos Aires.

- Blaustein AR, Walls SC, Bancroft BA, Lawler JJ, Searle CL, Gervasi SS. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* 2: 281-313.
- Bonier F, Martin PR., Sheldon KS., Jensen JP., Foltz SL., Wingfield JC. 2006. Sex-specific consequences of life in the city. *Behavioral Ecology*, 18: 121-129.
- Boonstra R., Dantzer B., Delehanty B., Fletcher Q.E., Sheriff, MJ. 2014. Equipped for life in the boreal forest: the role of the stress axis in mammals. *Arctic*, 82-97.
- Bourgeon S, Martinez J, Criscuolo F, Le Maho Y, Raclot T. 2006. Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 336-342.
- Bradley CA., Gibbs SE., Altizer, S. 2008. Urban land use predicts West Nile virus exposure in songbirds. *Ecological Applications*. 18:1083-1092.
- Brochu CA. 2003. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 31: 357-397.
- Campbell TW. 1995. *Avian hematology and cytology*. Iowa State University Press.
- Castañeda Cortés DC, Langlois VS, Fernandino JI. 2014. Crossover of the hypothalamic pituitary–adrenal/interrenal,–thyroid, and–gonadal axes in testicular development. *Frontiers in endocrinology*, 5: 1-11.
- Cirule D, Krama T, Vrublevska J, Rantala MJ, Krams I. 2012. A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress?. *J. Ornithol.* 153: 161-166.
- Cote J, Clobert J, Poloni LM, Haussy C, Meylan S. 2010. Food deprivation modifies corticosterone-dependent behavioural shifts in the common lizard. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166: 142-151
- Cotter PF, Ayoub J, Parmentier HK. 2005. Directional selection for specific sheep cell antibody responses affects natural rabbit agglutinins of chickens. *Poult. Sci.* 84: 220-225.
- Coulson RA, Herbert JD. 1981. Relationship between metabolic rate and various physiological and biochemical parameters. A comparison of alligator, man and shrew. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology*. 69: 1-13.
- Crespi EJ, Williams TD, Jessop TS, Delehanty B. 2013. Life history and the ecology of stress: how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals?. *Funct. Ecol.* 27: 93-106.
- Cuervo PF. 2017. Estudio de marcadores del sistema inmune de roedores en un contexto de estrés. Su aplicación a estudios eco-epidemiológicos. Tesis doctoral: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Dallman MF, Bhatnagar S. 2001. Chronic stress and energy balance: role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Handbook of physiology*. Section, 7: 179-210.
- 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 AK. 2005. Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *J. Field Ornithol.* 76: 334-338.
- Demas GE, Adamo SA, French SS. 2011. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Funct. Ecol.* 25: 29-39.
- 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, Miller AH, McEwen BS, Spencer R L. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol.* 157: 1638-1644.
- Dhabhar FS, Satoskar AR, Bluethmann H, David JR, McEwen, B S. 2000. Stress-induced enhancement of skin immune function: a role for γ interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2846-2851.
- Dhabhar FS. 2002. Stress-induced augmentation of immune function—the role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines. *Brain. Behav. Immun.* 16: 785-798.
- Dhabhar FS., Viswanathan K. 2005. Short-term stress experienced at the time of immunization induces a long-lasting increase in immunological memory. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: 738-744.
- Dhabhar F.S. 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic research.* 58: 193-210.
- Dobráková M, Kvetnansky R, Oprsalová Z, Ježová D. 1993. Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 18: 163-174
- Dupoué A, Brischoux F, Lourdaís O, Angelier F. 2013. Influence of temperature on the corticosterone stress–response: an experiment in the Children’s python (*Antaresia childreni*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 193: 178-184.
- Eberhardt AT, Costa SA, Marini MR, Racca A, Baldi C J, Robles MR, Beldomenico P M. 2013. Parasitism and physiological trade-offs in stressed capybaras. *PLoS ONE* 8, e70382.
- Elf PK. 2003. Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *Gen Comp Endocr.* 132: 349-355.
- Elsley RM, Joanen T, McNease L, Lance V. 1990a. Growth rate and plasma corticosterone levels in juvenile alligators maintained at different stocking densities. *J. Exp. Zool.* 255: 30-36.
- Elsley RM, Joanen T, McNease L, Lance V. 1990b. Stress and plasma corticosterone levels in the American alligator relationships with stocking density and nesting success. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 95: 55-63.

Erickson K, Drevets W, Schulkin J. 2003. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 233-246.

Evans-Osses I, de Messias-Reason I, Ramirez MI. 2013. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. *The Scientific World Journal*.

Ewenson E, Zann R, Flannery G. 2003. PHA immune response assay in captive zebra finches is modulated by activity prior to testing. *Anim. Behav.* 66: 797-800.

Fainboim L, Geffner J. 2011. *Introducción a la Inmunología Humana*. 6ª ed. Ed. Panamericana, Buenos Aires. p.584.

Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LO. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 194-204.

Finger J W, Gogal RM. 2013. Endocrine-disrupting chemical exposure and the American alligator: a review of the potential role of environmental estrogens on the immune system of a top trophic carnivore. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 704-714.

Finger J W, Thomson P C, Adams A L, Benedict S, Moran C, Isberg S R. 2015. Reference levels for corticosterone and immune function in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) hatchlings using current Code of Practice guidelines. *Gen. Comp. Endocrinol.* 212: 63-72.

Finger JW Jr, Isberg SR. 2012. A review of innate immune functions in crocodylians. *CAB R.* 7:1-11.

Finger JW. 2014. Stressor induced immunomodulation in crocodylians. Doctoral dissertation, University of Georgia.

Franklin CE, Davis BM, Peucker SKJ, Stephenson H, Mayer R, Whittier J, Grigg GC. 2003. Comparison of stress induced by manual restraint and immobilisation in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 298: 86-92.

Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. 2008. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J. Immunol.* 180: 2741-2746.

French SS, Fokidis HB, Moore, MC. 2008. Variation in stress and innate immunity in the tree lizard (*Urosaurus ornatus*) across an urban-rural gradient. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol. Journal of Comparative Physiology B.* 178: 997-1005.

Frye FL. *Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry*. 1991. 2 vol. Krieger Publishing, Malabar, Florida

Gadjeva M. 2014. Overview. *The Complement System*. Humana Press, Totowa, NJ. p.381.

Ganswindt SB, Myburgh JG, Cameron EZ, Ganswindt A. 2014. Non-invasive assessment of adrenocortical function in captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 177: 11-17.

- Gist DH, de Roos. 1966. Corticoids of the alligator adrenal gland and the effects of ACTH and progesterone on their production in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 7: 304-313.
- Gist DH, Kaplan ML. 1976. Effects of stress and ACTH on plasma corticosterone levels in the caiman *Caiman crocodilus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 28: 413-419.
- Graham CM, Narayan EJ, McCallum H, Hero JM. 2013. Non-invasive monitoring of glucocorticoid physiology within highland and lowland populations of native Australian Great Barred Frog (*Mixophyes fasciolatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 191: 24-30.
- Graham SP, Freidenfelds NA, McCormick GL, Langkilde T. 2012. The impacts of invaders: basal and acute stress glucocorticoid profiles and immune function in native lizards threatened by invasive ants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176: 400-408.
- Gregory LF, Gross TS, Bolten AB, Bjorndal KA, Guillette LJ. 1996. Plasma corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 312-320.
- Gregory LF. 1994. Capture stress in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). Master's thesis, University of Florida, Gainesville.
- Guillette Jr LJ, Crain DA, Rooney AA, Woodward AR. 1997. Effect of acute stress on plasma concentrations of sex and stress hormones in juvenile alligators living in control and contaminated lakes. *J. Herpetol.* 347-353.
- Guillette LJ, Cree A, Rooney AA. 1995. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In *Health and welfare of captive reptiles*. pp. 32-81. Springer, Dordrecht.
- Hamilton MT, Finger Jr JW, Elsey RM, Mastromonaco GF, Tuberville TD. 2018. Corticosterone in American alligator (*Alligator mississippiensis*) tail scutes: Evaluating the feasibility of using unconventional samples for investigating environmental stressors. *Gen. Comp. Endocrinol.* En prensa.
- Hangalapura BN, Nieuwland MG, De Vries Reilingh G, Buyse J, Van Den Brand H, Kemp B, Parmentier H K. 2005. Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult. Sci.* 84: 1520-1529.
- Hangalapura BN, Nieuwland MG, de Vries Reilingh G, Heetkamp MJ, Van den Brand H, Kemp B, Parmentier H K. 2003. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poult. Sci.* 82: 1692-1700.
- Hennessy MB, Deak T, Schiml PA. 2014. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure?. *Brain Behav. Immun.* 37: 15-20.
- Huchzermeyer FW. 2002. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Revue scientifique et technique-Office international des epizooties.* 21: 265-276.
- Isberg SR, Shilton CM. 2013. Stress in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*): no difference between individually and communally housed animals. *Springerplus* 2: 381.

- Jacobson ER, Origgi F. 2002. Use of serology in reptile medicine. *J. Exot. Pet. Med.* 11: 33-45.
- 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
- Jenkins-Perez, J. 2012. Hematologic evaluation of reptiles: a diagnostic mainstay. *Vet. Tech.* August. E1-E8.
- Jessop TS, Tucker AD, Limpus CJ, Whittier JM. 2003. Interactions between ecology, demography, capture stress, and profiles of corticosterone and glucose in a free-living population of Australian freshwater crocodiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 161-170.
- Jessop TS, Webb J, Dempster T, Feit B, Letnic M. 2018. Interactions between corticosterone phenotype, environmental stressor pervasiveness and irruptive movement-related survival. *J. Exp. Biol.* En prensa.
- Jessop TS. 2000. Endocrinal Ecology of the Green Turtle. Doctoral dissertation, Dissertation, University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Johnstone CP, Reina RD, Lill A. 2012. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J. Comp. Physiol. B.* 182: 861-879.
- Josserand R, Dupoué A, Agostini S, Haussy C, Le Galliard J F, Meylan S. 2017. Habitat degradation increases stress-hormone levels during the breeding season, and decreases survival and reproduction in adult common lizards. *Oecologia.* 184: 75-86.
- Killen SS, Marras S, Metcalf, NB, McKenzie DJ, Domenici P. 2013. Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends Ecol. Evol.* 28: 651-658.
- Kitaysky AS, Kitaiskaia EV, Piatt JF, Wingfield JC. 2003. Benefits and costs of increased levels of corticosterone in seabird chicks. *Horm. Behav.* 43: 140-149.
- Klukowski M. 2011. Effects of breeding season, testosterone and ACTH on the corticosterone response of free-ranging male fence lizards (*Sceloporus undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 173: 295-302.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda BD, De Boer SF, Flügge G, Korte S M, Richter-Levin G. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35: 1291-1301.
- Kuhlman JR, Martin LB. 2010. Captivity affects immune redistribution to skin in a wild bird. *Funct. Ecol.* 24: 830-837.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30: 16-34.
- Lance VA, Elsey RM, Butterstein G, Trosclair PL, Merchant M. 2010. The effects of Hurricane Rita and subsequent drought on alligators in southwest Louisiana. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet Physiol.* 313: 106-313.

- Lance VA, Elsey RM. 1999. Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. *J. Exp. Zool.* 283: 559-565.
- Lance VA, Grumbles JS, Rostal DC. 2001. Sex differences in plasma corticosterone in desert tortoises, *Gopherus agassizii*, during the reproductive cycle. *J. Exp. Zool.* 289: 285-289.
- Lance VA, Lauren D. 1984. Circadian variation in plasma corticosterone in the American alligator, *Alligator mississippiensis*, and the effects of ACTH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 1-7.
- Lance VA. 2003. Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Exp. Gerontol.* 38: 801-805.
- Lang JW, Andrews HV. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *J. Exp. Zool.* 270: 28-44.
- Lang JW. 1979. Thermophilic response of the American alligator and the American crocodile to feeding. *Copeia.* 48-59.
- Lang JW. 1987. Crocodylian behaviour: implications for management. In *Wildlife management: crocodiles and alligators: 273-294*. Webb, G.W.J., Manolis, S.C. and Whitehead, P.J. (Eds). Sydney: Surrey Beaty and sons.
- Larriera A, 1998. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina. The first commercial rearing. En: *Crocodyles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the CSG/IUCN.* 379-385. Ed. The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Larriera A, Imhof A, Siroski P. 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo de género *Caiman* en Argentina. En: *Castroviejo J, Ayarzagüena J, Velasco A, Contribución al conocimiento del Género Caiman de Suramérica.* p 139-179. Ed. Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18. Sevilla, España.
- Larriera A, Imhof A. 2006. Proyecto Yacaré. Cosecha de huevos para cría en granjas del género Caimán en la Argentina. En: *Bolkovic ML, Ramadori D, Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable.* p 51-64. Dirección de Fauna Silvestre. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina.
- Larriera A. 1991. Cría en granjas: una alternativa de manejo para los caimanes argentinos. (Revisión Bibliográfica). *Rev. Arg. Prod. Anim.* 11: 479-484.
- Larriera A. 1993. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: *Verdade LM, Packer IU, Rocha MB, Molina FB, Duarte PG y L. A. B. M. Lula.* Ed. Anais do 30 Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-papo-amarelo. p 61-69. CIZBAS / ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba SP, Brasil.
- Larriera A. 1994. *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina, with the aim of management. En: *CSG Proceedings, Pattaya, Thailand.* p.188-198. Crocodile Specialist Group.
- Larriera A. 2011. Ranching the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) in Argentina: an economic incentive for wetland conservation by local inhabitants. In *CITES and CBNRM*

proceedings of an international symposium "the relevance of CBNRM to the conservation and sustainable use of CITES-listed species in exporting countries. Gland, IUCN.

Larriera, A. 1995. Areas de nidificación y momento óptimo de cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: Larriera A, Verdade LM. La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina. p 221-232. Vol. 1. Ed. Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina.

Latorre MA, López González EC, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. 2013. Effects of in vivo exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. J. immunotoxicol. 10: 349-354.

Latorre MA, Romito ML, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. 2016. Total and differential white blood cell counts in *Caiman latirostris* after in ovo and in vivo exposure to insecticides. J. Immunotoxicol.13: 903-908.

Lewis SM, Bain BJ, Bates I. 2008. Hematología practica. Ed. Elsevier, España. p.608

Liebl AL, Martin LB. 2013. Stress hormone receptors change as range expansion progresses in house sparrows. Biol. Lett. 9: 20130181.

Lifjeld JT, Dunn PO, Whittingham LA. 2002. Short-term fluctuations in cellular immunity of tree swallows feeding nestlings. Oecologia. 130: 185-190.

Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?. Oikos. 88: 87-98.

Lorenzon P, Clobert J, Oppliger A, John-Alder H. 1999. Effect of water constraint on growth rate, activity and body temperature of yearling common lizard (*Lacerta vivipara*). Oecologia. 118: 423-430.

Lourdais O, Heulin B, Denardo DF. 2008. Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*): a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. Biol. J. Linn. Soc. 93: 499-508.

Magadán-Mompó S, Sánchez-Espinel C, Gambón-Dez, F. 2013. IgH loci of American alligator and saltwater crocodile shed light on IgA evolution. Immunogenetics. 65: 531-541.
Mahmoud IY, Vliet K, Guillette Jr LJ, Plude JL. 1996. Effect of Stress and ACTH, on Hormonal Levels in Male Alligators, Alligator mississippiensis. Comp. Biochem. Physiol. 115: 57-62.

Martin LB II, Gilliam J, Han P, Lee K, Wikelski M. 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical house sparrows *Passer domesticus*. Gen. Comp. Endocrinol. 140: 126-135

Martin LB, Ghalambor CK, Woods HA. 2014. Integrative organismal biology. John Wiley & Sons. p.360.

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. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. Gen. Comp. Endocrinol. 163: 70-76

Mashaly MM, Hendricks GL, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* 83: 889-894.

Mason GJ. 2010. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends Ecol. Evol.* 25: 713-721.

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

Matson KD, Tieleman BI, Klasing KC. 2006. Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. *Physiol. Biochem. Zool.* 79: 556-564.

Maxwell MH. 1993. Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poult. Sci. J.* 49: 34-43.

McCormick G L, Shea K, Langkilde T. 2015. How do duration, frequency, and intensity of exogenous CORT elevation affect immune outcomes of stress?. *Gen. Comp. Endocrinol.* 222: 81-87.

McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43: 2-15.

McEwen BS. 2017. Allostasis and the epigenetics of brain and body health over the life course: the brain on stress. *Jama Psychiatry.* 74: 551-552.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 2000. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338-344.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 2002. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science.* 12: 298-300.

Merchant ME, Roche C, Elsey RM, Prudhomme J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136: 505-513.

Merchant M, Thibodeaux D, Loubser K, Elsey RM. 2004. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasitol.* 90: 1480-1483.

Merchant ME, Pallansch M, Paulman RL, Wells JB, Nalca A, Ptak R. 2005. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antivir. Res.* 66: 35-38.

Merchant M, Britton A. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 143: 488-493.

Meylan S, Haussy C, Voituron Y. 2010. Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169: 158-166.

Mitchelmore CL, Rower CL, Place AR, 2005. Tools for Assessing Contaminant Exposure and Effects in Reptiles. En: Gardner SC, Oberdörster E. *Toxicology of Reptiles. New perspective: Toxicology and the Environment.* p. 63-122. Ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton. Florida, USA.

- Moleón MS, Parachú Marcó MV, Pietrobon EO, Jahn GA, Beldomenico PM, Siroski PA. 2017. Corticosterone levels and immunological indices in stressed juvenile broad-snouted caimans. *J. Zool.* 304: 151-158.
- Montini JP, Piña CI, Larriera A, Siroski P, Verdade LM. 2006. The relationship between nesting habitat and hatching success in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology.* 5: 91-96.
- Moore IT, Jessop TS. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* 43: 39-47
- Morandini L, Honji RM, Ramallo MR, Moreira RG, Pandolfi M. 2014. The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: relationship with stress and the establishment of social hierarchies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195: 88-98.
- Morici LA, Elsey RM, Lance VA. 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators. *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* 279: 156-162.
- Murphy K. 2011. Janeway's immunobiology. Garland Science, New York, NY.
- Mussart NB, Barboza NN, Fioranelli SA, Koza GA, Prado WS, Coppo JA. 2006. Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae). *Revista Veterinaria.* 17: 3-10.
- Nazar FN, Marin RH. 2011. Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Stress.* 14: 166-173.
- Nonaka M, Kimura A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics.* 58: 701-713.
- Olsson A, Phalen D. 2013. Comparison of biochemical stress indicators in juvenile captive estuarine crocodiles (*Crocodylus porosus*) following physical restraint or chemical restraint by midazolam injection. *J. Wildl. Dis.* 49: 560-567.
- Pacak K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22: 502-548.
- Parachú Marco M V, Siroski P A, Jahn G, Piña C I. Corticosterone response in Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) after restrain conditions. 23th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. Mc Neese State University. Lake Charles, Louisiana. USA, 26 al 30 de Mayo de 2014, p 404.
- Parachú Marcó MV, Leiva P, lungman JL, Simoncini MS, Piña CI. 2017. New evidence characterizing Temperature-dependent Sex Determination in Broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. *Herpetol. Conserv. Biol.* 12: 78-84.
- Parachu Marco MV, Piña CI, Simoncini M, Larriera A. 2010. Effects of incubation and rearing temperatures on *Caiman latirostris* growth. *Zool. Stud.* 49: 367-373
- Parachu Marco MV, Piña CI, Somoza GM, Jahn GA, Pietrobon EO, lungman J L. 2015.

Corticosterone Plasma Levels of Embryo and Hatchling Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*) Incubated at Different Temperatures. *South Am. J. Herpetol.* 10: 50-57.

Parmentier HK, Lammers A, Hoekman JJ, Reilingh GDV, Zaanen IT, Savelkoul HF. 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 39-49.

Parmesan C, Burrows MT, Duarte CM, Poloczanska ES, Richardson AJ, Schoeman D S, Singer MC. 2013. Beyond climate change attribution in conservation & ecological research. *Ecol. Lett.* 16: 58-71.

Phillips JG, Bellamy D. 1963. Adrenocortical hormones. *Comp. Endocrinol.* 1: 208-257. Academic Press New York.

Piña CI, Larriera A, Siroski P. 2004. Cocodrilos en la Región Litoral: especies, distribución geográfica, modo de vida. *Miscelánea.* 12: 318.

Piña CI, Merchant ME, Verdade LM. 2015. Introduction: Reproduction in Crocodilians. *South. Am. J. Herpetol.* 10: 1-3.

Poletta GL, Siroski PA, Amavet PS, Ortega HH, Mudry M D. 2013. Reptiles as animal models: examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. *Book: Reptile across research field.* 1-39.

Prado WS, Piña CI, Waller T. 2012. Categorización del estado de conservación de los caimanes (yacarés) de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología.* 26: 403-410.

Raberg L, Stjernman M, Hasselquist D. 2003. Immune responsiveness in adult blue tits: heritability and effects of nutritional status during ontogeny. *Oecologia.* 136: 360–364.

Racca A L, Eberhardt A T, 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.

Rich E L, Romero LM. 2005. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: 1628-1636.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11: 785.

Romero LM, Romero RC. 2002. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. *The Condor.* 104: 129-135.

Romero L M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19: 249-255.

Romero LM, Wingfield JC. 1999. Alterations in hypothalamic–pituitary–adrenal function associated with captivity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 122:13-20.

Romero, LM. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128: 1-24.

Rooney A A, Bermudez DS, Guillette Jr L J. 2003. Altered histology of the thymus and spleen in contaminant exposed juvenile American alligators. *J. Morphol.* 256: 349-359.

Rooney A A. 1998. Variation in the endocrine and immune system of juvenile alligators: environmental influence on physiology. Doctoral dissertation, State University System of Florida.

Ross J P. 1998. Status survey and conservation Action Plan: Revised Action Plan for Crocodiles. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland, 96 p.

Ross JP, Godshalk R. 2003. Taller Internacional para el Manejo y Comercio de *Caiman yacare*. 3 al 5 de Octubre de 2002, Gainesville, Florida, USA. 85 pp.

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 R, Romero L, Munck A. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, & preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55-89.

Sarkis-Gonçalves F, Castro AMV, Verdade L. M. 2004. The influence of weather conditions on caiman night-counts. In *Crocodiles. Proceedings of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.* IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland (pp. 387-393).

Seddon RJ, Klukowski M. 2012. Influence of stressor duration on leukocyte and hormonal responses in male southeastern five-lined skinks (*Plestiodon inexpectatus*). 317: 499-510.

Seijas AE. 2011. Los Crocodylia de Venezuela. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Ecología y Conservación. Colección Estudios y Divulgación Científica y Tecnológica, Venezuela.

Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138: 32.

Selye H. 1975. Confusion & controversy in the stress field. *Journal of Human Stress.* 1: 37-44.

Shaharabany M, Gollop M, Ravin S, Golomb E, DeMarco L, Ferreira P C, Boson W L, Friedman E. 1999. Naturally occurring activities of avian and crocodile tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 416-418.

Sistema de información y gestión agrometeorológica. INTA. Ministerio de producción y trabajo. <http://siga2.inta.gov.ar>

Silvestre AM, González SL, Cuenca R. 2013. La bioquímica sanguínea en clínica de reptiles. *Consulta de difusión veterinaria.* 21: 31-40.

Silvestre AM. 2011. Hematología y bioquímica sanguínea en tres especies de lagartos gigantes de las islas canarias (género *gallotia*). Tesis doctoral dissertation: Universitat Autònoma de Barcelona.

Silvestre AM. 2014. How to assess stress in reptiles. *J. Exot. Pet Med.* 23: 240-243.

- Siroski PA, Piña CI, Larriera A, Merchant ME, Di Conza J. 2009. Plasma activity of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). Zool. Stud. 48: 238-242.
- Siroski P A. 2011. Caracterización del sistema del complemento e identificación de componentes del sistema inmune innato del yacar e overo (*Caiman latirostris*). Tesis doctoral: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Siroski P, Merchant M, Parachu Marco V, Piña C, Ortega H. 2010. Characterization of serum complement activity of the broad snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia: Alligatoridae). Zool. Stud. 49: 64-70.
- Siroski P. 2004. *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* population surveys in Formosa Province, Argentina. En: Proceedings of the 17th working meeting of the IUCN-Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN. p 443-446. Gland: The World Conservation Union.
- Siroski PA, Bassetti L, Piña CI y Larriera A. 2014. Broad-snouted Caiman *Caiman latirostris*. Pp. 18-22 in Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition, ed. by S.C. Manolis and C. Stevenson. Crocodile Specialist Group: Darwin.
- Siroski PA, Poletta GL, Latorre MA, Merchant ME, Ortega HH, Mudry MD. 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). Chem. -biol. interact. 244: 64-70.
- Sompayrac L M. 2012. How the Immune System Works, 4^a Ed. WileyBlackwell.
- Sopinka N M, Patterson L D, Redfern J C, Pleizier N K, Belanger C B, Midwood J D, Cooke S J. 2015. Manipulating glucocorticoids in wild animals: basic and applied perspectives. Conserv. Physiol. 3: 1-16.
- The R project for statical computing. [http:// www.r-project.org](http://www.r-project.org)
- Turton J A, Ladds P W, Manolis S C, Webb G J W. 1997. Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight. Aust. Vet. J. 75, 114.
- Ujvari B, Madsen T. 2011. Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons? Funct. Ecol. 25: 813-817.
- Uno Y, Usui T, Fujimoto Y, Ito T, Yamaguchi T. 2012. Quantification of interferon, interleukin, and Toll-like receptor 7 mRNA in quail splenocytes using real-time PCR. Poult. Sci. 91: 2496-2501.
- van Hoek M L. 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. Pharmaceuticals. 7: 723-753.
- Verdade LM, Larriera A, Piña CI. 2010. Broad-snouted Caiman *Caiman latirostris*. Pp. 18-22 in Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition, ed. by S.C. Manolis and C. Stevenson. Crocodile Specialist Group: Darwin.

- Verdade LM. 1997. Morphometric Analysis of the broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*): an assessment of individual's clutch, body size, sex, age, and area of origin. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, Florida, USA. 174 p.
- Waller T, Micucci PA. 1992. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los Crocodilios de la República Argentina. Fase I (1990/91): Provincia de Corrientes, 61 pp.
- Webb GJW, Manolis SC, Buckworth R. 1983. *Crocodylus johnstoni* in the McKinlay River Area N. T. V. Abnormalities and injuries. *Wildl. Res.* 10: 407-420.
- Wingfield JC, Romero LM. 2001. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. *Handbook of physiology. Section 7*: 211-236.
- Wingfield JC. 2013. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Funct. Ecol.* 27: 37-44.
- Wolinska J., King KC. 2009. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 25: 236-244.
- Yang Y, Tung JW, Ghosn EE, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 2007. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 4542-4546.
- Yanosky A. 1990. Histoire naturelle du Caiman à museau large (*Caiman latirostris*), un alligatoriné mal connu. *Revue Fr. Aquariol.* 17:19-31.
- Zayas MA, Rodríguez HA, Galoppo GH, Stoker C, Durando M, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. 2011. Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). *J. Herpetol.* 45: 516-524.
- Zhang S, Cui P. 2014. Complement system in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 46: 3-10.
- Zimmerman LM, Clairardin SG, Paitz RT, Hicke JW, La Magdeleine K A, Vogel L A, Bowden R M. 2013. Humoral immune responses are maintained with age in a long-lived ectotherm, the red-eared slider turtle. *J. Exp. Biol.* 216: 633-640.
- Zimmerman LM, Paitz RT, Vogel LA, Bowden RM. 2010. Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *J. Exp. Biol.* 213: 1477-1483.
- Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 661-671.
- Zuk M, Stoehr A M. 2002. Immune defense and host life history. *The american naturalist.* 160: S9-S22.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

- Moleón, M. S., Parachú Marcó, M. V., Pietrobon, E. O., Jahn, G. A., Beldomenico, P. M., & Siroski, P. A. (2017). Corticosterone levels and immunological indices in stressed juvenile broad-snouted caimans. *Journal of Zoology*, 304(3), 151-158.

Corticosterone levels and immunological indices in stressed juvenile broad-snouted caimans

M. S. Moleón^{1,2}, M. V. Parachú Marcó^{2,3}, E. O. Pietrobon⁴, G. A. Jahn⁴, P. M. Beldomenico¹ & P. A. Siroski^{2,3}

1 Laboratorio de Ecología de Enfermedades (ICiVet-CONICET-UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina

2 Proyecto Yacaré, Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC - UNL/MMA, Santa Fe, Argentina)

3 Laboratorio de Biología Celular y Molecular (ICiVet-CONICET-UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina

4 Laboratorio de Reproducción y Lactancia CRICYT-CONICET, Mendoza, Argentina

Keywords

Caiman latirostris; caimans; corticosterone; immunology; Nab; stressors; temperature.

Correspondence

María Soledad Moleón, Laboratorio de Ecología de Enfermedades (ICiVet-CONICET-UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Email: soledadmoleon@yahoo.com.ar

Editor: Mark-Oliver Rödel

Received 6 May 2017; revised 31 August 2017; accepted 22 September 2017

doi:10.1111/jzo.12513

Abstract

The effect of stress in wild vertebrates has been little investigated, especially in crocodylians. In the wild, crocodylians face numerous stressors such as climatic factors, toxicant exposure, and infection. Exposure to stressors may affect the physiological processes of crocodylians, with consequences on its fitness and survival. We experimentally investigated the effect of a 4-week exposure to environmental challenges (food restriction, water restriction and high temperature) on growth, immunological investment and corticosterone levels of juvenile *Caiman latirostris*. White blood cells counts, natural antibody (NAb) levels and complement system activity were evaluated to characterize the influence of those treatments on the immune system. We found deprivation of food resulted in reduction in growth and body condition, whereas high temperature had a beneficial effect on the variables measured. Individuals exposed to heat treatment ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) grew more, and obtained better body condition, higher NAb levels, and significantly lower corticosterone levels relative to caimans in all other groups. Food restricted caimans also illustrated higher NAb levels. Our findings suggest that *C. latirostris* juveniles are able to tolerate environmental stressors and they are even favored by high temperatures.

Introduction

Stress is defined as the physiological and behavioral response to unpredictable and/or uncontrollable demands that exceed the regulatory capacity of an organism (Koolhaas *et al.*, 2011). In vertebrates, the stress response is modulated by glucocorticoids (GCs) (Moore & Jessop, 2003; Meylan, Haussy & Voituron, 2010), which activate a cascade of physiological and behavioral responses. The production of GCs is regulated by the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis in mammals and birds, and by the hypothalamic pituitary–interrenal (HPI) axis in fish, amphibians and reptiles (Sopinka *et al.*, 2015). Some of the physiological effects triggered by GCs are the mobilization of energy from adipose and hepatic tissues, the shutdown of digestive processes, and immunosuppression (Meylan *et al.*, 2010).

Although it is generally accepted that immunity is down-regulated during chronic stress responses, data from rodents have shown the opposite. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) exposed to prolonged stress (twelve weeks of food limitation or physical restriction) showed elevated eosinophil counts, and food restricted animals had higher levels of natural

antibodies (Eberhardt *et al.*, 2013). This demonstrates that there is no general pattern regarding the effect of chronic stress on the immune function, and suggests strongly that this effect may depend on the natural history of a given species (Beldomenico & Begon, 2015).

Crocodylians are an ancient group of archosaurs, composed of three distinct familial lineages: Alligatoridae, Crocodylidae and Gavialidae. They are opportunistic, top trophic carnivores inhabiting semi-aquatic environments (Finger & Gogal, 2013). They also have complex behaviors that involve violent interactions, which result in serious wounds, including the loss of entire limbs. However, they do not show signs of infection, despite that these animals continually live in contact with potentially pathogenic agents in their habitat (Siroski *et al.*, 2009; Siroski, 2011). Several studies have indicated that crocodylians exhibit potent immune capabilities that allow them to overcome such conditions. The antimicrobial activity of crocodylian blood was described by Merchant *et al.* (2003, 2004); Merchant & Britton (2006) in serum of *Alligator mississippiensis*; and Siroski *et al.* (2009) reported that antibacterial activity in *Caiman latirostris* serum is higher than that of hen and human plasma.

Whether the antibacterial immunocompetence of crocodylians might be impaired under certain conditions, such as exposure to stressors, is not well known. The information related to the effect of stressors on crocodylian physiology is limited to a few studies that examined the impact of capture method, crowding and other forms of stress on growth (Elsey *et al.*, 1990; Morici, Elsey & Lance, 1997), hematological values (Turton *et al.*, 1997) and immunity (Finger *et al.*, 2015). Herein, we examine the effect of a 4-week exposure to the most commonly faced environmental stressors (i.e. water restriction, food restriction, and elevated temperature; Moore & Jessop, 2003; Johnstone, Reina & Lill, 2012) on growth, immunological investment and other physiological parameters of juvenile *C. latirostris*.

Materials and methods

Animals and husbandry

Caiman latirostris eggs were harvested from the Natural Reserve 'El Fisco', an area free of farming and urban activities (30°11'26'S, 61°0'27'O; San Cristóbal, Santa Fe, Argentina; Provincial Law 12.930/2008) during 2015 and 2016 years. After collection, eggs were incubated at $31 \pm 1^\circ\text{C}$ at facilities of Proyecto Yacaré (PY), in an artificial incubator placed at the Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC - UNL/MMA, Santa Fe). Immediately after hatching, we selected 192 juvenile caimans from eight clutches, cut a scute for identification, and housed the individuals in 16 pens (40.4 cm in width and 78.5 cm in length). Each pen had both dry and wet areas, and fed minced chicken head *ad libitum* to the animals. We changed water every 2 days alternating with feeding days. Pen temperature remained at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and monitored with Hobo™ data loggers (Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA).

Experimental design

Before the beginning of the experiment, we weighed, measured (TL = Total Length, SVL = Snout Vent Length) and randomly distributed animals into 4 treatment groups in duplicate, 24 animals per treatment, distributing clutches homogeneously. Commencement of stress treatments began at approximately 60 days of age. Treatments of groups are as follows: (1) control (CTL): animals kept in the same conditions that preceded experimental treatments; (2) water restriction (WR): water level reduced to 50% in pen. This treatment attempted to simulate a moderate to severe drought (Lance *et al.*, 2010); (3) food restriction (FR): animals did not receive food during the experiment (Cote *et al.*, 2010); and (4) high temperature (TMP): air temperature was maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 8 h each day. We selected this temperature based on global warming predictions (Killen *et al.*, 2013). After exposure to these stressors for 1 month, we weighed, measured and calculated body condition (Bc = weight/SVL). The exposure time was selected because it is approximately the length of time we expect the stressors investigated to be present in nature. For instance, at the study area, average temperatures over 30°C are recorded mostly in January, being less frequent in preceding and subsequent month ([\[inta.gov.ar\]\(http://siga2.inta.gov.ar\)\). In addition, longer exposures might result in the development of tolerance to these type of stressors \(Romero, 2004\), and consequently the animal no longer responds in the same robust manner to chronic stressors. Previous experimental studies of adult rats demonstrated that after 2 weeks of handling the GC response to handling was significantly reduced compared to their initial response \(Dobráková *et al.*, 1993\).](http://siga2.</p>
</div>
<div data-bbox=)

Samples

This study was evaluated and approved by the ethics and safety committee of the Facultad de Ciencias Veterinarias of the Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) (N°301/15) and is in accordance with the 'Guide for the Care and Use of

Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching' (https://www.aaalac.org/about/Ag_Guide_3rd_ed.pdf).

We collected blood samples at the end of the experiment from the spinal vein with heparinized syringe to analyze total white blood cells (TWBC) counts and estimation of the proportion of leukocytes. We then centrifuged the blood for further analyses in order to separate the plasma, which was stored at -80°C until assayed.

Corticosterone Assay

Corticosterone concentrations in plasma were measured by radioimmunoassay (RIA) after extraction with diethyl ether as previously described (Jahn *et al.*, 1995) and modified for *C. latirostris* by Parachú Marcó *et al.* (2014). Samples were run in duplicate.

Immunological indexes

Total white blood cells (WBC) counts

We used a Neubauer chamber to determine the total number of leukocytes after diluting an aliquot of whole blood with a solution of 0.6% NaCl at ratio of 1:200. Analysis occurred using an optical microscope at $400\times$ and expressing results as total cells μL^{-1} blood (Lewis, Bain & Bates, 2008).

Differential white blood cells (WBC) counts

Calculation of differential leukocyte count included making 2 smears per animal fixed with ethanol, and then stained with May Grunwald–Giemsa solution and observed under an optical microscope at $1000\times$. We examined smears and counted each type of leukocyte (heterophil, basophil, eosinophil, lymphocyte and monocyte) to establish a percentage. These values and the TWBC count were then used to estimate the concentration of each leukocyte type in blood (cells μL^{-1}). We coded each preparation to achieve maximum objectivity in the analysis.

Natural Antibody Assay (NAbs)

To evaluate constitutive immunity, we measured the levels of natural antibodies (NAbs) in blood using the hemagglutination

method, which is based in the antigen-antibody interaction between NAbs and rabbit red blood cells (RRBC). Lysis reflects the interaction of complement and NAbs, whereas agglutination results from NAbs only (Matson, Ricklefs & Klasing, 2005). We washed rabbit blood several times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) until the supernatant was clear, and then prepared a 1% RRBC (v/v) solution. The plasma was serially diluted in PBS in U-shaped microtiter plates followed by an equal volume of RRBC in NaCl (0.15 M) (RRBC 1%). We covered plates with parafilm after homogenization and incubated plates at an ambient temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) for 2 h. We then visually determined agglutination. Titers were expressed as the log₂-transformed reciprocal of the highest dilution of plasma showing hemagglutination.

Complement system activity

According to Siroski *et al.* (2010), the assay to detect activity of complement system called SRBC (Sheep red blood cells) hemolysis assay is based on the hemolytic disruption of SRBCs by means of serum immunological proteins. Collection of heparinized whole blood from the jugular vein of Merino sheep (*Ovis aries*) provided fresh SRBCs needed for our experiment. We washed sheep blood several times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) until the supernatant was clear, and then prepared a 2% SRBC (v/v) solution.

Tests occurred at laboratory ambient temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) by placing 0.5 mL of plasma from each animal together with 0.5 mL SRBC solution at 2% (v/v). After 30 min incubation, the mixture was centrifuged and 300 μL of supernatant was used for analysis on microplate reader.

We obtained a positive control for hemolysis by 1% SRBCs solution and 1% (v/v) Triton X-100. Complete hemolysis occurred after injecting and ejecting the mixture several times through a tuberculin syringe. We measured optical density of the supernatant in a microplate reader at 540 nm, and calculated the maximum hemolysis. Results were expressed as the percentage of maximum hemolysis (MH%; mean \pm SE).

Statistical analyses

We conducted baseline comparisons before treatments to confirm that groups did not differ in terms of weight, length (TL and SVL) and body condition. We set α at 0.1, and comparisons were made using analysis of variance (ANOVA).

The main set of analyses was conducted with Linear Mixed Models (LMM) and Generalized Linear Mixed Models (GLMM), using the lme4, languageR and lmerTest package of the statistical software R (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). We added the random intercept 'Pen ID' and 'year' to take into account the lack of independence of observations from the same pen. We used a GLMM with a negative binomial response to analyze natural antibody titers. For the remaining parameters, LMMs were used. The independent variables were 'treatment' (4 levels) and 'clutch'; the latter to account for the 'nest' effect.

Results

Baseline comparisons showed that experimental groups did not significantly differ in terms of weight ($P = 0.160$), length ($P = 0.464$) and body condition ($P = 0.473$) before treatments were applied. The descriptive statistics of all parameters measured at the end of the experiment are shown in Table S1.

Growth

Stress treatments had dissimilar effects on the weight, SVL and body condition (weight/SVL) (Fig. 1; Table S2). While individuals in the WR group appeared to weigh less than controls, this difference did not statistically differ ($P = 0.6400$). Animals exposed to temperature stress weighed on average 50% more than controls ($P < 0.0001$), whereas those in the food deprivation group weighed 36% less ($P < 0.0001$). Individuals from WR and FR were significant shorter than controls (0.5 cm and 1.1 cm on average, respectively), whereas those exposed to higher temperatures had on average 1.2 cm more than controls. Body condition of caimans from WR did not differ significantly compared to controls ($P = 0.8244$), yet the body condition of the FR treatment animals was on average 26.5% lower than controls ($P < 0.0001$). In turn, individuals in TMP groups had body condition indices 36.5% higher ($P < 0.0001$) than controls.

Corticosterone

We found that stress treatments did not increase plasma corticosterone levels (ng mL^{-1}) by the end of the experiments (Fig. 2). Individuals from WR and FR did not differ from controls ($P = 0.6577$ and $P = 0.5248$, respectively). Conversely, caimans exposed to high temperature showed 49.5% lower corticosterone levels than controls ($P < 0.0029$).

Immunological indices

We found no statistical difference among treatments of white blood cells counts, all combined or by leukocyte type (Table S3). Also, we found no significant differences in activity of complement system (MH%-percentage of maximum hemolysis). In contrast, the effect of treatments on Nabs differed significantly (Table S4, Fig. 3). Individuals from TMP and FR groups showed significantly higher NAbs titers than controls ($P = 0.00177$ and $P = 0.04419$, respectively). Natural antibodies levels did not differ statistically comparing WR and controls (Table S5).

We found no significant difference in the heterophil/lymphocyte ratio (H/L ratio) across stress treatments (WR = 0.5504, FR = 0.9547 and TMP = 0.3960).

Discussion

Glucocorticoids have been measured as an indication of stress response in a wide range of taxa, fish (e.g. Fast *et al.*, 2008; Morandini *et al.*, 2014), birds (e.g. Martin *et al.*, 2005; Liebl

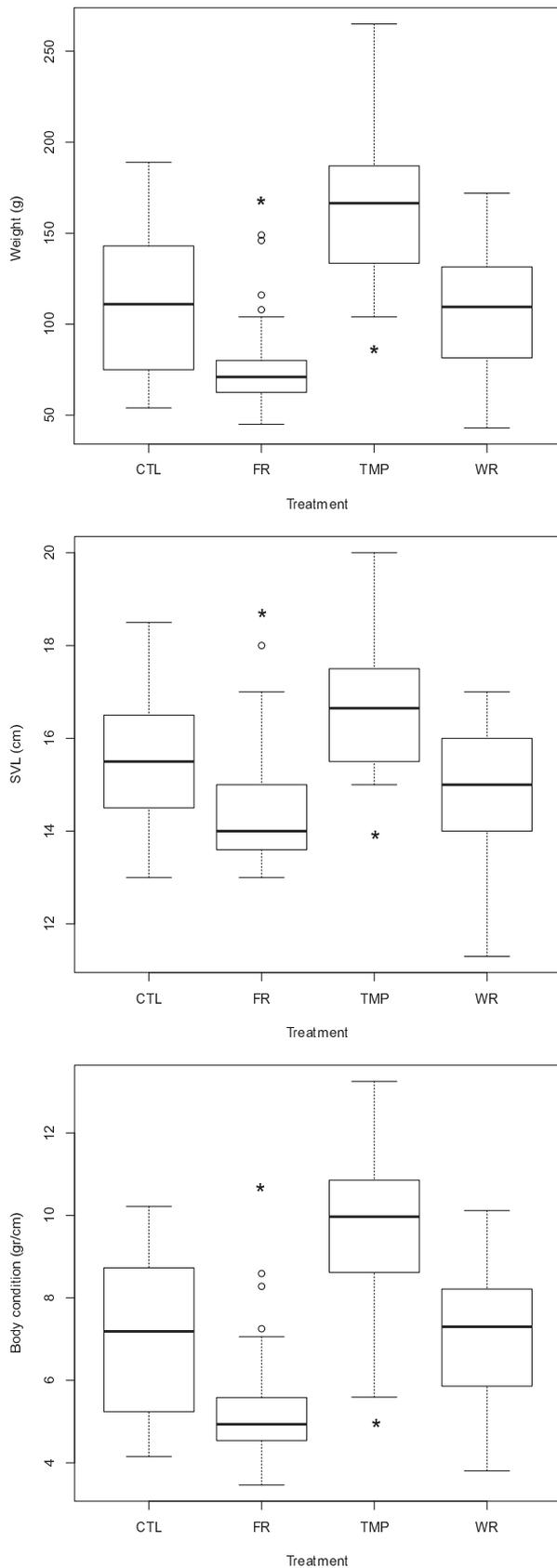


Figure 1 The effect of treatments on growth. Boxplots showing the effect of three different treatments FR (food restriction), TMP (temperature), WR (water restriction) and CTL (control) on weight (a), SVL (b) and body condition (c). Boxplots represent the median (bold bar), 25–75% quartiles (box), 10–90% quartiles (whiskers) and outliers (points). *Indicates significantly difference.

& Martin, 2013), reptiles (e.g. Cote *et al.*, 2010; Meylan *et al.*, 2010) and rodents (Bartolomucci, 2007; Cuervo, 2017). These studies have assessed different types of stressors (e.g. natural or anthropogenic), finding diverse effects. For example, in reptiles, Cote *et al.* (2010) reported that common lizards (*Lacerta vivipara*) under food restriction had high levels of corticosterone, but this did not alter their normal behavior. Extreme temperature, a stressor of special interest for ectotherms, was evaluated by Dupoué *et al.* (2013) in constricting snakes (*Antaresia childreni*), finding that pythons exposed to cold temperature (17°C) had higher corticosterone concentrations compared to those exposed to warm temperature (35°C). The corticosterone values found in this work are within the ranges reported in the studies cited above by Turton *et al.* (1997) (2.2 to 140.5 ng mL⁻¹) in *C. porosus* and Morici *et al.* (1997) in *A. mississippiensis* (3.8 to 42.8 ng mL⁻¹). However, average values were significantly higher than those described in Finger *et al.* (2015) (1.8 ng mL⁻¹) and Parachú Marcó *et al.* (2015) for *C. latirostris* embryos (0.01 ng mL⁻¹ to 7 ng mL⁻¹).

Our current knowledge on the effect of stress on crocodylian physiology is limited to only four experimental studies that evaluated temperature, farming practices, crowding and corticosterone implants. A study conducted by Turton *et al.* (1997)

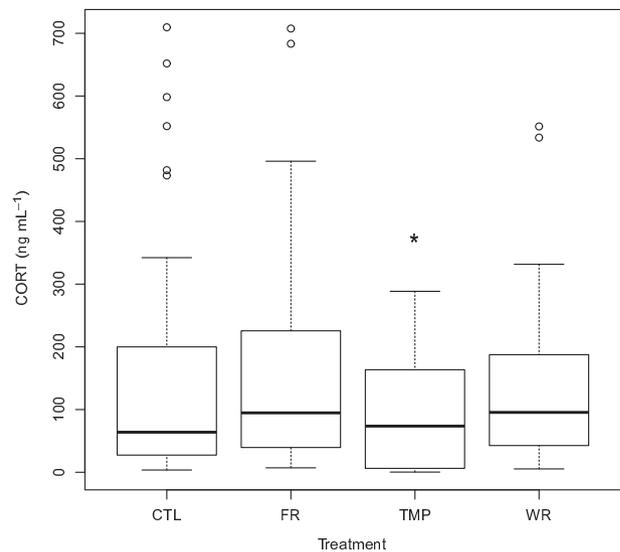


Figure 2 The effect of treatments on plasma corticosterone levels. Boxplots showing the effect of three different treatments FR (food restriction), TMP (temperature), WR (water restriction) and CTL (control) on plasma corticosterona levels. Boxplots represent the median (bold bar), 25–75% quartiles (box), 10–90% quartiles (whiskers) and outliers (points). *Indicates significantly difference.

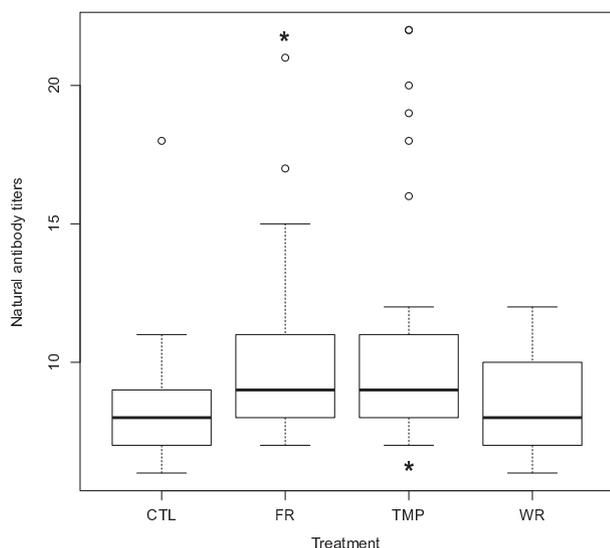


Figure 3 The effect of treatments on Natural Antibody titers. Boxplots showing the effect of three different treatments FR (food restriction), TMP (temperature), WR (water restriction) and CTL (control) on natural antibody titers, expressed as the last serum or plasma dilution showing clear evidence of agglutination. Boxplots represent the median (bold bar), 25–75% quartiles (box), 10–90% quartiles (whiskers) and outliers (points). *Indicates significantly difference.

in *Crocodylus porosus* reported that animals exposed to low water temperature (28°C) had decreased hematological values, whereas those exposed to high water temperature (36°C) showed increased corticosterone levels and reduced growth, compared to controls (32°C). A study in *A. mississippiensis* produced evidence of the stressing effect of crowding, as alligators maintained at the lowest stocking density (0.18 m²/Alligator) grew significantly faster than those maintained at high stocking densities (0.12 m²/Alligator) (Elsy *et al.*, 1990). Further, stocking densities directly correlated with corticosterone levels. Similarly, Morici *et al.* (1997) carried out an experiment injecting corticosterone in alligators, and found those animals that received corticosterone experienced a reduction in growth and had decreased percentages of lymphocytes, eosinophils, and basophils. In contrast, Finger *et al.* (2015) showed that corticosterone injection in hatchlings of *C. porosus* failed to affect growth, innate immunity and cellular immunity.

In our study, deprivation of food caused the only negative effects. Snout vent length, body mass and body condition were significantly lower in caimans in 'FR' groups compared with other groups. This effect of nutritional stress on growth parameters is expected and has been documented in several taxa (Kitaysky *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2010). Nonetheless, the strong effect in growth and body condition is in contrast with the lack of significant difference in corticosterone levels between in FR caimans and controls, which suggests that this failure to find a statistically significant difference may be due to lack of statistical power. This could be attributed to the large variances observed in corticosterone levels.

High temperatures are known to be stressful in ectotherms and may therefore elicit an activation of the HPA axis (Lourdais, Heulin & Denardo, 2008). However, in our experiment the effect of high temperature appeared to be beneficial in several variables measured. Individuals exposed to heat treatment (37 ± 1°C) grew more and had better body condition, and higher levels of NAb. In addition, we found no evidence of a stress response in those housed at 37°C, in addition to significantly lower corticosterone levels than those of caimans in all other groups. Similarly, pythons exposed to acute heat stress (35°C for 48 h), unexpectedly presented lower corticosterone levels compared to baseline corticosterone levels before heat exposure. In laying hens, elevated temperatures (37°C) resulted in the opposite: anorexia and weight loss (Mashaly *et al.*, 2004). It should be taken into account that the environmental temperature is important for food intake, behavior, and digestive processes in crocodiles. In *A. mississippiensis* and *C. acutus*, the optimum temperature range for feeding is considered to be between 25 and 35°C (Lang, 1979; Turton *et al.*, 1997). The optimum temperature range for *C. latirostris* is between 23°C and 35°C (Basetti *et al.*, 2014), but the results reported suggest that caimans perform better at higher temperatures. Other authors reported enhanced growth in *C. latirostris* at high temperatures. Parachú Marcó *et al.* (2010) found that the rearing temperature had a profound effect on hatchling growth. Animals kept at 33°C had grown more than those kept at 29°C. Appetite may ultimately depend on the availability of warm temperatures to digest and assimilate food (Lang, 1987). Digestion is directly affected by temperature, increasing temperatures result in more appetite, elevated gastric contraction frequency and amplitude, and peptic activity. An explanation for the lower corticosterone levels in caimans exposed to 37°C might be that the sensitivity of the adrenocortical function may be dependent of the body condition of crocodilians (here, animals under heat stress had better body condition). This has been suggested by Jessop *et al.* (2003), who found that Australian freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) under capture stress had differential corticosterone levels depending on their body condition: the stress response was lower the better the body condition.

Surface water is also an important resource in the life history of crocodilians because it is involved in many physiological processes. Evaporation increases when temperature increases, suggesting a potential interaction between thermoregulation and water balance in ectotherms (Lorenzon *et al.*, 1999). Lizards and snakes subjected to total water restriction for 1 month experienced significant body weight loss and increases in plasma corticosterone (Lorenzon *et al.*, 1999; Dupoué *et al.*, 2013). We expected corticosterone levels to be higher in juvenile of *C. latirostris* under water restriction treatment as a result of hydric stress, but the difference observed did not statistically differ. This might result from poor statistical power as argued above for the food restriction treatment, but we observed no effect in the physiological parameters evaluated, likely illustrating that 50% water restriction failed to trigger a stress response. Perhaps more severe restrictions would have resulted in measurable stress.

Previous studies performed on crocodilians and other reptiles showed an association between high corticosterone levels and depression of the immune function (Morici *et al.*, 1997; Berger

et al., 2005; Martin, 2009). We could not confirm such findings. Indices of the immune function varied significantly across individuals, yet we did not observe any evidence of reduced immunological defenses, not even in the treatment group where we observed the effects of food restriction. Moreover, heat stress and food restriction caused an increase in the levels of natural antibodies.

Natural antibodies (NABs) are part of the constitutive (innate) immune system and are unique among immunoglobulins molecules because their presence does not require previous exposure to a particular antigen (Martin, 2009). Natural antibodies react with various affinities to a wide variety of epitopes on macromolecular and particulate antigens including foreign red blood cells (RBCs), bacteria, viruses, toxins and should be less sensitive to short-term variations in environmental conditions, nutritional status, or stress levels (Matson *et al.*, 2005). Interestingly, the FR group was the only group in which fitness of caimans seemed to be affected. A similar effect was observed in a rodent that lives in sympatry with caimans, the capybara. Capybaras exposed to prolonged food restriction grew less and had very poor body condition, but had higher NAB titers than individuals fed *ad libitum* (Eberhardt *et al.*, 2013). Laboratory rats also illustrate poor body condition and higher NAB titers when deprived of food with the addition or combination of social conflict (Cuervo, 2017). This enhancement of the immune response at times when there is lack of resources strongly suggests that in these species chronic nutritional stress induces an enhancement of some compartments of the immune function, and not the opposite. This might be interpreted as a stress-induced prophylaxis. In the life history of some species, chronic limitation of food might be associated with higher infection risk (Beldomenico & Begon, 2015), so enhancing some compartments of the immune system during these periods might prove a good strategy to maximize probabilities of survival.

Regarding increases in NAB levels in individuals kept at higher temperatures, this might be interpreted as a useful immune investment during a critical period. Several authors mentioned wound and injuries in some crocodylians species as a consequence of severe disputes (Siroski *et al.*, 2009; Isberg & Shilton, 2013). This social behavior becomes more conspicuous in breeding seasons, which occur in parallel with the times of higher temperatures, and greater exposure to pathogens where *C. latirostris* lives. The same applies to food restriction: increased competition for limited resources may result in greater incidence of injuries, and therefore increasing NAB levels as a response to food limitation would also be a reasonable strategy.

This is the first study to explore the effect of selected stressors on the fitness of *C. latirostris*. Our findings contribute to our knowledge of the natural history of this species and in crocodylians in general, and suggests that *C. latirostris* is a species that tolerates exposure to environmental stressors, particularly benefiting from high temperatures. Further research is needed on the stress-immune system interaction of caiman and other wild animal species in order to compare the immunological investment within and between species.

Acknowledgments

We thank Ma. Agustina Latorre, Evelyn López González and Pablo Cuervo for helping me with the laboratory techniques and statistical analyses for this work. This study is part of the research of M.S.M as a doctoral fellow at CONICET and FCV-UNL.

References

- Bartolomucci, A. (2007). Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front. Neuroendocrinol.* **28**, 28. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.02.001>
- Basetti, L.A.B., Marques, T.S., Malvásio, A., Piña, C.I. & Verdade, L. (2014). Thermoregulation in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Zool. Stud.* **53**, 9. <https://doi.org/10.1186/1810-522X-53-9>
- Beldomenico, P. & Begon, M. (2015). Interacciones entre el estrés, el parásito y el hospedador: ¿un triángulo vicioso? (versión en español). *FAVE Sección Ciencias Veterinarias* **14**, 41. <https://doi.org/10.14409/favecv.v14i1/3.5160>
- Berger, S., Martin, L.B., Wikelski, M., Romero, L.M., Kalko, E.K., Vitousek, M.N. & Rödl, T. (2005). Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Horm. Behav.* **47**, 419. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.11.011>
- Cote, J., Clobert, J., Poloni, L.M., Haussy, C. & Meylan, S. (2010). Food deprivation modifies corticosterone-dependent behavioural shifts in the common lizard. *Gen. Comp. Endocrinol.* **166**, 142. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2009.11.008>
- Cuervo, P.F. (2017). *Estudio de marcadores del sistema inmune de roedores en un contexto de estrés- Su aplicación a estudios eco-epidemiológicos*. Tesis doctoral: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Dobráková, M., Kvetňanský, R., Opršalová, Z. & Ježová, D. (1993). Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* **18**, 163. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(93\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0306-4530(93)90001-2)
- Dupoué, A., Brischoux, F., Lourdais, O. & Angelier, F. (2013). Influence of temperature on the corticosterone stress-response: an experiment in the Children's python (*Antaresia childreni*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **193**, 178. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2013.08.004>
- Eberhardt, A.T., Costa, S.A., Marini, M.R., Racca, A., Baldi, C.J., Robles, M.R. & Beldomenico, P.M. (2013). Parasitism and physiological trade-offs in stressed capybaras. *PLoS ONE* **8**, e70382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070382>
- Else, R.M., Joanen, T., McNease, L. & Lance, V. (1990). Growth rate and plasma corticosterone levels in juvenile alligators maintained at different stocking densities. *J. Exp. Zool.* **255**, 30. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-010X](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-010X)
- Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C. & Afonso, L.O. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic

- salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.* **24**, 194. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.009>
- Finger, J.W. & Gogal, R.M. (2013). Endocrine-disrupting chemical exposure and the American alligator: a review of the potential role of environmental estrogens on the immune system of a top trophic carnivore. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **65**, 704. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9953-x>
- Finger, J.W., Thomson, P.C., Adams, A.L., Benedict, S., Moran, C. & Isberg, S.R. (2015). Reference levels for corticosterone and immune function in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) hatchlings using current Code of Practice guidelines. *Gen. Comp. Endocrinol.* **212**, 63. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.023>
- Isberg, S.R. & Shilton, C.M. (2013). Stress in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*): no difference between individually and communally housed animals. *Springerplus* **2**, 381. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-381>
- Jahn, G.A., Moya, G., Jammes, H. & Rosato, R.R. (1995). Effect of chronic thyroid hormone treatment on cycling, ovulation, serum reproductive hormones and ovarian LH and prolactin receptors in rats. *Endocrine* **3**, 121. <https://doi.org/10.1007/BF02990063>
- Jessop, T.S., Tucker, A.D., Limpus, C.J. & Whittier, J.M. (2003). Interactions between ecology, demography, capture stress, and profiles of corticosterone and glucose in a free-living population of Australian freshwater crocodiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 161. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00078-9)
- Johnstone, C.P., Reina, R.D. & Lill, A. (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 861. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0656-9>
- Killen, S.S., Marras, S., Metcalfe, N.B., McKenzie, D.J. & Domenici, P. (2013). Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends Ecol. Evol.* **28**, 651. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.005>
- Kitaysky, A.S., Kitaiskaia, E.V., Piatt, J.F. & Wingfield, J.C. (2003). Benefits and costs of increased levels of corticosterone in seabird chicks. *Horm. Behav.* **43**, 140. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00030-2)
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B.D., De Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M. & Richter-Levin, G. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 1291. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Lance, V.A., Elsey, R.M., Butterstein, G., Troclair, P.L. & Merchant, M. (2010). The effects of Hurricane Rita and subsequent drought on alligators in southwest Louisiana. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **313**, 106. <https://doi.org/10.1002/jez.577>
- Lang, J.W. (1979). Thermophilic response of the American alligator and the American crocodile to feeding. *Copeia*. **1979**, 48–59. <https://doi.org/10.2307/1443728>
- Lang, J.W. (1987). Crocodilian behaviour: implications for management. In *Wildlife management: crocodiles and alligators*: 273–294. Webb, G.W.J., Manolis, S.C. and Whitehead, P.J. (Eds). Sydney: Surrey Beatty and sons.
- Lewis, S.M., Bain, B.J. & Bates, I. (2008). *Hematología práctica*. España: Elsevier.
- Liebl, A.L. & Martin, L.B. (2013). Stress hormone receptors change as range expansion progresses in house sparrows. *Biol. Lett.* **9**, 20130181. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0181>
- Lorenzon, P., Clobert, J., Oppliger, A. & John-Alder, H. (1999). Effect of water constraint on growth rate, activity and body temperature of yearling common lizard (*Lacerta vivipara*). *Oecologia* **118**, 423. <https://doi.org/10.1007/s004420050744>
- Lourdais, O., Heulin, B. & Denardo, D.F. (2008). Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*): a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biol. J. Linn. Soc.* **93**, 499. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00925.x>
- Martin, L.B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* **163**, 70. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.008>
- Martin, L.B. II, Gilliam, J., Han, P., Lee, K. & Wikelski, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical house sparrows *Passer domesticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **140**, 126. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.10.010>
- Mashaly, M.M., Hendricks, G.L., Kalama, M.A., Gehad, A.E., Abbas, A.O. & Patterson, P.H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* **83**, 889. <https://doi.org/10.1093/ps/83.6.889>
- Matson, K.D., Ricklefs, R.E. & Klasing, K.C. (2005). A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 275. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.07.006>
- Merchant, M. & Britton, A. (2006). Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **143**, 488. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.009>
- Merchant, M.E., Roche, C., Elsey, R.M. & Prudhomme, J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **136**, 505. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00256-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00256-2)
- Merchant, M., Thibodeaux, D., Loubser, K. & Elsey, R.M. (2004). Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasitol.* **90**, 1480. <https://doi.org/10.1645/GE-3382>
- Meylan, S., Haussy, C. & Voituron, Y. (2010). Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **169**, 158. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.002>

- Moore, I.T. & Jessop, T.S. (2003). Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* **43**, 39. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00038-7)
- Morandini, L., Honji, R.M., Ramallo, M.R., Moreira, R.G. & Pandolfi, M. (2014). The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: relationship with stress and the establishment of social hierarchies. *Gen. Comp. Endocrinol.* **195**, 88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.10.009>
- Morici, L.A., Elsey, R.M. & Lance, V.A. (1997). Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators. *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* **279**, 156. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-010X](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-010X)
- Parachú Marcó, M.V., Piña, C.I., Simoncini, M. & Alejandro, L. (2010). Effects of incubation and rearing temperatures on *Caiman latirostris* growth. *Zool. Stud.* **49**, 367.
- Parachú Marcó, M.V., Siroski, P.A., Jahn, G. and Piña, C.I. (2014). *Corticosterone response in Broad-snouted caiman (Caiman latirostris) after restrain conditions*. 23th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. Mc Neese State University. Lake Charles, Louisiana. USA.
- Parachú Marcó, M.V., Piña, C.I., Somoza, G.M., Jahn, G.A., Pietrobon, E.O. & Iungman, J.L. (2015). Corticosterone Plasma Levels of Embryo and Hatchling Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*) Incubated at Different Temperatures. *South Am. J. Herpetol.* **10**, 50. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00026.1>
- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 249. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.008>
- Siroski, P.A. (2011). *Caracterización del sistema del complemento e identificación de componentes del sistema inmune innato del yacaré overo (Caiman latirostris)*. Tesis doctoral: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Siroski, P.A., Piña, C.I., Larriera, A., Merchant, M.E. & Di Conza, J. (2009). Plasma activity of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Zool. Stud.* **48**, 238.
- Siroski, P., Merchant, M., Parachu Marco, V., Piña, C. & Ortega, H. (2010). Characterization of serum complement activity of the broad snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia: Alligatoridae). *Zool. Stud.* **49**, 64.
- Sopinka, N.M., Patterson, L.D., Redfern, J.C., Pleizier, N.K., Belanger, C.B., Midwood, J.D. and Cooke, S.J.. (2015). Manipulating glucocorticoids in wild animals: basic and applied perspectives. *Conserv. Physiol.* **3**(1), cov031. <https://doi.org/10.1093/conphys/cov031>
- Turton, J.A., Ladds, P.W., Manolis, S.C. & Webb, G.J.W. (1997). Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight. *Aust. Vet. J.* **75**, 114. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb14170.x>

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Resumen.

Table S1. Mean, minimum and maximum values for growth, Bc (Body condition), CORT (Corticosterone), NAb (Natural antibody) and CS (Complement system) measured in *C. latirostris* in each stress treatment. CTL (Control), WR (water restriction), FR (Food restriction), TMP (Temperature).

Table S2. Mean \pm SD for total white blood cell (TWBC), and by cell type (in cells/ μ L and percentages) measured in *C. latirostris* under four stress treatments. CTL (Control), WR (water restriction), FR (Food restriction), TMP (Temperature), WBC (Total white blood cell count), H (Heterophil), E (Eosinophil), L (Lymphocyte) and M (Monocyte).

Table S3. Models describing the effect of treatments on somatic parameters. *indicates significantly difference.

Table S4. *P*-values estimated by the model assessing the effect of treatments on WBC.

Table S5. Models describing the effect of treatments on Natural antibody titers. *indicates significantly difference.

Graphical Abstract

The contents of this page will be used as part of the graphical abstract of html only. It will not be published as part of main article.



The effect of stress in wild vertebrates has been little investigated, especially in crocodilians. We experimentally investigated the effect of exposure to environmental challenges (food restriction, water restriction and high temperature) on growth, immunological investment and corticosterone levels of juvenile *Caiman latirostris*. The only negative effect observed was significant reduction in growth and body condition in caimans that were deprived of food. Individuals exposed to heat treatment ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) grew more, had better body condition and higher levels of NAb, and corticosterone levels were significantly lower compared to caimans in all other groups.