



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

**MAESRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN MEDICINA PREVENTIVA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN CARPINCHOS.
RELACIÓN CON EL ESTRÉS Y RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN
ECO-EPIDEMIOLOGICA.**

Autora: Vet. Cecilia Josefina Baldi

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Santa Fe, Octubre 2014



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

**MAESRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN MEDICINA PREVENTIVA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN CARPINCHOS.
RELACIÓN CON EL ESTRÉS Y RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN
ECO-EPIDEMIOLÓGICA.**

Autora: Vet. Cecilia Josefina Baldi

Director: Dra. Andrea Laura Racca

Codirector: Dr. Pablo Martín Beldomenico

Jurado

Dra. Cristina Scaglione

Magíster Onelia Lavaroni

Dra. Carolina Veaute

DEDICATORIA

Con amor a:

**Mis hijos Lautaro y Manuela que son la razón de mi vida y a mi madre que siempre
confió en mí.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar un profundo agradecimiento a la Dra. Andrea Racca por ser mi directora, brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y por su ayuda y apoyo incondicional.

A la Dra. Ayelen Eberhardt por su colaboración y permitirme usar información de su trabajo de Tesis doctoral.

Al Dr. Pablo Beldomenico por facilitarme las instalaciones del laboratorio y financiamiento para el desarrollo de este trabajo

Al Dr. Lucas Monje por su colaboración y aportes.

A todo el grupo de personas que conforman el Laboratorio de Ecología de Enfermedades - ICIVET LITORAL (UNL-CONICET) que de una u otra forma han colaborado.

A la Dra. Adriana Soutullo, Sonia Riccoti, Romina Russi y Maria Victoria Barcarolo del Laboratorio de Diagnósticos e Investigaciones del Ministerio de la Producción, por su apoyo.

A Matías Oscar Lapissonde por acompañarme y alentarme en este trayecto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
SUMMARY	XIV
CAPITULO I – INTRODUCCION	1
I.1. Aspectos generales.....	1
I.2. Objetivo general.....	5
I.3. Objetivos específicos	5
I.4. Hipótesis.....	5
CAPITULO II - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
II.1. Contexto.....	6
II.2. Ecoinmunología.....	8
II.3. <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (carpincho).....	9
II.4. Marcadores de inmunocompetencia evaluados	11
II.4.1 Anticuerpos Naturales (AcN)	11
II.4.2 Citocinas	14
II.4.2.1. Citocinas pro-inflamatorias.....	16
II.4.2.1.1. IL-1 β	16
II.4.2.1.2. TNF.....	17
II.4.2.2. Citoquina anti inflamatoria	18
II.4.2.2.1. IL-10	18
CAPITULO III - MATERIALES Y METODOS	20
III.1. Estudio experimental.....	20
III.1.1. Aclimatación y comparaciones de base.....	22
III.1.2. Tratamientos.....	23

III.2. Toma de muestras	24
III.3. Valoración del estrés	25
III.4. Valoración de parámetros de salud generales	26
III.4.1 Valoración del esfuerzo somático	26
III.4.2. Evaluación de los parámetros hematológicos	26
III.4.3. Determinación de proteínas totales y albúmina sérica	27
III.5. Valoración del sistema inmune innato	28
III.5.1. Determinación de anticuerpos naturales (AcN)	28
III.5.1.1. Suspensión de glóbulos rojos:	28
III.5.1.2. Ensayos de hemoaglutinación:	29
III.5.2. Determinación de citocinas	29
III.5.2.1. Extracción de ARN:	30
III.5.2.2. Transcripción reversa	31
III.5.2.3. Diseño de oligonucleótidos	31
III.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>Polimerase Chain Reaction - PCR</i>) en tiempo real.....	33
III.6. Análisis estadístico	33
CAPITULO IV – RESULTADOS	35
IV.1. Valoración del estrés	36
IV.2. Valoración de parámetros de salud generales	36
IV.2.1. Valoración de esfuerzo somático	36
IV.2.2. Evaluación de los parámetros hematológicos	36
IV.2.3. Determinación de proteínas totales y albúmina sérica	37
IV.3. Valoración de parámetros del sistema inmune innato.....	37
IV.3.1. Determinación de AcN.....	37
IV.3.2. Determinación de citocinas	38
IV.3.2.1. Diseño de los Oligonucleótidos (cebadores específicos)	38
IV.3.2.2. Condiciones de la PCR.....	39
CAPITULO V – DISCUSION	42

	VI
V.1. Sinopsis de los resultados relevantes del experimento.....	42
V.2. Estrés: masa corporal y condición corporal.....	43
V.3. Estrés e inversión inmunológica.....	44
CAPÍTULO VI – CONCLUSIÓN	49
CAPITULO VII -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPITULO VIII - ANEXO.....	61

ABREVIATURAS

A: albúmina

AcN: Anticuerpos Naturales

ACTB: beta-actina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: acidoácido desoxirribonucleico copia

Ag: antígeno

APCs: células presentadoras de antígenos profesionales

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

°C: grados centígrados

C (CLR): receptores de lectinas tipo C

c/u: cada una

CD80 y CD86: moléculas coestimuladoras

CSIF: Factor Inhibidor de la Síntesis de Citocinas

Ct: Ciclo umbral (del inglés: *cycle threshold*)

DEPC: Agua tratada con dietil pirocarbonato

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etildiaminotetraacético,

EIE: Enfermedades Infecciosas Emergentes

g: fuerza centrífuga

Gb: globulina

GB: glóbulos blancos

GLMM: modelos mixtos lineales generalizados

GR: glóbulos rojos

gr: gramo

IgM: inmunoglobulina M

IL-1: Interleuquina -1 β

IL-10: Interleuquina -10

IL-17: interleuquina -17

IL-22: interleuquina -22

IL-27: interleuquina -27

IL-6: interleuquina -6

kg: kilogramo

LB: linfocitos B

LMM: modelos lineales mixtos

LT: linfocitos T

MCI: Masa Corporal Inicial

mg: miligramo

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Min: minutos

ml: mililitro

mM: milimol

ng: nanogramo

NK: célula asesina (de sus siglas em inglés *natural killer*)

NKT: célula asesina-T (de sus siglas em inglés *natural killer-T*)

nm: nanometro

NOD (NLR): receptores tipo NOD

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PBS: solución buffer fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PPT: proteínas totales

RIG-I (RLR): receptores tipo RIG-I

Rpm: revoluciones por minuto

RRP: Receptores de Reconocimiento de Patrones

Seg.: segundo

T°: temperatura

TA: Temperatura Ambiente

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante- β

Th1: célula colaboradora T 1

Th17: célula colaboradora T 17

Th2: célula colaboradora T 2

TLR: receptores tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral- α

TNFR: Receptores de Factor de Necrosis Tumoral

Tr1: linfocitos T reguladores

U: unidades internacionales

UNL: Universidad Nacional del Litoral

μ l : microlitro

μ m: micrometro

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de salud.....	35
Tabla 2: secuencia de los cebadores específicos.....	39
Tabla 3: Condiciones de la PCR.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Respuesta inmune del hospedador frente a un desafío antigénico.....	13
Figura 2: Diagrama de la distribución de los recintos para el experimento.....	21
Figura 3: Alineamientos múltiples.....	32
Figura 4: El efecto de los tratamientos sobre la ganancia de masa corporal, condición corporal y los parámetros inmunológicos.....	38
Figura 5: Efecto de los tratamientos sobre la expresión de ARNm de las citocinas evaluadas.....	41

RESUMEN

Ciertos factores antropogénicos y/o ambientales pueden ocasionar diferentes tipos de estrés influyendo sobre el sistema inmune de animales silvestres. La valoración del estado inmunitario de estos individuos es fundamental para dilucidar la ecoepidemiología de enfermedades que afectarían la salud del hombre y los animales. En el presente trabajo, fueron evaluados componentes del sistema inmune innato (Anticuerpos naturales (AcN) y citocinas: TNF- α , IL-1 β e IL-10) e índices genéricos de salud (condición corporal y parámetros hematológicos), a partir de un modelo experimental de estrés en carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*). El objetivo fue establecer si estos marcadores eran sensibles al estrés crónico (estrés nutricional y psico-físico).

Los resultados mostraron un impacto negativo de ambos tipos de estrés en la condición corporal de los individuos y un efecto positivo en componentes inmune no específicos (eosinófilos y AcN). La determinación de la expresión de ARNm de las citocinas evaluadas no se vio modificada por el estrés.

Estos resultados sugieren que durante períodos prolongados de estrés los carpinchos invierten en componentes del sistema inmune como: AcN y eosinófilos, lo cual podría ser considerado una profilaxis dependiente del estrés. Estos marcadores constituirían una importante herramienta para el estudio de la dinámica de salud en poblaciones silvestres de carpinchos.

Palabras claves: ecoinmunología, anticuerpos naturales, citocinas, animales silvestres.

SUMMARY

Some anthropogenic and/or environmental factors may cause different kinds of stress influencing the immune system of wild animals. Assessing the immune-competence of these individuals is crucial to elucidate the eco-epidemiology of many diseases of importance for humans and animals. In this work, two components of innate immune system: natural antibodies (NAb) and cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-10) and generic indices of health (body condition and hematological parameters) were assessed as markers in stressed capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from an experimental model. The goal was to assess the effect of two types of chronic stress -food restriction and physical restraint- on these markers.

The results showed that both stress treatments had a marked negative impact on body condition, but they had a significant positive effect on some components of the immune system (eosinophil and NAb). Expression of cytokines messenger ribonucleic acid levels has not been affected by both types of stress.

These results suggest that during prolonged periods of stress capybaras preventively invest in some components of their innate defenses: NAb and eosinophils, which could be considered a stress-dependent prophylaxis. These markers have the potential to be an important tool for the study of dynamics of health in wild populations of capybaras.

Keywords: eco-immunology, natural antibodies, cytokines, wild mammals.

CAPITULO I – INTRODUCCION

I.1. Aspectos generales

La salud de los animales silvestres es actualmente objeto de creciente interés debido a su alta relevancia para la salud pública, la conservación de especies y la producción animal (Beldomenico, 2006). Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) constituyen una carga significativa para la economía global y la salud pública (Morens *et al.*, 2004). Una gran parte de las EIE son zoonosis, y la mayoría de estas se originan en animales silvestres (Pedersen *et al.*, 2008). Asimismo, muchas zoonosis de alta incidencia en el país (por ej. chagas, fiebre hemorrágica argentina., síndrome pulmonar por hantavirus, etc.) también poseen reservorios silvestres. Por ende, el estudio de la dinámica y distribución de patógenos en la fauna interesa a la salud pública. A su vez, se debe tener en cuenta que la actividad humana puede volver a la fauna vulnerable a un sinfín de enfermedades infecciosas. Están bien documentadas declinaciones poblacionales de animales silvestres debidas a epidemias (Pedersen *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009). Por esta razón, el estudio de enfermedades infecciosas y parasitarias en poblaciones silvestres es de relevancia para la conservación de biodiversidad. También hay varios ejemplos que demuestran un flujo de patógenos a nivel de la interfase doméstico-silvestre, por lo que la salud de los animales silvestres es de importancia para la sanidad de plantales de animales domésticos (Beldomenico, 2006)

Estudios recientes, tanto empíricos como teóricos, indican que la inmunocompetencia de los individuos de una población es un factor crucial para explicar las dinámicas de patógenos en sistemas naturales (Beldomenico y Begon, 2010; Lochmiller, 1996).

Se ha demostrado en roedores silvestres que individuos en condición nutricional y psico-física deteriorada, tienen más chances de ser parasitados (en el contexto de la ecología el término parásito comprende de virus a artrópodos) y el parasitismo resultante es de mayor intensidad (Beldomenico *et al.*, 2009a; Beldomenico *et al.*, 2009b). Estas infecciones severas suponen una afección mayor en la condición de los individuos, lo que desencadena un círculo vicioso (impacto sobre la conservación). Al mismo tiempo estas infecciones de mayor intensidad genera individuos superpropagadores y aumenta la densidad de patógenos, exponiendo al hombre y los animales domésticos a una mayor cantidad de estos patógenos (impacto sobre la salud pública y la producción animal) (Beldomenico y Begon, 2010). Asimismo, el estudio de la dinámica de los fenómenos de salud y enfermedad en sistemas naturales permitiría un mejor entendimiento de estos procesos biológicos, ya que no están influenciados por la medicina preventiva, la instauración de tratamientos y las respuestas comportamentales ante brotes (por ej. fumigaciones, uso de barbijo). Además, está demostrado que las interacciones entre patógenos en un mismo hospedador son uno de los principales determinantes del riesgo de infección con patógenos zoonóticos en roedores silvestres, lo cual en gran parte de los casos sucedería por mecanismos que involucran el sistema inmune como mediador (Telfer *et al.*, 2010). Indudablemente, nuestro entendimiento de la distribución y abundancia de enfermedades zoonóticas en sus hospederos reservorios depende de que logremos

profundizar en las dinámicas del sistema inmune y su interacción con las infecciones. En herbívoros silvestres, es de interés el sistema inmune innato ya que se encuentran bajo una intensa presión de selección (Lochmiller y Deerenberg, 2000). Actualmente, un gran desafío para el estudio de la inmunidad en poblaciones silvestres es el de discernir si los niveles de marcadores inmunológicos observados en un individuo son resultado de una exposición diferencial a ciertos patógenos, de una capacidad diferencial de respuesta inmune, o de una combinación de ambos. Esto es especialmente cierto para el sistema inmune adaptativo, pero resta determinar en qué medida lo es para el innato. Por lo expuesto, la valoración del estado inmunitario de individuos silvestres es importante para dilucidar la ecoepidemiología de muchas enfermedades de importancia para la salud en animales silvestres, domésticos y del hombre.

Los esfuerzos para medir el estado de salud y el estado inmunitario de los individuos silvestres han sido limitados. Si bien un número de estudios ha hecho énfasis en índices genéricos de salud, son muy escasos aquellos que evalúan compartimentos específicos de la inmunidad (Smits, 2007). Elementos de la inmunidad humoral innata, tales como anticuerpos naturales (AcN), componentes del sistema complemento y ciertas citocinas, estarían involucrados en la supervivencia de organismos por participar activamente en la resistencia temprana a la infección (Lochmiller y Deerenberg, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante evaluar cómo, ciertos factores antropogénicos y/o ambientales (estrés nutricional y psicofísico) podrían influir sobre el sistema inmune humoral innato en animales silvestres (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Rodentia: Caviidae). De este modo se generan herramientas para el estudio de la dinámica

de salud de estas poblaciones, contribuyendo así a la ecoepidemiología y a la ecoinmunología.

I.2. Objetivo general

Determinar experimentalmente el efecto del estrés (nutricional y psico-físico) sobre parámetros fisiológicos y del sistema inmune innato en un modelo experimental de carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

I.3. Objetivos específicos

- 1) Evaluar niveles de anticuerpos naturales (AcN) mediante técnicas de hemoaglutinación directa en carpinchos expuestos experimentalmente a diferentes niveles de estrés psicofísico y nutricional.

- 2) Evaluar niveles de citocinas mediadoras de la respuesta inmune innata (TNF- α , IL-1 β e IL-10) mediante técnicas de PCR en tiempo real en carpinchos expuestos experimentalmente a diferentes niveles de estrés psicofísico y nutricional.

- 3) Relacionar el título de AcN y los niveles de citocinas con características del hospedero, como ser la edad, condición corporal, parámetros hematológicos de las especies estudiadas

I.4. Hipótesis

- 1) Los marcadores del sistema inmune evaluados (títulos de AcN y citocinas) son sensibles al estrés nutricional y psico-físico.

- 2) Los marcadores del sistema inmune evaluados están asociados a la condición corporal y otros índices genéricos de salud (hematología).

CAPITULO II - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Contexto

Se ha propuesto que la inmunocompetencia podría ser un factor clave en la regulación de poblaciones silvestres (Lochmiller, 1996). El sistema inmune de un individuo se caracteriza por una serie de mecanismos celulares y humorales interrelacionados, en donde la respuesta inmune innata juega un rol esencial como primera línea de defensa contra patógenos invasores. Algunos autores sugieren que el componente innato del sistema inmune sería el más importante para especies de corta vida bajo intensa presión de selección (Lochmiller y Deerenberg, 2000), argumentando que la infección no persistiría más de algunas horas o días antes que el animal sucumba a la depredación o a la inanición.

Sin embargo, otros estudios demostraron que, en dos especies de roedores, aquella que poseía mayor capacidad de producción de anticuerpos, parte de la inmunidad adaptativa, mostraba mayor capacidad invasora (Klein y Nelson, 1999). La influencia de cada compartimiento del sistema inmune en las dinámicas poblacionales del hospedero y en las dinámicas de infección está lejos de ser dilucidada.

La infección con patógenos es tradicionalmente estudiada en forma dicotómica, en donde los individuos son clasificados como infectados o no infectados (Keeling y Eames, 2005). Sin embargo, luego de la exposición al patógeno, las consecuencias pueden variar desde la falla del proceso infeccioso al desarrollo de una infección muy severa. El éxito del proceso infeccioso dependerá en parte de características del patógeno (como por ejemplo, patogenicidad, dosis infectiva) pero también de la integridad de las defensas del hospedero.

En los vertebrados estas defensas consisten en barreras físicas y químicas, componentes del sistema inmune innato y de la respuesta inmune específica (Tizard, 2004). En la economía fisiológica del hospedero, la asignación de recursos al sistema inmune depende de la disponibilidad de nutrientes y demandas fisiológicas (Sheldon y Verhulst, 1996; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Demas, 2004). Diferencias del individuo relacionadas a la edad, co-infección, entre otras, determinan inversiones diferentes en los componentes del sistema inmune (Boonstra *et al.*, 2001; Jolles *et al.*, 2008), pero dadas circunstancias idénticas de historia de vida, es razonable asumir que un buen estado de salud prepara a un individuo de mejor manera para combatir y/o limitar una infección (Beldomenico y Begon, 2010).

Patógenos endémicos relativamente benignos, al acaparar recursos de sus hospederos e inducir en éstos una respuesta inmune nutricionalmente demandante, parecen capaces de ejercer un efecto negativo en la reproducción y/o la supervivencia, como ha sido demostrado para el virus cowpox en su especie hospedera reservorio (*Microtus agrestis*) (Burthe *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, las dinámicas de infección pueden depender de la vulnerabilidad del hospedero, ya que una condición deteriorada es factible que predisponga a los individuos a enfermedades infecciosas y parasitarias (Nelson y Demas, 1996). Estas nociones resultan en un claro potencial para el sinergismo entre infección y condición: una condición empobrecida predispone a infecciones, las que a su vez empeoran aún más la condición, y así sucesivamente. Datos obtenidos de poblaciones de roedores silvestres avalan la noción que un sinergismo entre infección y condición generan un círculo vicioso (Beldomenico *et al.*, 2008a). Este círculo vicioso sugiere que la interacción entre los

patógenos y la inmunocompetencia es más importante para la dinámica de las poblaciones de fauna que lo que se ha apreciado hasta el presente, y que el estudio del estado inmunitario de los hospederos es de relevancia para comprender las dinámicas de infección.

Sin embargo, los estudios que han intentado medir estado sanitario en poblaciones silvestres y relacionarlos con su demografía son escasos, y generalmente han centrado su interés en índices genéricos de salud (Smits, 2007; Beldomenico *et al.*, 2008b).

II.2. Ecoinmunología

La ecoinmunología es una disciplina que surge recientemente, con amplias perspectivas empíricas y conceptuales en lo que concierne a la interacción entre la fisiología y la ecología en el contexto de evolución de enfermedades y la respuesta inmune de la población hospedera (Schulenburg, *et al.*, 2009).

Esta disciplina ha comenzado a abordar la complejidad de la respuesta inmune en un contexto ecológico y evolutivo. Tanto para los ecologistas como para los inmunólogos la respuesta inmune es el resultado de una variedad de factores tales como: (a) la variabilidad genética (alelos de MHC), (b) la historia de la infección (memoria inmunológica, infecciones actuales), (c) el estado fisiológico (sexo, edad, estado reproductivo y la historia), (d) la disponibilidad de recursos alimenticios, (e) las condiciones abióticas (la estacionalidad y la temperatura) y (f) la historia co-evolutiva entre el hospedero y el patógeno (Pederson y Babayan., 2011).

Se sabe que las poblaciones silvestres son exogámicas y por lo tanto tienen un alto grado de variación genética que probablemente afectan a los componentes que conforman

un respuesta inmune protectora (Abolins *et al.*, 2011). Estas poblaciones están compuestas por individuos de diferentes edades, sexo, madurez sexual, estado reproductivo (gravidez, lactancia), además de presentar diferentes densidades entre comunidades. Todas estas variaciones, tanto individualmente como a escala poblacional, influirán en la susceptibilidad del hospedero frente a parásitos, afectando el inicio de la respuesta inmune, la memoria inmunológica y, como consecuencia de ello, incidiendo en la condición física del mismo. A su vez, la supervivencia y la reproducción afectarán la densidad de la población y la futura transmisión de patógenos (Martin *et al.*, 2008; Lazzaro y Little, 2009).

El objetivo de esta disciplina es crear beneficios sinérgicos entre la inmunología, la ecología, la evolución y la salud de los individuos de una población.

II.3. *Hydrochoerus hydrochaeris* (carpincho)

Los roedores son el grupo más grande de especies “reservorio” que involucran problemas para la salud pública (Mills y Childs, 1998; Simpson, 2002). Por otra parte, factores ambientales pueden actuar como fuente de estrés, lo cual afecta negativamente el sistema inmune de los mamíferos, particularmente roedores (Geller y Christian, 1982; Barnard *et al.*, 1996). De este modo, la dinámica de un patógeno determinado en poblaciones de roedores puede reflejar una dinámica subyacente en la inmunocompetencia del hospedero.

Algunos roedores son importantes como recurso faunístico. El carpincho es el roedor más grande del mundo, siendo autóctono de la Argentina y otros países de Sudamérica.

Vive en grupos formados por un macho dominante, varias hembras jóvenes y uno o más machos subordinados. Se encuentra ampliamente distribuido en las zonas de llanos y

humedales, habitando desde Panamá hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, exceptuando Chile (Allekotte, 2003; Bolkovic y Ramadori, 2006). Es una especie emblemática de nuestra región con gran potencial para su uso como recurso, ya que representa una de las especies de fauna más utilizadas en el país y constituye una fuente adicional de proteínas así como un ingreso económico de importancia para muchas comunidades locales (Quintana *et al.*, 1992, Bolkovic y Ramadori., 2006). En esta región, el hábitat del carpincho está siendo invadido en gran medida por el ganado bovino (Belloso, 2007). Se ha observado que los carpinchos cambian sus patrones forrajeros cuando comparten su hábitat con especies de herbívoros domésticos (Quintana *et al.*, 2002). Estos cambios, sumados a la disminución de territorio y la presión de caza, entre otros factores, podrían estar influyendo sobre su estado sanitario, contribuyendo de este modo a la declinación de la especie.

Los carpinchos son hospederos de una amplia comunidad de parásitos, entre ellos varios helmintos y protozoos específicos que muestran una alta prevalencia y ubicuidad (Freyre *et al.*, 1979; Salas y Herrera, 2004; Vieira *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2008; Sinkoc *et al.*, 2009; Eberhardt, 2013).

Estudios en la dinámica poblacional en carpinchos mostraron que la densidad de la población se veía afectada por la ganancia de peso, la natalidad, la supervivencia de los recién nacidos y la mortalidad de los adultos (Ojasti y Sosa Burgos 1985), pero la participación de los patógenos y la inmunocompetencia de las poblaciones en esta dinámica, no han sido aun investigados.

II.4. Marcadores de inmunocompetencia evaluados

II.4.1 Anticuerpos Naturales (AcN)

Para estudiar en detalle las dinámicas de infección es imprescindible contar con marcadores adecuados de inmunocompetencia. Un desafío para el estudio de dinámicas de inmunidad en poblaciones silvestres es el de discernir si diferentes niveles de marcadores inmunológicos resultan por una exposición diferencial a patógenos, o bien por una capacidad diferencial de respuesta. Por ejemplo, un individuo silvestre puede tener niveles elevados de un marcador de inmunocompetencia determinado por tener una alta capacidad de respuesta, o bien por haber estado muy expuesto a patógenos, o una combinación de ambos. Es necesario identificar marcadores que tengan el menor grado de ambigüedad posible. Los AcN son un candidato a tener en cuenta (Schmid-Hempe y Ebert, 2003; Carrol y Prodeus, 1998), y es necesario llevar adelante investigaciones para evaluar su potencial en estudios ecoepidemiológicos. Los AcN son moléculas producidas, en mamíferos, por células B-1 CD5+ presentes en fluidos de cavidad peritoneal y pleural (Murphy, 2012). Estos AcN son únicos entre las inmunoglobulinas, su síntesis no requiere exposición previa a un antígeno (Ag) en particular; son codificados por genoma de línea germinal y no sufren hipermutación somática ni recombinación genética durante la ontogénesis (Casali y Schettino, 1996). Ha sido demostrada la presencia de AcN en animales sin experiencia inmunológica, incluyendo aquellos desarrollados en ambientes libres de patógenos (Pereira *et al.*, 1986). Estos AcN reconocen, con afinidades diferentes, una amplia variedad de antígenos tanto solubles como particulados. Entre estos últimos se encuentran aquellos que forman parte de la membrana de glóbulos rojos y bacterias (Ochsenbein *et al.*, 1999). Las células B-1 crean anticuerpos, en su mayoría IgM, contra

oligosacaridos, los cuales se comportan como antígenos T independiente. Sin embargo, esta respuesta podría aumentar mediante la colaboración de células T (Murphy, 2012)

Una amplia variedad de funciones ha sido propuesta para los AcN. Estas moléculas neutralizan bacterias y virus presentes en circulación, protegiendo al animal de infecciones virales y bacteriales, como por ejemplo el virus de la estomatitis vesicular y *Streptococcus pneumoniae* (Ochsenbein *et al.*, 1999). Además, son capaces de opsonizar patógenos invasores e iniciar la cascada del sistema complemento, favoreciendo la destrucción del microorganismo. La actividad hemolítica de los AcN asociada al sistema complemento ha sido demostrada en animales domésticos, entre ellos patos, pollos, pavos (Barman y Das, 1997; Ellis *et al.*, 1989) y en vertebrados silvestres, tanto superiores como inferiores (Vestey y Lochmiller, 1994). Por otra parte, los AcN y el sistema complemento favorecen el reclutamiento y permanencia de Ag en órganos linfáticos primarios estimulando la repuesta tanto a antígenos T-dependientes como T-independientes. La interacción de AcN y complemento es un importante nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa (Carroll y Prodeus, 1998; Oschsenbein y Zinkernagel, 2000).

Los AcN cumplirían, además, una importante función inmunorregulatoria (Boes, 2000) por modular la reactividad de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) hacia Ag propios. Asimismo, jugarían un rol fisiológico fundamental desde el punto de vista de la evolución. Ha sido propuesto que los AcN estarían involucrados en la supervivencia de las especies por participar activamente en la resistencia temprana a la infección (Oschsenbein y Zinkernagel, 2000) (Figura 1).

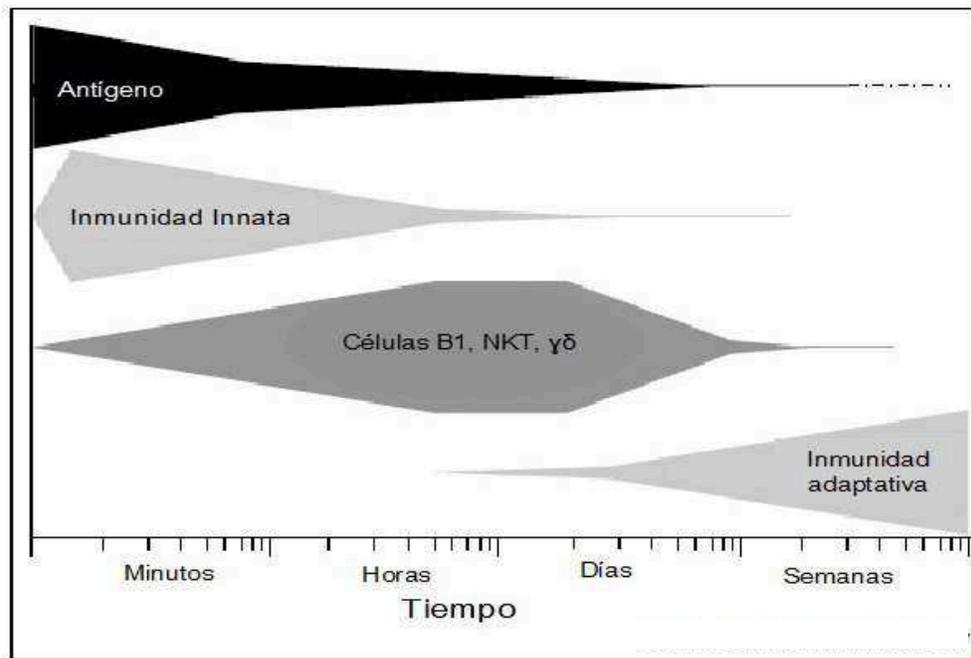


Figura 1: **Respuesta inmune del hospedador frente a un desafío antigénico.** Gran parte del antígeno se elimina tempranamente mediante mecanismos de la inmunidad innata mientras que a la inmunidad adaptativa le lleva días para desarrollarse plenamente. El nexo entre ambas son los componentes del compartimento de “memoria natural” (células B1, NKT, $\gamma\delta$), que asegura la eliminación óptima y temprana del antígeno (Martin y Kearney, 2001)

Dado que los AcN confieren inmunidad humoral inespecífica independiente de la estimulación antigénica y son estables en el tiempo, tienen el potencial de ser buenos indicadores de la inmunocompetencia humoral de animales silvestres. Sin embargo, rara vez se han evaluado en estudios de ecología de enfermedades. Recientemente han sido empleados como indicadores de inmunidad humoral inespecífica en aves silvestres (Whiteman *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2010) y reptiles (Sandmeier *et al.*, 2012) pero son escasos los trabajos en mamíferos silvestres (Gilot-Fromont *et al.*, 2012).

II.4.2 Citocinas

Otro componente importante del sistema inmune son las citocinas. Estas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular, las cuales son producidas y secretadas no sólo por leucocitos, sino también por células epiteliales, endoteliales y parenquimatosas de diferentes órganos, entre otras. Estas citocinas, a través de la interacción con sus receptores específicos, median acciones tanto del sistema inmune innato como adaptativo, en respuesta a procesos infecciosos, entre otros (Kourilsky y Truffa-Bachi, 2001). Las citoquinas son particularmente importantes en la polarización y amplificación de la respuesta inmune (Germain, 2001). Asimismo, la magnitud y tipo de respuesta de citocinas producidas frente a un proceso infeccioso, lo son también por influir en la susceptibilidad e infectividad de enfermedades. La susceptibilidad del hospedero hacia un parásito determinado se verá afectada por las respuestas de las citocinas que están en curso en el momento de la exposición, como ser la respuesta a infecciones pre-existentes. La infectividad, sin embargo, puede depender de la respuesta dinámica de citocinas en el transcurso de la coinfección (Graham *et al.*, 2007).

La inflamación es uno de los principales mecanismos de la respuesta inmune innata, la cual puede llevarse a cabo en forma localizada o sistémica en respuesta a diferentes microorganismos: virus, bacterias, hongos, protozoos y aún macroparásitos, así como a otros antígenos. Este proceso, que ocurre rápidamente luego del ingreso del patógeno, es uno de los primeros mecanismos puesto en marcha en el individuo que intentan eliminar al agente causal. Sin embargo, si esta respuesta no es adecuadamente sincronizada y regulada puede conducir a daño persistente con destrucción de tejido (Natha, 2002).

A nivel molecular, la respuesta inmune inflamatoria es iniciada principalmente por receptores de reconocimiento de patrones (RRP) y citocinas (Medzhitov, 2008). Los RRP es una familia de receptores, entre los que se incluyen: receptores tipo Toll (TLR), tipo NOD (NLR), tipo RIG-I (RLR), de lectina de tipo C (CLR) y receptores depuradores; todos ellos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y/o señales indicativas de daño tisular (Trevani y Geffner, 2011a). Muchas de las interacciones entre los RRP y los PAMP conduce a la activación de vías de señalización, que determinan en última instancia, la activación de factores de transcripción (NF- κ B y factor regulador de interferón) promoviendo la expresión de genes que codifican citocinas, quemoquinas, receptores celulares y moléculas capaces de mediar una reacción inflamatoria (Jackson *et al.*, 2011).

Entre las citocinas con acciones pro-inflamatorias se destacan interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Se trata de citocinas pleiotrópicas que juegan un rol fundamental en respuestas locales, como activación linfocitaria y del endotelio vascular, necrosis y apoptosis, y en respuestas sistémicas, como aumento de proteínas de fase aguda, movilización de proteínas y grasas, pudiendo producirse shock séptico (Rahman y McFadden, 2006; Jackson *et al.*, 2011). La IL-10, junto al factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), ejercen funciones moduladoras de las respuestas inflamatorias: inhiben la proliferación linfocítica así como el incremento de expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras, además de inhibir los efectos mediados por IL-1 β y TNF- α . De este modo, regulan la respuesta inmune

y evitan efectos nocivos en el individuo frente al proceso infeccioso (Nathan, 2002; Graham, 2007).

II.4.2.1. Citocinas pro-inflamatorias

II.4.2.1.1. IL-1 β

La IL-1 β es una molécula monomérica de bajo peso molecular formada por 153 aminoácidos. La IL-1 β es una citocina con importantes funciones pro-inflamatorias, es producida principalmente por macrófagos y células epiteliales y se encuentra dentro de estas células de forma inactiva. En células estresadas, tales como aquellas expuestas a una infección, se forma una estructura multiproteica llamada inflammasoma, que junto a la caspasa-1, son responsables de la conversión del precursor de IL-1 β en citocina activa (Dinarello, 2011).

La IL-1 β como el TNF α y la IL-6 poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Estas citocinas activan a los hepatocitos aumentando la síntesis de proteínas de fase aguda y al endotelio de la médula ósea para la liberación de neutrófilos. Asimismo son pirógenos endógenos por inducir la síntesis de prostaglandina E₂, la cual actúa sobre el hipotálamo. El aumento de la temperatura corporal disminuye la replicación bacteriana y viral como así también aumentan la presentación antigénica y activación de linfocitos T favoreciendo el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. (Ceciliani, *et al.*, 2002).

.La IL-1 β en presencia de IL-6 y TGF β sería inductora de un perfil inmune T colaborador 17 (Th17) en modelos murinos (se desconoce el efecto inductor TGF β en otras especies),

siendo la IL-23 la responsable del mantenimiento de esta respuesta (Weaver *et al.*, 2006; Dong, 2008; Van de Veerdonk *et al.*, 2009).

Esta citocina también sería responsable de la producción de IL-17 por parte de las células asesinas NKT (de sus siglas en inglés: *natural killer-T*) (Moreira *et al.*, 2011), y de IL-22 por células NK (Hughes *et al.*, 2010). Ambas células con importantes funciones en mediar respuestas anti-infecciosas.

II.4.2.1.2. TNF

El TNF es una proteína trimérica formada por 157 aminoácidos producida principalmente por macrófagos, células NK y células T. Los efectos de TNF están mediados por cualquiera de los dos receptores de TNF: TNFR I el cual se expresa en una amplia variedad de células, incluyendo células endoteliales y macrófagos; mientras que TNFR II es expresado, en gran medida, por linfocitos (Svanborg *et al.*, 1999). El TNF actúa sobre las células endoteliales estimulando la expresión de moléculas de adhesión y ayuda a la extravasación de células como monocitos y neutrófilos en el sitio de infección. Otra acción importante de TNF consiste en estimular a las células endoteliales, de pequeños vasos, para que las mismas expresen proteínas activadoras de la coagulación sanguínea ocluyendo el flujo sanguíneo. Esto puede ser particularmente importante en la prevención de la diseminación de patógenos hacia otros órganos y mantener, de esta manera, la infección en forma localizada. Sin embargo, una vez que la infección se ha diseminado al torrente sanguíneo (sepsis), la liberación de TNF a partir de los macrófagos de bazo, hígado y otros órganos. puede convertirse en nociva. Esta liberación sistémica de TNF provoca vasodilatación con

la consecuente pérdida de presión arterial y aumento de la permeabilidad vascular conduciendo al shock séptico y coagulación intravascular diseminada (Dellinger, 2003).

Esta citocina también tiene un papel importante en la estimulación de la migración de células dendríticas del tejido periférico a nódulos linfáticos, y en su proceso de maduración como células presentadoras de antígeno (Ceciliani *et al.*, 2002).

II.4.2.2. Citoquina anti inflamatoria

II.4.2.2.1. IL-10

La IL-10 es un homodímero de 160 aminoácidos secretada por una amplia variedad de células, tanto por células de la respuesta inmune innata: monocitos, células NKT, NK, macrófagos, células dendríticas inmaduras; como de la respuesta inmune adaptativa: linfocitos T colaboradores (la secreción de esta citocina se produce en procesos inflamatorios crónicos en presencia de IL-27 por parte de perfiles Th1 y Th17 y es constante en Th2), linfocitos T reguladores (Tr1), y una subpoblación de linfocitos B con funciones reguladoras (Kubo y Motomura, 2010).

La IL-10 es una de las citocinas claves en la regulación de la respuesta inflamatoria (Berg *et al.*, 2001). La IL-10 se identificó, originalmente, como el factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF). Se secreta a partir de linfocitos T colaboradores tipo 2 (células Th2) y suprime las funciones de diferenciación y efectoras de las células Th1 y Th17 (Fiorentino *et al.*, 1989; McGeachy y Cua, 2008). Su función inhibitoria se explica por su capacidad para suprimir la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como la IL-12 y TNF a partir de macrófagos, células dendríticas. Disminuye la expresión de moléculas del

MHC II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígenos profesionales (APCs), con la subsecuente inhibición de la activación de células T (Fiorentino *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 2001). Tanto IL-10 como el factor de crecimiento transformante (TGF), inhiben la producción de IL-1, TNF α , IL-6 y quimocinas inflamatorias producida por macrófagos y otros tipos celulares presentes en el entorno inflamatorio (Abbas *et al.*, 2012).

CAPITULO III - MATERIALES Y METODOS

La especie animal utilizada en el presente trabajo fué *Hydrochoerus hydrochaeris*, comúnmente conocida como carpincho. Se trata de roedores gregarios pertenecientes al suborden Histricognatha (roedores cavimorfos). El peso adulto es de 60 Kg aproximadamente y lo alcanza después de los 2 años de vida. El rango de vida es de 10 a 14 años (Herrera y Macdonald, 1984). Las hembras alcanzan la pubertad fisiológica entre los 12 y 18 meses de edad.

III.1. Estudio experimental

El experimento fue llevado a cabo con 26 hembras jóvenes, provenientes del criadero Ayuí (Santo Tomé, Corrientes), donde se encontraban en semicautiverio y no recibían ningún tratamiento medicamentoso.

Para evitar variaciones relacionadas al sexo y a la edad se utilizaron hembras de 6 a 12 meses de edad al iniciar el experimento.

Los individuos fueron distribuidos en seis grupos de 4 o 5 individuos cada uno, en recintos acondicionados para tal fin. Éstos consistieron de un refugio de 3,5 x 7 m cada uno, con piso de tierra; la mitad de su superficie se encontraba cubierta por media sombra y el tejido que delimitaba los ambientes consistía en arpillera blanca (Figura 2). El estudio experimental tuvo asiento en la estación experimental “Granja La Esmeralda”, Santa Fe Capital, dependiente del Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe.

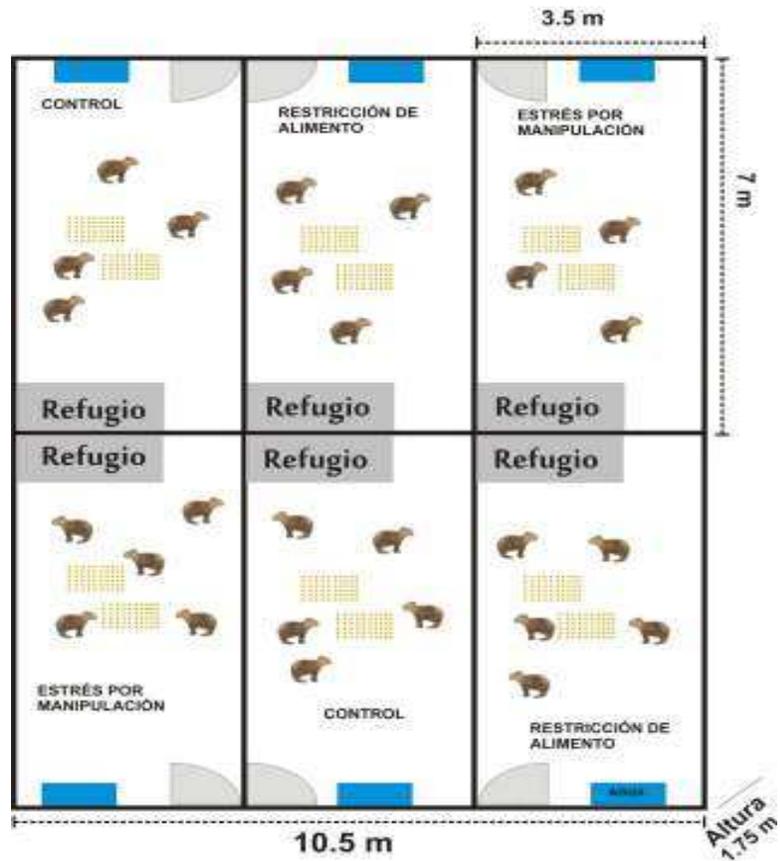


Figura 2: **Diagrama de la distribución de los recintos para el experimento.** Las paredes de los recintos estaban cubiertas con tela de tipo rafin para evitar el contacto visual entre los grupos de carpinchos

El número de individuos usados en el experimento fue intencionalmente bajo por dos razones, por un lado para cumplir con las recomendaciones de “reemplazo, refinamiento y” reducción” postuladas por Russell y Burch (Russell y Burch, 1959) en lo que concierne a bienestar animal. Por otro lado, se evaluaron efectos no sutiles, es decir, aquellos de magnitud suficiente para ser detectados con el poder estadístico disponible.

Previo a la distribución en grupos, se realizaron comparaciones de base con respecto a los pesos y cargas parasitarias. Los individuos fueron asignados a sus respectivos recintos al azar por un método de aleatorización estratificado, según masa corporal.

Los individuos tuvieron disponible agua *ad libitum* a lo largo de todo el experimento. Diariamente los animales eran inspeccionados por veterinarios para asegurarse de la ausencia de signos clínicos de enfermedad. El único tratamiento médico administrado durante el experimento fue el uso de insecticida (Bactrobet Plata, laboratorio König) en aerosol, el cual fue aplicado sobre heridas para prevenir miasis.

III.1.1. Aclimatación y comparaciones de base

Antes de que fueran establecidos los tratamientos, los animales permanecieron en su nuevo ambiente durante 4 semanas con el fin de ser aclimatados. Durante dicho período fueron alimentados *ad libitum* y no estuvieron sujetos a capturas ni restricción física.

Este período de adaptación fue implementado para asegurarse homogeneidad entre cada grupo de tratamiento al comienzo del experimento. A tal fin, se tuvo en cuenta el peso corporal, índice de masa corporal, huevos de parásitos en materia fecal y conteo de ooquistes. Estas comparaciones fueron realizadas usando pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (Kruskal-Wallis), dependiendo de la distribución de la variable respectiva. Para todas las comparaciones basales, α fue establecida en 0,1. Una prueba estadísticamente significativa ($P < 0,1$) indicaba que la aleatorización debía repetirse.

En esta instancia, la alimentación de todos los animales consistió en un 60% de alfalfa y avena fresca, y un 40% de fardo de moha o heno de maíz, suplementando con arroz y

afrecho de arroz; fraccionado en 2 comidas diarias. De esta manera cada individuo recibió diariamente 500gr de alfalfa y avena fresca, 300 gr de fardo de moha o heno de maíz más el suplemento con 800 gr de arrocín o afrecho de arroz. La misma fue suministrada sobre el suelo en raciones individuales.

III.1.2. Tratamientos

Los individuos de cada recinto recibieron uno de los tres siguientes tratamientos:

III.1.2.1. Tratamiento I: “Alimentación restringida o estrés nutricional”: los animales de 2 de los recintos recibieron alimentación restringida la cual consistió en un 50 % menos de afrechillo de arroz (400gr/animal) y 40% menos de fardo y alfalfa fresca (150 y 300gr/animal respectivamente) en comparación con la alimentación ad libitum que recibieron durante el periodo de aclimatación. Las dietas de restricción pudieron lograrse evitando la desnutrición con un 20 a 60% de reducción en la media del consumo ilimitado, incluyendo una reducción balanceada en calorías, proteínas, vitaminas y minerales (Yu, 1996; Weindruch y Walford, 1998).

III.1.2.2. Tratamiento II: “Manipulación o estrés psico-físico”: en otros dos de los recintos los animales fueron restringidos físicamente tres veces por semana (días lunes, miércoles y viernes), para ello fueron capturados utilizando una red y restringidos sosteniendo sus extremidades por un lapso de 10 minutos. La alimentación de este grupo continuó siendo la misma que la del período de aclimatación.

III.1.2.3. Tratamiento III: “Control”: los animales de este grupo no fueron sometidos a ninguno de los tratamientos descritos anteriormente. La alimentación fue la misma que durante el período de aclimatación.

Todos los tratamientos fueron implementados durante 12 semanas consecutivas y comenzaron inmediatamente después de finalizado el período de aclimatación. La densidad de carpinchos fue representativa en cada uno de los tratamientos.

Después de las 12 semanas de tratamiento, todos los animales fueron anestesiados con 10mg/kg de peso corporal de ketamina (Plano3, Zoovet) y 0.5mg/kg de peso corporal de xilazina (Kensol, Köning) y eutanaciados por exanguinación inmediatamente después de tomar una muestra de sangre por punción de la vena cava, obtención del peso corporal y medidas morfométricas. Posteriormente, los animales fueron sometidos a necropsia para obtener muestras de diferentes órganos.

III.2. Toma de muestras

Se evaluaron los efectos de cada uno de los tratamientos sobre parámetros asociados con el sistema inmune innato y salud general de los individuos a partir de muestras de sangre entera y bazo. Para ello, una vez que los animales fueron anestesiados, se tomaron 15-20 ml

de sangre entera a partir de la vena cava. Una fracción de la misma fue recolectada en tubos de polipropileno (DeltaLab, Argentina) sin anticoagulante y otra con adición de EDTA 10%.(SB, Argentina) Estas últimas fueron refrigeradas y procesadas dentro de las 8 horas posteriores a la extracción. Aquellas sin anticoagulante fueron centrifugadas y el suero obtenido fue congelado a -20°C hasta su utilización.

En el momento de la necropsia, se separó el bazo, el cual fue pesado para calcular el índice de masa esplénica (peso del órgano/ peso inicial); una fracción del órgano fue conservada a -80 °C para su utilización en técnicas de biología molecular. Asimismo se separó la glándula adrenal la cual fue fijada en formol al 10% en solución amortiguadora, para su posterior examen histopatológico.

III.3. Valoración del estrés

Para evaluar si los tratamientos indujeron estrés sobre los carpinchos, se comparó la proporción de la corteza adrenal correspondiente a la porción fascicular (parte de la glándula que sintetizan glucocorticoides) que es estimulada en respuesta al estrés (Jubb *et al.*, 1990). Las glándulas adrenales se fijaron en formol bufferado al 10% y luego deshidratados en diferentes graduaciones de etanol, 70°, 96°, 100°, por dos horas en cada uno de ellos; posteriormente se aclaró la muestra en xilol (disolvente de parafina), y luego se embebieron en parafina. Se cortaron secciones seriales de 5µm utilizando un micrótopo (Microtom HM315R), las cuales fueron montados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina y eosina (Biopur, Argentina). A continuación, cada sección fue examinada

bajo microscopio de luz con un aumento de 1000X y la media de porción fascicular fue realizada utilizando un ocular milimetrado.

III.4. Valoración de parámetros de salud generales

III.4.1 Valoración del esfuerzo somático

Antes y después del experimento todos los individuos fueron pesados (peso inicial; peso final, respectivamente) en una balanza mecánica (Macro-Line Spring Scale, precisión 0.2 kg). La medida morfométrica usada en el estudio fue largo total final.

Los parámetros de esfuerzo somático utilizados fueron: (a) Ganancia de peso (peso inicial – peso final); (b) Índice de masa corporal (peso final/largo total final); (c) Condición corporal. Este último parámetro fue estimado por palpación del tejido adiposo y grosor del músculo ubicado sobre las vértebras torácicas y pelvis (*longissimus dorsi*) medidos mediante regla de precisión de 1mm. De esta manera se estableció un score con una escala del 1 al 5 con el que fue puntuado cada animal (Burthe *et al.*, 2006)

III.4.2. Evaluación de los parámetros hematológicos

A partir de las muestras con anticoagulante se realizó recuento total de glóbulos rojos (GR) y recuento total y diferencial de glóbulos blancos (GB), lo que nos permitió evaluar capacidad aeróbica y comenzar con la evaluación del estado inmune del individuo, respectivamente (Beldomenico *et al.*, 2008). La sangre entera fue diluida en solución salina 1:10. A partir de esta suspensión se obtuvieron dos diluciones finales: 1:20 en solución de Türk (3% de ácido acético - 0,5% azul de metileno); y 1:200 en solución salina, utilizadas

para el recuento de GR y GB, respectivamente. Para tal fin se utilizaron cámaras de Neubauer (Boeco, Germany)(Arouca *et al.* 2000; Madella *et al.*, 2006).

El recuento diferencial de GB se realizó a partir de extendidos sanguíneos (frotis), los cuales fueron secados al aire, fijados durante 6 minutos en May Grunwald y teñidos con Giemsa 30 min (Biopur, Argentina). El recuento se realizó sobre un total de 200 GB.

III.4.3. Determinación de proteínas totales y albúmina sérica

Se determinó la concentración de proteínas totales (PPT), albúmina (A) y globulina (Gb) en muestras séricas provenientes de cada uno de los individuos del experimento. A partir de estos datos se obtuvo la relación Albúmina/Globulinas totales. Las variaciones en la relación A/Gb pueden indicar la subproducción (alta relación) o sobreproducción (baja proporción) de anticuerpos, o subproducción de la albúmina (baja proporción) (Latimer *et al.*, 2003). Para tal fin, se utilizó un kit comercial colorimétrico (Proti2, Wiener lab, de Rosario, Argentina) y se procedió según instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción para la determinación de proteínas totales fue leída a 540nm y para la de albúmina a 625 nm. En ambos casos se utilizó un espectrofotómetro (Labnet, EEUU). En forma paralela se realizó un blanco de muestra y un patrón de proteínas totales o albúmina, según corresponda.

III.5. Valoración del sistema inmune innato

III.5.1. Determinación de anticuerpos naturales (AcN)

La determinación de los títulos de AcN se llevó a cabo mediante un ensayo de hemoaglutinación según describe Matson (Matson *et al.*, 2005) con algunas modificaciones.

Los AcN 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, 2012). Por este motivo fue necesario obtener una suspensión de GR de especies que expresaran altos niveles de α -N acetil-galactosamina (Cotter *et al.*, 2005) tales como la ovina o cunicola.

III.5.1.1. Suspensión de glóbulos rojos:

Se extrajeron semanalmente 3 ml de sangre entera, tanto de ovino como de conejo, los cuales se anticoagularon con 40 μ l de EDTA. La toma de muestra se realizó siempre a partir del mismo individuo, tanto de ovino que pertenecía a la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de Esperanza, como del conejo que se encontraba alojado en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (FCV UNL). Las muestras fueron tomadas por personal idóneo.

La sangre entera fue centrifugada a 4000 rpm durante 5 min, se separó el plasma de las células y se procedió al lavado de los GR 3 veces con solución buffer fosfato 1X (PBS 1X). La concentración final de GR fue ajustada al 1% en PBS 1X. La suspensión de GR

fue realizada en PBS 1X y utilizada en un período no mayor a 24 horas y almacenada a 4°C.

III.5.1.2. Ensayos de hemoaglutinación:

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos con fondo en U (Corning Costar). En los pocillos 1 al 11 se colocaron 25 µl de plasma de conejo al 1% en PBS 1X. En la primera columna fueron colocados 25 µl de la muestra de suero o plasma., a continuación se procedió a realizar diluciones seriadas al medio, transfiriendo 25 µl con microdiluidor del primer pocillo al consecutivo hasta el pocillo 11 de cada fila, dejando el pocillo número 12 como control negativo (únicamente plasma de conejo al 1% en PBS 1X). Una vez realizadas las diluciones correspondientes se agregaron en todos los pocillos 25 µl de la suspensión de GR de conejo/ovino homogeneizada. Luego se agitaron las placas mecánicamente por algunos segundos y se incubaron por el plazo de 2 horas a temperatura ambiente. La aglutinación resultó de la acción de los AcN. El título fue registrado como \log^2 de la última dilución en la que se evidenció claramente aglutinación.

III.5.2. Determinación de citocinas

En esta instancia se evaluaron los niveles de expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 mediante técnica de PCR en tiempo real, a partir de muestras de tejido linfóide (bazo) proveniente de cada uno de los animales de experimentación.

III.5.2.1. Extracción de ARN:

Las muestras de bazo fueron homogenizadas directamente en reactivo Trizol (Life Technology, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: 0,50 gr de tejido fueron disgregados y homogeneizados en 1000 μ l de Trizol dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se agregaron 200 μ l de cloroformo (Merck), y luego de agitar vigorosamente durante 15 segundos se incubó durante 3 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000g durante 15 min a 4°C (Thermo Scientific), la fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf estéril, al cual se le añadieron 500 μ l de isopropanol y, luego de invertir hasta mezclar las fases, se incubó durante 30 min a 4°C. Seguidamente fueron centrifugados a 12000g durante 20 min. a 4°C, el sobrenadante fue removido con pipeta y el pellet lavado con 800 μ l de etanol al 75%. Luego de centrifugar a 7500g durante 5 min a 4°C y descartar el sobrenadante, el pellet se dejó secar por 20 min. y fue resuspendido en 40 μ l de agua ultra pura estéril (F. J. Llamas S.A., Argentina). Para mejorar la resuspensión, las muestras se incubaron a 55-60°C durante 10 min. homogeneizando cada 2 min.

La concentración y pureza de ARN total de cada muestra fue evaluada en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano y su programa de análisis MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany). El ARN obtenido se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

III.5.2.2. Transcripción reversa

Para la obtención del ADN copia (ADNc), en primera instancia, se mezclaron 2 µg de ARN de cada muestra con 1µg de cebadores al azar (random primers, Promega) llevando a un volumen de 10µl con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (según instrucciones del fabricante). Posteriormente, las muestras se colocaron en baño a 70°C durante 5 min, con el fin de abrir las estructuras secundarias y permitir el pegado de los primers, inmediatamente se colocaron en hielo. A continuación se procedió con la segunda etapa de la transcripción reversa en la cual, cada muestra fue incubada con una mezcla de la siguiente composición: mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Genbiotech) en una concentración final de 20mM total, 25U de inhibidor de ribonucleasas (RNaseOUT, Invitrogen), 1 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV, Promega), con su buffer 1X y agua ultra pura estéril en cantidad suficiente para completar los 15 µl finales. Las muestras, luego de ser incubadas por 60 minutos a 37°C, se conservaron a -20°C hasta su utilización.

III.5.2.3 Diseño de oligonucleótidos

Para la confección de los oligonucleótidos, se buscaron en primera instancia las secuencias de ARN de cada citocina de la especie en estudio: *Hydrochoerus hydrochaeris*. Al no encontrarse indexadas en la bases de datos, se buscaron las especies filogenéticamente mas relacionadas con el carpincho (Honeycutt, 2009) y se verificó que la secuencia de dichas citocinas se encontraran indexadas en la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A partir de aquellas secuencias de ARN de las especies

encontradas (*Cavia porcellus*, *Rattus norvegicus*, *Peromyscus maniculatus*, *Mus musculus*, *Microtus agrestes*, *Mesocricetus auratus*), se procedió a la realización de alineamientos múltiples; para tal fin se utilizó el programa VectorNTI versión 6.0. Luego de seleccionar regiones conservadas entre las especies analizadas, se procedió al diseño de los cebadores usando como secuencia molde estas regiones de la especie *Cavia porcellus*, la cual es la especie filogenéticamente más próxima al carpincho (Figura 3). Se utilizaron los programas informáticos de libre acceso: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y The Primer Express® Software v3.0.1, para la confección de los mismos. En caso de que las regiones, correspondientes a los oligonucleótidos, no hayan presentado 100% homología entre las especies analizadas, se procedió a generar oligonucleótidos degenerados.

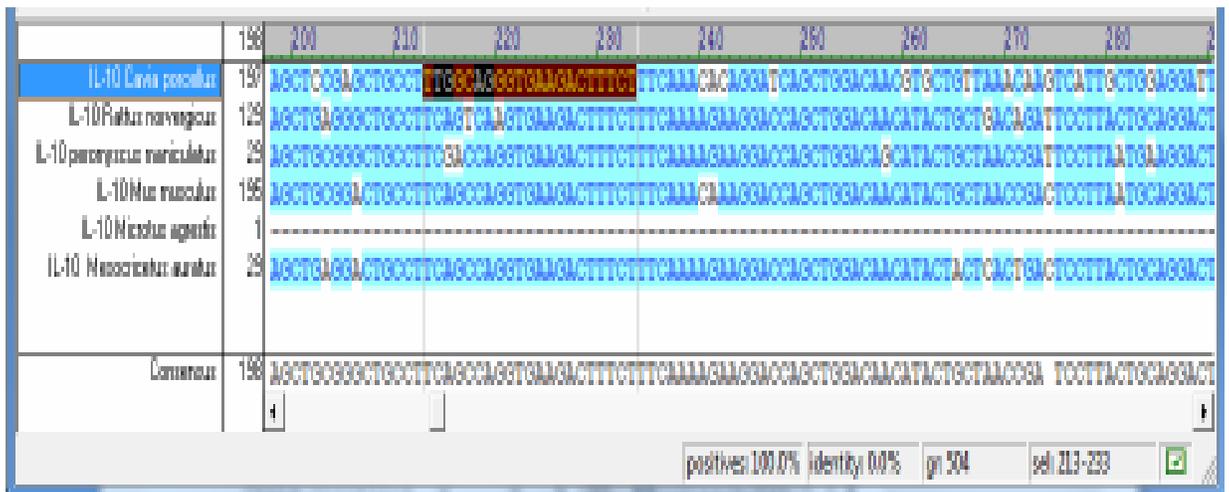


Figura 3: Alineamientos múltiples: alineamientos múltiples para el diseño de oligonucleótidos de la citocina IL-10 utilizando el programa VectorNTI versión 6.0.

III.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polimerase Chain Reaction - PCR*) en tiempo real

La cuantificación relativa de la expresión de los genes codificantes de cada una de las citocinas evaluadas, se realizó mediante PCR en tiempo real. En todos los casos se trabajó con un volumen final de 20 μ l. La composición de la mezcla de reacción consistió en ADN polimerasa (Phire Hot Star, Thermo) (0,1 μ l), y su buffer en concentración final 1X, dNTPs 0,8mM total final (100mM total, Life Technologies), SYBR Green 1X final (Cambrex Corp.) en concentraciones recomendadas por el fabricante. La concentración de los cebadores específicos (Life Technologies) fue establecida empíricamente. La concentración de ADNc que se utilizó fue obtenida a partir de la curva de eficiencia para cada molécula. Por último se llevó a un volumen final de 20 μ l con agua ultra pura estéril. Los controles negativos se realizaron reemplazando el volumen de ADNc por agua ultra pura estéril.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La pureza de los productos de PCR fue confirmada mediante curvas de disociación y secuenciación. La beta-actina (ACTB) fue utilizada como gen de control interno.

III.6. Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando modelos lineales mixtos (LMM):

Parámetros inmunológicos (variable respuesta) \sim Tratamiento + MCI (masa corporal inicial) + Tratamiento * MCI; factor al azar = recinto

MCI y Tratamiento*MCI fueron incluidos para considerar el potencial enmascaramiento o modificación de efecto de la masa corporal inicial de los carpinchos, respectivamente. La significancia del término de interacción fue evaluada mediante un “Likelihood ratio test”.

“Recinto” fue incluido como un factor aleatorio para tener en cuenta la falta de independencia de observaciones del mismo recinto (Chavez, 2010; Paterson y Lello, 2003).

Las variables respuestas, cuyas distribuciones no se aproximaban a la normal, fueron convertidas mediante exponenciación.

Los LMM fueron realizados utilizando paquetes lme4 (Douglas *et al*, 2013) y languageR (Baayen, 2011) del software estadístico R (funciones lmer y pvals.fnc, respectivamente).

Se exploró la existencia de asociaciones significativas entre las citocinas y las demás variables evaluadas mediante pruebas de correlación de Pearson.

CAPITULO IV – RESULTADOS

Los análisis estadísticos descriptivos de los parámetros medidos en los carpinchos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. **Parámetros de salud** (incluidos los valores fisiológicos, los parámetros inmunológicos, el crecimiento y las medidas de condición corporal) de carpinchos en cautiverio bajo tres tratamientos diferentes. Para la confección de la tabla se utilizó la mediana de la masa corporal inicial (17 kg) como el criterio para dividir en dos clases a los carpinchos: individuos más livianos (IL) y más pesados (IP).

Parámetros de Salud	Grupos control		Grupos con restricción de alimentos		Grupos Estresado Físicamente	
	IL	IP	IL	IP	IL	IP
	Media (Rango)	Media (Rango)	Media (Rango)	Media (Rango)	Media (Rango)	Media (Rango)
Proporción fascicular de la adrenal (%) *	73,7 (64,0 - 86,7)	75,6 (72,7 - 77,4)	76,9 (68,9 - 82,3)	78,8 (77,4 - 81,2)	82,2 (78,2 - 85,7)	74,8 (66,7 - 81,1)
Masa corporal ganada (kg) *	4,2 (3,0 - 5,5)	4,4 (3,0 - 6,5)	1,0 (0,5 - 3,0)	1,5 (1,5 - 1,5)	3,6 (1,5 - 6,9)	1,2 (-1,0 - 4,0)
Condición corporal *	6,5 (6,0 - 7,0)	7,6 (7,0 - 8,0)	4,6 (3,0 - 5,5)	6,0 (6,0 - 6,0)	5,8 (5,5 - 6,5)	7,3 (6,0 - 8,0)
Índice de masa corporal *	0,198 (0,19,0,21)	0,262 (0,23,0,30)	0,158 (0,10,0,18)	0,240 (0,22,0,27)	0,193 (0,14,0,25)	0,246 (0,22,0,29)
GR (1x10⁶ cel/ul)	2,97 (2,06 - 3,75)	3,43 (2,30 - 5,05)	4,09 (3,00 - 4,95)	3,80 (3,27 - 4,34)	3,49 (3,41 - 3,64)	4,08 (3,25 - 5,30)
GB (1x10³ cel/ul)	6,58 (9,20 - 4,80)	6,58 (7,50 - 5,40)	6,37 (9,85 - 3,55)	8,5 (6,45-11,40)	6,57 (4,20 - 9,35)	6,59 (5,42 - 7,55)
L (1x10³ cel/ul)	3,10 (1,84 - 4,44)	3,24 (2,51 - 4,29)	3,05 (2,16 - 4,44)	4,20 (3,20 - 5,03)	3,17 (1,99 - 3,93)	3,20 (2,33 - 4,28)
N (1x10³ cel/ul)	2,97 (2,46 - 3,79)	2,75 (2,08 - 3,73)	2,25 (1,09 - 3,41)	3,50 (2,59 - 5,24)	2,59 (1,83 - 4,12)	2,62 (1,97 - 3,22)
E (células/ul) *	229 (170 - 391)	315 (70 - 716)	730 (121 - 2036)	702 (428 - 975)	580 (304 - 971)	477 (181 - 587)
B (células/ul)	124 (0 - 222)	158 (0 - 422)	151 (0 - 415)	72 (0 - 185)	120 (60 - 185)	128 (26 - 219)
M (células/ul)	126 (50 - 261)	108 (0 - 214)	168 (69 - 258)	83 (0 - 153)	101,23 (0 - 145)	166 (20 - 330)
Log2 títulos de AcN *	7,0 (6 - 9)	7,8 (6 - 9)	8,8 (7 - 12)	11,3 (10 - 13)	6,7 (6 - 7)	5,8 (4 - 7)
Índice de masa espléndice *	3,61 (2,84 - 4,37)	3,07 (2,27 - 3,75)	2,99 (1,97 - 4,69)	2,81 (2,50 - 3,28)	3,23 (3,02 - 3,37)	2,74 (2,22 - 3,81)
PPT (g/dl)	4,26 (3,14 - 5,26)	5,14 (4,54 - 6,22)	5,10 (4,46 - 5,59)	5,44 (3,90 - 7,02)	4,72 (4,09 - 5,59)	5,58 (4,85 - 7,01)
A (g/dl)	2,81 (1,64 - 3,60)	2,99 (2,80 - 3,60)	3,17 (2,58 - 3,58)	3,15 (2,88 - 3,42)	3,06 (2,69 - 3,28)	3,20 (2,52 - 3,84)
A/Gb (g/dl)	2,04 (1,10 - 3,18)	1,46 (1,02 - 1,84)	1,72 (1,04 - 2,36)	1,78 (0,81 - 2,82)	1,99 (1,35 - 2,73)	1,59 (0,56 - 2,18)
Abreviaciones: IL: individuos más livianos al comienzo del experimento; IP individuos más pesados al comienzo del experimento; GR: glóbulos rojos; GB: glóbulos blancos; L: linfocitos; N: neutrófilos; E: Eosinófilos; B: Basófilos; M: Monocitos; AcN: anticuerpos naturales; PPT: proteínas plasmáticas totales; A: albúmina; Gb: globulinas. (*) Indican donde se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control.						

IV.1. Valoración del estrés

El análisis de la histo- arquitectura de la corteza adrenal reveló que, en los individuos que pertenecían a ambos grupos de tratamientos (estrés psico- físico y estrés nutricional), la porción fascicular era significativamente mayor con respecto a los animales del grupo control. La diferencia entre los animales del grupo control y los individuos estresados físicamente fue mayor en aquellos que iniciaron el experimento con menor peso comparados con los que lo hicieron con mayor peso. Esta tendencia también se observó en los animales sometidos a estrés nutricional pero el término de interacción no fue muy significativo ($p = 0,089$).

IV.2. Valoración de parámetros de salud generales

IV.2.1. Valoración de esfuerzo somático

El efecto de ambos tratamientos fue evidente en la ganancia de peso, índice de masa corporal y condición corporal; sin embargo fue fuertemente significativo en aquellos individuos sometidos a alimentación restringida. Mientras que los individuos del grupo control ganaron una media de 4,3 kg durante el experimento, los animales sometidos a estrés nutricional y estrés psico- físico solo ganaron el 25% ($p=0,0005$) y 50% ($p=0,0178$) de ese valor respectivamente (Tabla 1- Figura 4).

IV.2.2. Evaluación de los parámetros hematológicos

No se observaron diferencias entre tratamientos en el recuento de GR, linfocitos, neutrófilos y monocitos. La única diferencia significativa entre tratamientos fue en el

recuento de eosinófilos; los individuos sometidos a estrés nutricional y estrés psico- físico tuvieron un recuento de eosinófilos mayor comparados con los individuos pertenecientes al grupo control ($p=0,0113$ y $p=0,0494$ respectivamente) (Tabla 1- Figura 4).

IV.2.3. Determinación de proteínas totales y albúmina sérica

En ninguno de los dos tratamientos se observó efectos significativos sobre PPT, A, Gb y relación Albúmina/Globulina totales, como así tampoco en la masa esplénica; sin embargo una tendencia casi significativa se manifestó en los animales sometidos a restricción nutricional los cuales mostraron una masa esplénica menor que los animales del grupo control ($p=0,053$) (Tabla 1).

IV.3. Valoración de parámetros del sistema inmune innato

IV.3.1. Determinación de AcN

Para la optimización de la técnica se emplearon GR de carnero y conejo donde se obtuvieron mejores resultados con GR de conejo. Asimismo la concentración de la suspensión de GR en PBS 1X fue establecida al 1,2% a partir del resultado de varios ensayos. Para llevar a cabo las diluciones se estableció el agregado de plasma de conejo al 1% en PBS 1X

Los individuos del grupo de restricción alimentaria mostraron significativamente mayores títulos de AcN que los controles y los animales estresados físicamente ($p = 0,011$ y $p = 0,002$, respectivamente). Los animales físicamente estresados mostraron una tendencia ($p = 0,051$) a tener menores títulos de AcN que los controles. (Tabla 1-Figura 4)

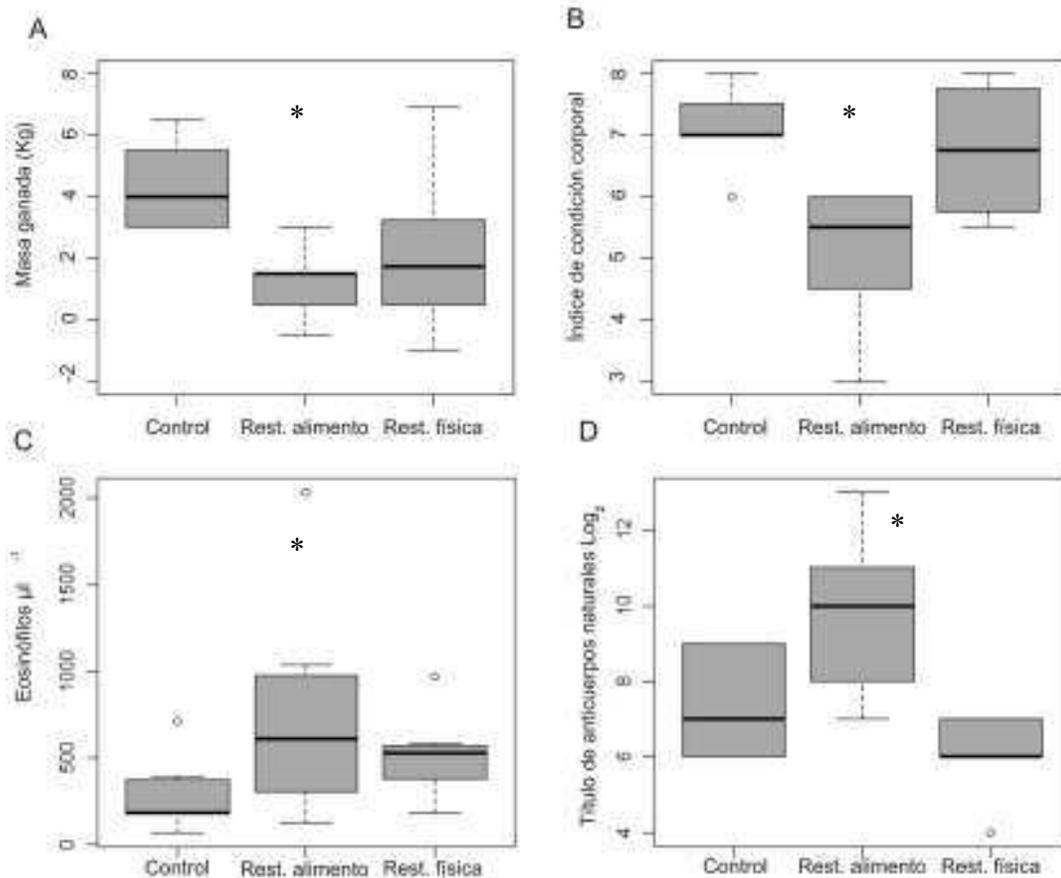


Figura 4: El efecto de los tratamientos sobre la ganancia de masa corporal, condición corporal y los parámetros inmunológicos. Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos en, (A) la ganancia de masa corporal durante el experimento; (B) el índice de la condición corporal, (C) la concentración de eosinófilos en sangre, y (D) los títulos de anticuerpos naturales. El diagrama de cajas representan la mediana (barra negra), 25-75% cuartiles (caja), 10-90% cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos). (*) Indican diferencias significativas respecto al grupo control

IV.3.2. Determinación de citocinas

IV.3.2.1. Diseño de los Oligonucleótidos (cebadores específicos)

Los cebadores que se confeccionaron tal como se describe en el punto III.5.2.3 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de los cebadores específicos utilizados en la reacción de PCR. (K= T+G; R= A+G; M= A+C; Y= C+T)

Nombre	Número de acceso GenBank	Secuencia	Tamaño amplificado
ACTB sense	NM_001172909	GYTCACCATGGATGACGATA	172 pb
ACTB antisense		TCCCACGTAGGAGTCCTTCT	
TNF α sentido	NM_001173025	TGGTGCCTCAGCCTCTTCTC	155 pb
TNF α antisentido		GCTGATCTGAGTGTGAGCGTCTG	
IL-1 β sense	NM_001172968	CGCCTGGTGTGTCTGACCC	150 pb
IL-1 β antisense		ATTCTTCCCCTTGAGGCCCA	
IL-10 sense	NM_001260485.1	TYGGCMRGGTGAAGACTTTCT	157 pb
IL-10 antisense		TTYTCTGCCTKGGGCATCAC	

IV.3.2.2. Condiciones de la PCR

Para cada gen analizado se puso a punto el programa de ciclado y se verificó la identidad y pureza del producto mediante curva de disociación y secuenciación. A partir de la curva de eficiencia se obtuvo el rango dinámico de trabajo.

El programa genérico utilizado fue:

- Etapa de desnaturalización inicial

Paso 1: 3 min 98°C

- Etapa de ciclado

Paso 1: 5 seg 98°C - desnaturalización

Paso 2: 10 seg * °C – hibridación (T° específica para cada oligonucleótido, Tabla 3)

Paso 3: 20 seg 65°C – extensión

Paso 4: 10 seg 80°C – lectura de fluorescencia

- Etapa de curva de fusión (en inglés: melting curve)

Paso 1: 15 seg 95°C

Paso 2: 1 min 70°C

Paso 3: gradiente 70-95°C, lectura de fluorescencia cada 0,3°C

Tabla 3: Condiciones de la PCR: datos obtenidos en forma empírica para la evaluación de la expresión de cada uno de los genes.

Nombre	Concentración de ADNc	Concentración de cebadores específicos	Temperatura de hibridación
ACTB	2 ng	0,5 μ M c/u	60°C
TNF α	5 ng	0,25 μ M c/u	61°C
IL-1 β	2 ng	0,5 μ M c/u	60°C
IL-10	2ng	0,5 μ M c/u	57°C

Luego de cada real time-PCR los resultados se obtuvieron de la siguiente manera: se promediaron los valores de ciclo umbral (Ct; del inglés: *cycle threshold*) de cada muestra correspondiente a cada citocina y del gen de control interno. Posteriormente se obtuvo Δ Ct de cada muestra (Ct de cada citocina – Ct del gen de control interno) y el Δ Ct correspondiente a la muestra de referencia (pool de muestra de todos los individuos del experimento). A partir de estos valores se obtuvo el $\Delta\Delta$ Ct mediante la resta del Δ Ct correspondiente a la muestra de referencia al Δ Ct de cada muestra para cada una de las citocinas evaluadas. El valor que se utilizó para los análisis estadísticos fue el $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Mediante pruebas de correlación se comprobó que no hubo diferencias significativas en los niveles de ARNm de las citoquinas estudiadas IL 1 β , IL 10 y TNF (Figura 5) entre los grupos de tratamiento ($p > 0.1$ en todos los casos). Además, no hubo relación entre estas moléculas y las otras variables evaluadas (histo-arquitectura de la corteza adrenal, esfuerzo somático, parámetros hematológicos, proteínas totales y albúmina sérica, determinación de AcN).

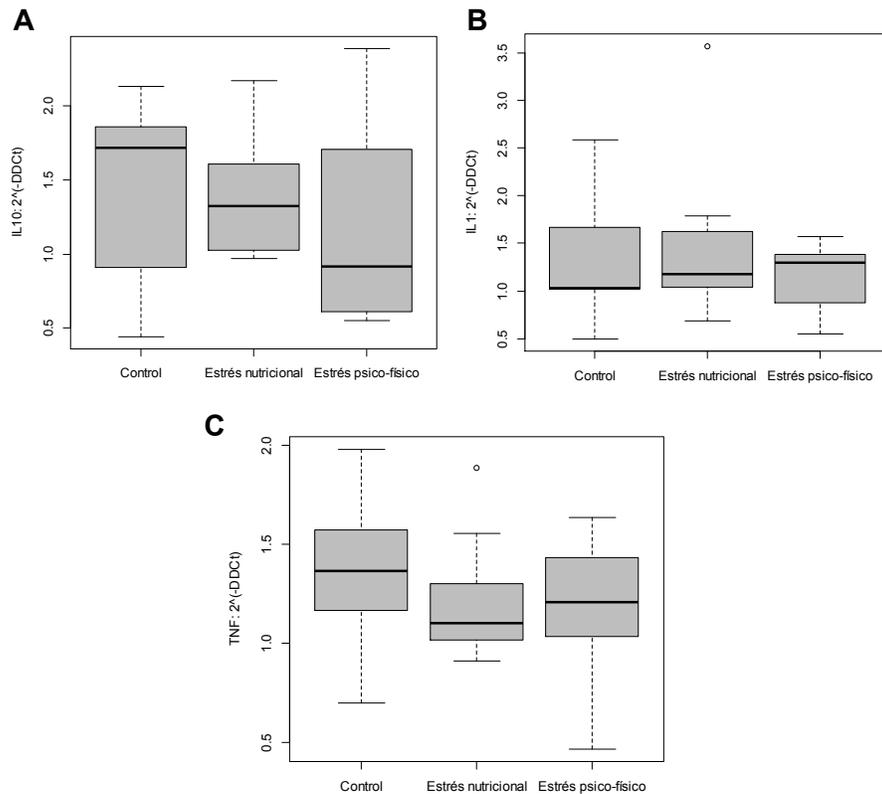


Figura 5: Efecto de los tratamientos sobre la expresión de ARNm de las citoquinas evaluadas: Diagramas de caja que muestran el efecto de tres tratamientos en, (A) IL 10 (B) IL 1 β , y (C) TNF. El diagrama de cajas representa la mediana (barra negra), 25-75% cuartiles (caja), 10-90% cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos).

CAPITULO V – DISCUSION

V.1. Sinopsis de los resultados relevantes del experimento

En el presente experimento, los resultados ecológicamente más significativos consisten en que los animales estresados (nutricional como físicamente), han sufrido un marcado impacto negativo en lo que refiere a ganancia de peso, índice de masa corporal y condición corporal, más manifiesto en aquellos sometidos a estrés nutricional. Asimismo, hay un aumento de la porción correspondiente a la corteza de la glándula adrenal, lo que indica estrés con producción de glucocorticoides en los animales sometidos a estrés con respecto al grupo control, siendo mas marcado en aquellos que iniciaron el experimento con menor masa corporal.

No obstante, se observa un efecto positivo en los componentes no específicos del sistema inmune: el recuento de eosinófilos es mayor en animales estresados con respecto a los del grupo control. Además, los títulos de AcN son mayores en aquellos individuos del grupo de estrés nutricional en relación a los del grupo control. En cuanto a la masa esplénica, existe una tendencia a la disminución de tamaño en aquellos individuos nutricionalmente estresados.

En la determinación de la expresión de ARNm de las citocinas IL-1 β ; IL-10 y TNF α no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

V.2. Estrés: masa corporal y condición corporal

Teniendo en cuenta que estos animales están en crecimiento (6 a 12 meses de edad al inicio del experimento), la evidente disminución en la ganancia de peso y masa corporal de los animales sometidos a estrés se explicaría con el principio de asignación dinámica de la energía a las funciones fisiológicas (Oli, 1999). Este principio propone que: aunque los animales ingieran una cantidad limitada de alimentos, solo asimilan parte de la energía de esa ingesta. Luego de cubrir los costos energéticos necesarios para lograr un metabolismo activo quedaría un “potencial excedente” (Stearns, 1992). Ese excedente es dividido en dos importantes procesos biológicos (Hirschfield y Tinkle, 1975; Perrin y Sibly, 1993; Stearns, 1992), el esfuerzo somático (crecimiento y desarrollo), y esfuerzo reproductivo (maduración, comportamiento reproductivo, pariciones). Hasta la madurez sexual, la energía es asignada completamente al esfuerzo somático para permitir un rápido crecimiento y desarrollo. Luego, el esfuerzo somático y reproductivo compiten directamente por este “potencial excedente”. Este tipo de conflicto en la asignación de energía es el resultado entre los rasgos de historia de vida y redistribución de la energía (*Trade-off*) (Stearns, 1992). Ante la ausencia de una palabra específica que defina “*trade-off*” en idioma español, se opta por definir el término como: intercambios entre compartimentos/sistemas que suponen un compromiso en la disponibilidad de recursos. Por tal motivo se reemplaza la palabra “*trade-off*” por el vocablo “intercambio”.

Martin (Martin, 2008) define a esta redistribución de energía (“intercambio”) como la interacción antagonista, directa o indirecta, entre dos procesos fisiológicos, lo cual (pero no

necesariamente), a largo plazo tiene consecuencias en la aptitud física de un organismo. En los individuos del ensayo esta interacción estaría dada por el crecimiento y el estrés

V.3. Estrés e inversión inmunológica.

En el presente ensayo se observa que los individuos estresados están desviando parte de su energía disponible limitada (potencial excedente), a algunos compartimentos del sistema inmune innato, ya que poseen mayores recuentos de eosinófilos y elevados títulos de AcN (este último sólo en los animales sometidos a estrés nutricional).

Los glucocorticoides son el producto final, efectores primarios y principales reguladores negativos de un importante eje neuroendocrino (hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA)).

La interacción de los glucocorticoides y el sistema inmune es compleja y bidireccional. Factores estresantes inductores de elevada concentración de glucocorticoides puede modular la actividad inmune, sin embargo, la activación del sistema inmune derivaría en la producción de esta hormona (Turnbull y Rivier 1996; McEwen *et al.*, 1997). Los glucocorticoides tienden a suprimir la inflamación pero son inducidos por estímulos pro inflamatorios; estos han sido conceptualizados como “frenos” sobre el sistema inmune para evitar la diseminación de la inflamación y promover una respuesta inmune adecuada (Sapolsky *et al.*, 2000).

Existe evidencia que los glucocorticoides, dependiendo de la situación del individuo, pueden mejorar ciertos aspectos de la respuesta inmune. Uno de ellos consistiría en una inmuno-redistribución de sus componentes provocando una inmunosupresión aparente (Braude *et al.*, 1999).

El aumento de eosinófilos y AcN que se observan en estos animales, estaría demostrando un “intercambio” tendiente a adecuar el sistema inmune bajo estas condiciones de estrés experimental.

Los eosinófilos son leucocitos multifuncionales implicados en la patogénesis de numerosos procesos inflamatorios, incluyendo infecciones de parásitos helmintos. Sin embargo, existen evidencias que han cambiado esta perspectiva mostrando que estas células son leucocitos pleiotrópicos multifuncionales, que participan en la iniciación y propagación de diversas respuestas inflamatorias y modulan la respuesta inmune adaptativa mediante la activación directa de linfocitos T favoreciendo un perfil Th2. En la respuesta inmune innata actúan, como fagocitos y productores de una variedad de citocinas pro y anti inflamatorias.

Trabajos realizados en el Laboratorio de Ecología de Enfermedades - ICIVET LITORAL (UNL-CONICET) demuestran que las consecuencias de ambos tratamientos sobre la dinámica de parásitos gastrointestinales dependen del tipo de parásito y del tamaño del individuo al inicio del experimento. Los animales estresados tienen una intensidad de infección por coccidios significativamente mayor que los animales del grupo control (siendo mas marcada en los animales del grupo de restricción nutricional). Por lo contrario se encuentra una mayor intensidad de helmintos en los individuos del grupo control, sobre todo en animales más livianos, y en consecuencia los más joven (Eberhardt *et al.*, 2013). El aumento de eosinófilos en los animales sometidos a ambos tratamientos coincide con el menor recuento de helmintos y el mayor de coccidios, lo que indicaría una mayor

asignación de recursos a la respuesta inmune contra macroparásitos (Martin *et al.*, 2008; Råberg *et al.*, 2009).

Por otra parte, los AcN por ser inespecíficos y constitutivos, estarían actuando como importante herramienta del sistema inmune innato otorgando defensas genéricas contra gran variedad de micro y macroparásitos en los individuos sometidos a estrés. En otras experiencias llevadas a cabo por el Laboratorio de ecología de enfermedades ICIVET LITORAL (UNL-CONICET), en las cuales también se evalúan los niveles de AcN comparándolos entre dos herbívoros sudamericanos en su hábitat natural (guanaco (*Lama guanicoe*) y carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*)), los resultados sugieren una fuerte diferencia en la inversión de la inmunidad humoral constitutiva entre estas dos especies.

Los AcN, y quizás el resto de los componentes de la inmunidad humoral innata constitutiva serían mayores en carpinchos con respecto a guanacos lo que podría ser resultado de la evolución en relación a la exposición de parásitos, como así también, atribuidos a la adaptación a diferentes entornos (Racca *et al.*, 2014).

Si bien se ignora el modo en que el estrés nutricional afecta a los AcN, los resultados de este experimento sugieren que su producción es sensible al estrés nutricional.

Las citocinas estudiadas (TNF, IL-1 β , IL-10) juegan un rol importante en procesos anti infecciosos y se han visto niveles aumentados de las mismas en situaciones de estrés.

La influencia de las citocinas en las respuestas efectoras es tan poderosa que muchos parásitos manipulan la respuesta inmune en beneficio propio. Es así como las vías mediadas por TNF son utilizadas por diversos microparásitos como lo hacen algunos virus que inhiben al TNF o bien modulan la señalización del mismo (Rahman y Mc Fadden,

2006). Mientras que aquellas mediadas por TGF β e IL-10 podrían ser usadas por macroparásitos (Gomez-Escobar *et al.*, 2000). Se ha descrito al TNF no solo como un mediador de la respuesta inmune innata (respuesta inflamatoria local y sistémica), sino también como un mediador de la respuesta Th1; promoviendo mecanismos (fagocitosis, estallido respiratorio) que controlan infecciones producidas por patógenos intracelulares (bacterias intracelulares, virus, protozoos)(Abbas *et al.*, 1996). En muchas infecciones por helmintos existe una respuesta predominante Th2, la cual se sostiene a lo largo de la infección favorecida por la respuesta inmune innata. La IL-10 juega un rol fundamental en este tipo de respuesta ya que media la supresión de las poblaciones Th1 y Th17. Esta molécula estaría producida principalmente por macrófagos activados alternativamente; los cuales fueron previamente activados por IL-4 e IL-13, producidas por células Th2. La principal función de esta citocina junto al TGF β es detener la respuesta inflamatoria producida por el parásito (ejemplo: migración del parásito hacia otros tejidos) y favorecer a continuación, la cicatrización del tejido afectado (Allen y Maizels, 2011).

La carga de coccidios hallados en los animales sometidos a estrés en ambos grupos de tratamiento es mayor que en los animales control, este debería presuponer un aumento de la respuesta Th1. Por otro lado, los individuos controles presentaron mayor carga de parásitos helmintos, lo que sugeriría un aumento de IL-10. A pesar de esto, las citocinas evaluadas no mostraron diferencias entre los diferentes grupos de tratamientos (control, estrés nutricional y estrés psico físico) como así tampoco entre individuos.

Como se mencionó previamente, los glucocorticoides producidos en un estrés determinado, dependiendo de la intensidad y duración del mismo, llevarían a una

inmunosupresión que no sería aplicable para todo el sistema inmune. Ciertos estudios indican que la respuesta inmune innata tiende a aumentar minutos a horas post aplicación del factor estresante, este efecto disminuye a lo largo de días a semanas pero tiende a reactivarse luego de varias semanas a meses en el caso de persistir el factor estresante (Martin, 2009; Medzhitov, 2008). Las citocinas IL-1, IL-10 y TNF evaluadas en estos animales tampoco mostraron diferencias en función del estrés al cual fueron sometidos.

CAPÍTULO VI – CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados que se presentan en este trabajo se vislumbra la necesidad de realizar más estudios de AcN en estas y otras especies de animales silvestres, comparando la inversión inmunológica y exposición a agentes patógenos y estresantes dentro y entre especies. De este modo, los AcN constituirían una importante herramienta para el estudio de la dinámica de salud de estas poblaciones.

Las citocinas IL-1 β , IL-10, TNF estudiadas no demuestran asociación a la condición corporal ni los otros índices genéricos de salud (hematología), como así tampoco a los hallazgos parasitológicos de estos individuos. Por esta razón, no pueden considerarse como indicadores de salud en estas condiciones.

Es de destacar que el experimento con estos carpinchos, originalmente, fue diseñado para la evaluación de parásitos gastrointestinales en relación con el estrés nutricional y psico-físico; con lo cual no se procedió a una toma de muestra de sangre periférica en el periodo de aclimatación de los animales ni en otro momento durante el ensayo para hacer comparaciones seriadas de los marcadores del sistema inmune escogidos. También es probable que el tamaño de la muestra (n) no supere el ruido de la variación individual. En animales endogámicos (animales de laboratorio) el número de muestras es n = 5 por tratamiento y es factible que esta “n” sea baja para animales exogámicos (como lo es en este caso), con un alto grado de variación genética que afectaría a los componentes que conforman un respuesta inmune protectora; además, hay que tener en cuenta la variabilidad ambiental existente en este ensayo.

Los animales asumen la respuesta al estrés de forma tal de maximizar sus perspectivas de aptitud física dentro del ambiente en el cual viven (Wingfield *et al.*, 1998). Aunque el estrés afecta muchas veces la inmunidad de los individuos, no significa obligatoriamente una supresión de la misma. En muchos contextos, la inmunidad podría mejorar y contribuir a la supervivencia del animal o bien, a recuperarse de los factores estresantes. Esta perspectiva modificada del estrés e inmunidad debería conducir a una nueva visión de cómo los animales de una población superan condiciones adversas en su ambiente. Para ello es determinante identificar los factores estresantes, su intensidad y duración para luego determinar cuándo y cómo se ajusta el sistema inmune a dichos factores.

Uno de los objetivos más importantes de la ecoinmunología en animales silvestres, es comprender los mecanismos que regulan la tolerancia y resistencia a parásitos en especies reservorio. Esto significaría un aumento de nuestra capacidad de predecir el lugar y frecuencia de aparición de enfermedades infecciosas emergentes que afectan al hombre y al ganado, con impacto positivo en salud pública y animal, económica global, y conservación de la biodiversidad.

CAPITULO VII -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., MURPHY, K.M., & SHER, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787-793.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. (2012). Inmunología celular y molecular 7^o ed. Ed. by S.A. Elsevier España. 555p

ABOLINS, S.; POCOCK, M.; HAFALLA, J.; RILEY, E.; VINEY, M. (2011). Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Molecular Ecology*, 20: 881-892

ALBUQUERQUE, G.R.; BERTO, B.P.; CATENACCI, L.S.; NOGUEIRA, S.S.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.; LOPES, C.W. (2008). Eimerid coccidia from capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in southern Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **28**: 323-328.

ALLEKOTTE, R. (2003). La cría del carpincho. Ediciones INTA, Buenos Aires.

ALLEN, J.E. y MAIZELS, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, **11**(6): 375-388.

AROUCA, M.E.; MIRANDA, L.B.; LOPES, R.S.; TAKAHIRA, R.K.; KOHAYAGAWA, A.; CIARLINI, P.C.; OBA, E. (2000). Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) criadas em cativeiro no município de Botucatu, SP. *Ciência Rural* **30**: 813-817

BAAYEN, R.H. (2011). LanguageR: Data sets and functions with “Analyzing Linguistic Data: A practical introduction to statistics”. R package version 1.4. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=languageR>. Accessed 14 June 2013.

BARMAN, N. N. y DAS, S. (1997). Haemolytic complement activity in normal and duck-plague-virus-vaccinated ducks. *Indian J Anim Sci* **67**: 367-368.

BARNARD, C.J.; BEHNKE, J.M.; SEWELL, J. (1996). Social behaviour stress and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of duration of grouping and aggressive behaviour prior to infection on susceptibility to *Babesia microti*. *Physiol Behav* **60**: 1223-1231

BELDOMENICO, P.M. (2006). Medicina y animales silvestres: desafío para las ciencias veterinarias en el siglo XXI. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* **5**: 7-20

- BELDOMENICO, P.M.; TELFER, S.; GEBERT, S.; LUKOMSKI, L.; BENNETT, M.; BEGON, M. (2008a). Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proc R Soc B*. **275**: 1753-1759.
- BELDOMENICO, P.; TELFER, S.; GEBERT, S.; LUKOMSKI, L.; BENNETT, M.; BEGON, M. (2008b). The dynamics of health of wild field vole (*Microtus agrestis*) populations: a haematological perspective. *J Anim Ecol*. **77**: 984-997
- BELDOMENICO, P.M.; TELFER, S.; GEBERT, S.; LUKOMSKI, L.; BENNETT, M.; BEGON, M. (2009a). The vicious circle and infection intensity: the case of *Trypanosoma microti* in field vole populations. *Epidemics*. **1**: 162-167
- BELDOMENICO, P.; TELFER, S.; LUKOMSKI, L.; GEBERT, S.; BENNETT, M.; BEGON, M. (2009b). Host condition and individual risk of cowpox virus infection: cause or effect? *Epidemiology & Infection*. **137**: 1295–1301
- BELDOMENICO, P.M. y BEGON, M. (2010). Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 25: 21 – 27.
- BELLOSO, C. (2007). Contaminación en las Islas Frente a la Ciudad de Rosario por Futura Expansión de la Explotación Ganadera. UNR. Disponible en URL: http://www.tallerecologista.org.ar/menu/archivos/Contaminacion_islas_exp_ganadera.pdf (12-12-2010).
- BERG, D.J.; ZHANG, J.; LAURICELLA, D.M. AND MOORE, S.A. (2001). IL-10 is a central regulator of cyclooxygenase - 2 expression and prostaglandin production. *J. Immunol*. **166**: 2674–2680.
- BOES, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* **37**: 1141-1149.
- BOLKOVIC, M.L. Y RAMADORI, D. (eds). (2006). "Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable". Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Pp.: 105-119.
- BOONSTRA, R.; Mc COLL, C.; KARELS, T. (2001). Reproduction at all costs: the adaptative stress response of male arctic ground squirrels. *Ecology* **82**: 1930-1946
- BRAUDE, S.; TANG-MARTINEZ, Z.; TAYLOR, G.T. (1999). Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology* **10**: 345–350.
- BURTHE, S.; TELFER, S.; LAMBIN, X.; BENNETT, M.; CARSLAKE, D.; SMITH, A.; BEGON, M. (2006). Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: delayed density dependence and individual risk. *J. Anim Ecol*. **75**: 1416-1425.

- BURTHER, S.; TELFER, S.; BEGON, M.; BENNETT, M.; SMITH, A.; LAMBIN, X. (2008). Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: significant negative impacts on survival. *J Anim Ecol* **77**: 110-119.
- CARROLL, M.C. y PRODEUS, A.P. (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* **10**: 36-40.
- CASALI, P. y SCETTINO, E.W. (1996) Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* **210**: 167-179.
- CHAVEZ, L.F. (2010). An Entomologist Guide to Demystify Pseudoreplication: Data Analysis of Field Studies with Design Constraints. *J Med Entomol* **47**: 291–298.
- CECILIANI, F., GIORDANO, A., AND SPAGNOLO, V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept. Lett.* **9**: 211-223.
- COTTER, P.; AYOUD, J.; PARMENTIER, H. (2005). Directional selection for specific sheep cell antibody responses affects natural rabbit agglutinins of chickens. *Poult Sci* **84**: 220-225
- DELLINGER, R.P. (2003). Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1259-1265.
- DEMAS, G. (2004). The energetic of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Horm Behav* **45**: 173-180
- DINARELLO, C.A. (2011). A clinical perspective of IL-1 beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur.J.Immunol.* **41**:1203–1217. doi:10.1002/eji.201141550.
- DONG, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat.Rev.Immunol.* **8**: 337–348.
- DOUGLAS, B.; MARTIN, M.; BEN, B. (2013). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and syntax. R package version 0.999999-2. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>. Accessed 14 June 2013.
- EBERHARDT, A.T.; COSTA, S.A.; MARINI, M.R.; RACCA, A.; BALDI, C.J.; ROBLES, M.R.; MORENO, P.G.; BELDOMENICO, P.M. (2013). Parasitism and Physiological Trade-Offs in Stressed Capibaras. *Plos One* on line. DOI: 10.1371/journal.pone.0070382
- ELLIS, M.G., ARP, L.H., and LAMONT, S.J. (1989). Interaction of turkey complement with *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* **50**: 1285-1289.

- ENGVALL, E. y PERLMAN, P. (1972). Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-879
- FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R.(1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp.Med.* **170**: 2081–2095.
- FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O’GARRA, A. (1991). IL-10 acts on the antigen- presenting cell to inhibit cytokine production by Th1. *J. Immunol.* **146(10)**: 3444-51
- FOURNIER, D.A.; SKAUG, H.J.; ANCHETA, J.; IANELLI, J.; MAGNUSSON, A.; MAUNDER, M.N.; NIELSEN, A.; SIBERT, J. (2012). AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optim Methods Softw.* **P** 233–249
- FREYRE, A.; BURGUES, C.; SEOANE, L.; CORREA, I.; RODRIGUEZ PIQUINELA, W.; AYALA, R.; AYALA, J.C.; MONTAÑEZ, O. (1979). Parásitos encontrados en autopsias de carpinchos (*Hydrochaeris hydrochaeris*) en Uruguay. *Anales de la Facultad de Veterinaria, Montevideo* **16**: 65-79.
- GELLER, M.S. y CHRISTIAN, J.J. (1982). Population dynamics, adrenocortical function and pathology in *Microtus pennsylvanicus*. *J Mammal* **63**: 85-95
- GERMAIN, R.N. (2001). The art of the probable: system control in the adaptive immune system. *Science* **293**: 240–245
- GILOT-FROMONT, E.; JÉGO, M.; BONENFANT, C.; GIBERT, P.; RANNOU, B.; KLEIN, F.; GAILLARD, J.M. (2012). Immune phenotype and body condition in Roe deer: Individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PLoS ONE* **7**, e45576.
- GOMEZ-ESCOBAR, N.; GREGORY, W.F.; MAIZELS, R.M.. (2000). Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor b, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect. Immun.* **68**: 6402–6410
- GRAHAM, A.L.; CATTADORI, I.M.; LLOYD-SMITH, J.O.; FERRARI, M.J.; BJØRNSTAD, O.N. (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large?. *Trends Parasitol.* **23(6)**:284-291
- HERRERA, E. Y MACDONALD, D.W. (1984). The capybara. In: Encyclopedia of Mammals. Ed Macdonald, D.W. Ed by: George Allen & Unwin. London. P 696-699

- HIRSCHFIELD, M.F. y TINKLE, D.W. (1975). Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 2227-2231.
- HONEYCUTT, R.L. (2009). Rodents (Rodentia). In: The timetree of life. Ed by S.B. Hedges and S. Kumar. Oxford University press. Pp 490-494
- HUGHES, T.; BECKNELL, B.; FREUD, A.G.; MCCLORY, S.; BRIERCHECK, E.; YU, J.; MAO, C.; GIOVENZANA, C.; NUOVO, G.; WEI, L.; ZHANG, X.; GAVRILIN, M.A.; WEWERS, M.D.; CALIGIURI, M.A. (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cell in secondary lymphoid tissue. *Immunity* **32**: 803-814.
- JACKSON, J.A.; BEGON, M.; BIRTLES, R.; PATERSON, S.; FRIBERG, I.M.; HALL, A.; LOWE, A.; RALLI, C.; TURNER, A.; ZAWADZKA, M.; BRADLEY, J.E. (2011). The analysis of immunological profiles in wild animals: a case study on immunodynamics in the field vole, *Microtus agrestis*. *Mol Ecol.* **20(5)**:893-909.
- JOLLES, A.E.; EZENWA V.; ETIENNE R.; TURNER W.; OLFF H. (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* **89**: 2239-2250
- JUBB, K.; KENNEDY, P.; PALMER, N. (2007). Pathology of domestic animals. Saunders Ltd..
- KEELING, M.J. and EAMES, K.T. (2005). Networks and epidemic models. *J R Soc Interface* **2**: 295-307
- KLEIN, S. y NELSON, R. (1999). Activation of the immune-endocrine system with lipopolysaccharide reduces affiliative behaviors in voles. *Behav Neurosci* **113**: 1042-1048.
- KOURILSKY, P. y TRUFFA-BACHI, P. (2001). Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends immunol.* **22**: 502-509.
- KUBO, M.Y MOTOMURA, Y. (2012). Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Frontiers in Immunology.* **3**. doi: 10.3389/fimmu.2012.00275
- LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. (2003). Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology. Iowa State Press, Ames, IA.
- LAZZARO, B.P.y LITTLE, T.J. (2009). Immunity in a variable world. Philosophical Transactions of the Royal Society B: *Biological Sciences* **364**: 15-26.

- LOCHMILLER, R. (1996). Immunocompetence and animal population regulation. *Oikos* **76**: 594-602.
- LOCHMILLER, R. y DEERENBERG, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87-98.
- MADELLA, D.A.; NETO, E.J.; FELISBERTO, M.E.; y DE SOUZA, C.E. (2006). Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Rodentia:Hydrochoeridae) de vida livre na região de Campinas-SP. *Ciência Rural* **36**: 1321-1324
- MARTIN, F. y KEARNEY, J. F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. **13**: 195–201
- MARTIN, L.B.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*. **363**: 321-339.
- MARTIN, L. B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *General and Comparative Endocrinology* **163**: 70–76
- MATSON, K.D.; RICKLEFS, R.E.; KLASING, K.C. (2005). A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate immunity in wild and domestic birds. *Develop Comp Immunol* **29**: 275-286
- [McEWEN, B.S.](#); [BIRON, C.A.](#); [BRUNSON, K.W.](#); [BULLOCH, K.](#); [CHAMBERS, W.H.](#); [DHABHAR, F.S.](#); [GOLDFARB, R.H.](#); [KITSON, R.P.](#); [MILLER, A.H.](#); [SPENCER, R.L.](#); [WEISS, J.M.](#) (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Rev.* **23**: 79–133.
- McGEACHY, M.J. y CUA, D.J. (2008). Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, **28**(4): 445-453.
- MEDZHITOV, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428-435.
- MILLS, J.N. and CHILDS, J.E. (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis* **4**: 529-537
- MOREIRA, A.P.; CAVASSANI, K.A.; ISMAILOGLU, U.B.; HULLINGER, R.; DUNLEAVY, M.P.; KNIGHT, D.A.; KUNKEL, S.L.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; HOGABOAM, C.M. (2011). The protective role of TLR6 in a mouse model of asthma is mediated by IL-23 and IL-17A. *J. Clin. Invest.* **121**: 4420–4432.

- MORENS, D.M.; FOLKERS, G.K.; FAUCI A, S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242-249.
- MURPHY, K. (2012). Janeway's Immunobiology, 8^oed. Ed. by. Garland Science, Taylor y Francis Group. New York.
- NATHAN, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* **420**:846-852.
- NELSON, R.J. y DEMAS, G.E. (1996). Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol* **71**: 511-548.
- OCHSENBEIN, A.F.; FEHR, T.; LUTZ, C.; SUTER, M.; BROMBACHER, F.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**: 2156-2159.
- OCHSENBEIN, A.F. y ZINKERNAGEL, R.M. (2000). Natural antibodies and complemen link innate and acquired immunity. *Immunol Today* **21**: 624-630.
- OJASTI, J. Y SOSA BURGOS, L.M. (1985). Density regulation in population of capybara. *Acta Zoologica Fennica*. **173**: 81-83.
- PATERSON, S. y LELLO, J. (2003). Mixed models: getting the best use of parasitological data. *Trends Parasitol* **19**: 370-375.
- PEDERSEN, A.B.; JONES, K.; NUNN, C.; ALTIZER, S. (2008). Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Cons Biol*. **21**: 1269-1279.
- PEDERSEN, A.B.; BABAYAN, S.A. (2012). Wild immunology. *Molecular Ecology*. **20**: 872-880
- PEREIRA, P.; FORNI, L.; LARSSON, E.L.; COOPER, M.; HEUSSER, C.; COUTINHO, A. (1986) Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol* **16**: 685-688.
- PERRIN, N. y SIBLY, R.M. (1993). Dynamic models of energy allocation and investment. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 379_410.
- OLI, M.K. (1999). The Chitty Effect: A Consequence of Dynamic Energy Allocation in a Fluctuating Environment. *Theoretical Population Biology*. **56**: 293_300
- QUINTANA, R.D.; BÓ, R.; MERLER, J.; MINOTTI, P.; MALVÁREZ, A. (1992). Situación y uso de la fauna silvestre en la región del Bajo Delta del río Paraná, Argentina. *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre*, **73**: 13-33.

QUINTANA, R. D.; BÓ, R., KALESNIK, F. (2002). La vegetación y la fauna de la porción terminal de la cuenca del Plata. Consideraciones ecológicas y biogeográficas. En: "El Río de la Plata como Territorio" (J.M.Bortharagay, ed). Facultad de Arquitectura y Urbanismo, UBA y Ediciones Infinito, Buenos Aires, Argentina. p. 99-124.

RÅBERG, L.; GRAHAM, A.L.; READ, A.F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 37-49.

RACCA, A.L.; EBERHARDT, A.T.; MORENO, P.G.; BALDI, C.; BELDOMENICO, P. M. (2014). Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *The Veterinary Journal* **199**: 308–309

RAHMAN, M.M. AND MCFADDEN, G. (2006) Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.* **2**, e4

RUSSELL, W.M.S. y BURCH, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Ed. By Methuen & Co. Ltd. London.

SALAS, V. y HERRERA, E.A. (2004) Intestinal helminths of capybaras, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from Venezuela. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* **99**: 563-566.

SANDMEIER, F.C.; TRACY, C.R.; DUPRÉ, S.; HUNTER, K. (2012). A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: Implications for long-term resistance to disease. *Biology Open* **1**: 1078–1082.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **21**: 55–89.

SCHMID-HEMPEL, P. y EBERT, D. (2003). On the evolutionary ecology of specific immune defense. *Trends Ecol Evol* **18**: 27-32.

SCHULENBURG, H.; KURTZ, J.; MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M.T. (2009). Introduction. Ecological immunology. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364**: 3–14

SHELDON, B. y VERHULST, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* **11**: 317-321

SIMPSON, V.R. (2002). Wild animals as reservoir of infectious diseases in the UK. *Vet J* **163**: 128-146

SINKOC, A.L.; BRUM, J.G.W.; MULLER, G. (2009). Gastrintestinal helminths of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) in Cattle Breeding Farm in the area

of the Ecological Reserve of Taim, Rio Grande. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **52**, 327-333.

SMITH, K.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A.B. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim Cons* **12**: 1-12.

SMITS, J.E. (2007). Are we enlightened about the immunocompetence of a severely inbred population of New Zealand robins? Challenges inherent in studies using immunological endpoints. *Animal Conservation* **10**: 14-16.

STEARNS, S. 1992. "Evolution of Life Histories," Oxford Univ. Press, Oxford.

SVANBORG, C.; GODALY, G.; HEDLUND, M. (1999). Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 99-105

TELFER, S.; LAMBIN, X.; BIRTLES, R.; BELDOMENICO, P.; BURTHE, S.; PATERSON, S.; BEGON, M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* **330**: 243-246.

TIZARD, I.R. (2004). Veterinary Immunology. An Introduction, W B Saunders

TOWNSEND, A.K.; CLARK, A.B.; MCGOWAN, K J.; MILLER, A.D.; BUCKLES, E.L. (2010). Condition, innate immunity and disease mortality of inbred crows. *Proc R Soc B* **277**: 2875-2883

TREVANI, A. y GEFNER, J. (2011a). Inmunidad innata. En: Introducción a la Inmunología Humana. Fainboim, L. y Geffner, J. 6ta Edición. Editorial Médica Panamericana. **2**: 9-64.

TREVANI, A. y ZWIRNER, N.I. (2011b). Inmunidad innata. En: Introducción a la Inmunología Humana. Fainboim, L. y Geffner, J. 6ta Edición. Editorial Médica Panamericana. **3**: 65-108.

TURNBULL, A.V. y RIVIER, C. (1996). Corticotropin-releasing factor, vasopressin, and prostaglandins mediate, and nitric oxide restrains, the hypothalamic-pituitary-adrenal response to acute local inflammation in the rat. *Endocrinology* **137**: 455-463.

UENO, H. y GONÇALVES, P. C. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes, 2º Edición. Editado por Japan International Cooperation Agency, Tokyo, Japón.

VAN DE VEERDONK, F.L.; GRESNIGT, M.S.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W.; JOOSTEN, L.A.; NETEA, M.G. (2009). Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep.* **42**: 776-787.

VESTHEY, M.R. and LOCHMILLER, R.L. (1994). Spontaneous lytic activity against heterologous erythrocytes in cotton rat (*Sigmodon hispidus*) serum. *Comp Biochem Physiol Physiol* **109**: 133-138.

VIEIRA, F.M.; LIMA, S.S.; BESSA, E.C. (2006). Morphology and biometry of eggs and larvae of *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae), a gastrointestinal parasite of *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae), in the municipality of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.* **15**: 7-12.

WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**: 677–688.

WEINDRUCH, R. Y WALFORD, R.L. (1998). *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Thomas Press, Springfield, IL.

WHITEMAN, N.K.; MATSON, K.D.; BOOMER, J.L.; PARKER, P.G. (2006). Disease ecology in the Galápagos Hawk (*Buteo galapagoensis*): host genetic diversity, parasite load and natural antibodies. *Pro R Soc B* **273**: 797-804.

WINGFIELD, J.C.; MANEY, D.L.; BREUNER, C.W.; JACOBS, J.D.; LYNN, S.; RAMENOFISKY, M.; RICHARDSON, R.D. (1998). Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage”. *American Zoologist* **38**: 191–206.

WILSON, K.; BJØRNSTAD O.N.; DOBSON A.P.; MERLER, S.; POGLAYEN, G.; RANDOLPH, S.E.; READ, A.F.; SKORPING, A. (2002). Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. In Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H.; Dobson, A.P. editors. Oxford : Oxford University Press. *The Ecology of Wildlife Diseases*. p 6–44.

YU, B.P. (1996). Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Radical Biology and Medicine* **21**: 651-668.

CAPÍTULO VIII – ANEXO

Parte de los resultados que se describen en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos

PUBLICACIONES:

EBERHARDT, M.A.T.; COSTA, S.A.; MARINI, R.; RACCA, A.; BALDI, C.J.; ROBLES, R.; MORENO, P.A.; BELDOMENICO, P.M. (2013). Parasite load and physiological trade-offs in stressed capybaras”. PLoS ONE. 8(7): 1-12.

RACCA, A.; EBERHARDT, A.T.; MORENO, P.G.; BALDI, C.J.; BELDOMENICO, P.M. (2014). Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Vet J 199(2):308-309.

CONGRESO:

RACCA, A.; EBERHARDT, A.T.; MORENO, P.; BALDI, C.; BELDOMENICO, P.M. (2013). Evaluación de títulos de anticuerpos naturales de dos especies silvestres: guanacos (*Lama guanicoe*) y carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*). VI Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Casilda.