



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**ESTRATEGIAS DE DEFENSA CONTRA PARÁSITOS  
ANTE DIFERENTES ESCENARIOS DE DESAFÍOS  
AMBIENTALES**

---

*Tesis presentada para acceder al grado académico de Doctora en Ciencias  
Veterinarias*

*Autor:* Lic. Cintia Carolina Palavecino

*Directora:* Dra. Andrea Laura Racca

*Co-director:* Dr. Pablo Fernando Cuervo

2024

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias  
Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET)

## **Dedicatorias y agradecimientos**

A mi directora Andrea y a mi co-director Pablo por la confianza, las enseñanzas, por acompañarme en el desarrollo de la tesis, y por brindar el financiamiento necesario.

Al director del LECEn, Pablo Beldomenico, por abrirme las puertas del laboratorio para permitirme realizar esta tesis y crecer profesionalmente.

A Natalia Salvetti, Hugo Ortega y todo el ICIVET Litoral (UNL-CONICET) por brindarme un espacio en el cual pude aprender durante tanto tiempo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas de postgrado que me permitieron realizar este doctorado. Asimismo, agradezco a la ANPCyT por el financiamiento de los proyectos PICT 2016-1934 y PICT 2019-1167.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral por haberme permitido realizar mi tesis de doctorado.

Al Comité Académico del Doctorado y al jurado evaluador por la buena predisposición, por sus aportes y el seguimiento de la tesis todos estos años.

A mis compañeros/as de laboratorio que actualmente están y también a los que ya no están en el laboratorio, pero compartimos mucho. En especial a Sandra, Pauli, Sofi, Majo, Ceci, Ale, Pitu, Franco, Johann, Agus, Cele, Flor. Con quienes compartí no sólo el lugar de trabajo sino también momentos fuera, y nos bancamos mutuamente.

Gracias omatopopiH por compartir esta sana locura.

Al personal del CMC, sin quienes no hubiera sido posible la ejecución de los experimentos de la tesis: Facundo Salinas, Leandro Neme, Enrique Rebelindo, Paula Taborda, Juan Chiaraviglio, Enzo Cabaña, Estefania Grenon, Carolina Panzani.

A Soledad por confiar en mí para este nuevo camino que comienza.

A los/as estudiantes de grado que colaboraron en diferentes etapas del proyecto: Estela Calvet, Fiorela Pontarelli, Lucia Romero Mattio, Alexandra Simón, Sebastián Detarsio, Josefina Bando y Berenice Hunziker.

A Ivan Bontempi, Ivan Marcipar, Paula Cacik, Marcelo Ruiz, Rafael Marengo, Amorina Sánchez, Ma. del Rocío Marini, Matías Belotti, Florencia Bono Battistoni, Lucia Fagnoli y Paula Silvestrini, por su colaboración con las técnicas moleculares, parasitológicas, histológicas y hematológicas.

A mi familia y afectos que me acompañaron y me bancaron en diferentes momentos por fuera del doctorado. En especial a Marita, Dani, Fi, Ema, Mika, Maga y Laura, que estuvieron en los momentos más difíciles. A Marta, por haber bancado esta odisea por más de 10 años. A Constanza y Belén por su atención y sus enseñanzas sobre salud mental cuando más lo necesité. A Tango y Milonga por ser mi alegría de cada día. A mis compañeros de militancia, por alentarme a defender aquello que creo que es justo.

A la tecnología por hacer posible la ciencia en estos tiempos que corren. Sobre todo, a mi pobre notebook que se bancó de todo. Al R, a BioRender, y tantos otros programas que fueron mis herramientas infaltables.

Me siento orgullosa de la Educación Pública que me tocó y de la Ciencia Argentina que me acobijó. Me siento orgullosa de ser quien soy.

A la Cinti que de pequeña soñó con esto: lo logramos!

*“La ciencia no es cara, cara es la ignorancia”. Bernardo Houssay, fundador del CONICET, premio Nobel en Medicina.*

## Índice

Dedicatorias y agradecimientos .....	i
Índice.....	iii
Índice de tablas y figuras.....	vi
Abreviaturas y símbolos.....	xv
Resumen.....	xviii
Abstract .....	xix
CAPÍTULO I: ¿La estrategia de defensa varía según el contexto? Una introducción a los conceptos de resistencia y la tolerancia .....	1
I.I. Introducción .....	2
I.I.I.    Influencia de desafíos ambientales sobre las estrategias de defensa.....	3
I.I.II.   Estrategias de defensa en coinfección.....	5
I.I.III.  Consecuencias de la interacción hospedador-parásito: dos caras de una misma moneda .....	6
I.I.IV.   Sistema inmune y su relación con la resistencia y la tolerancia .....	6
I.II. Objetivos.....	10
General:.....	10
Específicos:.....	10
I.III. Hipótesis y predicciones.....	11
Hipótesis .....	11
Predicciones .....	11
CAPÍTULO II: Diseño experimental, condiciones y procedimientos .....	12
II.I.  Justificación del modelo hospedador-parásito seleccionado .....	13
II.II. Condiciones de alojamiento .....	17
II.III. Diseño experimental .....	18
II.IV. Procedimientos y registro de variables .....	21
II.V.  Declaración ética .....	22
CAPÍTULO III: Variación de la respuesta inmune frente a desafíos ambientales y antigénicos.....	23
III.I. Introducción .....	24

III.I.I.	Respuesta inmune ante parásitos.....	24
III.I.II.	La influencia de desafíos ambientales sobre la respuesta inmune .....	26
III.II.	Materiales y métodos.....	28
III.II.I.	Evaluación de parámetros inmunológicos celulares.....	28
III.II.II.	Evaluación de parámetros inmunológicos humorales .....	28
III.II.III.	Análisis estadísticos .....	31
III.III.	Resultados.....	36
III.III.I.	Respuesta inmune humoral frente a infecciones en distintos escenarios de desafíos ambientales .....	37
III.III.II.	Respuesta inmune celular frente a infecciones en distintos escenarios de desafíos ambientales .....	40
III.IV.	Discusión .....	49
CAPÍTULO IV: Modulación de la estrategia de defensa en roedores frente a diversos escenarios de desafíos ambientales y antigénicos .....		57
IV.I.	Introducción .....	58
IV.II.	Materiales y métodos .....	60
IV.II.I.	Cuantificación de la intensidad de los parásitos.....	60
IV.II.II.	Evaluación de la tolerancia.....	65
IV.II.III.	Indicadores de salud/enfermedad .....	67
IV.II.IV.	Análisis estadístico .....	69
IV.III.	Resultados .....	70
IV.III.I.	Efecto de la exposición a desafíos ambientales sobre la resistencia frente a los parásitos.....	70
IV.III.II.	Efecto de la exposición a desafíos ambientales sobre la tolerancia frente a los parásitos.....	71
IV.IV.	Discusión.....	75
IV.IV.I.	Los desafíos ambientales modularon la resistencia a <i>Tri. spiralis</i> pero no a <i>Try. cruzi</i> 76	
IV.IV.II.	La tolerancia fue influenciada tanto por los desafíos antigénicos como por los desafíos ambientales .....	77
CAPÍTULO V: Discusión general .....		81
CAPÍTULO VI: Conclusiones y perspectivas .....		85

Bibliografía .....	90
ANEXO I .....	111
Ensayo piloto .....	111
Infección experimental .....	111
Determinación de parámetros hematológicos .....	111
Evaluaciones histopatológicas .....	111
Resultados .....	112
ANEXO II .....	115
Resúmenes de los modelos estadísticos .....	115

## Índice de tablas y figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i> (adaptado de: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria, 2024). .....	15
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de <i>Try. cruzi</i> (adaptado de: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria, 2024). .....	17
<b>Figura 3.</b> A- Tratamientos aplicados en cada jaula. R: restricción alimentaria; CS: conflicto social; Tcru: presencia de <i>Try. cruzi</i> ; Tspi: presencia de <i>Tri. spiralis</i> . Los intrusos están sombreados en gris. B- Cronología de los procedimientos experimentales. ....	19
<b>Tabla 1.</b> Detalles del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). .....	29
<b>Tabla 2.</b> Modelos aplicados para los diferentes tipos de análisis de la respuesta inmune ante diferentes desafíos antigénicos y ambientales.....	35
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los resultados del análisis del AUC de los diversos indicadores inmunológicos frente a <i>Try. cruzi</i> y <i>Tri. spiralis</i> en diferentes escenarios de desafíos ambientales.....	37
<b>Figura 4.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles semanales de anticuerpos naturales mediante la técnica de ELISA. AcNs: anticuerpos naturales. DO: densidad óptica. Tspi (1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru (0/1): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	38
<b>Figura 5.</b> Análisis <i>post-hoc</i> con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con <i>Try. cruzi</i> y/o <i>Tri. spiralis</i> sobre AUC_AcNs mediante la técnica de ELISA. Variable respuesta: área bajo la curva (AUC) de los niveles semanales de anticuerpos naturales (AcNs) post-inmunización. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....	38
<b>Figura 6.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles de anti-Tspi mediante la técnica de ELISA. Anti-Tspi: anticuerpos anti- <i>Tri. spiralis</i> . DO:	

densidad óptica. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	39
<b>Figura 7.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles de anti-Tcru mediante la técnica de ELISA. Anti-Tcru: anticuerpos anti- <i>Try. cruzi</i> . DO: densidad óptica. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	40
<b>Figura 8.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de leucocitos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	41
<b>Figura 9.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de linfocitos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	42
<b>Figura 10.</b> Análisis <i>post-hoc</i> con test de Tukey para comparaciones múltiples. Variable respuesta: AUC_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización). a-Influencia de restricción alimentaria e infección con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_linfocitos; b-Influencia de conflicto social e infección con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_linfocitos; c-Influencia de infección con <i>Tri. spiralis</i> e infección con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_linfocitos. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....	43
<b>Figura 11.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de neutrófilos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> . .....	44
<b>Figura 12.</b> Análisis <i>post-hoc</i> con test de Tukey para comparaciones múltiples. Variable respuesta: AUC_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización). a-Influencia de la infección con <i>Tri. spiralis</i> y con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_neutrófilos; b-Influencia de restricción alimentaria e infección con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_neutrófilos; c-Influencia de conflicto social sobre AUC_neutrófilos. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....	45

<b>Figura 13.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de monocitos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> .....	46
<b>Figura 14.</b> Análisis <i>post-hoc</i> con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con <i>Tri. spiralis</i> y con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_monocitos. Variable respuesta: AUC_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización). Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....	47
<b>Figura 15.</b> Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de eosinófilos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de <i>Tri. spiralis</i> . Tcru(1/0): ocurrencia de <i>Try. cruzi</i> .....	48
<b>Figura 16.</b> Análisis <i>post-hoc</i> con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con <i>Tri. spiralis</i> y con <i>Try. cruzi</i> sobre AUC_eosinófilos. Variable respuesta: AUC_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización). Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....	48
<b>Figura 17.</b> Curva estándar generada a partir de cinco diluciones 1/10 de parásitos equivalentes/50 ng ADN. Cada punto de la curva (cuadrados rojos) se realizó por triplicado. Ct: <i>cycle threshold</i> (ciclo umbral).....	63
<b>Tabla 4.</b> Programa de ciclado para TCZ. El programa fue modificado del propuesto por Cummings et al. (2003). Los datos de fluorescencia fueron adquiridos a los 81°C y fueron analizados con el software StepOne 2.1.....	64
<b>Tabla 5.</b> Programa de ciclado para 18S. Los datos de fluorescencia fueron adquiridos a los 79°C y fueron analizados con el software StepOne 2.1.....	64
<b>Figura 18.</b> Representación gráfica de la tolerancia, representada como una regresión entre el indicador de salud/enfermedad y la intensidad del parásito en hospedadores expuestos a dos niveles de un desafío ambiental, distinguidos por diferentes colores. El eje de ordenadas (“eje y”) puede ilustrarse con: a- Un indicador de condición de salud (o <i>fitness</i> ), donde una pendiente menos negativa indica un fenotipo más tolerante; b- Un indicador	

de enfermedad, donde una pendiente más positiva indica un fenotipo menos tolerante; c- Un indicador de condición de salud (o *fitness*) o un indicador de enfermedad donde, dada la inversión propuesta en el eje “y” para los indicadores de enfermedad, una pendiente menos negativa indica un grupo de hospedadores más tolerantes. ....66

**Figura 19.** Resistencia a *Tri. spiralis* frente a desafíos ambientales en mono- y coinfección con *Try. cruzi* (Tcru [0/1]). Las letras por encima de cada *boxplot* corresponden a un análisis *post hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. ....71

**Figura 20.** Resistencia a *Try. cruzi* frente a desafíos ambientales (Tratamientos: conflicto social [0/1],) en mono- y coinfección con *Try. spiralis* (Tspi [0/1]). ....71

**Tabla 6.** Resumen de los resultados finales de los LMM en términos de tolerancia frente a *Try. cruzi* y *Tri. spiralis*. ....71

**Figura 21.** Predicciones del modelo del efecto del conflicto social sobre la tolerancia frente a *Try. cruzi*, considerando diferentes indicadores de salud o enfermedad. Simulación para R (0), Tspi (0). La intensidad del parásito se estandarizó antes de la modelización. a- Niveles de peso testicular relativo (PRT) según la intensidad de *Try. cruzi* y el conflicto social; b- Alanina aminotransferasa (ALT) según la intensidad de *Try. cruzi* y el conflicto social. ....73

**Figura 22.** Predicciones del modelo del efecto de la restricción alimentaria y la coinfección con *Tri. spiralis* sobre la tolerancia frente a *Try. cruzi*, considerando diferentes indicadores de salud o enfermedad. Simulación para CS (0). a- Aspartato aminotransferasa (AST) según la intensidad de *Try. cruzi* y la restricción alimentaria; b- Albúmina (ALB) según la intensidad de *Try. cruzi* y la coinfección; c- Cambio del índice de masa corporal tras la infección ( $\Delta$ IMC) según la intensidad de *Try. cruzi*, la presencia de *Tri. spiralis* y la restricción alimentaria. ....73

**Figura 23.** Predicciones del modelo del efecto de la restricción alimentaria y la coinfección sobre la tolerancia frente a *Tri. spiralis*, considerando varios indicadores de salud o enfermedad. Las intensidades del parásito se estandarizaron antes de la modelización. a- Cambio del índice de masa corporal tras la infección ( $\Delta$ IMC) según la

intensidad de *Tri. spiralis* y la presencia de *Try. cruzi* (simulación para CS (0), R [0]); b- Niveles de albúmina (ALB) según la intensidad de *Tri. spiralis* y la restricción alimentaria (simulación para CS (0), Tcru [0]).....74

**Figura 24.** Predicciones del modelo del efecto del conflicto social y la coinfección sobre la tolerancia frente a *Tri. spiralis* considerando el peso relativo de los testículos (PRT) como indicador de salud. Las intensidades de los parásitos se estandarizaron antes de la modelización (simulación para R [0]). .....75

**Tabla A3.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos naturales. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....115

**Tabla A4.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_AcNs (área bajo la curva de los niveles de AcNs en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ )...115

**Tabla A5.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos anti-Tspi. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....116

**Tabla A6.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_anti-Tspi (área bajo la curva de los niveles de anti-Tspi en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).....116

**Tabla A7.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos anti-Tcru. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....116

<b>Tabla A8.</b> Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC_anti-Tcru (área bajo la curva de los niveles de anti-Tcru en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ).....	117
<b>Tabla A9.</b> Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de leucocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....	117
<b>Tabla A10.</b> Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de linfocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....	117
<b>Tabla A11.</b> Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ).....	118
<b>Tabla A12.</b> Análisis <i>post hoc</i> de AUC_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término R*Tcru.....	118
<b>Tabla A13.</b> Análisis <i>post hoc</i> de AUC_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término CS*Tcru. ....	119
<b>Tabla A14.</b> Análisis <i>post hoc</i> de AUC_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi*Tcru.....	119
<b>Tabla A15.</b> Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de neutrófilos. Las variables significativas aparecen en	

negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....120

**Tabla A16.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). ....120

**Tabla A17.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término  $T_{spi} * T_{cru}$ . ....121

**Tabla A18.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término  $R * T_{cru}$ . ....121

**Tabla A19.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término CS. ....122

**Tabla A20.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de monocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....122

**Tabla A21.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). ....122

**Tabla A22.** Análisis *post hoc* de AUC\_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término  $T_{spi} * T_{cru}$ . ....123

<b>Tabla A23.</b> Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo de eosinófilos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia. ....	123
<b>Tabla A24.</b> Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ).....	124
<b>Tabla A25.</b> Análisis <i>post hoc</i> de AUC_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi*Tcru.....	124
<b>Tabla A26.</b> Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de desafíos ambientales en la resistencia a <i>Tri. spiralis</i> . Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.....	125
<b>Tabla A27.</b> Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de desafíos ambientales en la resistencia a <i>Try. cruzi</i> . Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.....	125
<b>Tabla A28.</b> Modelo lineal mixto que describe el efecto de <i>Try. cruzi</i> intensidad y desafíos ambientales en PTR. Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....	125
<b>Tabla A29.</b> Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de <i>Try. cruzi</i> intensidad y desafíos ambientales en alanina amino transferasa (ALT). Las variables significativas aparecen en negrita (valor $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.....	126
<b>Tabla A30.</b> Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de <i>Try. cruzi</i> intensidad y desafíos ambientales en aspartato amino transferasa (AST). Las	

variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.....126

**Tabla A31.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en albúmina (ALB). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....127

**Tabla A32.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en cambio en IMC post infección ( $\Delta$ IMC). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....127

**Tabla A33.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en cambio en IMC post infección ( $\Delta$ IMC). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....128

**Tabla A34.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en albúmina (ALB). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....128

**Tabla A35.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en Peso testicular relativo (PTR). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....129

**Tabla A36.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en aspartato amino transferasa (AST). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....129

**Tabla A37.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en alanina amino transferasa (ALT). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis. ....130

## Abreviaturas y símbolos

AcNs: anticuerpos naturales.

AIC: criterio de información de Akaike.

AICc: criterio de información de Akaike de segundo orden.

ALB: albúmina.

ALT: alanina aminotransferasa.

Anti-ASB: anticuerpos específicos anti albúmina sérica bovina.

Anti-Tcru: anticuerpos específicos anti *Trypanosoma cruzi*.

Anti-Tspi: anticuerpos específicos anti *Trichinella spiralis*

ASB: albúmina sérica bovina.

AST: aspartato aminotransferasa.

AUC: área bajo la curva, del inglés *area under the curve*.

BCR: receptor de antígeno de linfocitos B.

CPK: Creatina fosfokinasa (UI/L[Unidades internacionales por Litro]).

CS: conflicto social, en el cual el mecanismo de estrés social estuvo determinado tanto por inestabilidad social como hacinamiento.

DO: densidad óptica.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ES: excreción-secreción.

FAS: Fosfatasa alcalina (UI/L[Unidades internacionales por Litro]).

GAM: modelos aditivos generalizados.

GAMM: modelos aditivos generalizados mixtos.

GLMM: modelos lineales generalizados mixtos.

HCl: ácido clorhídrico.

IgA: inmunoglobulina A.

IgE: inmunoglobulina E.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

IL: interleuquina.

KLH: hemocianina de lapa.

LTfh: linfocito T folicular *helper* específico.

LMM: modelos lineales mixtos.

min: minuto.

NET: trampas extracelulares de neutrófilos.

nm: nanómetro.

NK: células *natural killer*.

PBS: *buffer* fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PRT: peso relativo testicular.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa.

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

r.p.m.: revoluciones por minuto.

Tspi: Grupo experimental expuesto a infección por *Tri. spiralis*. La inoculación se realizó mediante la administración de 100 larvas musculares suspendidas en solución fisiológica

estéril a través de una sonda gástrica vía oral (Falduto et al., 2015). Las larvas se obtuvieron a partir de tejido muscular de ratón mediante la técnica de digestión artificial (Nöckler y Kapel, 2007).

Tcru: Grupo experimental expuesto a infección por *Try. cruzi*. La dosis infecciosa consistió en 250.000 tripomastigotes de *Try. cruzi* (cepa Tulahuen DTU- TcVI), que se mantuvieron de forma rutinaria en ratones BALB/c mediante pases seriados (Pascutti et al., 2003). La dosis infectiva de tripomastigotes se determinó basándose en un ensayo piloto desarrollado previamente (ver ANEXO I) y se administró por vía intraperitoneal.

TCR: receptor de antígeno de linfocitos T.

Th1: células/linfocitos T colaboradores/auxiliares tipo 1 (en inglés *T helper 1*). Son un subtipo de linfocitos T CD4+ efectoros que están involucrados en la respuesta inmunitaria contra patógenos intracelulares como virus y ciertas bacterias.

Th2: células/linfocitos T colaboradores/auxiliares tipo 2 (en inglés *T helper 2*). Son un subtipo de linfocitos T CD4+ efectoros que están involucrados en la respuesta inmunitaria contra patógenos extracelulares como parásitos helmintos.

$\Delta$ IMC: cambio post-inmunización del índice de masa corporal.

$\mu$ l: microlitro.

$\mu$ g: microgramo.

## Resumen

Desde una perspectiva ecofisiológica, los hospedadores emplean dos estrategias principales de defensa para superar las infecciones: la resistencia, que limita la aptitud del patógeno, y la tolerancia, que reduce el daño de la infección. Estas estrategias, junto con la respuesta inmune, su principal mediador, pueden ser influenciadas por factores externos como la escasez de alimento, el conflicto social y las coinfecciones. Esta tesis investiga las estrategias de defensa de ratas de laboratorio infectadas con *Trichinella spiralis* y/o *Trypanosoma cruzi* bajo desafíos ambientales. Después de cuatro semanas de tratamientos ambientales (restricción alimentaria y/o conflicto social), las ratas fueron expuestas a *Tri. spiralis* y/o *Try. cruzi*. Seis semanas después de la inoculación, se midieron la intensidad del parásito y varios indicadores de salud o enfermedad. Los resultados mostraron que la tolerancia a *Try. cruzi* aumentó en presencia de conflicto social y restricción alimentaria, pero disminuyó en ratas coinfectadas en comparación con las mono infectadas. Por el contrario, las ratas mono infectadas con restricción alimentaria exhibieron menor tolerancia. En el caso de *Tri. spiralis*, la tolerancia aumentó con la restricción alimentaria y la coinfección. Además, se observó un posible cambio en la estrategia de defensa: las ratas mono infectadas expuestas a conflicto social fueron más resistentes, pero menos tolerantes a *Tri. spiralis*. En cuanto a la respuesta inmune, los desafíos ambientales mejoraron ciertos indicadores de la respuesta inmune celular, mientras que la coinfección influyó en la inversión en estos indicadores. En general, los hallazgos subrayan la naturaleza dependiente del contexto de las estrategias de defensa en este modelo de infección y sugieren respuestas adaptativas a los desafíos ambientales. Comprender estos mecanismos de defensa es crucial, dado el papel significativo de los roedores como reservorios de patógenos zoonóticos.

## Abstract

From an eco-physiological perspective, hosts employ two primary defense strategies to overcome infections: resistance, which limits pathogen fitness, and tolerance, which reduces infection damage. These strategies, along with the immune response, their main mediator, can be influenced by external factors such as food scarcity, social conflict, and coinfections. This thesis investigates the defense strategies of laboratory rats infected with *Trichinella spiralis* and/or *Trypanosoma cruzi* under environmental challenges. After four weeks of environmental treatments (food restriction and/or social conflict), the rats were exposed to *Tri. spiralis* and/or *Try. cruzi*. Six weeks post-inoculation, parasite intensity and various health or pathology indicators were measured. The results showed that tolerance to *Try. cruzi* increased in the presence of social conflict and food restriction but decreased in coinfecting rats compared to monoinfected ones. Conversely, monoinfected rats with food restriction exhibited lower tolerance. For *Tri. spiralis*, tolerance increased with food restriction and coinfection. Furthermore, there appeared to be a shift in defense strategy: monoinfected rats exposed to social conflict were more resistant but less tolerant to *Tri. spiralis*. Regarding the immune response, environmental challenges enhanced certain cellular immune response indicators, while coinfection influenced the investment in these indicators. Overall, the findings underscore the context-dependent nature of defense strategies in this infection model and suggest adaptive responses to environmental challenges. Understanding these defense mechanisms is crucial, given the significant role of rodents as reservoirs of zoonotic pathogens.

**CAPÍTULO I: ¿La estrategia de defensa varía según el contexto? Una introducción a los conceptos de resistencia y la tolerancia**

## **I.I. Introducción**

En la actualidad, las enfermedades infecciosas y parasitarias constituyen una problemática a escala global, que afecta tanto a humanos como a animales (Dharmarajan et al., 2022). Esto implica una amenaza a la salud y al bienestar general, que se encuentra potenciada debido a cambios ambientales de origen antrópico ligados a las formas de producción, migraciones, cambios de densidad demográfica, entre otros (Jones et al., 2008; Thompson, 2013; Webster et al., 2016). Los animales silvestres cumplen un rol preponderante en la transmisión de numerosas de estas enfermedades (Thompson, 2013; Webster et al., 2016). Dentro del ámbito de la ecoinmunología y la ecofisiología, se ha comenzado a explorar la complejidad de las defensas de los hospedadores en un contexto ecológico y evolutivo (Martin et al., 2006; Lazzaro y Little, 2009; Jackson et al., 2014; Råberg, 2014; Jackson, 2015; Balard y Heitlinger, 2022). Estudios en esta área han revelado un amplio espectro de posibilidades que surgen de la interacción entre el hospedador y el parásito<sup>1</sup>. Los escenarios más extremos incluyen la ausencia total de infección, individuos con altas intensidades de infección pero con perjuicios limitados (a veces denominados “superpropagadores”), esterilidad (Singh y Best, 2023) o la muerte del hospedador (Beldomenico y Begon, 2010, 2016).

Existen múltiples factores que pueden influir en la variabilidad de estos escenarios. Entre los más destacados se encuentran las estrategias de defensa del hospedador, a saber, la resistencia y la tolerancia (Råberg et al., 2009). La resistencia tiene como principal objetivo combatir al organismo invasor (énfasis sobre la causa); mientras que la tolerancia implica minimizar los daños de la infección (énfasis sobre las consecuencias) (Råberg et al., 2009). Ambas estrategias suponen costos, perjuicios y beneficios, lo que influirá de manera determinante en la interacción hospedador-parásito y sus consecuencias (Råberg et al., 2009; Manzoli et al., 2018; McNew et al., 2019).

---

<sup>1</sup> En la presente tesis nos referimos a patógeno y parásito indistintamente, tal como es utilizado en ecología de enfermedades o eco-epidemiología, y lo definimos como: agente transmisible (viral, bacteriano, parasitario o micótico) que mantiene con su hospedador una interacción inter-específica de parasitismo que resulta, en mayor o menor medida, deletérea para este último.

### I.I.I. Influencia de desafíos ambientales sobre las estrategias de defensa

Diariamente, los animales deben enfrentarse a desafíos ambientales abióticos, como el clima, y bióticos, que incluyen, entre otros factores, la competencia por recursos limitados (como alimentos y refugio), las complejidades sociales (competencia intra- y/o inter-específica), la presencia de depredadores y el parasitismo (Boonstra, 2013; Boonstra et al., 2014; Binning et al., 2017). En un escenario de cambio climático y globalización, tanto los elementos bióticos como abióticos están experimentando alteraciones significativas a un ritmo acelerado (Mas-Coma et al., 2009; Gellesch et al., 2013; Bozinovic y Pörtner, 2015; Spence y Tingley, 2020). En las últimas décadas, se ha evidenciado un período de cambios sin precedentes en términos tecnológicos, demográficos y climáticos. Por ejemplo, el número de vuelos aéreos se ha duplicado desde el año 2000, la población urbana supera a la rural desde 2007 y el cambio climático se ha convertido en una creciente amenaza para la sociedad (Baker et al., 2022).

Estos cambios globales han potenciado el riesgo de brotes de patógenos emergentes, reemergentes y endémicos que se propagan rápidamente, indicando la posibilidad de una nueva era en el ámbito de las enfermedades infecciosas (Baker et al., 2022). El estudio de las variaciones en las estrategias de defensa de los hospedadores según el contexto ambiental comenzó hace unos años, centrándose principalmente en factores como la disponibilidad de alimento y factores estacionales (Kutzer y Armitage, 2016; Knutie et al., 2017; Miller y Cotter, 2018; McNew et al., 2019). Dos de los desafíos ambientales más comúnmente enfrentados por los animales son la escasez de alimento y el conflicto social (Creel et al., 2013; Schultner et al., 2013).

La restricción de alimentos representa un factor ambiental crucial que influye en las estrategias de defensa del hospedador (Knutie et al., 2017; Miller y Cotter, 2018). El impacto de la disponibilidad de recursos en la resistencia y la tolerancia del hospedador puede depender de factores como el estadio de la infección (Knutie et al., 2017) y el sistema hospedador-parásito estudiado (Budischak y Cressler, 2018). En términos generales, la escasez de alimentos disminuye tanto la tolerancia, restringiendo la capacidad del hospedador para compensar los costes de la infección (Budischak y

Cressler, 2018), como la resistencia, limitando los recursos disponibles para combatir las infecciones (Cressler et al., 2014; Agostini et al., 2017).

No obstante, algunos estudios han informado de que la restricción alimentaria también puede potenciar ciertos aspectos de la respuesta inmunitaria (Eberhardt et al., 2013; Cuervo et al., 2018; Moleón et al., 2018), lo cual podría suponer consecuencias para las estrategias de defensa. Por un lado, hay casos en los que la restricción alimentaria puede favorecer la tolerancia (Ayres y Schneider, 2009; Cornet et al., 2014; Budischak y Cressler, 2018). Esta respuesta podría atribuirse al efecto de la anorexia, que podría desempeñar un papel terapéutico al reducir la movilidad y conservar las reservas de energía del hospedador para otros procesos (Bernardo y Singer, 2017). También podría aumentar la resistencia al proporcionar suficientes recursos para combatir la infección (Cressler et al., 2014).

La alta densidad de hospedadores es otro desafío externo que, potencialmente, puede conducir al hacinamiento y al conflicto social, impactando en las estrategias de defensa (Alaidrous et al., 2022). Sin embargo, hasta la fecha, en nuestro conocimiento, sólo hay un estudio que examinó el efecto de la densidad del hospedador y la restricción alimentaria en la tolerancia y la resistencia (Alaidrous et al., 2022). En este estudio encontraron que la susceptibilidad y tolerancia de las mariposas monarca (*Danaus plexippus*) a un parásito protozoario (*Ophryocystis elektroscirrha*) se mantuvo constante a través de diferentes densidades de orugas (Alaidrous et al., 2022).

La mayoría de los estudios se han centrado principalmente en examinar la relación entre la densidad de hospedadores y la respuesta inmune (por ejemplo, Møller et al., 2006; Becker et al., 2018; Cuervo et al., 2018) o la densidad de hospedadores y la dinámica de la infección (Buck y Lutterschmidt, 2017; Albery et al., 2020). Desde la perspectiva de la “hipótesis de la profilaxis dependiente de la densidad” (*density-dependent prophylaxis hypothesis*), los organismos invierten más en su sistema inmunitario cuando viven en poblaciones de alta densidad, ya que corren un mayor riesgo de enfermedad (Michel et al., 2016). En línea con esta hipótesis, estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que las ratas expuestas al conflicto social y la restricción de alimentos

impactaron positivamente en la respuesta inmune humoral innata y adquirida en ratas (Cuervo et al., 2018). Por otro lado, según la “hipótesis del estrés por hacinamiento” (*crowding stress hypothesis*), los hospedadores que residen en entornos de alta densidad experimentan mayores niveles de estrés, lo que los hace más susceptibles a las infecciones como resultado de la regulación negativa del sistema inmune (Lin et al., 2018).

### I.I.II. Estrategias de defensa en coinfección

En la naturaleza, lo usual es que un hospedador esté simultáneamente infectado por distintos parásitos (coinfecciones), lo cual constituye otro factor crucial en la modulación de la tolerancia y la resistencia (Balard et al., 2020; Ramsay y Rohr, 2021). Los parásitos coinfectantes tienen la capacidad de interactuar directa o indirectamente entre sí mientras se encuentren dentro de su hospedador, lo que conlleva una serie de consecuencias que afectan a la dinámica de las poblaciones de parásitos, a la estructura de su comunidad y a las características del propio hospedador (Pedersen y Fenton, 2007; Vaumourin et al., 2015; Rovenolt y Tate, 2022). Las interacciones indirectas pueden surgir de la modulación de la respuesta inmune, como, por ejemplo, a través de un equilibrio Th1-Th2 o un efecto inmunosupresor, así como también por la competencia por los recursos disponibles dentro del hospedador. Por otro lado, las interacciones directas pueden originarse a partir de la facilitación mecánica o, por el contrario, por la competencia por la localización física de los parásitos (Pedersen y Fenton, 2007; Rovenolt y Tate, 2022).

Esto podría tener consecuencias significativas en cuanto a las estrategias de resistencia y de tolerancia. Por ejemplo, una especie de parásito que genere inmunidad cruzada hacia una segunda especie podría promover la resistencia hacia esta última. En otro escenario potencial, la competencia entre dos parásitos por recursos dentro del hospedador podría llevar al hospedador a realizar compensaciones (en inglés *trade-offs*) entre la respuesta inmune y otros procesos como el crecimiento y la reproducción, lo cual podría afectar la tolerancia. Sin embargo, las investigaciones previas que han explorado la influencia de las coinfecciones tanto en la tolerancia como en la resistencia son limitadas (Kutzer et al., 2019; Schoenle et al., 2019; Balard et al., 2020; Ramsay y Rohr, 2021; Rovenolt y Tate, 2022; Rovira-Díaz et al., 2022).

### I.I.III. Consecuencias de la interacción hospedador-parásito: dos caras de una misma moneda

Los efectos de la exposición a un parásito pueden analizarse tanto desde el punto de vista de los atributos del hospedador, como del parásito. Mientras que la resistencia y la tolerancia se asocian al éxito del hospedador, el éxito del parásito está determinado por diversos factores que influyen en su capacidad para infectar, crecer y transmitirse. Calcular la adecuación biológica (en inglés *fitness*) de un parásito es esencial para comprender la evolución de la relación entre hospedador y parásito (Vale y Little, 2009).

Aunque en modelos teóricos se emplea frecuentemente la tasa reproductiva básica  $R_0$  para expresar el *fitness*, su cuantificación empírica resulta desafiante. Debido a esta dificultad, los estudios experimentales suelen recurrir a otras medidas indirectas vinculadas a los resultados de la infección, como la intensidad de la infección y la productividad (Refardt y Ebert, 2007; Manzoli et al., 2018). Sin embargo, es importante destacar que la cuantificación precisa de la intensidad parasitaria y la productividad (por ejemplo, en el contexto de infecciones con parásitos sanguíneos polimorfos) puede ser un desafío debido a la variabilidad individual y las limitaciones técnicas en la detección y medición de estos parámetros (Ramírez et al., 2015; Mulenga et al., 2021).

### I.I.IV. Sistema inmune y su relación con la resistencia y la tolerancia

Los mecanismos de resistencia han sido ampliamente estudiados en animales, e incluyen barreras anatómicas, procesos inmunológicos, fisiológicos y comportamentales (Murphy y Weaver, 2017; Amoroso, 2021). Entre éstos, el sistema inmune presenta una serie de mecanismos celulares y humorales altamente relacionados que cumplen un rol esencial en la resistencia a patógenos (Råberg et al., 2009). Por otra parte, los mecanismos de tolerancia han sido reconocidos en animales hace escasos años (Råberg et al., 2007). Los que se consideran en la actualidad son la reparación de tejidos, inmunidad contra toxinas y regulación del sistema inmune para limitar la inmuno-patología (Råberg et al., 2009; Sears et al., 2011; Gause et al., 2013). En consecuencia, tanto la resistencia como la

tolerancia implican una variedad de mecanismos inmunológicos que pueden mediar a ambas estrategias, tanto de manera independiente como simultánea (Råberg et al., 2009).

El sistema inmune se caracteriza por una compleja serie de mecanismos celulares y humorales altamente interrelacionados, cuyo fin común es hacer frente al patógeno, controlando la infección (Murphy y Weaver, 2017). Estos mecanismos son complejos y se dividen en dos grandes grupos: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa o adquirida (Tizard, 2019). El sistema inmune innato o inespecífico es la primera línea de defensa contra las infecciones y dirige el curso de las respuestas inmunes adaptativas posteriores. Asimismo, el sistema inmune adquirido conlleva una respuesta específica y a largo plazo, ya que se ajusta con el tiempo para reconocer patógenos específicos de manera más eficaz, generando memoria inmunológica (Murphy y Weaver, 2017).

El análisis del perfil leucocitario se considera un indicador apropiado para evaluar la respuesta inmunitaria mediada por células en estudios ecológicos (Biard et al., 2015). En la mayoría de los roedores, este análisis abarca el conteo total de glóbulos blancos y el conteo diferencial de cada uno de los cinco tipos celulares: linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos (Washington y Van Hoosier, 2012). Entre estas células, los linfocitos se clasifican en linfocitos B y linfocitos T, las cuales son células con especificidad de antígeno que coordinan conjuntamente la respuesta inmune adquirida (Murphy y Weaver, 2017).

En lo que respecta a la respuesta inmune innata celular, esta es mediada por células NK (*natural killer*), leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos (Tizard, 2019). Los neutrófilos se generan en médula ósea, y aumentan rápidamente en circulación sanguínea como respuesta a procesos inflamatorios, y desempeñan un papel clave en la eliminación de microorganismos opsonizados mediante fagocitos (Weiss y Wardrop, 2011). Los eosinófilos y basófilos participan en procesos inflamatorios mediante la liberación de proteínas activas, y también actúan como células presentadoras de antígenos. Además, los eosinófilos desempeñan un papel crucial en las defensas contra helmintos (Weiss y Wardrop, 2011). Por último, los monocitos, que

tienen una vida media prolongada, están vinculados a las defensas contra infecciones al transformarse en macrófagos luego de migrar a los tejidos (Weiss y Wardrop, 2011).

Los linfocitos B y T expresan receptores que les permiten reconocer de manera específica los antígenos. Cuando estos receptores se encuentran con un antígeno, activan a las células, además de generar memoria inmunológica (Weiss y Wardrop, 2011; Murphy y Weaver, 2017; Abbas et al., 2022). Cuando un antígeno se une a su receptor (BCR), se genera la primera señal de activación de los linfocitos B. Seguidamente se recibe una segunda señal proporcionada por un linfocito T folicular *helper* (LTfh) específico para el antígeno (Murphy y Weaver, 2017). El LTfh producirá citoquinas que interaccionarán con receptores en células B, logrando su activación seguida de proliferación y diferenciación en células plasmáticas, productoras de anticuerpos específicos para el antígeno que las estimuló (Weiss y Wardrop, 2011). Por otro lado, los linfocitos T reconocen los antígenos -a través del receptor de antígeno de las células T (TCR)- en el marco de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Posteriormente se produce una segunda señal, impartida por el reconocimiento de las moléculas coestimuladoras expresadas por la célula dendrítica y el mismo linfocito T (Murphy y Weaver, 2017). Como resultado, los linfocitos T se activan, y se produce una proliferación mediada por IL-2, lo que llevará a la expansión y diferenciación en diferentes tipos de linfocitos T efectores (Weiss y Wardrop, 2011).

Existen dos subpoblaciones de linfocitos T: CD4+ y CD8+. Luego de su activación mediante la acción de células dendríticas, los linfocitos CD4+ se diferenciarán en células colaboradoras (también conocidas como linfocitos T *helper*), mientras que los linfocitos CD8+ se diferenciarán en células citotóxicas (Murphy y Weaver, 2017). Las células citotóxicas están especializadas en la destrucción de células infectadas por virus u otros patógenos intracelulares. Por otro lado, las células T colaboradoras activan funciones efectoras apropiadas para la eliminación del patógeno, a través de la producción de citoquinas específicas (Fainboim, 2012). Por otro lado, existe un grupo de células denominadas T reguladoras, las cuales tienen la función de suprimir la actividad de otros linfocitos y colaborar en la limitación del daño que podría ser causado por una activación prolongada de la respuesta inmune (Murphy y Weaver, 2017).

El sistema inmune humoral está mediado principalmente por los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, que desempeñan un papel esencial en la inmunidad de los vertebrados. Los anticuerpos actúan en la sangre y en los espacios extracelulares, y tienen la capacidad de neutralizar patógenos, bloqueando su unión a las células del hospedador. Además, activan el sistema de complemento, promoviendo así la migración celular hacia los sitios de infección y estimulando la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos (Murphy y Weaver, 2017).

Los anticuerpos naturales (AcNs) son moléculas que se encuentran presentes en diversos grupos de vertebrados, y se caracterizan por brindar una protección amplia contra una gran diversidad de antígenos. A diferencia de otros anticuerpos, los AcNs no requieren de una exposición previa a un antígeno para ser producidos. Esto los hace particularmente importantes en la defensa contra la infección inicial por un patógeno, así como en la eliminación de células dañadas y en la regulación del sistema inmunológico (Murphy y Weaver, 2017; Tizard, 2019).

Los anticuerpos específicos son componentes clave del sistema inmunológico adquirido, ya que reconocen específicamente a los antígenos, mediando mecanismos de eliminación de los mismos (Tizard, 2019). Tal como se mencionó previamente, los linfocitos T colaboradores ayudan en la activación de los linfocitos B para que produzcan anticuerpos (Murphy y Weaver, 2017). En un primer momento, la respuesta humoral que se activa se caracteriza por un rápido aumento inicial de anticuerpos específicos del tipo IgM (generalmente en 5-7 días). Posteriormente, este proceso inicial es seguido por una mejora en la afinidad, un cambio en el tipo de anticuerpo y la subsiguiente producción abundante de anticuerpos IgG, IgA e IgE (Murphy y Weaver, 2017).

## **I.II. Objetivos**

En la presente tesis doctoral se propone investigar cómo diferentes desafíos ambientales modulan las estrategias implementadas (resistencia y/o tolerancia) por hospedadores en dos modelos diferentes de hospedador-parásito: un protozoo, *Trypanosoma cruzi*, y un nematodo, *Trichinella spiralis*, en ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*, var. Wistar/Cmedc). El conocimiento que se desarrolle a partir de este enfoque será de particular relevancia para la comprensión de la ecología de las zoonosis y su aplicación en veterinaria y salud pública.

### General:

Evaluar, en ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus* - Wistar/Cmedc) la modulación de las estrategias de defensa (resistencia y/o tolerancia) ante infecciones por distinto tipo de parásitos (protozoo *Trypanosoma cruzi*, y/o nematodo *Trichinella spiralis*) frente a diferentes escenarios de desafíos ambientales.

### Específicos:

- i) Establecer el efecto de la exposición crónica a desafíos ambientales (solos o interactuando), sobre compartimentos de la respuesta inmune humoral y celular frente a diferentes parásitos (protozoo, nematodo, o ambos).
- ii) Establecer si la exposición a desafíos ambientales (solos o interactuando) produce cambios en la estrategia de defensa (resistencia y/o tolerancia) implementada y su eficacia, en ratas expuestas a una mono- o coinfección por parásitos.
- iii) Evaluar si los cambios en las estrategias de defensa que produjeran los desafíos ambientales tienen impacto sobre el éxito de parásitos de distinta índole (protozoo/nematodo) infectando en forma única o en combinación.

### **I.III. Hipótesis y predicciones**

#### Hipótesis

La exposición crónica a desafíos modula las estrategias de defensa frente a parásitos, determinando contrastes en las consecuencias de la interacción parásito-hospedador (virulencia y productividad parasitaria).

#### Predicciones

- i) Ratas expuestas a desafíos ambientales (restricción alimentaria y/o hacinamiento) presentan mayor inversión en inmunidad ante nematodos o protozoos, en comparación con las ratas en grupos control.
- ii) En situaciones de coinfección, la presencia de un protozoo afecta la resistencia, la tolerancia y la virulencia de los nematodos, y vice versa.
- iii) La producción de parásitos se va a ver favorecida por la restricción alimentaria y el hacinamiento (y especialmente cuando ambos se combinan) y por la coinfección (en especial cuando se da en circunstancias de restricción alimentaria y hacinamiento).

## **CAPÍTULO II: Diseño experimental, condiciones y procedimientos**

## II.I. Justificación del modelo hospedador-parásito seleccionado

Los roedores (orden Rodentia) se encuentran entre los principales reservorios de los patógenos responsables de enfermedades zoonóticas (Meerburg et al., 2009; Thompson, 2013; Webster et al., 2016). En Argentina, desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de diversas zoonosis, como la triquinelosis, el mal de Chagas, la leptospirosis, el hantavirus y la fiebre hemorrágica argentina, entre otras (Loffler et al., 2014; Orozco et al., 2014; Sequeira et al., 2016; Vadell y Gómez Villafaña, 2016). Por lo tanto, resulta crucial y de especial relevancia en los campos de veterinaria y salud pública entender los elementos que afectan la susceptibilidad de los roedores como portadores y reservorios de patógenos.

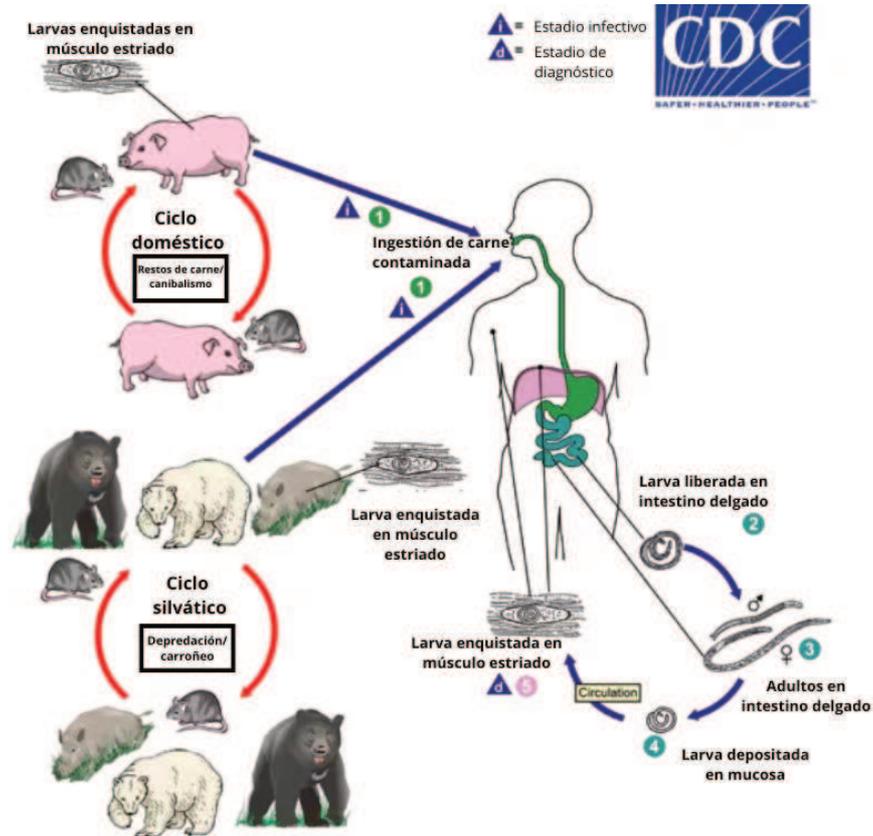
Se utilizaron como modelos parasitarios un protozoo, *Trypanosoma cruzi* (*Try. cruzi*), y un nematodo, *Trichinella spiralis* (*Tri. spiralis*), debido a: i) su relevancia como agentes causales de enfermedades zoonóticas (Schmunis y Yadon, 2010; Murrell y Pozio, 2011); ii) que estimulan dos respuestas inmunes diferentes (Falduto et al., 2015; Acevedo et al., 2018); iii) el rol de los roedores en su mantenimiento y transmisión en la naturaleza (Larrieu et al., 2004; Ribicich et al., 2010; Orozco et al., 2014; Yefi-Quinteros et al., 2018). Además, estos organismos son relativamente fáciles de mantener en condiciones de laboratorio, con un riesgo bajo o moderado para el personal (Clase II) (Malkmus, 2006).

En consideración de lo expuesto, en el presente estudio se analizará la variación de las estrategias de resistencia/tolerancia ante infecciones, simples o simultáneas, de parásitos de diferente naturaleza. Para ello, se utilizará como modelo de protozoo a *Trypanosoma cruzi* (*Try. cruzi*), y como modelo de nematodo a *Trichinella spiralis* (*Tri. spiralis*).

*Trichinella spiralis* es una especie de nematodo que se transmite al ingerir carne con presencia de larvas enquistadas (Pozio, 2000). Es la única especie de *Trichinella*, de las 12 especies o genotipos reconocidos, que es transmitida y mantenida tanto a nivel doméstico como silvestre (Pozio et al., 2009). En Argentina, *Tri. spiralis* se ha detectado en cerdos (*Sus scrofa domesticus*), jabalíes (*Sus scrofa*), perros (*Canis lupus familiaris*),

gatos (*Felis catus*), armadillos (*ChaetophRACTUS villosus*), pumas (*Puma concolor*), comadreja overa (*Didelphis albiventris*), ratas (*Rattus norvegicus*) y en leones marinos sudamericanos (*Otaria flavescens*) (Ribicich et al., 2020). Las ratas juegan un importante papel en la transmisión de *Tri. spiralis* desde animales domésticos a silvestres y viceversa (Schad et al., 1987; Leiby et al., 1990).

*Trichinella spiralis* tiene un ciclo autoheteroxeno con dos fases: una intestinal, desde la liberación de la larva infectiva hasta la producción de una nueva generación por el adulto, y otra parental, con migración sistémica e infección muscular por la larva 1 (L1) (Wu et al., 2016; Bruschi, 2021). Las larvas musculares enquistadas (L1 infectantes) se liberan en el intestino delgado del hospedador, penetran la mucosa y, tras cuatro mudas, se desarrollan en adultos. Machos y hembras copulan en el intestino y las hembras penetran la mucosa, donde empiezan a parir larvas recién nacidas (LRN) alrededor del día 6 o 7 post-infección. Las LRN entran en sangre o linfa, se distribuyen por el cuerpo y, a los 17 días post-infección, se vuelven infectivas. Estas larvas migran e infectan preferentemente fibras musculares estriadas (Wu et al., 2016; Bruschi, 2021) (Fig. 1).

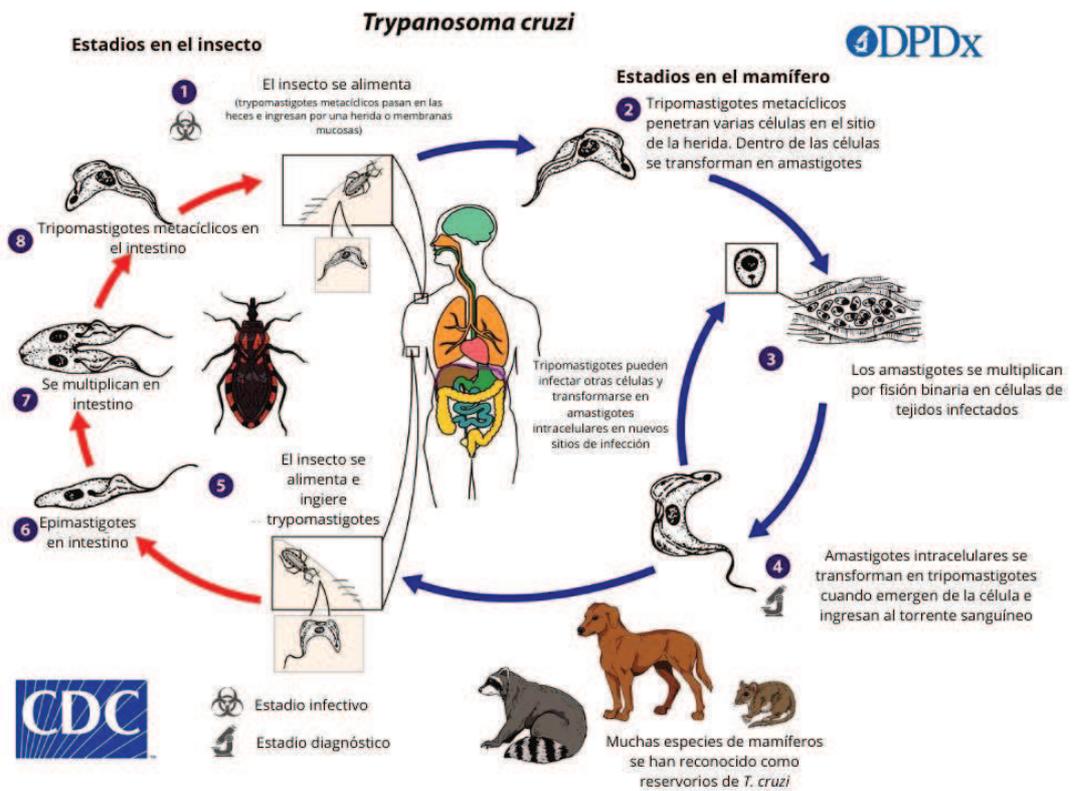


**Figura 1.** Ciclo biológico de *Trichinella spiralis* (adaptado de: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria, 2024).

Por su parte, *Try. cruzi* es un protozoo parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados, y es el agente causal de la enfermedad de Chagas (De Souza et al., 2010; Telleria y Tibayrenc, 2017). *Trypanosoma cruzi* atraviesa tres fases morfológicas y fisiológicas distintas durante su ciclo de vida, que se distinguen por la posición del cinetoplasto respecto al núcleo celular y la presencia del flagelo: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes. El ciclo biológico comienza cuando los insectos hematófagos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) succionan la sangre de vertebrados infectados con tripomastigotes. Algunos tripomastigotes se transforman en epimastigotes, migran al intestino del insecto, se dividen y se adhieren a la membrana perimicrovillar. En la parte posterior del intestino y en el recto, muchos epimastigotes se desprenden y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que se liberan con las heces y la orina del insecto. La infección en mamíferos ocurre generalmente cuando estas

formas infecciosas entran en el cuerpo a través de la mucosa ocular o la piel lesionada durante la picadura del insecto (De Souza et al., 2010; Telleria y Tibayrenc, 2017).

Se distinguen dos ecosistemas específicos asociados a *Try. cruzi*: uno vinculado a triatomíneos y mamíferos silvestres, y otro dependiente de triatomíneos que residen en entornos domésticos, afectando principalmente a seres humanos y animales domésticos (Telleria y Tibayrenc, 2017). La interconexión entre estos dos ecosistemas se desarrolla a través de la transmisión por ratas infectadas, ratones, murciélagos, marsupiales y otros mamíferos silvestres (De Freitas et al., 2006). En cuanto a la transmisión en roedores, en sigmodontinos se han reportado prevalencias de infección que fluctúan entre 10,1 y 21,9% (Orozco et al., 2014, 2016). Sin embargo, es escasa la información disponible en el país acerca de su rol como reservorio de esta enfermedad. No obstante, cabe destacar que en áreas rurales de Chile se han reportado prevalencias cercanas al 83% en la rata negra (*Rattus rattus*) (Yefi-Quinteros et al., 2018) (Fig. 2).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Try. cruzi* (adaptado de: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria, 2024).

## II.II. Condiciones de alojamiento

Los objetivos propuestos fueron abordados mediante el desarrollo de cuatro experimentos, los cuales se ejecutaron de manera no simultánea debido a la falta de disponibilidad de espacio en el bioterio y por cuestiones de logística. Se utilizó un total de 128 ratas macho de laboratorio adultas (32 ejemplares por cada uno de los cuatro experimentos), de diez semanas de edad (*Rattus norvegicus*, var. Wistar/Cmedc), provistas por el bioterio del Centro de Medicina Comparada (CMC) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (Santa Fe, Argentina). Se eligieron machos porque su comportamiento se ve más afectado por las interacciones sociales que el de las hembras

(Blanchard et al., 2001). Los animales fueron alojados en una sala experimental con condiciones controladas de temperatura, humedad relativa e iluminación.

Se realizó un período de aclimatación de dos semanas, durante el cual se obtuvieron semanalmente mediciones morfométricas (peso y longitud) y muestras de sangre (para evaluar variables hematológicas), con el fin de asegurar que los animales no presentaran diferencias significativas de base. Luego del período de aclimatación, se procedió con el comienzo de los tratamientos.

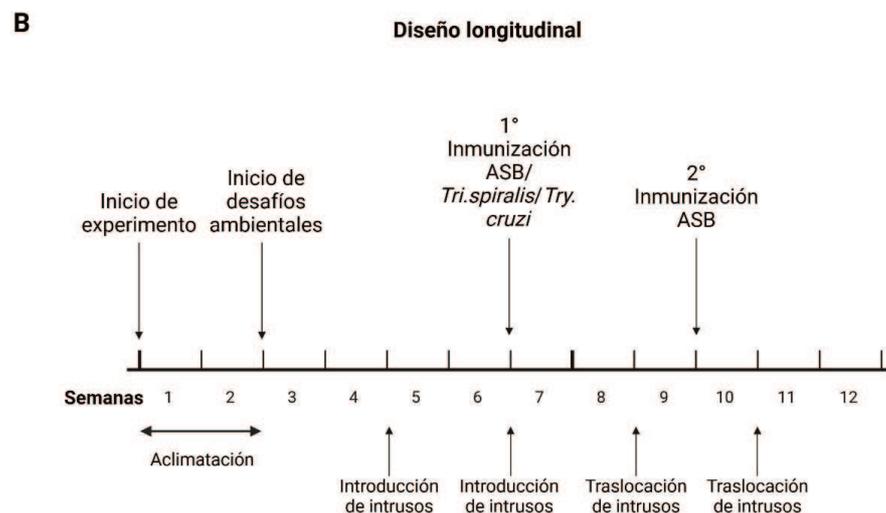
### **II.III. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño factorial completo  $4^2$ . Los animales fueron expuestos a dos tipos de desafíos: ambientales y antigénicos. En este contexto, los desafíos ambientales se refieren a exposiciones controladas a factores externos diseñados para replicar condiciones naturales que los organismos enfrentan en su entorno (Boonstra, 2013). En este estudio, se utilizaron las siguientes combinaciones de desafíos ambientales (detalladas en la Fig. 1A):

- Grupo control (ambiental) (R[0] CS[0]): Dos ratas por jaula con acceso a comida *ad libitum*.
- Grupo restricción alimentaria (R[1] CS[0]). Dos ratas por jaula recibiendo el 60% de la ración media consumida por las ratas del grupo control.
- Grupo conflicto social (R[0] CS[1]). Cuatro ratas por jaula con acceso a comida *ad libitum*.
- Grupo restricción alimentaria + conflicto social (R[1] CS[1]). Cuatro ratas por jaula recibiendo el 60% de la ración media consumida por las ratas del grupo Control.



Tcru (1) : infección por *Trypanosoma cruzi*  
 Tspi (1) : infección por *Trichinella spiralis*  
 R (1): restricción alimentaria  
 CS (1): conflicto social  
 : Intrusos



**Figura 3.** A- Tratamientos aplicados en cada jaula. R: restricción alimentaria; CS: conflicto social; Tcru: presencia de *Try. cruzi*; Tspi: presencia de *Tri. spiralis*. Los intrusos están sombreados en gris. B- Cronología de los procedimientos experimentales.

Se mantuvo un grupo adicional de 32 ratas (ocho por experimento), que compartían las mismas características y condiciones ambientales, con el fin de que sirvieran de “intrusas” para mantener la inestabilidad social en las jaulas con tratamiento CS (1). Dos semanas después del inicio de los tratamientos, se introdujo un “intruso” en cada jaula CS (1). Este procedimiento se repitió dos semanas después. Una vez alcanzada la densidad máxima permitida de seis ratas/jaula, cada dos semanas se trasladó un “intruso” de una jaula a otra, manteniendo el conflicto social. En la Sem4, las muestras del grupo Tspi (0) Tcr (0) se coagularon (parcial o totalmente) posterior a la extracción, por lo que no pudieron ser analizadas.

Tras cuatro semanas de exposición a desafíos ambientales, se procedió a realizar los desafíos antigénicos de los animales. Definimos como desafío antigénico a la exposición de un hospedador a antígenos específicos, con el propósito de activar la respuesta inmune (Demas et al., 2011). Dado que el enfoque de la propuesta es analizar procesos crónicos, las dosis infectivas de cada parásito fueron las utilizadas para el mantenimiento del ciclo en el laboratorio, buscando así una mayor supervivencia de los animales objeto de estudio. Los cuatro experimentos a desarrollar variaron entre sí según la conformación evaluada de la relación hospedador-parásito. Los desafíos antigénicos fueron los siguientes (Fig. 3A):

- Grupo control infección (Tspi[0] Tcr[0]): se realizaron inmunizaciones con ASB (albúmina sérica bovina), en las semanas cuatro y seis post inicio de los desafíos ambientales. Cada inmunización constó de 100 µg de ASB suspendida en hidróxido de aluminio 15%, dividiéndose el volumen final (200 µl) en dos dosis subcutáneas a ambos lados del flanco. En este caso, los animales no fueron infectados con parásitos, con el fin de evaluar la respuesta inmunológica (particularmente, la inmunidad adquirida) sin el efecto del parásito.
- Grupo Tspi (Tspi[1] Tcr[0]): la infección por *Tri. spiralis* se indujo mediante la administración de 100 larvas musculares suspendidas en solución fisiológica estéril a través de una sonda gástrica vía oral (Falduto et al., 2015). Las larvas se obtuvieron a partir de tejido muscular de ratón mediante la técnica de digestión artificial (Nöckler y Kapel, 2007).

- Grupo Tcru (Tspi[0] Tcru[1]): la dosis infecciosa consistió en 250.000 tripomastigotes de *Try. cruzi* (cepa Tulahuen DTU- TcVI), que se mantuvieron de forma rutinaria en ratones BALB/c mediante pases seriados (Pascutti et al., 2003). La dosis infectiva de tripomastigotes se determinó basándose en un ensayo piloto desarrollado previamente (ver ANEXO I) y se administró por vía intraperitoneal.
- Grupo Tspi + Tcru (Tspi[1] Tcru[1]): los individuos fueron infectados con ambos parásitos simultáneamente.

Para garantizar la uniformidad, se implementaron los mismos protocolos de inoculación en cada experimento, administrando solución fisiológica estéril a través de las distintas vías utilizadas en los demás experimentos. Por ejemplo, en el caso del experimento Tspi(0) Tcru(1), además de la inoculación de los parásitos por vía intraperitoneal, se realizaron dos inyecciones subcutáneas y la administración por sonda gástrica vía oral, todas ellas con solución fisiológica. Este enfoque se replicó de manera consistente en todos los experimentos.

#### **II.IV. Procedimientos y registro de variables**

Las muestras y variables de interés fueron obtenidas semanalmente durante todo el experimento. Se registró el peso corporal con una precisión de 0,1 gramos y la longitud corporal con una precisión de un milímetro, medida desde la punta del hocico hasta la base de la cola. El índice de masa corporal se calculó según Labocha et al., (2014) como el logaritmo del peso corporal dividido por el logaritmo de la longitud corporal.

Además, semanalmente se tomaron muestras de sangre entera. Antes de la extracción, los individuos fueron inmovilizados físicamente y la cola fue limpiada con etanol al 70%. La extracción de sangre se realizó entre 3 y 5 minutos después de la inmovilización para evitar alteraciones debido al estrés. Estas acciones fueron llevadas a cabo en conjunto con el personal del CMC. Las muestras de sangre se obtuvieron de las venas coccígeas con un volumen máximo de aproximadamente 300  $\mu$ l. Cada muestra se colocó en un tubo tipo eppendorf con EDTA como anticoagulante.

En un plazo de 2-3 horas posteriores a la extracción, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: primero, se realizó un análisis hematológico completo utilizando un analizador automático para hematología veterinaria (BC-2800Vet, Mindray®) con una alícuota de aproximadamente 13 µl de sangre entera. Luego del análisis, se hicieron dos extendidos sanguíneos por individuo para el conteo diferencial de glóbulos blancos. Finalmente, se separó y preservó el plasma: el volumen restante de sangre entera se centrifugó a 2000 g durante tres minutos, se separó el plasma de los glóbulos y se conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

Diez semanas después del inicio de los desafíos ambientales y seis semanas después de la inoculación de los parásitos, se anestesió a los animales y se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardíaca. El plasma recogido se utilizó para el análisis de parámetros bioquímicos. Posteriormente, se practicó la eutanasia a los animales (siguiendo el protocolo del CMC) y se extrajeron, pesaron y conservaron cuidadosamente órganos específicos con el fin de realizar estudios posteriores esenciales (ver diseño longitudinal en la Fig. 3B).

#### **II.V. Declaración ética**

Todos los protocolos aquí descritos han obtenido la aprobación del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina), con los números de referencia 296/16 y 540/19.

### **CAPÍTULO III: Variación de la respuesta inmune frente a desafíos ambientales y antigénicos**

### **III.I. Introducción**

El resultado de la interacción hospedador-parásito está determinado en gran medida por la plasticidad del hospedador, definida como la capacidad de un organismo para expresar diferentes fenotipos en respuesta a cambios en el entorno (Gervasi et al., 2015). Esta plasticidad puede manifestarse en los esfuerzos de defensa. Como se mencionó en el capítulo I, desde una perspectiva ecofisiológica, existen dos estrategias de defensa del hospedador: resistencia y tolerancia (Råberg et al., 2009; Råberg, 2014). La resistencia se centra en combatir al organismo invasor (enfocándose en la causa), mientras que la tolerancia busca minimizar los daños causados por la infección (enfocándose en las consecuencias) (Råberg et al., 2009).

Tanto la resistencia como la tolerancia implican una variedad de mecanismos inmunológicos que pueden mediar a ambas estrategias, tanto de manera independiente como simultánea (Råberg et al., 2009). Esto se ha estudiado particularmente en el contexto de la resistencia: diferentes niveles de inversión en resistencia pueden llevar a reducciones similares en la intensidad parasitaria, y viceversa. Reconocer esta variabilidad es esencial para lograr una comprensión más completa del fenómeno. Para abordar estas cuestiones, Manzoli et al., (2018) sugieren no solo medir la resistencia cuantitativa (es decir, inversa a la intensidad parasitaria), sino también evaluar la inversión en resistencia mediante un indicador de la respuesta inmunitaria inflamatoria. Este enfoque es relevante considerando que la mayoría de los estudios previos se han centrado en los resultados de los esfuerzos para eliminar los parásitos, en lugar de destacar la inversión realizada en dicho proceso.

#### **III.I.I. Respuesta inmune ante parásitos**

La respuesta del hospedador a una infección parasitaria puede observarse en diferentes niveles o escalas. Por un lado, hay una respuesta local en el sitio de la infección, que puede enfocarse en la reparación de tejidos o en controlar la propagación y el daño inicial del parásito (Rynkiewicz et al., 2019). Por otro lado, existe una respuesta sistémica en todo el organismo, donde los componentes inmunitarios que circulan en la sangre y el

bazo coordinan una respuesta más amplia a la infección (Murphy y Weaver, 2017; Rynkiewicz et al., 2019). Mientras que las respuestas inmunitarias locales influyen en la susceptibilidad del hospedador y en el éxito de la infección de los parásitos en el sitio específico, las respuestas sistémicas afectan la susceptibilidad a los parásitos que coinfectan otros tejidos dentro del hospedador (Rynkiewicz et al., 2019).

En la naturaleza lo usual es que un hospedador esté concomitantemente infectado por distintos parásitos (coinfecciones) (Ramsay y Rohr, 2021). Los parásitos que coexisten tienen la capacidad de interactuar de manera directa o indirecta dentro de sus hospedadores, generando una serie de consecuencias que afectan la dinámica de las poblaciones parasitarias dentro del hospedador, la estructura global de la comunidad parasitaria y las características del propio hospedador (Pedersen y Fenton, 2007; Vaumourin et al., 2015; Rovenolt y Tate, 2022).

La coexistencia de infecciones puede resultar en efectos perjudiciales o beneficiosos entre los parásitos infectantes, y los mecanismos que rigen estas interacciones han sido objeto de un exhaustivo examen en la literatura existente (ver Pedersen y Fenton, 2007; Hananeh et al., 2022; Rovenolt y Tate, 2022; Rovira-Diaz et al., 2022). Las interacciones perjudiciales pueden surgir cuando los parásitos compiten directamente por los recursos del hospedador. Alternativamente, estas interacciones perjudiciales pueden ser indirectas, ocurriendo cuando hay inmunidad cruzada, donde la exposición a un patógeno proporciona cierto grado de protección o inmunidad frente a otro patógeno diferente (Pedersen y Fenton, 2007; Hananeh et al., 2022). Las interacciones beneficiosas, ya sean directas o indirectas, también son posibles. Las interacciones positivas directas pueden resultar de una facilitación mecánica, mientras que las interacciones positivas indirectas pueden ocurrir en casos de inmunosupresión o de un *trade-off* Th1-Th2 (Pedersen y Fenton, 2007; Hananeh et al., 2022).

Entre los compartimentos que comprenden la respuesta inmune adquirida, los linfocitos T *helper* (Th) CD4+ son un grupo de células que tienen un rol crítico en la defensa e inmunorregulación del hospedador. La plasticidad de estas células les permite diferenciarse principalmente en dos perfiles efectoras: Th1 y Th2, los cuales difieren en

sus mecanismos efectoros, las citoquinas que producen y la expresión de factores de transcripción (Hirahara et al., 2011). Ante la exposición a parásitos intracelulares (protozoos, virus), el sistema inmune activa preferentemente un perfil efector de tipo Th1, con respuesta inflamatoria. Mientras que frente a parásitos helmintos se activa una respuesta de tipo Th2, con un fuerte perfil supresor y mecanismos inmuno-moduladores, los cuales facilitan al parásito su propia supervivencia. Al mismo tiempo, esta respuesta generada frente a helmintos suprime aquella frente a microparásitos intracelulares (principalmente Th1), y viceversa (Maizels et al., 2004; Díaz y Allen, 2007).

Al igual que otros parásitos helmintos, *Tri. spiralis* desencadena una respuesta inmunitaria de tipo Th2, que dan lugar a la producción de anticuerpos específicos (principalmente IgE) y citoquinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-21 e IL-33) (Ilic et al., 2012; Bruschi et al., 2022). Las células B y T reguladoras, la polarización de los macrófagos en un perfil M2 y citoquinas como IL-10, jugarían un rol fundamental en la inmunomodulación ejercida por el parásito (Falduto et al., 2015). Esta regulación inmune podría beneficiar tanto al parásito como al hospedador (Aranzamendi et al., 2013). Por otra parte, se ha comprobado que la infección por *Try. cruzi* desencadena una respuesta proinflamatoria Th1 intensificada durante las primeras semanas, caracterizada por niveles elevados de interferón gamma en la circulación, lo cual está asociado con daños, en ocasiones letales (Acevedo et al., 2018). Se desconoce si las respuestas ante ambos parásitos se ven afectadas por factores como el conflicto social y la restricción alimentaria.

### III.I.II. La influencia de desafíos ambientales sobre la respuesta inmune

Es sabido que la respuesta inmune puede ser significativamente afectada por desafíos ambientales (Sapolsky et al., 2000; Beldomenico y Begon, 2016). Por ejemplo, resultados previos de un experimento realizado por nuestro grupo de trabajo con carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*), sugieren que el hecho de tolerar o resistir helmintos depende de la exposición a estrés: animales bajo estrés nutricional elevaron sus defensas contra helmintos y redujeron sus cargas, mientras que animales no estresados las toleraron, pero al mismo tiempo se volvieron más vulnerables a protozoos (Eberhardt

et al., 2013). En otro estudio, encontramos que las ratas expuestas a la combinación de conflicto social con restricción alimentaria tenían un efecto sinérgico positivo sobre la respuesta inmune humoral innata (Cuervo et al., 2018). Además, los animales expuestos a cualquiera de los estresores, o a ambos, mostraron mayores niveles de respuesta humoral adquirida (Cuervo et al., 2018). Estos hallazgos -tanto en carpinchos como en ratas- sugieren que el contexto ambiental tiene fuerte influencia sobre la capacidad de un hospedador para resistir o tolerar una infección, lo que finalmente influirá sobre su transmisión.

La modulación de compartimentos y perfiles del sistema inmunológico por parte de desafíos ambientales puede influir en el patrón de resistencia/tolerancia ante infecciones exhibido por el hospedador (Råberg et al., 2009; Guivier et al., 2010; Råberg, 2014; Armitage, 2016). Tanto la resistencia como la tolerancia involucrarían una variedad de mecanismos inmunes, los cuales podrían afectar a ambas estrategias tanto en forma aislada como simultánea (Råberg et al., 2009). Es importante resaltar que los mecanismos puestos en marcha suponen costos para el hospedador, ya que requieren redistribución de recursos (Lochmiller y Deerenberg, 2000) y -en el caso concreto de la resistencia- implicarían efectos inmunopatológicos (Graham et al., 2005; Best et al., 2012).

En el presente capítulo se evaluó la modulación de la respuesta inmune frente a *Tri. spiralis* y *Try. cruzi* en mono- y coinfección frente a diferentes desafíos ambientales. Para ello, se utilizaron dos enfoques analíticos: por un lado, un análisis longitudinal para evaluar la variación de la respuesta inmune frente a los diferentes parásitos a lo largo del tiempo; por otro lado, un análisis del efecto de los desafíos ambientales y antigénicos en los niveles post-inmunización de distintos indicadores de la respuesta inmune en sangre periférica. Se planteó la predicción de que la inversión en la respuesta inmune frente a los diferentes parásitos sería mayor en situaciones de exposición a desafíos ambientales.

### **III.II. Materiales y métodos**

#### **III.II.I. Evaluación de parámetros inmunológicos celulares**

El conteo leucocitario total se realizó utilizando un equipo para análisis clínicos veterinarios (BC 2800 Vet, Mindray®) en un plazo inferior a cuatro horas después de la extracción de la muestra de sangre. Posteriormente, se prepararon extendidos sanguíneos que fueron coloreados mediante la técnica de May-Grünwald-Giemsa. Brevemente: los frotis fueron fijados y teñidos durante 3 minutos con la tinción May Grünwald, luego se enjuagó con agua destilada durante 1 minuto y por último se tiñó con Giemsa por un lapso de 15 minutos (Biopur, Argentina). Una vez finalizada la última etapa, los frotis se enjuagaron con agua corriente, luego con agua destilada y se colocaron de manera vertical para dejarlos secar a temperatura ambiente.

A partir de los extendidos se llevó a cabo un conteo diferencial de los glóbulos blancos, considerando un mínimo de 100 células, las cuales fueron clasificadas según sus características morfológicas (Weiss y Wardrop, 2011). El conteo absoluto de cada tipo de glóbulo blanco se determinó multiplicando el conteo diferencial por el total de glóbulos blancos. Se decidió examinar únicamente los conteos absolutos en lugar de las proporciones de cada tipo celular, ya que esta última ofrece información limitada sobre los cambios en el perfil de glóbulos blancos, según lo señalado por Weiss y Wardrop (2011). Los basófilos no fueron evaluados, ya que se encontraron en baja cantidad y en pocos individuos.

#### **III.II.II. Evaluación de parámetros inmunológicos humorales**

Como marcadores de la función inmune humoral se determinaron los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) y anticuerpos específicos (IgG, IgM, IgA). Para ello se utilizó la técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay* o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) indirecto, siguiendo el protocolo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (Cuervo, 2017; Cuervo et al., 2018), con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en el principio inmunológico de la interacción entre anticuerpos y un antígeno específico. La unión entre el antígeno y el

anticuerpo tiene lugar en la superficie de los pocillos de una microplaca, donde previamente se ha inmovilizado el conjugado antígeno-anticuerpo. Para la lectura de los resultados, uno de los componentes del ensayo (antígeno o anticuerpo) está unido a una enzima. Esta enzima, al interactuar con el sustrato adecuado, cataliza la formación de un producto coloreado (observable a simple vista), cuantificable mediante espectrofotometría.

Antes de la evaluación de los niveles de anticuerpos, se optimizó la técnica: se determinaron las concentraciones y diluciones de trabajo de antígenos parasitarios, anticuerpos conjugados con peroxidasa diluidos en PBS (*buffer* fosfato salino) 1X, y pool de muestras problemas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Detalles del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

	AcNs	Anti-ASB	Anti-Tspi	Anti-Tcru
Antígeno	KLH <sup>1</sup>	ASB <sup>2</sup>	Antígenos <i>Tri. spiralis</i> <sup>3</sup>	Antígenos <i>Try. cruzi</i> <sup>4</sup>
Dilución del antígeno	0,1 µg/100 µl	0,5 µg/100 µl	0,5 µg/100 µl	0,5 µg/100 µl
Dilución de la muestra a evaluar	1:100	1:400	1:100	1:100
Anticuerpo secundario <sup>5</sup>	1:1000	1:100000	1:7500	1:7500
Punto de corte y lectura	10 minutos	10 minutos	10 minutos	10 minutos

**Referencias:** <sup>1</sup> Sigma-Aldrich® (Saint Louis, USA); <sup>2</sup>Fundación Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina); <sup>3</sup>antígenos de excreción-secreción de larvas musculares de *Tri. spiralis* (ISS643) brindados por el Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”; <sup>4</sup>antígenos hechos de homogenato de *Try. cruzi* (Sylvio x10) brindados por el Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral; <sup>5</sup>Anticuerpo secundario hecho en conejo anti IgG, IgA e IgM de rata, ABCAM®

Los AcNs fueron evaluados cada dos semanas entre las Sem0 y Sem10; mientras que, en el caso de los anticuerpos específicos, se evaluaron semanalmente entre las Sem6

(momento de la inmunización) y Sem10. A continuación, se describirán brevemente los procedimientos utilizados.

En un primer paso, se trataron las microplacas de poliestireno (de fondo plano y alto pegado, Grenier Bio-One®) con el antígeno según cada caso, que fue diluido en una solución buffer de bicarbonato de sodio (pH = 9,6). Para los AcNs, se empleó hemocianina de lapa (KLH), una proteína comúnmente utilizada. En el caso de los anticuerpos específicos, se empleó albúmina sérica bovina (ASB) en el grupo de animales no infectados. En contraste, en aquellos infectados con *Tri. spiralis* y/o *Try. cruzi*, se utilizaron antígenos parasitarios suministrados por miembros del Grupo Colaborador para sensibilizar las placas, junto con anticuerpos comerciales de rata conjugados con peroxidasa de la marca ABCAM (antígenos de excreción-secreción de larvas musculares de *Tri. spiralis* y antígenos de homogenato de *Try. cruzi*. Ver referencia en Tabla 1).

La placa se incubó a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación a 4 °C hasta el día siguiente para lograr la adhesión del antígeno. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS (pH = 7,4) y 0,05% de detergente Tween 20 (PBS-T; pH = 7,4). Luego de la serie de lavados (3 lavados de 1 min), las placas fueron bloqueadas con 200 µl/pocillo de una solución al 3% de leche descremada en polvo en PBS para reducir uniones inespecíficas.

A continuación, se incubó durante 1 h a 37 °C, luego de lo cual se realizó una nueva serie de lavados con PBS-T. Después del lavado, se agregaron por duplicado 100 µl/pocillo de cada muestra de plasma a evaluar, las cuáles fueron previamente diluidas con una solución al 1% de leche descremada en polvo en PBS (Tabla 1).

En cada placa de 96 pocillos, se procesaron todas las muestras semanales de cada individuo, asegurándose de que las muestras procesadas no fueran del mismo grupo experimental. Esto tuvo como fin reducir la posible influencia de la variación entre placas. Además, en cada placa se incluyó como control interno y duplicado una muestra de plasma obtenida en la Sem13, de una rata de la misma edad, inmunizada y mantenida en las mismas condiciones que los animales del grupo control, pero que no participó en el experimento. Posteriormente, esta muestra se utilizó para normalizar los datos.

Luego, las placas fueron selladas y colocadas en incubación a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron lavados adicionales con PBS-T para eliminar cualquier anticuerpo primario no unido en los pocillos. Después de completar la serie de lavados, se agregaron 100 µl de una dilución de anticuerpos secundarios conjugados a una enzima (ver Tabla 1) a cada pocillo. Las placas fueron nuevamente selladas e incubadas durante 1 hora a 37 °C para permitir que el anticuerpo secundario se uniera al primario. Una vez finalizada la incubación, se llevó a cabo otro lavado con PBS-T para eliminar el anticuerpo secundario no unido. A continuación, se añadieron 100 µl de sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA) a cada pocillo.

La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 1 M. Dentro de los 20 minutos de detener la reacción enzimática, se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo utilizando un lector de absorbancia equipado con un filtro de 450 nm de longitud de onda (SPECTROstar Nano, BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Germany). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la DO media de cada par de pocillos, considerando la proporción en relación con la muestra de plasma utilizada como control interno para la variación de DO entre ensayos.

### III.II.III. Análisis estadísticos

Los análisis se dividieron en dos: i) un análisis longitudinal para examinar la variación de la respuesta inmune a los diferentes parásitos a lo largo del tiempo; ii) un análisis para evaluar el impacto de los desafíos ambientales y antigénicos en los niveles post-inmunización de los indicadores de la respuesta inmune en sangre periférica. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software *R for Statistical Analysis* versión 4.2.2 (R Core Team y R Core Team, 2022) en RStudio versión 2022.12.0.

#### *Análisis longitudinal*

Se llevó a cabo un análisis longitudinal (medidas repetidas) para evaluar diferentes indicadores de la respuesta inmune frente a desafíos ambientales e inmunológicos a lo largo de las semanas. Las variables respuesta fueron: AcNs, anticuerpos específicos (anti-

ASB, anti-Tspi y anti-Tcru), conteo total y diferencial de leucocitos (linfocitos, eosinófilos, monocitos y neutrófilos). En el caso particular de los anticuerpos, se consideraron las medidas proporcionales con respecto al control interno. El análisis longitudinal abarcó desde la primera semana de inmunización (Sem6 o SemInm0) en adelante, con el objetivo de examinar el impacto de los tratamientos durante la “fase de desafíos ambientales + inmunización”.

El análisis se llevó a cabo mediante modelos aditivos generalizados mixtos (GAMM) mediante los paquetes “mgcv” (Wood, 2012), “mgcViz” (Fasiolo et al., 2018) y “tidymv” (Coretta, 2023). Los GAMM ofrecen un enfoque amplio y adaptable para realizar análisis de regresión en contextos complejos, como aquellos que involucran datos longitudinales. En lugar de ajustarse a una función específica, como una línea recta o una curva polinómica, se realiza una suavización que permite que la relación entre la variable predictora y la respuesta se modele de manera flexible utilizando funciones suaves, como splines o funciones de base penalizadas (Fahrmeir y Lang, 2001).

En todos los modelos se incluyeron como factores fijos el desafío de inmunización con *Try. cruzi* (Tcru [0/1]) y *Tri. spiralis* (Tspi [0/1]). Se evaluó la interacción doble: “Tspi\*Tcru” y también se incluyó la interacción entre la variable suavizada “SemInm” y el desafío de inmunización, esto último para analizar si el patrón semanal difería entre los distintos niveles de infección. Se introdujo el factor “Jaula” como una variable aleatoria para tener en cuenta la posible influencia de pertenecer a la misma jaula y experimento (Tabla 2).

Para determinar la distribución de probabilidad más adecuada, se evaluaron varias opciones utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2020). En el caso de los niveles de anticuerpos, tanto específicos como naturales, se encontró que la distribución *gamma* proporcionaba el mejor ajuste. Para el conteo de eosinófilos, se eligió una distribución *poisson*, mientras que para los conteos de linfocitos y neutrófilos se optó por una distribución binomial negativa. En cuanto a los monocitos, se determinó que la distribución *tweedie* ofrecía el mejor ajuste. Para el conteo total de leucocitos, se aplicó una transformación logarítmica para obtener una representación más adecuada. La

selección modelos se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham et al., 2011), y se informó de la significación de los términos de suavización y de los grados de libertad efectivos (edf).

### *Niveles post-inmunización de indicadores de respuesta inmune frente a desafíos ambientales y antigénicos*

Se evaluaron los niveles post-inmunización de distintos indicadores de la respuesta inmune en sangre periférica. Para ello, se calculó el área bajo la curva (AUC) de cada indicador en cada individuo. El AUC se obtuvo recopilando los valores semanales de cada indicador en cada rata después de la inmunización y sumando los valores bajo la curva de los niveles del indicador a lo largo del tiempo.

Para el cálculo de AUC se utilizó la función “auc” del paquete “MESS” (Ekstrøm, 2023), según la siguiente fórmula:

$$AUC = \int_a^b S(x) dx$$

Donde:

- ✓  $a$  y  $b$  son los límites del intervalo sobre el cual se calcula el área bajo la curva.
- ✓  $S(x)$  es la función interpolante del *spline* cúbico.

Se aplicaron modelos lineales mixtos (LMM). En este caso la variable respuesta fue el AUC de cada indicador, denotada como “AUC\_indicador” (por ejemplo, AUC\_monocitos). Los factores fijos considerados fueron la restricción alimentaria (R [0/1]), el conflicto social (CS [0/1]) y la ocurrencia del parásito coinfectante *Try. cruzi* (Tcru [0/1]) o *Tri. spiralis* (Tspi [0/1]), respectivamente. Se examinaron las interacciones entre los desafíos ambientales y los desafíos antigénicos. Se incluyó el término “Jaula” como efecto aleatorio para tener en cuenta las posibles dependencias entre individuos de la misma jaula y experimento (Tabla 2).

En todos los análisis, se consideró un valor  $p < 0,05$  como significativo. Se empleó el paquete “DHARMA” para evaluar los supuestos de los modelos (Hartig, 2020), y se utilizó el paquete “broom.mixed” para evaluar los valores atípicos mediante análisis de distancia de Cook (Bolker y Robinson, 2022). La selección de modelos se llevó a cabo empleando simultáneamente las funciones “drop1” y “AICc” de los paquetes “lme4” (Bates et al., 2015) y “MUMIn” (Bartón, 2022), respectivamente.

Para ayudar en la interpretación de los resultados, se generaron simulaciones utilizando el paquete “ggplot2” (Wickham y Wickham, 2016). Se realizaron análisis post hoc de contraste cuando fue necesario para comparar entre grupos utilizando los paquetes “emmeans” (Lenth, 2022) y “multcomp” (Hothorn et al., 2008).

**Tabla 2.** Modelos aplicados para los diferentes tipos de análisis de la respuesta inmune ante diferentes desafíos antigénicos y ambientales.

Tipo de análisis	Variables respuesta	Variables explicativas	Factor al azar
<b>Longitudinal</b> (modelo aditivo generalizado mixto) <u>Modelo full:</u> Indicador respuesta inmune ~ s(Jaula, bs = “re”) + Tspi * Tcru + s(semana, bs = “cs”, by = Tspi, k = 4) + s(semana, bs = “cs”, by = Tcru, k = 4)	AcNs, Anti-Tspi, Anti-Tcru, conteo de linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos	Ocurrencia <i>Try.</i> <i>cruzi</i> : Tcru (0/1) Ocurrencia <i>Tri.</i> <i>spiralis</i> : Tspi (0/1) Semana	Jaula
<b>Valores en sangre periférica</b> (modelo lineal generalizado mixto) <u>Modelo full:</u> AUC_indicador respuesta inmune ~ CS * Triq * Tryp + R * Triq * Tryp + (1   Jaula)	Área bajo la curva (AUC) de los siguientes indicadores: AcNs, Anti-Tspi, Anti-Tcru, conteo de leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos	Ocurrencia <i>Try.</i> <i>cruzi</i> : Tcru (0/1) Ocurrencia <i>Tri.</i> <i>spiralis</i> : Tspi (0/1) Conflicto social: CS (0/1) Restricción alimentaria: R (0/1)	Jaula
<b>Referencias:</b> s(jaula, bs = “re”): término de suavizado cúbico para la variable “jaula”, utilizando un efecto aleatorio; s(semana, bs = “cs”, by = Tspi/Tcru, k = 4): Un término de suavizado cúbico para la variable semana, con un spline cúbico sujeto a las variables Tspi y Tcru, con 4 grados de libertad.			

### **III.III. Resultados**

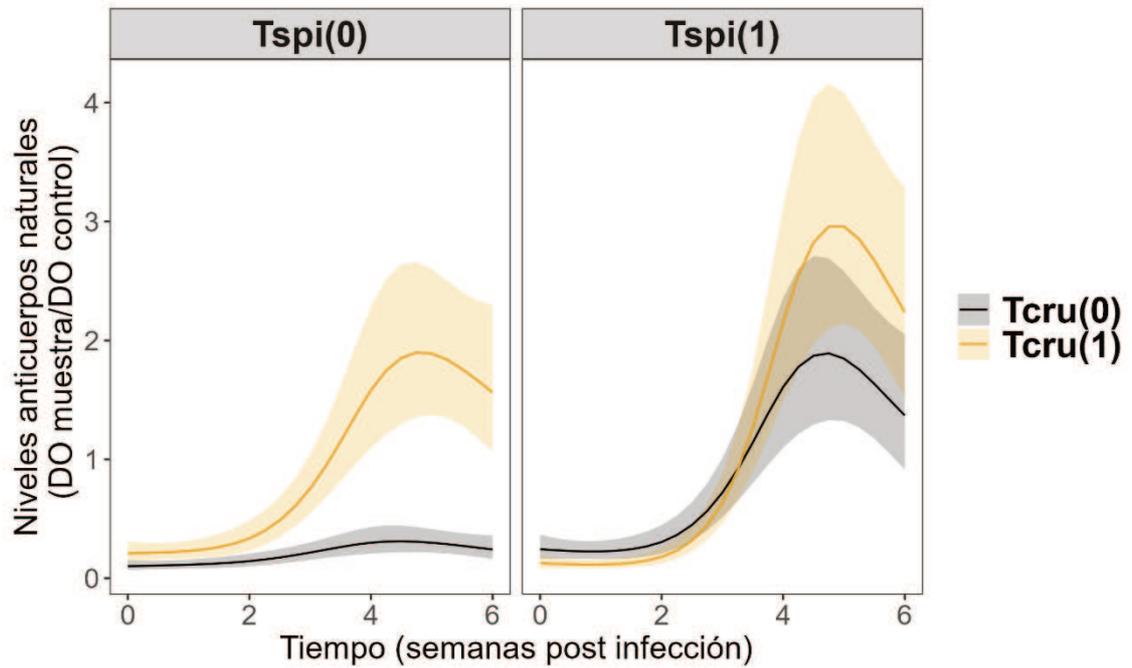
El nivel de todos los marcadores de la respuesta inmune evaluados fue modificado por al menos uno de los desafíos ambientales o antigénicos, a excepción de los anticuerpos específicos para ambos parásitos (ver resumen de resultados en Tabla 3). En lo que respecta a la evolución temporal de la respuesta inmune frente a los parásitos, todos los marcadores evidenciaron cambios no lineales con el tiempo, ya sea de manera diferencial según la combinación de desafíos antigénicos o de manera independiente de este, a excepción de los monocitos.

**Tabla 3.** Resumen de los resultados del análisis del AUC de los diversos indicadores inmunológicos frente a *Try. cruzi* y *Tri. spiralis* en diferentes escenarios de desafíos ambientales.

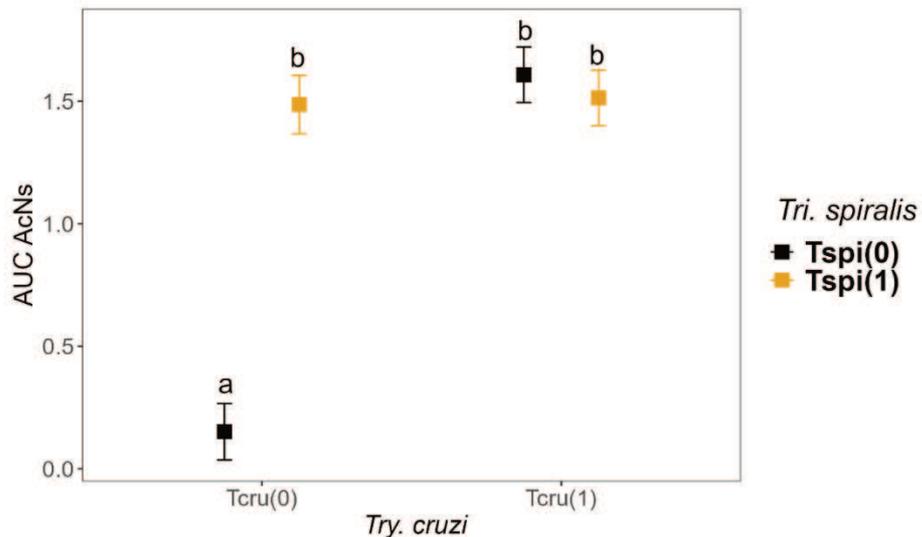
Variable respuesta	Respuesta frente a los desafíos antigénicos
AUC_AcNs	↑ Tspi(1) ↑ Tcru(1)
AUC_anti-Tcru	-
AUC_anti-Tspi	-
AUC_leucocitos	↓ en Tspi(1) / ↑ en Tcru(1) / ↑ en CS(1)
AUC_linfocitos	Tcru(1)*CS(1) > Tcru(1)*CS(0) > Tcru(0) Tcru(1) > Tcru(0)*Tspi(0) > Tcru(0)*Tspi(1)
AUC_neutrófilos	↑ en Tcru(1)*Tspi(0) Tcru(1)*R(0) > Tcru(1)*R(1) Tcru(0)*R(1) > Tcru(0)*R(0) ↑ en CS(1)
AUC_monocitos	↑ en Tcru(1)
AUC_eosinófilos	Tspi(1)*Tcru(0) > Tspi(1)*Tcru(1) > Tspi(0)
<b>Referencias:</b> Modelo lineal (generalizado) mixto: AUC_indicador de la respuesta inmune ~ R * Tspi * Tcru + CS * Tspi * Tcru + (1   jaula). Tcru (0/1): Ocurrencia <i>Try. cruzi</i> . Tspi (0/1): Ocurrencia <i>Tri. spiralis</i> . R (0/1): restricción alimentaria. CS (0/1): conflicto social.	

### III.III.I. Respuesta inmune humoral frente a infecciones en distintos escenarios de desafíos ambientales

Los niveles semanales de AcNs presentaron un aumento significativo con el tiempo a partir de la segunda semana post-inmunización en todos los grupos (Fig. 4). No obstante, en los roedores infectados el aumento fue mayor respecto a los no infectados (Fig. 4, Tabla A3). En relación al análisis de AUC\_AcNs, se observó que fue de menor magnitud en animales que no estaban infectados en comparación con aquellos que sí lo estaban (Fig. 5, Tabla A4). No se evidenciaron diferencias en los niveles de AcNs con respecto al desafío antigénico o a los desafíos ambientales (Fig. 5, Tabla A4).

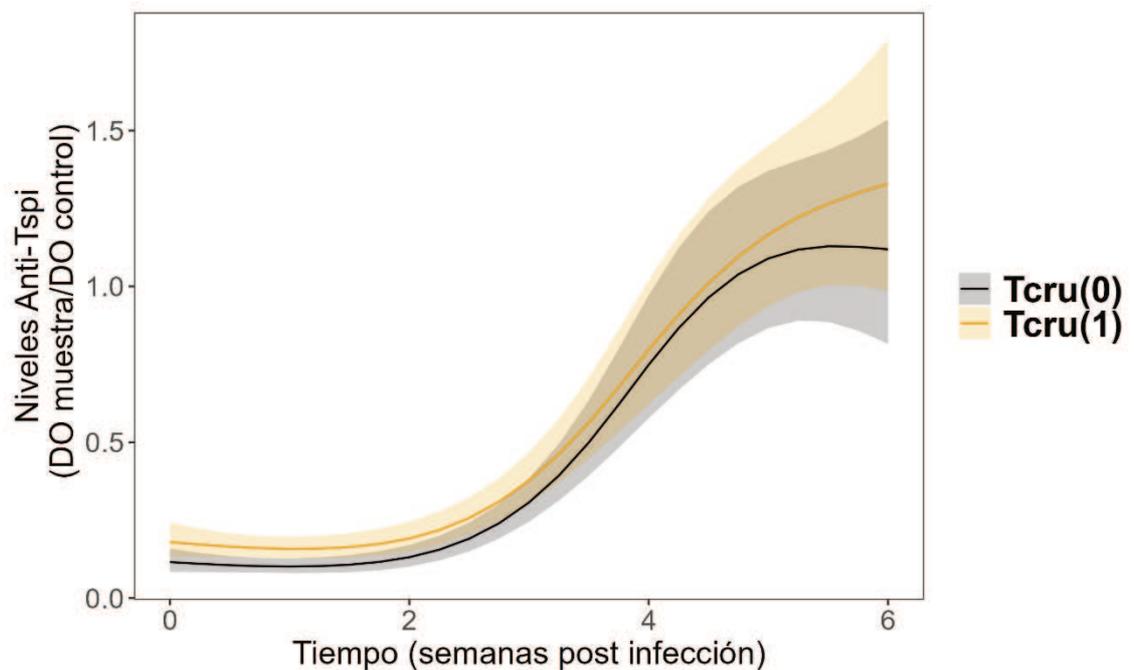


**Figura 4.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles semanales de anticuerpos naturales mediante la técnica de ELISA. AcNs: anticuerpos naturales. DO: densidad óptica. Tspi (1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru (0/1): ocurrencia de *Try. cruzi*.



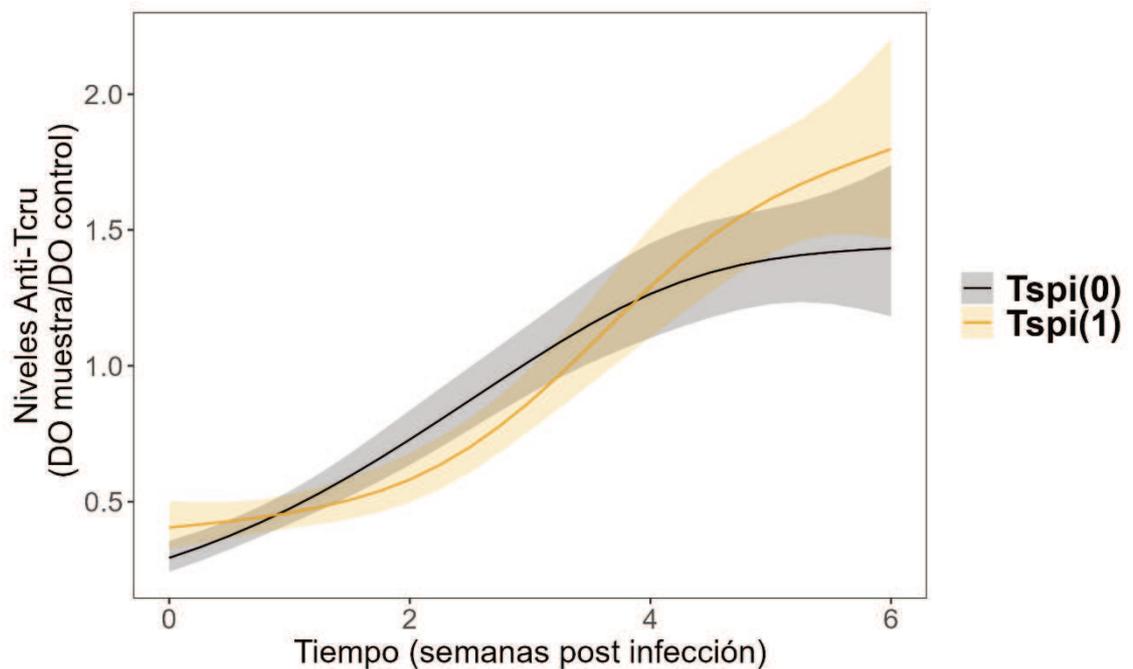
**Figura 5.** Análisis *post-hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con *Try. cruzi* y/o *Tri. spiralis* sobre AUC\_AcNs mediante la técnica de ELISA. Variable respuesta: área bajo la curva (AUC) de los niveles semanales de anticuerpos naturales (AcNs) post-inmunización. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

Los niveles de anticuerpos específicos anti-Tspi se elevaron notoriamente a partir de la segunda semana post-inmunización. No se evidenciaron diferencias entre desafíos antigénicos (Fig. 6, Tabla A5). Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos en AUC\_anti-Tspi (Tabla A6).



**Figura 6.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles de anti-Tspi mediante la técnica de ELISA. Anti-Tspi: anticuerpos anti-*Tri. spiralis*. DO: densidad óptica. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

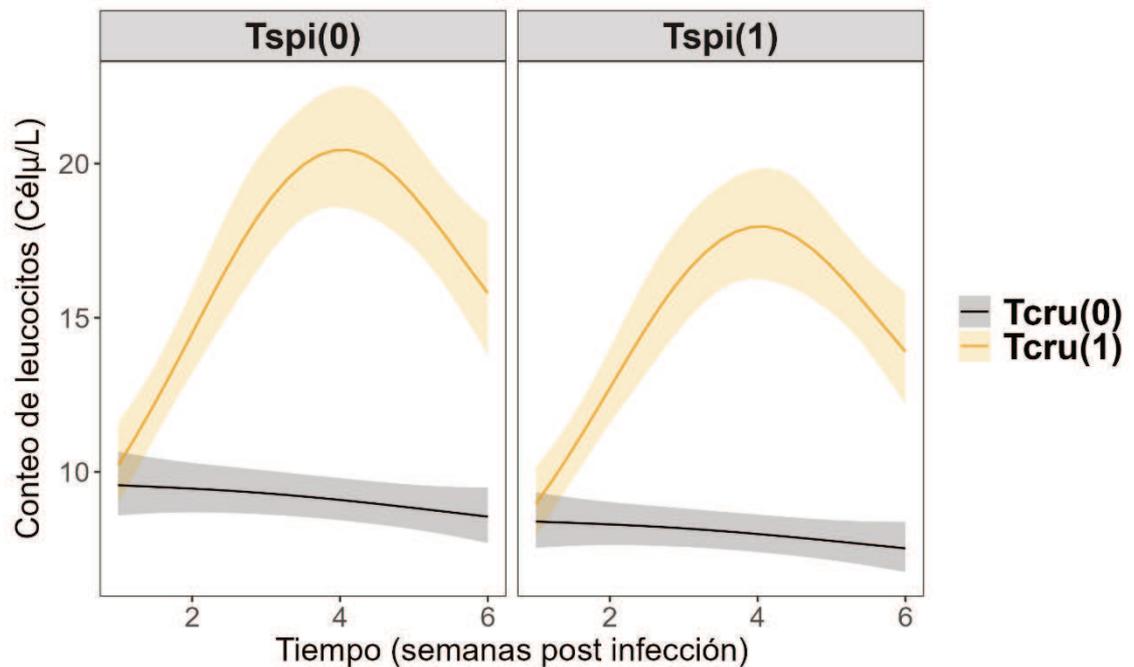
El nivel de anticuerpos específicos anti-Tcru aumentó a partir de la primera semana post-inmunización, sin diferencias significativas entre mono- y coinfección (Fig. 7, Tabla A7). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos en AUC\_anti-Tcru (Tabla A8).



**Figura 7.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre los niveles de anti-Tcru mediante la técnica de ELISA. Anti-Tcru: anticuerpos anti-*Try. cruzi*. DO: densidad óptica. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

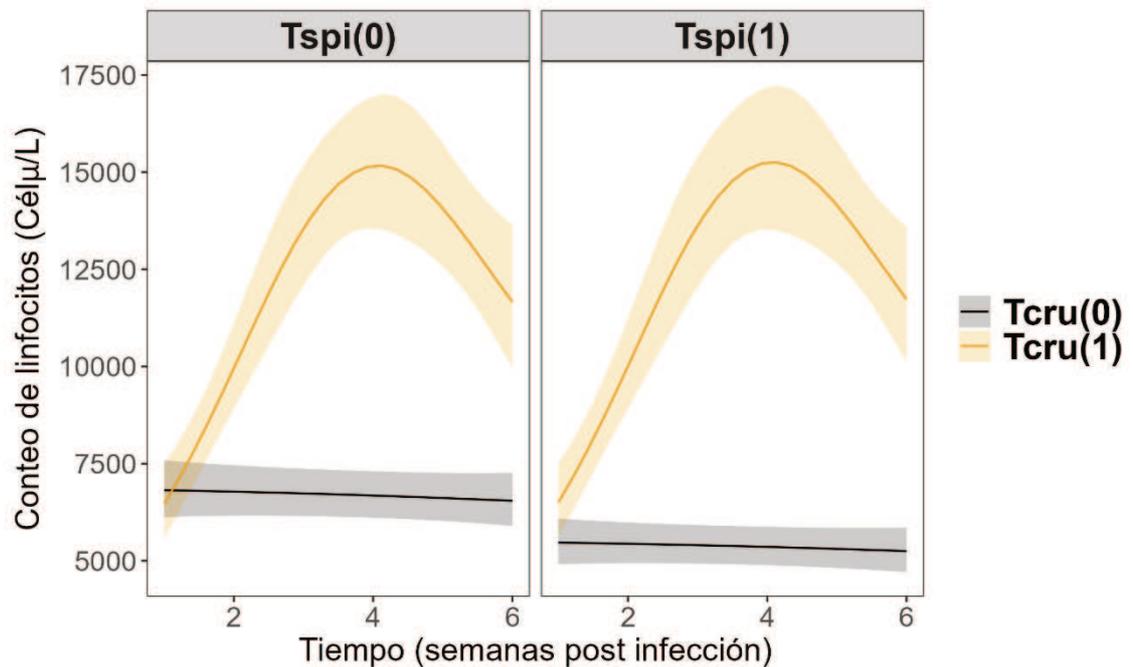
### III.III.II. Respuesta inmune celular frente a infecciones en distintos escenarios de desafíos ambientales

Los individuos expuestos a *Try. cruzi* tuvieron un aumento en el conteo de leucocitos en comparación al resto de los grupos (Fig. 8, Tabla A9). Dado lo complejo de estos procesos y la función específica de cada tipo de leucocito, se ha decidido no incluir el análisis de los niveles semanales de linfocitos post-inmunización. Esto se debe a que cualquier intento de analizar los cambios observados conllevaría a una interpretación arbitraria de la población celular responsable de dichos cambios. Por lo tanto, cada tipo de célula será analizado por separado.



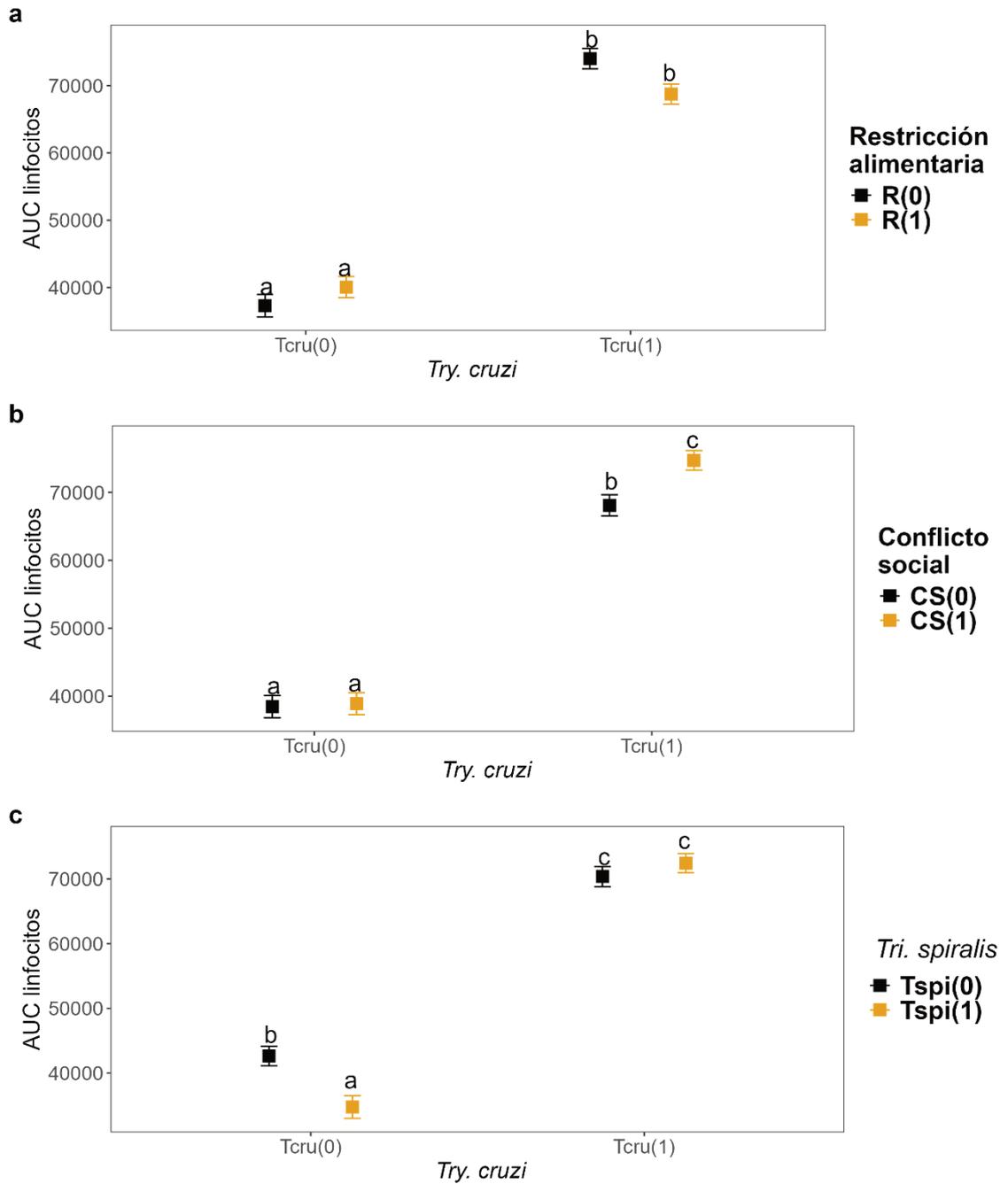
**Figura 8.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de leucocitos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

En presencia de *Try. cruzi*, se incrementó el nivel de linfocitos (Fig. 9, Tabla A10). En cuanto a los niveles post-inmunización de los linfocitos en sangre periférica (AUC\_linfocitos), se registró una interacción significativa entre las variables R y Tcru en el resumen del modelo (Tabla A11). No obstante, esta diferencia no se reflejó en el análisis *post hoc*, donde se observó un nivel más elevado de AUC\_linfocitos en presencia de *Try. cruzi* en comparación con los demás experimentos, independientemente de los desafíos ambientales (Fig. 10a, Tabla A12).



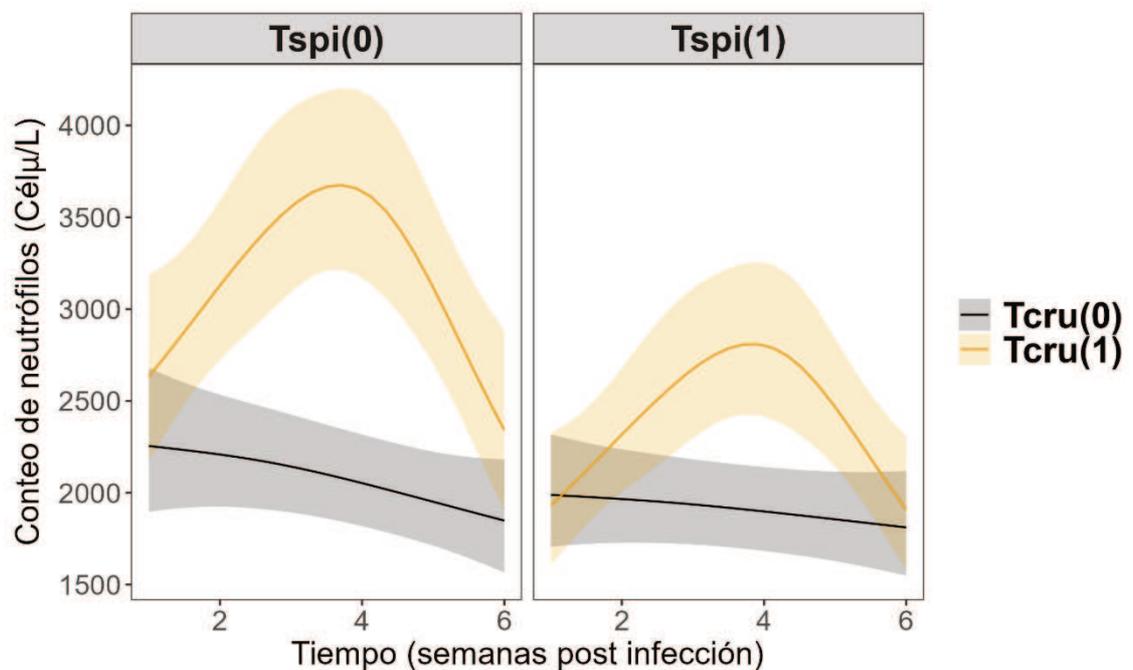
**Figura 9.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de linfocitos (Cél/μL) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

Asimismo, se observaron interacciones significativas entre Tcru y CS, y entre Tcru y Tspi (ver Tabla A11). De acuerdo con los análisis *post hoc*, la primera interacción sugiere que los animales con mayor AUC\_linfocitos fueron aquellos expuestos tanto a conflicto social como a *Try. cruzi*, seguidos por aquellos no expuestos a conflicto social pero sí a *Try. cruzi*, y finalmente, por los animales no expuestos a *Try. cruzi* (Fig. 10b, Tabla A13). Por otro lado, la interacción Tspi\*Tcru indicaría que los mayores valores de AUC\_linfocitos se dieron en los grupos Tcru (1), seguido por el grupo de animales no infectados, mientras que los menores valores se observaron en presencia de *Tri. spiralis* en monoinfección (Fig. 10, Tabla A14).

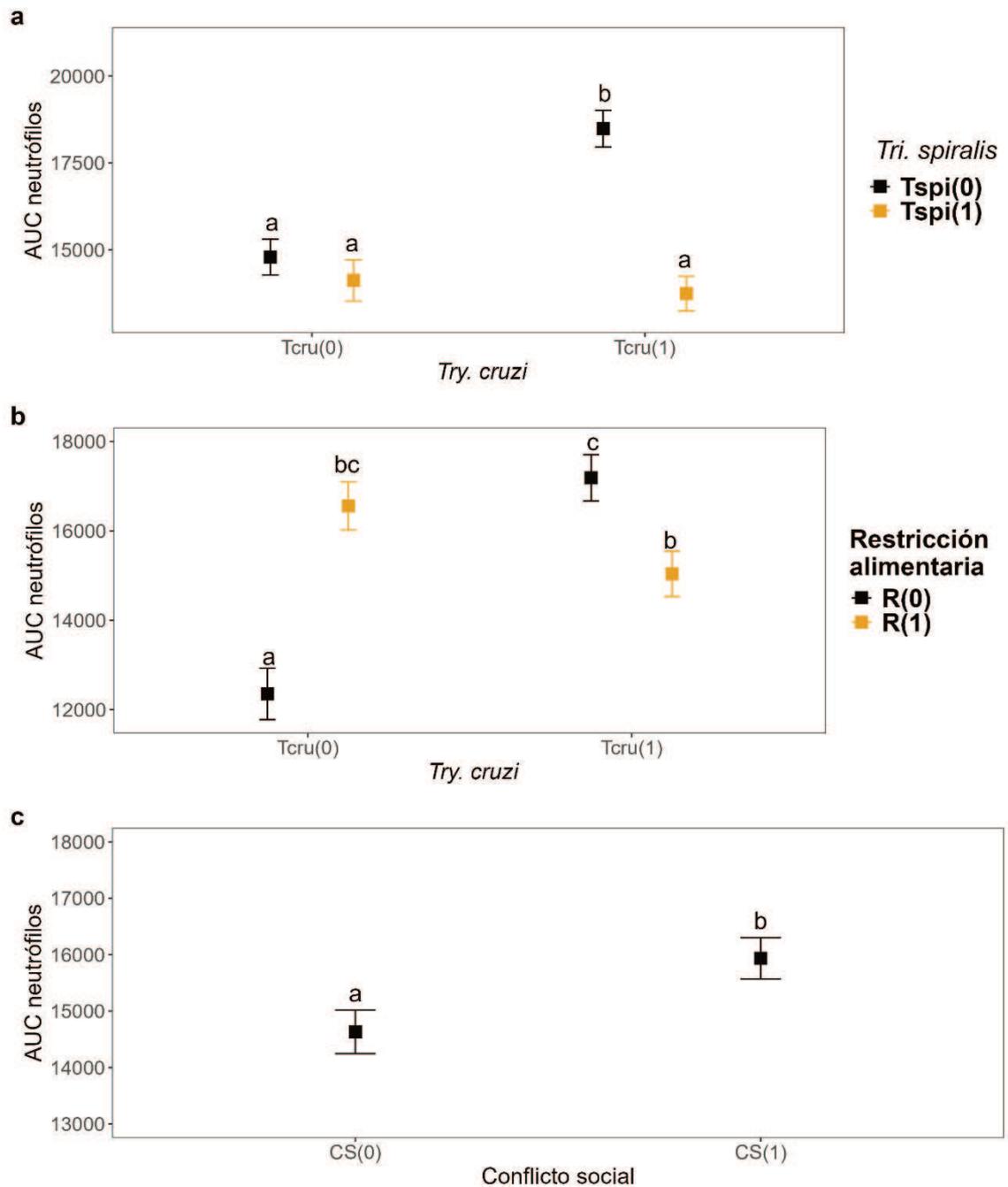


**Figura 10.** Análisis *post-hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Variable respuesta: AUC\_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización). a-Influencia de restricción alimentaria e infección con *Try. cruzi* sobre AUC\_linfocitos; b-Influencia de conflicto social e infección con *Try. cruzi* sobre AUC\_linfocitos; c-Influencia de infección con *Tri. spiralis* e infección con *Try. cruzi* sobre AUC\_linfocitos. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

El conteo de neutrófilos aumentó semanalmente en animales monoinfectados con *Try. cruzi* respecto al resto de los grupos (Fig. 11, Tabla A15). Los niveles de neutrófilos post-inmunización (AUC\_neutrófilos) mostraron variaciones significativas en relación con el estado de infección y la presencia de desafíos ambientales (Tabla A16). Por un lado, se observó un efecto combinado de la infección por ambos parásitos: el AUC\_neutrófilos fue significativamente mayor en individuos expuestos únicamente a *Try. cruzi* en comparación al resto de los grupos (Fig. 12a, Tabla A17). Además, se evidenció una interacción significativa entre R y Tcru: en condiciones de coinfección, el AUC\_neutrófilos fue menor en animales expuestos a restricción alimentaria en comparación con aquellos que no enfrentaron dicho desafío ambiental (Fig. 12b, Tabla A18). Sin embargo, este patrón se invirtió en el caso de la monoinfección con *Try. cruzi*: los animales con restricción alimentaria exhibieron un mayor AUC\_neutrófilos en comparación con aquellos no expuestos (Fig. 12b, Tabla A18). Por último, el conflicto social tuvo un efecto positivo significativo en AUC\_neutrófilos, independientemente de los demás tratamientos (Fig. 12c, Tabla A19).

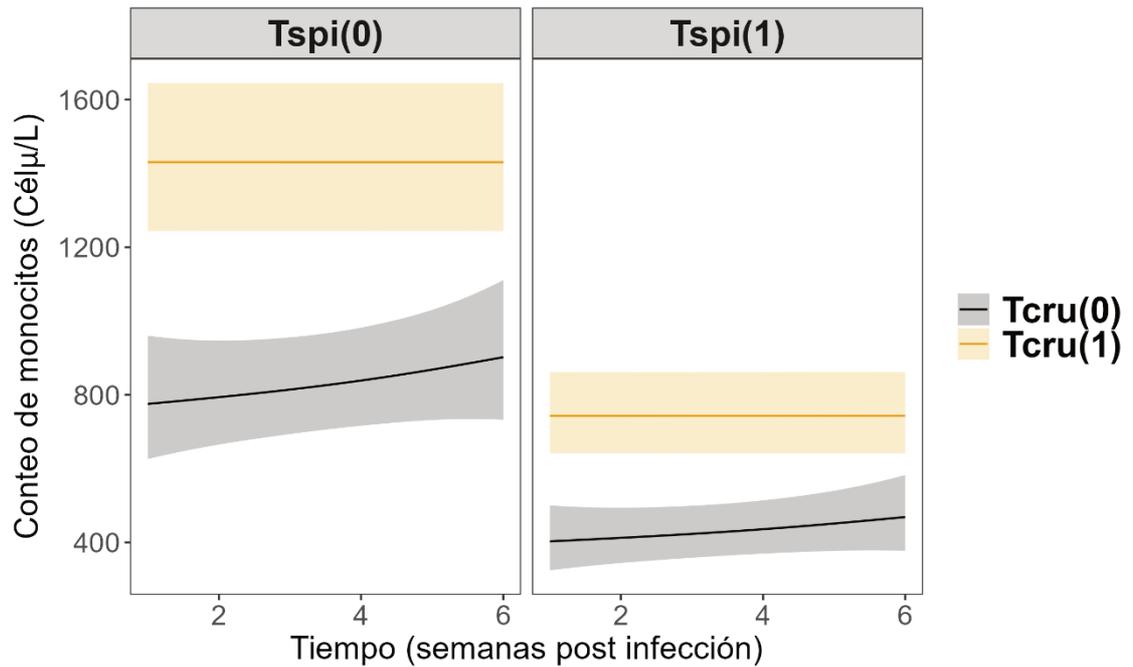


**Figura 11.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de neutrófilos (Cél/μL) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

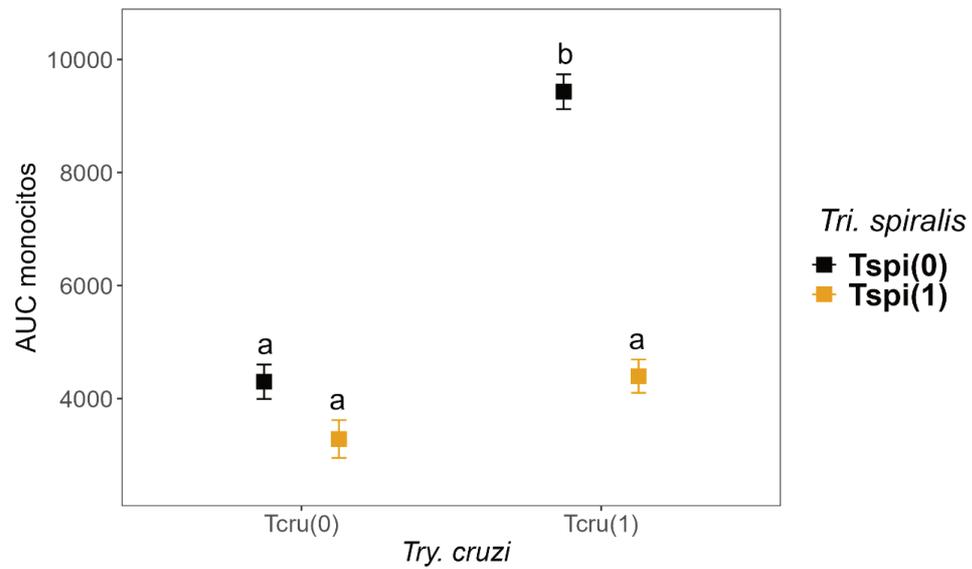


**Figura 12.** Análisis *post-hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Variable respuesta: AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización). a-Influencia de la infección con *Tri. spiralis* y con *Try. cruzi* sobre AUC\_neutrófilos; b-Influencia de restricción alimentaria e infección con *Try. cruzi* sobre AUC\_neutrófilos; c-Influencia de conflicto social sobre AUC\_neutrófilos. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

Los niveles de monocitos no variaron significativamente en el tiempo (Fig. 13, Tabla A20), pero sí se evidenciaron diferencias entre desafíos antigénicos. De manera equivalente a lo que se observó en los neutrófilos, los niveles de monocitos fueron mayores en presencia de *Try. cruzi* en monoinfección (Fig. 13 y 14, Tablas A21 y A22).

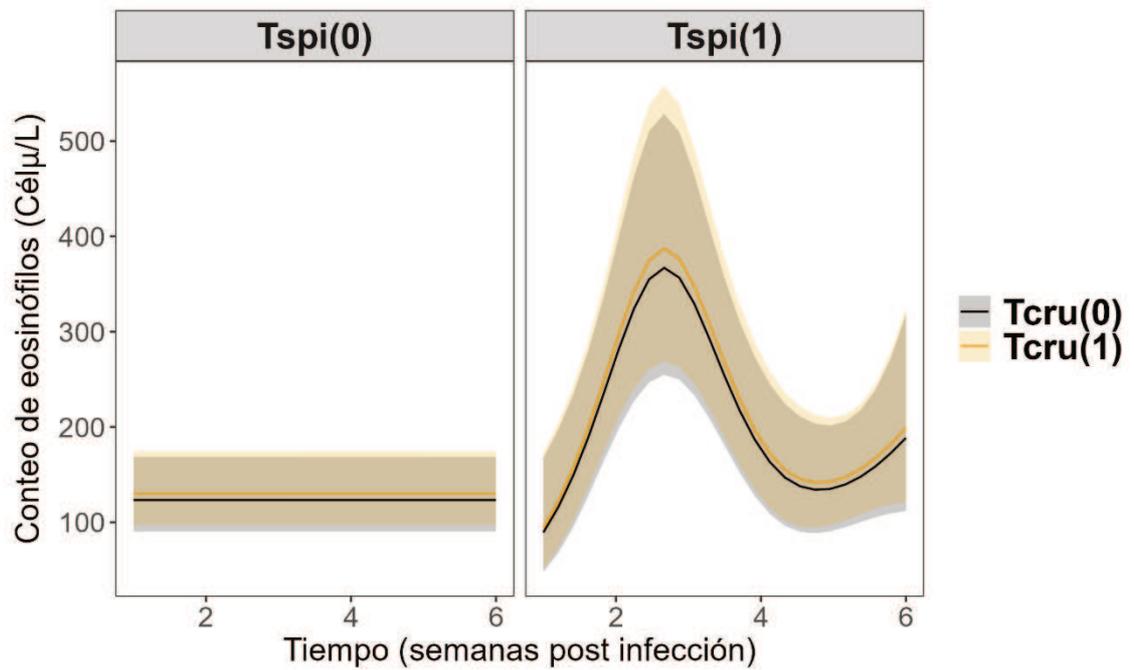


**Figura 13.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de monocitos (Cél/ $\mu$ L) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.

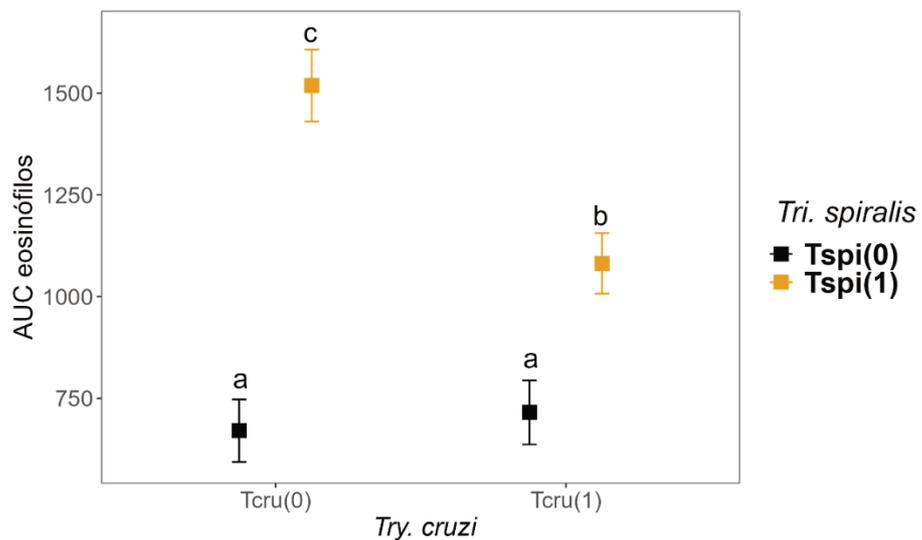


**Figura 14.** Análisis *post-hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con *Tri. spiralis* y con *Try. cruzi* sobre AUC\_monocitos. Variable respuesta: AUC\_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización). Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

En presencia de *Tri. spiralis* (tanto en mono- como coinfección), los roedores evidenciaron un aumento en el conteo de eosinófilos luego de la infección (Fig. 15, Tabla A23). Del mismo modo, AUC\_eosinófilos fue mayor en presencia de *Tri. spiralis* respecto al resto, pero en menor magnitud en animales coinfectados (Fig. 16, Tablas A24 y A25).



**Figura 15.** Predicciones del modelo de la influencia de la infección sobre el conteo semanal de eosinófilos (Cél/μL) post-inmunización. Tspi(1/0): ocurrencia de *Tri. spiralis*. Tcru(1/0): ocurrencia de *Try. cruzi*.



**Figura 16.** Análisis post-hoc con test de Tukey para comparaciones múltiples. Influencia de la infección con *Tri. spiralis* y con *Try. cruzi* sobre AUC\_eosinófilos. Variable respuesta: AUC\_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización). Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

### **III.IV. Discusión**

En este capítulo de la tesis, se examinó el impacto de la exposición crónica a desafíos ambientales sobre los compartimentos de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, frente a diversos parásitos. Para ello, se emplearon dos enfoques analíticos: en primer lugar, un análisis longitudinal destinado a evaluar la variación de la respuesta inmune frente a los diferentes parásitos a lo largo del tiempo; en segundo lugar, un análisis de los valores en sangre periférica de los distintos parámetros seleccionados, con el propósito de evaluar el efecto de los desafíos ambientales y de coinfección en dichos indicadores. La predicción formulada en este contexto sugería que la inversión en la respuesta inmune sería más pronunciada en situaciones de exposición a desafíos ambientales. Como se detallará en los próximos párrafos, dicha predicción se cumplió de manera parcial.

Los niveles de AcNs y anticuerpos específicos para ambos parásitos no experimentaron variaciones en respuesta a los desafíos ambientales. Esto no se condice con lo reportado en un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo (ver Cuervo, 2017; Cuervo et al., 2018), donde se registraron mayores niveles de anticuerpos, tanto naturales como específicos, en ratas expuestas a conflicto social junto con restricción alimentaria. Estas diferencias pueden deberse a que en dicho estudio se trabajó con ratas juveniles, mientras que en la presente tesis se emplearon ratas adultas.

La respuesta inmune puede variar significativamente a lo largo del ciclo de vida de un organismo, y las diferencias en la edad pueden influir en la capacidad del sistema inmunológico para responder a los desafíos ambientales. En animales no expuestos previamente a parásitos (como es el caso de esta tesis), este fenómeno puede atribuirse a varios factores, entre ellos: i) los cambios intrínsecos que experimenta el sistema inmunitario a medida que el individuo envejece, tales como la disminución de la proporción de linfocitos T vírgenes en comparación con los linfocitos T de memoria, así como el incremento de marcadores inflamatorios (Nussey et al., 2012; Babayan et al., 2018); y ii) el impacto de las infecciones parasitarias crónicas que eluden y suprimen la respuesta inmunitaria del hospedador (Babayan et al., 2018). Existe la posibilidad de que

en el trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo el sistema inmunológico de las ratas juveniles estuviera aún en proceso de desarrollo, lo que podría haberlas vuelto más susceptibles a los efectos de los desafíos ambientales (Cuervo, 2017; Cuervo et al., 2018). En contraste, en el caso de las ratas adultas en el estudio actual, es factible que su sistema inmunológico haya alcanzado cierta madurez o haya desarrollado mecanismos de regulación más eficaces en comparación con las ratas juveniles.

En cuanto a los desafíos antigénicos, los AcNs presentaron un incremento significativamente menor en animales no infectados (pero inmunizados con albúmina) respecto a infectados con *Try. cruzi* o *Tri. spiralis*. Ambos parásitos podrían desencadenar respuestas inmunes vigorosas debido a su capacidad para generar un *feedback* con el sistema inmunológico del hospedador, con estrategias de evasión y manipulación de la respuesta inmune (Ilic et al., 2012; Nagajyothi et al., 2012). Además, la complejidad de las interacciones entre el parásito y el sistema inmunitario puede llevar a una mayor activación y expansión de células específicas -como los linfocitos B y T- (Acevedo et al., 2018; Xu et al., 2021). Todo esto podría resultar en un incremento significativo en la respuesta inmune, observada en los animales infectados en comparación con aquellos solo inmunizados con albúmina.

Otra posible explicación podría ser que se haya producido una interacción entre los anticuerpos específicos dirigidos contra ambos parásitos y la KLH utilizada para evaluar los AcNs. La KLH es una glucoproteína ampliamente utilizada para tal fin debido a su origen filogenético lejano al hospedador, gran tamaño molecular y alta inmunogenicidad (Varshney et al., 2010). A pesar de su uso común en la evaluación de anticuerpos naturales, la posibilidad de una interacción entre los anticuerpos específicos y la KLH podría haber influido en los resultados. Esto podría deberse a la afinidad de estos anticuerpos hacia antígenos glicosilados, los cuales son abundantes en las estructuras parasitarias (Beck et al., 2008; Murphy y Weaver, 2017).

Respecto de la respuesta inmune humoral específica, se observó un aumento en los niveles de anticuerpos específicos anti-Tcru y anti-Tspi a partir de la primera semana después de la infección, sin diferencias notables entre la infección única y la coinfección.

Además, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en términos de los niveles de anticuerpos totales en sangre periférica post-inmunización. En esta tesis se examinaron los anticuerpos IgG, IgM e IgA. Aunque el anticuerpo marcado era específico para las moléculas completas de anticuerpos (cadenas H&L), es importante señalar que los anticuerpos IgE no fueron evaluados en el ensayo, a pesar que las cadenas livianas de estos anticuerpos podrían reaccionar con el conjugado utilizado. Teniendo esto en consideración, es posible que los niveles de IgE hayan aumentado mientras que el resto de los anticuerpos permanecieran dentro de sus valores normales. Esto sería una respuesta lógica a una infección con macroparásitos. Sin embargo, cabe mencionar que esta posible explicación no fue puesta a prueba.

El análisis del perfil leucocitario a partir del conteo diferencial en frotis sanguíneos se ha convertido en uno de los métodos más empleados en estudios veterinarios, biológicos y ecológicos para evaluar la respuesta inmunitaria celular (Walberg, 2001). Este enfoque es común debido a su relativa simplicidad y su viabilidad en condiciones de campo (Davis et al., 2008; Owen, 2011). En esta tesis, la respuesta inmune celular se vio influenciada tanto por las infecciones como por los desafíos ambientales. El conteo leucocitario total aumentó en exposición a *Try. cruzi* hasta la cuarta semana post-infección. Luego descendió hasta la última semana experimental. Dicho fenómeno es previsible, ya que durante la fase aguda de la infección por *Try. cruzi* puede producirse una leucocitosis de leve a moderada (De Araujo-Jorge et al., 2010).

Los linfocitos, componentes clave del sistema inmunitario, desempeñan funciones cruciales en la defensa del organismo contra infecciones. Existen principalmente dos tipos de linfocitos: B y T, cada uno con funciones especializadas. Ambos tipos poseen receptores específicos que reconocen antígenos, activan las células y generan memoria inmunológica (Weiss y Wardrop, 2011; Murphy y Weaver, 2017; Abbas et al., 2022). Los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización (AUC\_linfocitos) se vieron aumentados en animales infectados con *Try. cruzi* en comparación con los no infectados con este parásito. Se ha reportado que durante la fase aguda de infección por *Try. cruzi*, puede producirse linfocitosis (De Araujo-Jorge et al., 2010). La respuesta de los linfocitos contra *Try. cruzi* es vital para combatir la infección. Las células *natural killer* (NK)

desempeñan un papel inicial crucial al liberar IFN-gamma, que controla la replicación del parásito durante la fase aguda. Además, dirigen la diferenciación de los linfocitos T hacia un perfil Th1 y activan los macrófagos (De Araujo-Jorge et al., 2010; Acevedo et al., 2018). Por otro lado, los linfocitos B, además de producir anticuerpos, participan en la regulación inmunitaria al liberar citoquinas y presentar antígenos. Por su parte, los linfocitos T son fundamentales en la respuesta inmunitaria adaptativa, especialmente en la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, su producción de IFN-gamma disminuye con la progresión de la infección por *Try. cruzi* (Acevedo et al., 2018). Esta interacción entre diferentes tipos de linfocitos es esencial para controlar la infección y modular la respuesta inmunitaria.

Otros de los tipos celulares leucocitarios evaluados en esta tesis fueron los neutrófilos. Los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización (AUC\_neutrófilos) fueron mayores en animales monoinfectados con *Try. cruzi*, en comparación con los demás tratamientos de infección, incluidos aquellos de coinfectados. Los neutrófilos emplean una combinación de mecanismos para crear un ambiente extremadamente letal para los patógenos, como ser: especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la NADPH oxidasa, componentes citotóxicos de sus gránulos, péptidos antimicrobianos y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Teng et al., 2017).

Ante una infección por un protozoo como *Try. cruzi*, los neutrófilos contribuyen a la eliminación de los parásitos al fagocitar y destruir a los tripomastigotes (forma de vida presente en el torrente sanguíneo del hospedador), especialmente cuando están marcados por anticuerpos, así como a los amastigotes liberados de los tejidos infectados (Docampo et al., 1983). Se ha demostrado que los neutrófilos generan NETs en presencia de *Try. cruzi*, de manera dependiente de los receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4), lo que ayuda a limitar la infección al afectar la infectividad y patogenicidad de los parásitos (Sousa-Rocha et al., 2015). Además, los neutrófilos también secretan citocinas y quimiocinas que modulan la respuesta inmunitaria (Luna-Gomes et al., 2014). Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado estrategias para evadir estas defensas. Estudios recientes han demostrado que los antígenos de excreción-secreción (ES) de *Tri. spiralis* inhiben la liberación de NETs (Ríos-López et al., 2022; Wang et al., 2023).

En esta tesis, es razonable asumir que la disminución de los niveles de neutrófilos podría estar relacionada con el mecanismo de evasión de *Tri. spiralis* descrito previamente (Ríos-López et al., 2022; Wang et al., 2023). Este parásito, al inhibir la liberación de NETs, podría llevar a una menor activación y proliferación de neutrófilos, lo que se refleja en los niveles reducidos de neutrófilos post-inmunización observados en los animales infectados con *Tri. spiralis*.

En cuanto a la influencia del conflicto social, es posible que su efecto positivo en los niveles en sangre periférica post-inmunización tanto en neutrófilos como en linfocitos esté vinculado a una mayor activación de la respuesta inmunitaria, resultado de la exposición a situaciones de alta densidad poblacional donde el riesgo de enfermedad es más elevado. Este fenómeno se conoce como la hipótesis de la profilaxis dependiente de la densidad (*density-dependent prophylaxis hypothesis*) (Michel et al., 2016). En concordancia con esta hipótesis, en un estudio anterior, encontramos que las ratas expuestas al conflicto social y la restricción de alimentos experimentaron un impacto positivo en la respuesta inmune humoral innata y adquirida (Cuervo, 2017; Cuervo et al., 2018). No obstante, en dicho estudio no se encontraron efectos de los desafíos ambientales sobre la respuesta inmune celular, lo cual podría estar relacionado a que se trataba de ratas juveniles (Cuervo, 2017). Tal como se expuso al inicio de la discusión, existen cambios intrínsecos que experimenta el sistema inmune a medida que el individuo envejece, tales como la disminución de la proporción de linfocitos T vírgenes en comparación con los linfocitos T de memoria (Nussey et al., 2012; Babayan et al., 2018).

Por otro lado, la influencia de la infección por *Try. cruzi* en el nivel de neutrófilos también fue afectada por la restricción alimentaria. En ausencia de *Try. cruzi*, se notó un mayor AUC\_neutrófilos en animales expuestos a restricción alimentaria en comparación con aquellos que no enfrentaron este desafío. Por el contrario, en animales infectados, se observaron mayores niveles de este marcador cuando no había restricción alimentaria en comparación con cuando ésta estaba presente. En línea con estos hallazgos, en una investigación llevada a cabo en ratones expuestos a diversos desafíos dietéticos y a coinfecciones con *Mycobacterium bovis* y *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, se observó que aquellos animales expuestos a una dieta baja en proteínas y coinfectados con ambos

parásitos tenían niveles más bajos de eosinófilos intestinales en comparación con los ratones también expuestos a una dieta baja en proteínas pero no infectados (Budischak et al., 2015). Esto sugiere que los organismos sometidos a una dieta limitada tienden a dirigir más recursos hacia la inmunidad celular inespecífica que aquellos con acceso ilimitado al alimento, lo cual cambia cuando se presenta una infección. En entornos favorables donde los recursos son fácilmente accesibles, los organismos deberían poder mantener su temperatura corporal central, combatir infecciones y reproducirse de manera simultánea. Sin embargo, en situaciones donde los recursos son limitados, los organismos se enfrentan a desafíos significativos y deben establecer prioridades para superar estos momentos difíciles (Lochmiller y Deerenberg, 2000; French et al., 2009).

En cuanto al conteo de eosinófilos, era de esperar un aumento en las primeras semanas de esta población celular en presencia de *Tri. spiralis*. El incremento de eosinófilos en la sangre y los tejidos es una característica distintiva de las infecciones por helmintos, incluida la infección por *Tri. spiralis* (Bruschi et al., 2008). Los antígenos de *Trichinella* activan los linfocitos T, lo que desencadena la producción de citoquinas que promueven la formación de eosinófilos en el organismo del hospedador (Walls et al., 1973; Bruschi et al., 2008). El papel de estas células en la protección del hospedador o el parásito es complejo, ya que en algunos casos pueden contribuir a combatir la infección, mientras que en otros pueden aumentar la inflamación y provocar daño tisular (Bruschi et al., 2022). Durante una infección primaria, los eosinófilos protegen al parásito al inhibir la activación de los macrófagos y la subsiguiente producción de óxido nítrico; en una infección secundaria, cuando hay presencia de anticuerpos, su función se orienta a proteger al hospedador (Huang y Appleton, 2016).

Sin embargo, se observó un menor nivel de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización (AUC\_eosinófilos) en animales con infecciones combinadas con *Try. cruzi* en comparación con aquellos infectados únicamente con este *Tri. spiralis*. Esto podría deberse a una modulación de la respuesta inmune, en donde la inversión en un perfil se hace generalmente a expensas de la inversión en la otra (es decir, una compensación). En la naturaleza, es común que los organismos estén infectados por múltiples especies de

parásitos. Estas interacciones entre parásitos pueden ocurrir de manera directa o indirecta (Pedersen y Fenton, 2007).

Las interacciones directas se dan cuando los parásitos ocupan hábitats similares dentro de los hospedadores, compitiendo por recursos o facilitando la entrada de otros parásitos de manera mecánica (por ejemplo, los ectoparásitos pueden introducir bacterias en el hospedador mientras se alimentan). Por otro lado, se dan interacciones indirectas entre los parásitos, las cuales pueden actuar como facilitadoras o inhibidoras entre ellos, y a menudo son mediadas por el sistema inmunitario del hospedador (Pedersen y Fenton, 2007). Los microparásitos intracelulares (como virus y protozoos) generalmente activan la rama Th1 del sistema inmune adaptativo. Los microparásitos extracelulares y hongos también pueden activar una respuesta de tipo Th17. Asimismo, los macroparásitos activan el perfil Th2 (Murphy y Weaver, 2017). Esta estimulación por parte de los parásitos y las citoquinas circulantes asociadas potencia una rama de la respuesta inmune, mientras que la otra tiende a disminuir, lo que resulta en interacciones dinámicas cuando los hospedadores están coinfectados con varias especies de parásitos (Pedersen y Fenton, 2007; Ramsay y Rohr, 2021; Hananeh et al., 2022).

En la infección por *Try. cruzi*, los monocitos y macrófagos juegan un papel crucial en el control del parásito en las primeras etapas de la infección aguda (Fabrino et al., 2004; Villalba-Alemán et al., 2019). Además, se ha observado una alta migración de monocitos (que se transformarán luego en macrófagos) a los tejidos infectados durante la fase aguda, donde se cree que actúan como mediadores inflamatorios (Melo et al., 2003). En este contexto, el aumento observado en los niveles semanales de monocitos en animales monoinfectados con *Try. cruzi* fue esperable. Por otro lado, se evidenció una disminución de los niveles semanales de monocitos en animales infectados con *Tri. spiralis*.

Una posible explicación podría ser un proceso de inmunosupresión inducido por el helminto. Se ha documentado que los parásitos helmintos provocan una respuesta robusta de tipo Th2 que puede modular negativamente una respuesta de tipo Th1 dirigida hacia parásitos intracelulares (Shen et al., 2019; Hananeh et al., 2022). Esto suele resultar en una rápida proliferación de patógenos secundarios debido a la inhibición de los

mecanismos que activan la respuesta inmune. Por ejemplo, un estudio experimental demostró que la coinfección con *Tri. spiralis* y virus de la influenza A condujo a una disminución de los niveles del factor de necrosis tumoral en el lavado bronco alveolar e inhibió el reclutamiento celular en las vías respiratorias de ratones coinfectados (Furze et al., 2006). Los autores sugirieron que *Tri. spiralis* mejoró la patología pulmonar al reducir el reclutamiento de linfocitos CD4+ y CD8+ y neutrófilos, y suprimió el efecto inflamatorio del virus sobre la permeabilidad vascular en el tejido pulmonar (Furze et al., 2006).

En resumen, el análisis del perfil leucocitario y de la respuesta inmune humoral proporciona una valiosa visión sobre la distribución y activación del sistema inmunológico, aunque su interpretación debe ser cuidadosa debido a su complejidad. Aunque los indicadores de la respuesta inmune evaluados mostraron cambios a lo largo del tiempo en respuesta a diversas infecciones, hubo diferencias notables en cómo estas respuestas se vieron afectadas por las coinfecciones. Cabe destacar que la respuesta humoral no estaría modificada por los distintos desafíos ambientales y de coinfección, mientras que la respuesta celular sí lo estuvo, manifestando variaciones dependiendo del tipo celular. Aunque muchos de estos hallazgos requieren confirmación empírica, el entendimiento adquirido será valioso para guiar futuras investigaciones y mejorar nuestra comprensión de cómo las defensas inmunes se ajustan y modifican en los roedores silvestres.

**CAPÍTULO IV: Modulación de la estrategia de defensa en roedores  
frente a diversos escenarios de desafíos ambientales y antigénicos**

#### **IV.I. Introducción**

En la compleja interacción entre hospedador, parásito y ambiente, una infección puede resultar en una variedad de manifestaciones que afectan el *fitness* (adecuación biológica) del hospedador, que se manifiesta en su éxito reproductivo y supervivencia. Estos efectos pueden incluir infecciones de baja intensidad, individuos con alta intensidad de infección pero limitada patogenicidad, esterilidad reproductiva del hospedador o, en algunos casos, mortalidad del mismo (Beldomenico y Begon, 2010; Singh y Best, 2023). Los cambios que sufren los hospedadores tras una infección suelen clasificarse en tres tipos: i) cambios patológicos que no proporcionan ninguna ventaja adaptativa ni al parásito ni al hospedador; ii) cambios en el hospedador tras la infección, ocasionados por adaptaciones del parásito para mejorar su transmisión (por ejemplo, la tos y los estornudos causados por virus respiratorios); iii) cambios o adaptaciones del hospedador para mitigar o contrarrestar los efectos negativos causados por la infección (Lefèvre et al., 2008).

Las estrategias de defensa pertenecen a la tercera categoría. Frente a una infección, el hospedador puede optar por una estrategia de resistencia, que implica combatir el organismo invasor, concentrándose así en la causa de la infección. Alternativamente, el hospedador puede adoptar una estrategia diferente que se centra en mitigar las consecuencias de la infección, procurando minimizar los daños a su salud, fenómeno conocido como tolerancia (Råberg et al., 2009; Råberg, 2014). Ambas estrategias influyen en el papel que un hospedador determinado puede tener como reservorio de enfermedades, y conllevan costos y beneficios variables determinados por factores como la historia de vida de la especie y el ambiente (Råberg et al., 2009; Manzoli et al., 2018; McNew et al., 2019).

La resistencia y la tolerancia pueden considerarse rasgos defensivos complementarios (Mazé-Guilmo et al., 2014), que juntos determinan la protección de un hospedador frente a un parásito invasor. La relación entre ambas estrategias sigue sin estar clara, pero en estudios anteriores se han notificado correlaciones negativas (Råberg et al., 2007; Cornet et al., 2014; Vincent y Sharp, 2014; Balard et al., 2020). Esto se atribuye a los costos inherentes y a la redundancia asociada a ambas estrategias: la tolerancia puede resultar

inútil en un hospedador que muestre una resistencia perfecta, y la tolerancia absoluta no requiere invertir en resistencia.

En la mayoría de los casos, la tolerancia a la infección se evalúa mediante una norma de reacción, específicamente la pendiente que muestra la relación entre el *fitness* y la intensidad parasitaria (Råberg et al., 2009; Råberg, 2014). Dado que medir directamente el *fitness* no es factible en muchos sistemas de enfermedades, los estudios sobre tolerancia en animales tienden a emplear indicadores de condición de salud como indicadores de *fitness* (Adelman y Hawley, 2017). Alternativamente, otros trabajos emplean indicadores de enfermedad, tales como la pérdida de peso relativa máxima (Balard y Heitlinger, 2022), la gravedad de la lesión (Bonneaud et al., 2019) y el daño tisular (Gozzelino et al., 2012). En estos casos, una pendiente positiva (o menos negativa) en la curva de regresión sugiere que hay un mayor daño, lo que puede reflejar un nivel de tolerancia menor (Adelman y Hawley, 2017).

Un elemento clave que determina el resultado de una interacción hospedador-parásito es la plasticidad fenotípica, definida como la capacidad de un organismo para expresar diferentes fenotipos en respuesta a cambios en el entorno (West-Eberhard, 2003). Esta plasticidad puede manifestarse de diversas maneras, como alteraciones en el comportamiento, la morfología y la fisiología (Gervasi et al., 2015). Se espera que la plasticidad también se exprese en los esfuerzos de defensa. En consecuencia, es razonable suponer que la plasticidad fenotípica permita a los hospedadores cambiar entre estrategias de resistencia y tolerancia, o ajustar la intensidad de las mismas como mecanismo adaptativo. De hecho, se ha documentado el cambio en la estrategia de defensa, de resistencia a tolerancia -o viceversa-, según la edad del hospedador (Jackson et al., 2014), o en respuesta a la disponibilidad variable de recursos y a las distintas etapas de la infección (Knutie et al., 2017). En un estudio realizado en roedores silvestres de la especie *Microtus agrestis*, Jackson et al. (2014) observaron que los machos maduros, en contraste con sus homólogos inmaduros, mostraban una menor resistencia a la infección, desplazando su énfasis hacia el aumento de la tolerancia. Además, Knutie et al. (2017) demostraron que las ranas que disponían de recursos limitados exhibían un aumento de

la tolerancia una vez infectadas, pero se producía a expensas de una menor resistencia al establecimiento de parásitos.

En el presente capítulo, se propone evaluar las estrategias de resistencia y tolerancia y la interrelación entre ambas en ratas infectadas con parásitos de diferentes taxones bajo diferentes escenarios de desafíos ambientales. El objetivo es evaluar el impacto de los factores ambientales y la coinfección en i) la resistencia del hospedador, ii) la tolerancia del hospedador; y iii) determinar si estos desafíos provocan un cambio en la estrategia de defensa.

## **IV.II. Materiales y métodos**

### **IV.II.I. Cuantificación de la intensidad de los parásitos**

#### *Intensidad de Tri. spiralis*

La intensidad de *Tri. spiralis* se evaluó como larvas totales por individuo. Para ello se llevó a cabo la digestión artificial de cada individuo con la técnica de pepsina-ácido clorhídrico (Nöckler y Kapel, 2007; Franssen et al., 2016). Una vez terminada la digestión artificial, se efectuaron dos procesos simultáneos de filtración-sedimentación, donde se dejó sedimentar el digerido y se decantó el sobrenadante. El sedimento se vertió a través de un tamiz y tras 20 minutos de sedimentación, el sedimento que contenía larvas de *Tri. spiralis* se lavó repetidamente con agua. Luego, la suspensión resultante fue observada de manera completa bajo microscopio óptico Olympus para la evaluación cuantitativa de las larvas recuperadas (Nöckler y Kapel, 2007; Ribicich et al., 2007; Franssen et al., 2016). La intensidad de infección se expresó como la cantidad de larvas por individuo.

#### *Intensidad de Try. cruzi*

La intensidad de *Try. cruzi* se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*qPCR* o *PCR en tiempo real*) en tejido muscular cardíaco (Cummings y Tarleton, 2003). Durante la amplificación del ADN, se detectan fragmentos de parásitos en niveles menores a 1 parásito/ml, que pueden definirse como “equivalentes de parásitos” (Cummings y Tarleton, 2003; Davies et al., 2014). De esta manera, la

intensidad se expresó en términos de equivalentes de parásitos por 50 nanogramos de ADN (equivalentes de parásitos / 50 ng de ADN). A continuación, se ofrece una descripción de los protocolos.

#### 1- Extracción de ADN

La extracción se realizó mediante kit comercial “Purelink genomic DNA Kit” (ThermoFisher Scientific, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para las muestras de tejido muscular cardíaco infectado con amastigotes.

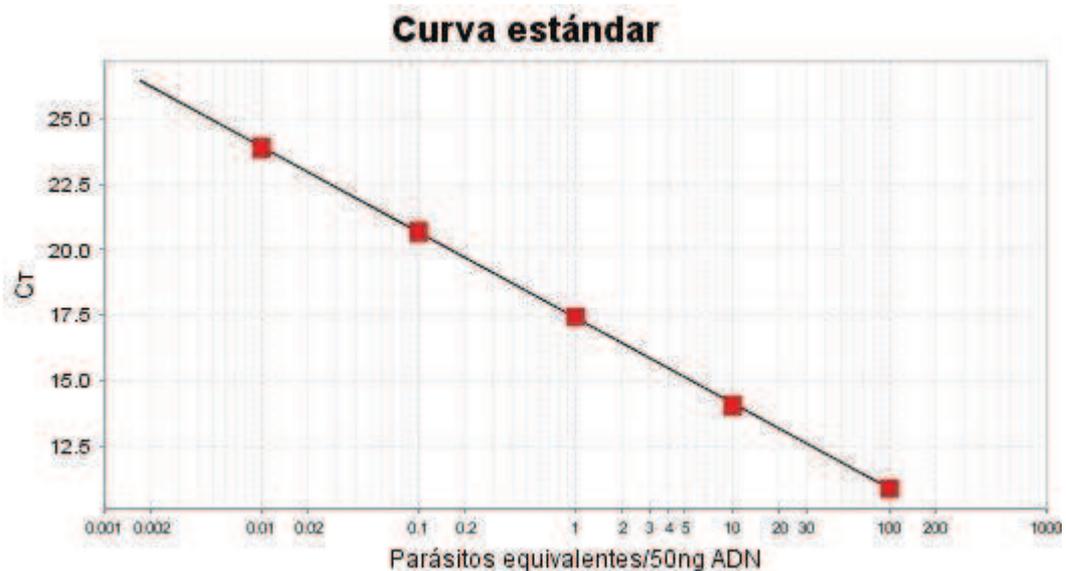
#### 2- Generación de los estándares de qPCR

Las curvas estándar son esenciales en la qPCR, debido a que permiten determinar la cantidad inicial de una secuencia *target* de ADN. Se crean preparando una serie de diluciones de una cantidad conocida del ADN *target*, que luego se amplifica utilizando las mismas condiciones que las muestras. Los datos resultantes se utilizan para generar una curva que traza los valores del umbral de ciclo (Ct) frente a la cantidad inicial del ADN *target* (Rutledge, 2003). En este caso, se pusieron a punto dos curvas estándar para la cuantificación del ADN de *Try. cruzi* en el tejido de las ratas, las cuales se utilizaron en cada reacción de qPCR. La primera curva estándar se realizó con una cantidad conocida de tripomastigotes de *Try. cruzi*, con el fin de calcular la cantidad relativa de ADN del parásito en las muestras. Por otro lado, la segunda curva estándar se elaboró con una cantidad conocida de tejido de ratas no infectadas, utilizada posteriormente para determinar la cantidad relativa de ADN del hospedador en las muestras (Cummings y Tarleton, 2003; Caldas et al., 2012). Finalmente, para la normalización de cada muestra, la concentración de *Try. cruzi* obtenida por qPCR se dividió por la concentración del gen de referencia (gen de la subunidad 18S del ARN ribosomal [18S ARNr]) de la misma muestra.

Los epimastigotes de *Try. cruzi* fueron provistos por parte del Laboratorio de Tecnología Inmunológica (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina), quienes los mantienen en cultivo para líneas de investigación propias. Una vez obtenidas, las dosis de epimastigotes de *Try. cruzi* fueron añadidas a tejido

cardíaco no infectado, para generar los estándares de la curva de cuantificación y así calibrar las reacciones de qPCR. Se procedió de la siguiente manera:

- i) Preparación de epimastigotes: los protozoos se contaron en cámara de Neubauer, y se almacenaron en un volumen total de 2-3ml de PBS 1X.
- ii) Se cuantificaron  $10^7$  epimastigotes y se mezclaron con 25 mg de tejido cardíaco de ratas de 10 semanas sin infectar.
- iii) Se llevó a cabo la extracción de ADN de dicho preparado.
- iv) Para llegar a una concentración de 25 ng/ul de ADN de rata se realizaron extracciones de ADN de ratas sin infectar. La solución obtenida se mezcló posteriormente con la solución del punto “c”, para llegar a la concentración deseada.
- v) Para *Try. cruzi* se generó una curva estándar con cinco puntos a partir de diluciones de 1/10, las cuales oscilaron desde 100 a 0,01 equivalentes de parásitos cada 50 ng de ADN (Fig. 17).
- vi) En las qPCR de ADN murino se generó una curva estándar con cinco puntos a partir de 5 diluciones seriadas de 1/5 utilizando la solución, las cuales oscilaron desde 100 ng hasta 0,16 ng.
- vii) Por cada muestra se procesó una qPCR distinta: una para la cuantificación de ADN murino, y otra para la cuantificación de ADN de *Try. cruzi*.
- viii) Las eficiencias de ambas curvas en cada reacción fueron calculadas automáticamente con el *software* StepOne2,1, siendo mayores a 95% en ambos casos.
- ix) Los valores medios de cuantificación del ADN de *Try. cruzi* se normalizaron a partir de los datos obtenidos con los cebadores específicos para murinos (gen 18S ARNr) de la siguiente manera: valor normalizado = (ADN medio de *Try. cruzi*/ADN medio de 18S).



**Figura 17.** Curva estándar generada a partir de cinco diluciones 1/10 de parásitos equivalentes/50 ng ADN. Cada punto de la curva (cuadrados rojos) se realizó por triplicado. Ct: *cycle threshold* (ciclo umbral).

### 3- Protocolo de qPCR

Cada placa de reacción de 48 pocillos contenía la curva estándar y tres controles negativos. Las muestras se procesaron por triplicado. Cada PCR contenía:

- ✓ 50 ng de ADN genómico
- ✓ 0,8  $\mu$ M del oligonucleótido TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', donde M = A o C y 0,8  $\mu$ M del oligonucleótido TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (Cummings y Tarleton, 2003). En el caso de 18S los oligonucleótidos fueron: F 5'-CAACTTTCGATGGTAGTCGC -3' y R 5'-CGCTATTG-GAGCTGGAATTAC -3' (Monje et al., 2007)
- ✓ 0,1  $\mu$ l de enzima Phire Hot Start II DNA polymerase (Thermo Scientific)
- ✓ 0,8  $\mu$ l de Sybr green (concentración solución de stock: 10X)
- ✓ 0,4  $\mu$ l dNTP 10 mM totales (Transbiotech, Canada)
- ✓ Agua de calidad para qPCR hasta un volumen total final de 20  $\mu$ l

- ✓ Los datos adquiridos se analizaron con el software StepOne 2,1, Cada muestra se analizó por duplicado.
- ✓ Los programas de ciclado para las reacciones se detallan en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Programa de ciclado para TCZ. El programa fue modificado del propuesto por Cummings et al. (2003). Los datos de fluorescencia fueron adquiridos a los 81°C y fueron analizados con el software StepOne 2.1

Fases	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	3 min	1
Amplificación	Desnaturalización: 98°C	0,05 seg	40
	Hibridación: 55°C	20 seg	
	Extensión: 72°C	15 seg	
	Lectura: 81°C	10 seg	
Melting	95°C	15 seg	1
	60°C	1 min	
	95°C	15 seg	

**Tabla 5.** Programa de ciclado para 18S. Los datos de fluorescencia fueron adquiridos a los 79°C y fueron analizados con el software StepOne 2.1

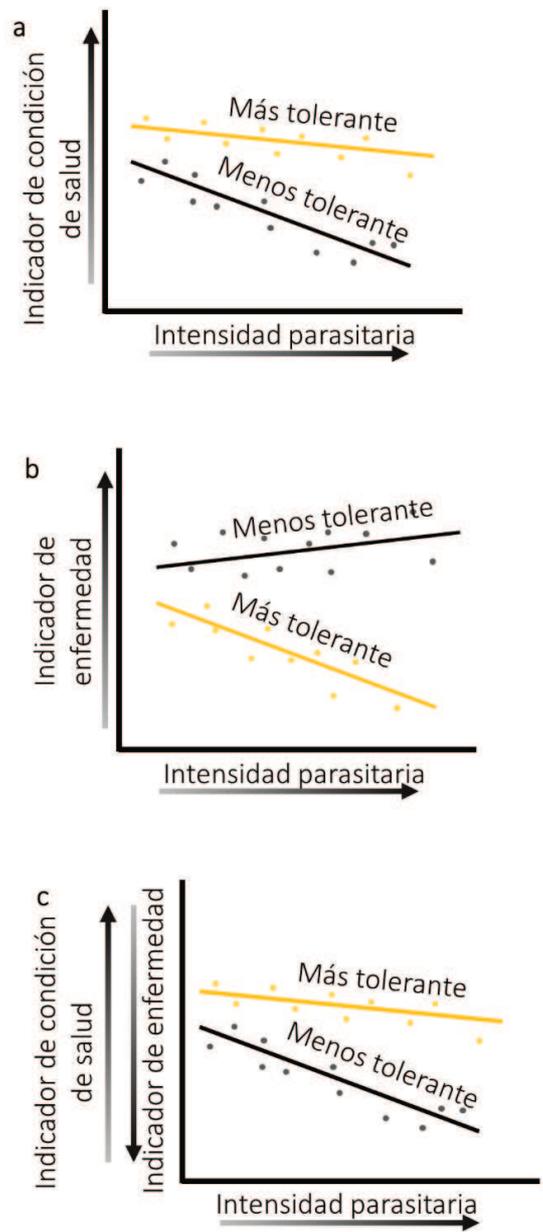
Fases	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Amplificación	Desnaturalización: 95°C	10 seg	36
	Hibridación: 53°C	20 seg	
	Extensión: 65°C	20 seg	
	Lectura: 79°C	10 seg	
Melting	95°C	15 seg	1
	75°C	1 min	
	95°C	15 seg	

#### IV.II.II. Evaluación de la tolerancia

La tolerancia puede estimarse como la pendiente de la norma de reacción (expresada como curva de regresión) entre la intensidad parasitaria y aspectos seleccionados del *fitness* del hospedador (Råberg et al., 2009). La intensidad parasitaria (o de la infección) es el número de individuos de una determinada especie de parásito en un único hospedador infectado, es decir, el número de individuos de una infrapoblación (población parasitaria dentro de un solo hospedador) (Bush et al., 1997). El impacto de la intensidad parasitaria sobre el *fitness* del hospedador puede manifestarse como una reducción de su estado de salud o de su éxito reproductivo (Balard y Heitlinger, 2022). Para cuantificar la tolerancia se han empleado diversos indicadores de condición de salud o *fitness*, como el peso corporal (Cornet et al., 2014; Knutie et al., 2017), la condición corporal (Bonneaud et al., 2017), la supervivencia (Howick y Lazzaro, 2014), las medidas hematológicas (Cornet et al., 2014; Manzoli et al., 2018) y la fecundidad (Kutzer y Armitage, 2016). En estos estudios, una pendiente positiva (o menos negativa) en la curva de regresión indica un perjuicio menor por unidad de parásito y, por tanto, un mayor nivel de tolerancia (Kutzer y Armitage, 2016) (Fig. 11a).

Sin embargo, en otras investigaciones se han elegido indicadores diferentes, en los que una pendiente positiva (o menos negativa) de la curva de regresión indica un perjuicio mayor por unidad de parásito y, en consecuencia, puede indicar un menor nivel de tolerancia (Adelman y Hawley, 2017) (Fig. 11b). Algunos ejemplos de estos indicadores son la pérdida de peso relativa máxima (Balard y Heitlinger, 2022), la gravedad de la lesión (Bonneaud et al., 2019) y el daño tisular (Gozzelino et al., 2012).

Aquí, nos referimos al primer grupo de medidas nombradas anteriormente como “indicadores de salud” y al segundo como “indicadores de enfermedad” (Fig. 18). Para facilitar la interpretación de los resultados, en esta tesis se propone invertir el eje de ordenadas (“eje y”) de los indicadores de enfermedad. En consecuencia, una pendiente más negativa significaría una menor tolerancia, mientras que una pendiente menos negativa significaría una mayor tolerancia tanto en lo que respecta a los indicadores de estado de salud como a los de enfermedad.



**Figura 18.** Representación gráfica de la tolerancia, representada como una regresión entre el indicador de salud/enfermedad y la intensidad del parásito en hospedadores expuestos a dos niveles de un desafío ambiental, distinguidos por diferentes colores. El eje de ordenadas (“eje y”) puede ilustrarse con: a- Un indicador de condición de salud (o *fitness*), donde una pendiente menos negativa indica un fenotipo más tolerante; b- Un indicador de enfermedad, donde una pendiente más positiva indica un fenotipo menos tolerante; c- Un indicador de condición de salud (o *fitness*) o un indicador de enfermedad donde, dada la inversión propuesta en el eje “y” para los indicadores de enfermedad, una pendiente menos negativa indica un grupo de hospedadores más tolerantes.

#### IV.II.III. Indicadores de salud/enfermedad

Se evaluaron un total de siete posibles indicadores de salud o enfermedad en los modelos de tolerancia frente a ambos parásitos, los cuales se describen a continuación:

- i) Peso testicular relativo (PTR): el tamaño relativo de los testículos está estrechamente relacionado con el éxito reproductivo en varios taxones vertebrados y puede utilizarse como uno de los indicadores de la aptitud reproductiva de los machos. El mismo se calculó dividiendo el peso de los testículos por la masa corporal (Weil et al., 2006; Jackson et al., 2014).
- ii) Cambio post-infección del índice de masa corporal ( $\Delta IMC$ ): la condición corporal se utiliza ampliamente para inferir el estado energético, robustez o salud general de un hospedador. Muchas medidas de condición evalúan variables morfométricas como la masa o el tamaño (o indicadores compuestos similares a los índices de masa corporal) para inferir la energía asignada al crecimiento y mantenimiento (Sánchez et al., 2018). El  $\Delta IMC$  se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\Delta IMC = \frac{(IMC_f - IMC_i)}{IMC_i} * 100,$$

donde  $IMC = \frac{\log \text{ peso corporal}}{\log \text{ longitud corporal}}$  (Labocha et al., 2014).

- iii) Alanina aminotransferasa (ALT [UI/L])
- iv) Aspartato aminotransferasa (AST [UI/L])
- v) Albúmina (ALB [g/dL]), que se midieron a partir de muestras de suero procesadas con kits comerciales de línea líquida UV de Wiener Lab utilizando el autoanalizador Metrolab 2300 plus (Wiener Lab).
- vi) Fosfatasa alcalina (FAS [UI/L])
- vii) Creatina fosfokinasa (CPK [UI/L])

Cabe señalar que consideramos PTR y  $\Delta IMC$  como indicadores de salud, mientras que ALT, AST, ALB, FAS y CPK se consideran indicadores de enfermedad.

A continuación, se describen brevemente los indicadores de enfermedad y las implicaciones de un cambio en sus niveles. La albúmina (ALB) es una proteína sanguínea implicada en diversas funciones, tales como el control de la inflamación y el mantenimiento de la integridad de las células endoteliales vasculares. También es el modulador más importante de la presión osmótica (Wiedermann, 2021). La hipoalbuminemia suele deberse a procesos inflamatorios o a diversos factores como el daño hepatocelular, la ingesta inadecuada de aminoácidos o el aumento de la eliminación de albúmina (Soeters et al., 2019).

En cuanto a la enzima alanina aminotransferasa (ALT), se encuentra principalmente en los hepatocitos, implicada en el ciclo de la alanina. Una ALT elevada en el torrente sanguíneo indica daño, necrosis o regeneración hepática, sirviendo como marcador fiable de enfermedad hepática (Siegel y M. Walton, 2020). La enzima aspartato aminotransferasa (AST) es otra enzima hepática, que se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias de los hepatocitos, pero su presencia en los músculos cardíacos y esqueléticos la hace menos específica para evaluar el daño hepatocelular (célula hepática) que la ALT (Siegel y M. Walton, 2020).

La enzima creatina fosfoquinasa (CPK) es crucial para el metabolismo energético y se distribuye por diversos tejidos, incluidos los músculos. Un aumento de esta enzima puede deberse a una necrosis o enfermedad muscular (Washington y Van Hoosier, 2012). La enzima fosfatasa alcalina (ALP) es un grupo enzimático conocido por su capacidad para eliminar grupos fosfato de diversas moléculas, como nucleótidos y proteínas. La concentración de ALP suele elevarse en respuesta a factores como la digestión, la colestasis o lesiones en el epitelio intestinal o biliar (Washington y Van Hoosier, 2012).

El hígado es reconocido como uno de los tejidos diana de la infección por *Try. cruzi* y contribuye a la eliminación de tripomastigotes sanguíneos (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015), a la vez que desempeña un papel relevante en la migración de larvas de *Tri. spiralis* (Campbell, 1983). El tejido muscular es un objetivo compartido por ambos parásitos (Campbell, 1983; Barreto-de-Albuquerque et al., 2015). Por lo tanto, se espera

que los niveles de los marcadores antes mencionados se vean alterados en presencia de ambos parásitos.

#### IV.II.IV. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software *R for Statistical Analysis* versión 4.2.2 (R Core Team y R Core Team, 2022) en RStudio versión 2022.12.0, La resistencia se estimó como la inversa de la carga parasitaria, ante igual exposición a parásitos (Råberg et al., 2009). Para evaluar la resistencia, se emplearon modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) realizados con los paquetes “lme4” (Bates et al., 2015), “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) y “lmerTest” (Kuznetsova et al., 2017). En estos modelos, se consideró la intensidad del parásito como la variable de respuesta, mientras que los factores fijos incluyeron la restricción alimentaria (R [0/1]), el conflicto social (CS [0/1]) y el parásito coinfectante *Try. cruzi* (Tcru [0/1]) o *Tri. spiralis* (Tspi [0/1]), respectivamente. La distribución de probabilidad más adecuada se determinó utilizando los paquetes “ggplot2” (Wickham y Wickham, 2016), “fitdistrplus” (Delignette-Muller y Dutang, 2015) y “performance” (Lüdecke et al., 2020). Finalmente, se seleccionó una distribución binomial negativa como el mejor ajuste para el análisis de la resistencia de *Tri. spiralis*, mientras que se seleccionó una distribución gamma para el análisis de la resistencia de *Try. cruzi*.

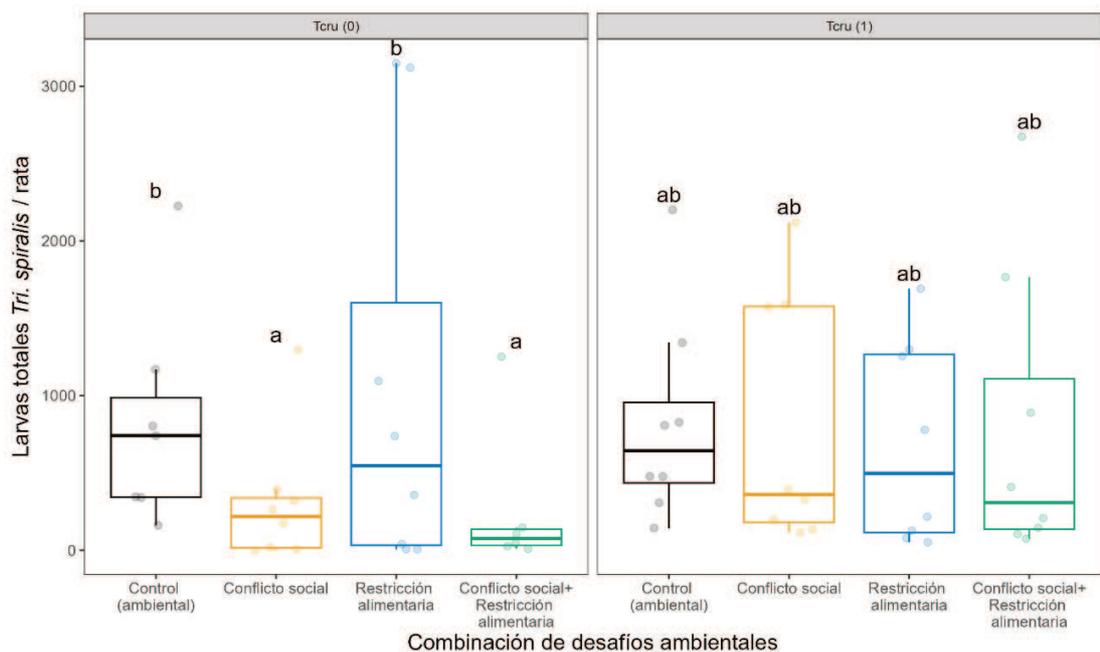
En los análisis de tolerancia se emplearon modelos del tipo lineal generalizado mixto, al igual que en los análisis de la resistencia. Se exploraron diversas distribuciones de probabilidad para las variables de respuesta mediante el paquete “DHARMA” (Hartig, 2020). En este caso, todas las variables de respuesta (indicadores de salud o enfermedad) presentaban una distribución normal o gamma, o requerían una transformación logarítmica para alcanzar la normalidad. La intensidad parasitaria de uno u otro parásito, según el caso, fue considerada como la variable explicativa numérica. A su vez, los factores fijos fueron los mencionados anteriormente (R, CS, Tcru, Tspi). Dado que se trata de una norma de reacción, se analizó la interacción entre los factores y la intensidad de la infección para evaluar cómo el contexto influye en la tolerancia (Gupta y Vale, 2017). Todas las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Al igual que en el CAPÍTULO II, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: un valor  $p < 0,05$  indicó significancia estadística; se evaluaron los valores atípicos mediante análisis de distancia de Cook (Bolker y Robinson, 2022) utilizando el paquete “broom.mixed”; la selección de modelos se llevó a cabo empleando simultáneamente las funciones “drop1” y “AICc” de los paquetes “lme4” (Bates et al., 2015) y “MUMIn” (Bartoń, 2022); se generaron simulaciones utilizando los paquetes “ggeffects” (Lüdtke et al., 2020) y “ggplot2” (Wickham y Wickham, 2016); se incluyó el término “Jaula” como efecto aleatorio; se realizaron análisis *post hoc* de contraste cuando fue necesario para comparar entre grupos utilizando los paquetes “emmeans” (Lenth, 2022) y “multcomp” (Hothorn et al., 2008).

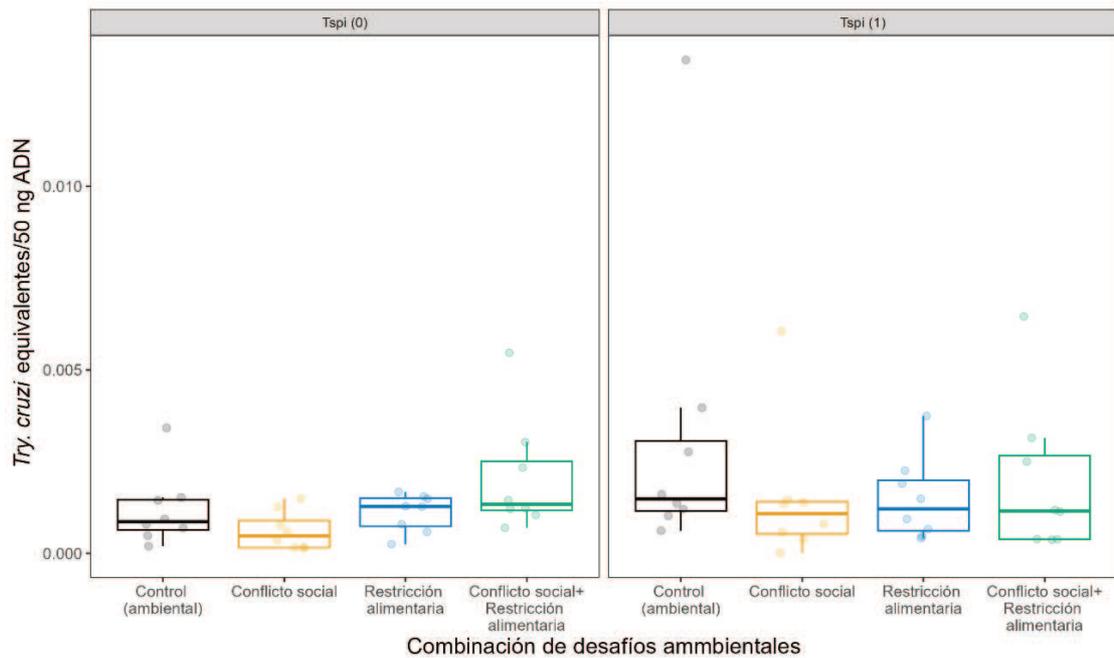
### IV.III. Resultados

#### IV.III.I. Efecto de la exposición a desafíos ambientales sobre la resistencia frente a los parásitos

Las ratas mostraron una intensidad menor de *Tri. spiralis* cuando estaban mono infectadas y expuestas al conflicto social con respecto al resto de los grupos (Fig. 19, Tabla A26). En cuanto a *Try. cruzi*, la intensidad de infección no varió entre tratamientos (Fig. 20, Tabla A27).



**Figura 19.** Resistencia a *Tri. spiralis* frente a desafíos ambientales en mono- y coinfección con *Try. cruzi* (Tcru [0/1]). Las letras por encima de cada *boxplot* corresponden a un análisis *post hoc* con test de Tukey para comparaciones múltiples. Los grupos que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.



**Figura 20.** Resistencia a *Try. cruzi* frente a desafíos ambientales (Tratamientos: conflicto social [0/1],) en mono- y coinfección con *Try. spiralis* (Tspi [0/1]).

#### IV.III.II. Efecto de la exposición a desafíos ambientales sobre la tolerancia frente a los parásitos

En la Tabla 6 se ofrece un resumen de los resultados obtenidos en términos de tolerancia. Además, en el ANEXO II se encuentran los detalles de cada uno de los modelos analizados (Tablas A26 a A37).

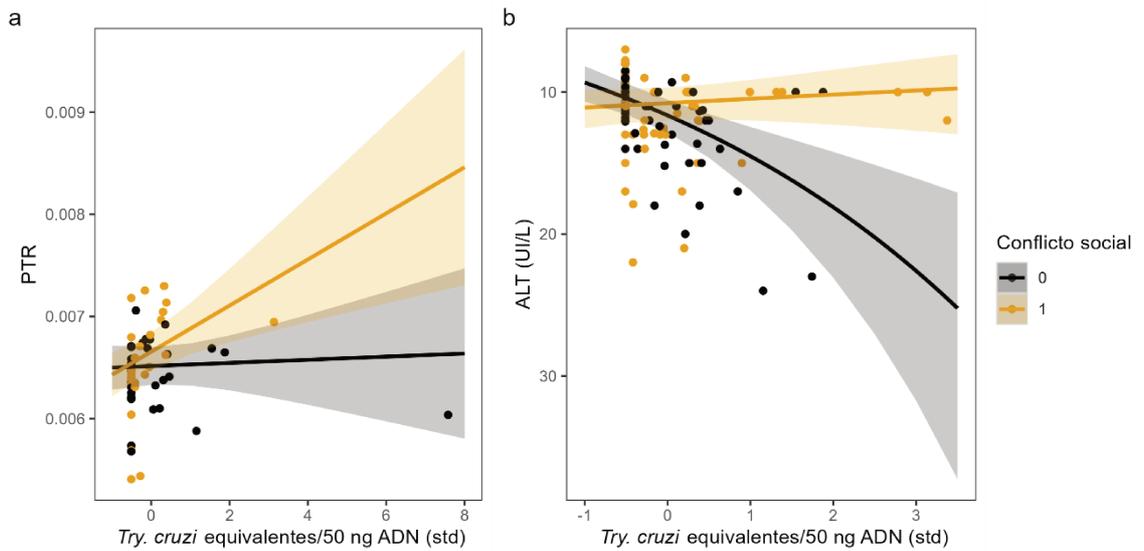
**Tabla 6.** Resumen de los resultados finales de los LMM en términos de tolerancia frente a *Try. cruzi* y *Tri. spiralis*.

Indicador de condición de salud/enfermedad (variable dependiente)	Términos significativos en la tolerancia a <i>Try. cruzi</i>	Términos significativos en la tolerancia a <i>Tri. spiralis</i>
---	--	---

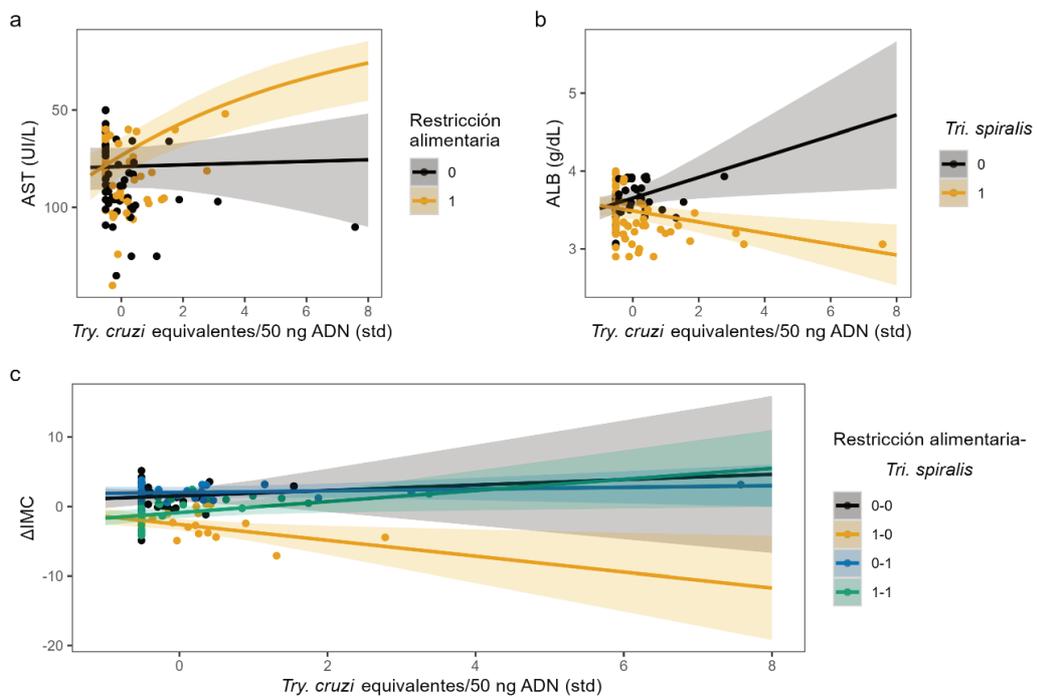
Índice de masa corporal ( $\Delta$ IMC)	↓ R(1) * Tcru intensidad * Tspi(0)	↑ Tspi intensidad * Tcru(1)
Peso relativo testicular (PRT)	↑ CS(1) * Tcru intensidad	↓ CS(1) * Tspi intensidad * Tcru (0)
Alanina aminotransferasa (ALT)	↑ CS(1) * Tcru intensidad	-
Aspartato aminotransferasa (AST)	↑ R(1) * <i>Try. cruzi</i> intensidad	-
Albúmina (ALB)	↓ Tspi(1) * Tcru intensidad	↑ R * Tspi intensidad

**Referencias:** Modelo completo para cada variable dependiente: indicador de condición de salud/enfermedad ~ R \* CS \* intensidad parásito A \* ocurrencia parásito B + (1 | jaula)

Al evaluar la tolerancia a *Try. cruzi*, el impacto de la intensidad del parásito sobre PTR y ALT dependió de la exposición al conflicto social (Tablas A28 y A29), mientras que los niveles de AST se vieron influenciados por la exposición a restricción alimentaria (Tabla A30). Tanto para PTR como ALT, la tolerancia al protozoo fue mayor en el grupo CS (1) en comparación con CS (0) (Fig. 21a y 21b, Tablas A28 y A29). Con AST como indicador de enfermedad, la tolerancia frente a *Try. cruzi* fue mayor en el grupo R (1) en comparación con R (0) (Fig. 22a, Tabla A30). Por el contrario, los niveles de ALB disminuyeron con la intensidad de *Try. cruzi* en los animales coinfectados (Fig. 22b, Tabla A31). En el caso de  $\Delta$ IMC, los animales R (1) Tspi (0) mostraron menor tolerancia frente a *Try. cruzi* en comparación con otros grupos (Fig. 22c, Tabla A32).



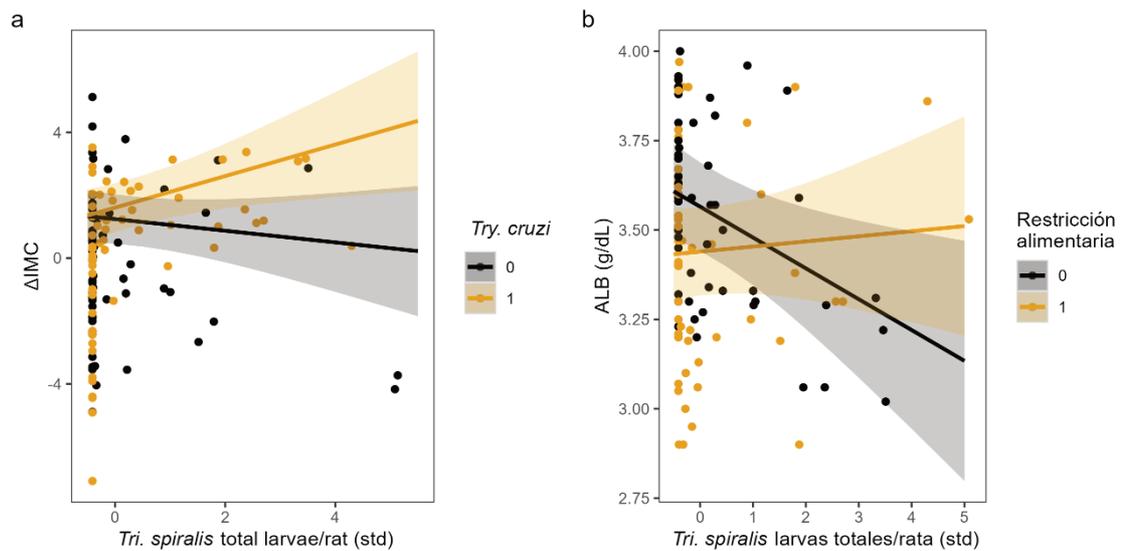
**Figura 21.** Predicciones del modelo del efecto del conflicto social sobre la tolerancia frente a *Try. cruzi*, considerando diferentes indicadores de salud o enfermedad. Simulación para R (0), Tspi (0). La intensidad del parásito se estandarizó antes de la modelización. a- Niveles de peso testicular relativo (PTR) según la intensidad de *Try. cruzi* y el conflicto social; b- Alanina aminotransferasa (ALT) según la intensidad de *Try. cruzi* y el conflicto social.



**Figura 22.** Predicciones del modelo del efecto de la restricción alimentaria y la coinfección con *Tri. spiralis* sobre la tolerancia frente a *Try. cruzi*, considerando diferentes indicadores de salud o

enfermedad. Simulación para CS (0). a- Aspartato aminotransferasa (AST) según la intensidad de *Try. cruzi* y la restricción alimentaria; b- Albúmina (ALB) según la intensidad de *Try. cruzi* y la coinfección; c- Cambio del índice de masa corporal tras la infección ( $\Delta$ IMC) según la intensidad de *Try. cruzi*, la presencia de *Tri. spiralis* y la restricción alimentaria.

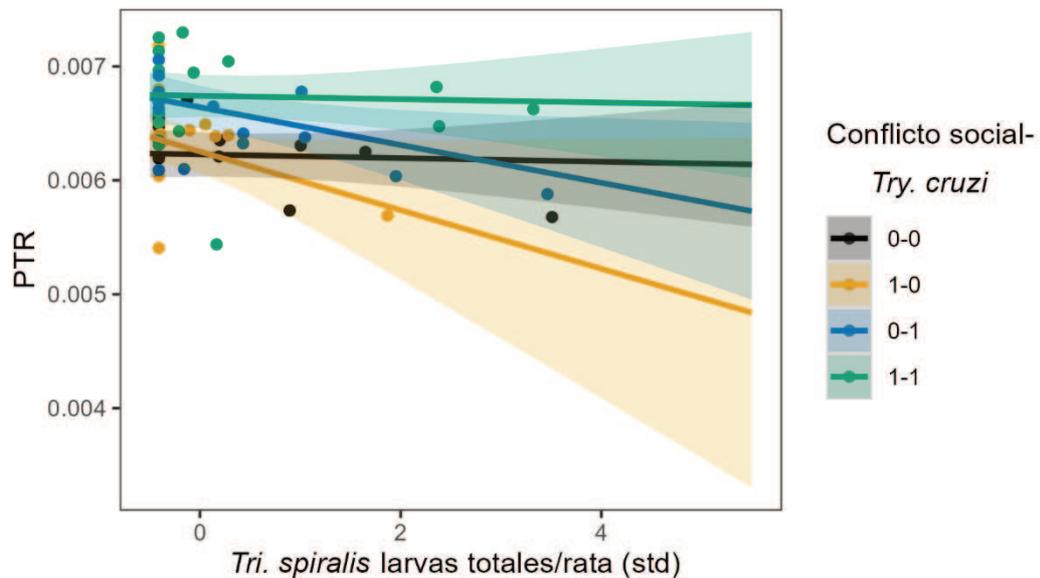
La tolerancia a *Tri. spiralis* estuvo influenciada por la coinfección, en particular en lo que respecta al  $\Delta$ IMC como indicador de salud. Se encontró que la tolerancia fue mayor en presencia de *Try. cruzi*, según lo evidenciado por el cambio en el  $\Delta$ IMC como indicador de la condición de salud (Fig. 23a, Tabla A33). Por otra parte, la asociación entre la intensidad del nematodo y los niveles de albúmina se vio afectada por la restricción alimentaria. El grupo R (0) mostró un descenso en los niveles de ALB a medida que aumentaba la intensidad de *Tri. spiralis*, mientras que en R (1), el efecto negativo de la intensidad de *Tri. spiralis* sobre ALB se neutralizó. Esto significa que la disminución de los niveles de ALB asociada a una mayor intensidad de *Tri. spiralis* se ve mitigada en cierta medida cuando hay exposición a restricción alimentaria (Fig. 23b, Tabla A34).



**Figura 23.** Predicciones del modelo del efecto de la restricción alimentaria y la coinfección sobre la tolerancia frente a *Tri. spiralis*, considerando varios indicadores de salud o enfermedad. Las intensidades del parásito se estandarizaron antes de la modelización. a- Cambio del índice de masa corporal tras la infección ( $\Delta$ IMC) según la intensidad de *Tri. spiralis* y la presencia de *Try. cruzi* (simulación para CS (0), R [0]); b- Niveles de albúmina (ALB) según la intensidad de *Tri. spiralis* y la restricción alimentaria (simulación para CS (0), Tcru [0]).

Al considerar PRT como indicador de salud, el conflicto social y la coinfección influyeron conjuntamente en la tolerancia frente a *Tri. spiralis*. En particular, las ratas

monoinfectadas con *Tri. spiralis* y expuestas al conflicto social mostraron una menor tolerancia en comparación con todos los demás grupos (Fig. 24, Tabla A35). Cabe señalar que los valores de AST y ALT no variaron con la carga parasitaria de *Tri. spiralis* en los diferentes tratamientos (Tablas A36 y A37).



**Figura 24.** Predicciones del modelo del efecto del conflicto social y la coinfección sobre la tolerancia frente a *Tri. spiralis* considerando el peso relativo de los testículos (PTR) como indicador de salud. Las intensidades de los parásitos se estandarizaron antes de la modelización (simulación para R [0]).

#### IV.IV. Discusión

En este capítulo se evaluó la resistencia, la tolerancia y la relación entre las estrategias de defensa bajo diferentes escenarios de desafíos ambientales (conflicto social y/o restricción alimentaria) y coinfección (*Tri. spiralis* y/o *Try. cruzi*). Los resultados alcanzados se analizarán no sólo en torno a la estrategia de defensa implementada por el hospedador, sino también en cuanto al éxito (productividad de los parásitos). Nuestros resultados indican que los desafíos examinados tuvieron un impacto significativo tanto en la resistencia (al menos para uno de los patógenos) como en la tolerancia. Sin embargo, como se detalla a continuación, las predicciones planteadas en relación a este capítulo se cumplieron parcialmente.

La segunda predicción planteada en la tesis se centró en el impacto que la coinfección tendría en las estrategias de defensa adoptadas frente a ambos parásitos. En términos de resistencia, se observó que la coinfección (combinada con el conflicto social) afectó significativamente la respuesta frente a *Tri. spiralis*, pero no frente a *Try. cruzi*, cumpliendo parcialmente con la predicción formulada. En cuanto a la tolerancia, se encontró que la coinfección influía en esta estrategia solo en ciertos indicadores relacionados con ambos parásitos. En los próximos párrafos se discutirán las implicancias de estos hallazgos.

#### IV.IV.I. Los desafíos ambientales modularon la resistencia a *Tri. spiralis* pero no a *Try. cruzi*

Los desafíos ambientales influyeron en la resistencia a *Tri. spiralis*, mientras que no tuvieron ningún impacto en la resistencia a *Try. cruzi*. En concreto, cuando las ratas fueron infectadas solamente con *Tri. spiralis* y sometidas a conflicto social, demostraron una mayor resistencia a la infección en comparación con el resto de los grupos experimentales.

En un estudio previo observamos mayores niveles en la respuesta inmune humoral, tanto innata como adquirida, en ratas expuestas a conflicto social junto con restricción dietética (Cuervo et al., 2018), en consonancia con la hipótesis de profilaxis dependiente de la densidad (Michel et al., 2016). Los parásitos helmintos -como *Tri. spiralis*- desencadenan respuestas inmunes con perfil Th2, lo que resulta en la producción de anticuerpos específicos (principalmente IgE) y citoquinas (IL-4, IL-5 e IL-13) (Bruschi et al., 2022). Estos anticuerpos específicos son un elemento crucial en la respuesta inmune contra *Tri. spiralis*, por lo tanto, se esperaba que, en situaciones de conflicto social y monoinfección, se observaran niveles elevados de estos componentes inmunológicos. Esto podría explicar la mayor resistencia a *Tri. spiralis* detectada en nuestros hallazgos. Sin embargo, de acuerdo a lo expuesto en el CAPÍTULO III, no podemos afirmar que la resistencia observada en el contexto descrito pueda deberse a la inversión en algún parámetro de la respuesta inmune evaluado en esta tesis, ya que ninguno de los indicadores evaluados

mostró un aumento diferencial en función de la interacción entre el conflicto social y la coinfección.

La disminución de la resistencia a *Tri. spiralis* observada en ratas expuestas a coinfección, en contraste con las ratas expuestas a monoinfección, puede atribuirse a cambios en la configuración de la respuesta inmune a causa de la estimulación simultánea por parásitos de diferente índole. Este fenómeno ha sido sugerido en estudios anteriores (Pedersen y Fenton, 2007; Ahmed et al., 2017; Hananeh et al., 2022; Rovenolt y Tate, 2022). Por ejemplo, en un modelo de ratones expuestos a coinfección con *Toxoplasma gondii* y *Heligmosomoides polygyrus*, la presencia de *T. gondii* dio lugar a una fecundidad significativamente mayor del nematodo *H. polygyrus*, ya que la infección previa por *T. gondii* suprimió la respuesta inmunitaria Th2 específica contra el helminto y favoreció un cambio hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Ahmed et al., 2017). La ausencia de efectos evidentes sobre la resistencia a *Try. cruzi* de los tratamientos aplicados en el presente trabajo de tesis, podría atribuirse a que los desafíos no fueran lo suficientemente potentes como para inducir cambios en la resistencia o a las limitaciones impuestas por el tamaño de la muestra.

#### IV.IV.II. La tolerancia fue influenciada tanto por los desafíos antigénicos como por los desafíos ambientales

Entre los indicadores de salud y enfermedad considerados, se identificaron tres parámetros específicos ( $\Delta$ IMC, PRT y ALB) para medir la tolerancia a ambos parásitos. Otros dos parámetros (ALT y AST) resultaron adecuados para evaluar la tolerancia a *Try. cruzi*, pero no a *Tri. spiralis*.

La tolerancia a *Try. cruzi* se vio influenciada tanto por el estado de coinfección como por los desafíos ambientales, en dos de los cinco indicadores identificados. El conflicto social resultó relevante cuando se lo evaluó en consideración de los indicadores ALT o PRT. Este incremento en la tolerancia podría explicarse a causa del estrés inducido por el conflicto social, el cual puede alterar los niveles de hormonas glucocorticoides (Creel et al., 2013). Estas hormonas poseen efectos inmunomoduladores, pudiendo afectar

significativamente la respuesta inmunitaria del hospedador (Cain y Cidlowski, 2017). Dado que la tolerancia está vinculada a mecanismos inmunomoduladores (Medzhitov et al., 2012), en nuestro estudio, los efectos de los glucocorticoides podrían haber contribuido a fomentar estos mecanismos de tolerancia. También sería razonable anticipar una regulación a la baja de los mecanismos de resistencia debido a dichos efectos de los glucocorticoides. Sin embargo, como se detalla en la sección anterior, no se observaron diferencias discernibles entre los tratamientos en términos de resistencia a *Try. cruzi*. Por otro lado, coincidente con estudios previos (Jackson et al., 2014), los resultados aquí presentados sugieren que bajo conflicto social se preservaría la inversión en reproducción (reflejada por los niveles de PTR).

La restricción alimentaria y la coinfección también fueron factores relevantes que afectaron la tolerancia a *Try. cruzi*. Esto dependió del indicador elegido y de la combinación específica de factores presentes. En el caso de  $\Delta$ IMC, los animales expuestos a restricción alimentaria y monoinfección por *Try. cruzi* mostraron una menor tolerancia a este parásito en comparación con los demás grupos. Esto podría explicarse debido a que la presencia concomitante de *Tri. spiralis* podría desencadenar ciertas respuestas fisiológicas, incluyendo un perfil tipo 2 modificado (Ilic et al., 2012), conocido por su asociación con la tolerancia (Martins et al., 2019). En este escenario, las ratas que experimentaron solo la restricción de alimentos, sin el desafío añadido de la coinfección por *Tri. spiralis*, podrían haber visto debilitadas su condición de salud y sus respuestas inmunes a causa de la ingesta reducida de calorías y la pérdida de condición corporal, resultando en una mayor susceptibilidad a la infección por *Try. cruzi* (Telfer et al., 2010). A su vez, esto podría haber conducido a una menor tolerancia a *Try. cruzi* en el grupo con restricción de alimentos en comparación con el grupo alimentado ad libitum. Estos mecanismos podrían haber proporcionado un apoyo adicional para que el hospedador gestionara de manera más eficaz el impacto de la infección por *Try. cruzi*.

Por otro lado, al considerar la enzima AST como indicador de enfermedad, la tolerancia a *Try. cruzi* fue mayor en el grupo con restricción alimentaria en comparación con los animales con libre disponibilidad de alimento. En nuestro estudio, la reducción del índice de masa corporal puede haber desempeñado un papel en la disminución de los niveles de

AST a medida que aumentaba la intensidad de *Try. cruzi*. De hecho, se ha informado que la restricción dietética conduce a una disminución en los niveles de enzimas hepáticas en humanos, incluyendo AST (Huang et al., 2023). Por lo tanto, la disminución de los niveles de AST a altas intensidades de parásitos puede ser consecuencia de una menor condición corporal en un contexto de limitación alimentaria. Sin embargo, la compensación puede tener límites: los niveles de albúmina aumentaron con la intensidad de *Try. cruzi* en animales coinfectados.

Según el marcador evaluado, la tolerancia a *Tri. spiralis* fue mayor en las ratas sometidas a restricción alimentaria (ALB) y en las coinfectadas ( $\Delta$ IMC). Una posible explicación de la tolerancia aumentada en presencia de coinfección podría ser que la presencia del nematodo induzca un predominio de las respuestas Th2 y reguladoras (Pedersen y Fenton, 2007; Hananeh et al., 2022), que están relacionadas con la tolerancia (Martins et al., 2019). Por lo tanto, un predominio de estas respuestas podría promover la tolerancia y ayudar al hospedador a coexistir con múltiples parásitos. En relación con la tolerancia aumentada en restricción alimentaria, en ciertos casos, las enfermedades parasitarias crónicas u otras infecciones persistentes provocan hipoalbuminemia, lo que a menudo contribuye al edema y a la alteración del crecimiento (Soeters et al., 2019). Curiosamente, nuestros resultados revelaron que los animales alimentados *ad libitum* siguieron este patrón esperado, mientras que los animales con restricción de alimentos mostraron lo contrario. Aunque es razonable suponer que la escasez de recursos podría disminuir la tolerancia, los hallazgos de este estudio -junto con otras investigaciones- revelan la tendencia opuesta (Ayres y Schneider, 2009; Budischak y Cressler, 2018; Hite et al., 2020).

Por otro lado, el aumento de la tolerancia a *Tri. spiralis* ante escasez de alimentos (evidenciado por el incremento de ALB en los grupos expuestos a R) podría estar relacionado con la anorexia inducida por la infección (Budischak y Cressler, 2018). Durante la infección, la anorexia (disminución en la ingesta de alimentos) puede tener varias implicaciones en los mecanismos de resistencia. Primero, puede funcionar como un mecanismo adaptativo empleado por el hospedador para restringir el acceso del patógeno a nutrientes esenciales (Martins et al., 2019). Segundo, podría mejorar la

compensación en la asignación fisiológica entre la función inmune y otros procesos fisiológicos, como la digestión (Adamo, 2010; Bernardo y Singer, 2017). Alternativamente, la reducción de la alimentación durante la infección podría tener una función terapéutica al disminuir la movilidad y, por ende, conservar las reservas energéticas del hospedador para ser utilizadas por otros procesos, lo cual podría tener implicancias en la tolerancia (Bernardo y Singer, 2017). Aunque no evaluamos específicamente la anorexia inducida por la infección en nuestro estudio, el impacto observado es compatible con tal efecto.

Al considerar el indicador PTR, la tolerancia a *Tri. spiralis* fue menor en las ratas monoinfectadas y expuestas al conflicto social en comparación con todos los demás grupos. Estos resultados coinciden con los expuestos en la sección previa, donde las ratas expuestas a la misma combinación de tratamientos (grupo CS [1] Tcru [0]) mostraron mayor resistencia al parasitismo por *Tri. spiralis* en comparación con los demás grupos. El impacto contrastado de la coinfección y el conflicto social sobre la resistencia en comparación con la tolerancia sugiere un posible cambio fisiológico, en el que los individuos enfrentados a retos ambientales como el conflicto social y la coinfección adoptan una estrategia de defensa dirigida hacia la resistencia.

La tolerancia y la resistencia funcionan como rasgos defensivos complementarios, esenciales para la protección del hospedador frente a los parásitos (Mazé-Guilmo et al., 2014). La plasticidad fenotípica tiene el potencial de influir en el equilibrio entre la resistencia a la enfermedad y la tolerancia a través de diversos mecanismos, incluyendo cambios en la asignación de recursos (Knutie et al., 2017), la activación de diferentes vías metabólicas y modificaciones en las respuestas inmunes (Martins et al., 2019). Es esencial seguir investigando para comprender a fondo estos mecanismos.

## **CAPÍTULO V: Discusión general**

## Discusión general

En esta discusión general final, se integran los hallazgos de los capítulos previos, abordando el impacto de los desafíos ambientales y la coinfección sobre la respuesta inmune y las estrategias de defensa del hospedador. Se evaluaron tanto la respuesta inmune humoral y celular como la resistencia y tolerancia a parásitos bajo condiciones de conflicto social y restricción alimentaria. A continuación, se presentan los resultados clave y su implicancia en el contexto de la ecoinmunología y la ecología de enfermedades.

La exposición crónica a desafíos ambientales mostró un impacto parcial en la respuesta inmune. Contrario a lo esperado, no se observaron variaciones significativas en los niveles de anticuerpos naturales (AcNs) y específicos en respuesta a los desafíos ambientales. Esto difiere de estudios previos con ratas juveniles, donde se registraron mayores niveles de anticuerpos bajo condiciones de conflicto social y restricción alimentaria (Cuervo et al., 2018). Las diferencias pueden atribuirse a la madurez del sistema inmunológico en ratas adultas utilizadas en esta tesis, ya que la respuesta inmune varía a lo largo del ciclo de vida y puede ser modulada por la edad.

En cuanto a los desafíos antigénicos, se observó un incremento menor de AcNs en animales no infectados pero inmunizados con albúmina en comparación con aquellos infectados con *Try. cruzi* o *Tri. spiralis*. Esto podría deberse a que los parásitos desencadenan respuestas inmunes vigorosas debido a su capacidad para generar un *feedback* con el sistema inmune del hospedador (Ilic et al., 2012; Nagajyothi et al., 2012). Además, las posibles interacciones entre los anticuerpos específicos y la KLH utilizada para evaluar los AcNs podrían haber influido en los resultados (Beck et al., 2008; Murphy y Weaver, 2017), aunque esta hipótesis no fue probada experimentalmente en esta tesis.

El análisis del perfil leucocitario mostró que la respuesta inmune celular fue significativamente influenciada tanto por las infecciones como por los desafíos ambientales. Los niveles de linfocitos aumentaron en animales infectados con *Try. cruzi*, en concordancia con la respuesta esperada durante la fase aguda de la infección (De Araujo-Jorge et al., 2010). Los neutrófilos, esenciales en la eliminación de *Try. cruzi*

(Sousa-Rocha et al., 2015), también mostraron niveles elevados en animales monoinfectados con este parásito. Sin embargo, la coinfección con *Tri. spiralis* parece inhibir la activación de neutrófilos, posiblemente debido a estrategias de evasión del helminto (Ríos-López et al., 2022; Wang et al., 2023).

La coinfección y los desafíos ambientales tuvieron un impacto significativo tanto en la resistencia como en la tolerancia del hospedador. La resistencia a *Tri. spiralis* fue modulada por los desafíos ambientales, mientras que no se observaron efectos en la resistencia a *Try. cruzi*. Específicamente las ratas monoinfectadas con *Tri. spiralis* y sometidas a conflicto social mostraron mayor resistencia a la infección, posiblemente debido a una mayor activación de la respuesta inmune humoral con perfil Th2 (Bruschi et al., 2022). Sin embargo, la coinfección disminuyó la resistencia a *Tri. spiralis*, lo que puede deberse a un cambio en la configuración de la respuesta inmune inducida por la presencia simultánea de parásitos de diferente índole (Pedersen y Fenton, 2007; Ahmed et al., 2017; Hananeh et al., 2022; Rovenolt y Tate, 2022).

Por otra parte, la tolerancia en este estudio fue influenciada por los desafíos antigénicos y ambientales. Entre los indicadores de salud y enfermedad considerados, se identificaron tres parámetros específicos ( $\Delta$ IMC, PRT y ALB) para medir la tolerancia a ambos parásitos, mientras que otros dos parámetros (ALT y AST) fueron adecuados solo para *Try. cruzi*.

La tolerancia a *Try. cruzi* fue afectada por el estado de coinfección y los desafíos ambientales, específicamente en los indicadores ALT y PRT. Se observó que el conflicto social influía en la tolerancia, posiblemente debido al estrés inducido que altera los niveles de hormonas glucocorticoides, las cuales tienen efectos inmunomoduladores que podrían afectar la respuesta inmune del hospedador y fomentar mecanismos de tolerancia (Creel et al., 2013; Cain y Cidlowski, 2017). La restricción alimentaria y la coinfección también afectaron la tolerancia a *Try. cruzi*, dependiendo del indicador utilizado y la combinación específica de factores presentes. Por ejemplo, los animales monoinfectados y expuestos a restricción alimentaria mostraron menor tolerancia a *Try. cruzi* en comparación con los demás grupos, lo cual podría deberse a que la coinfección con *Tri.*

*spiralis* podría desencadenar un perfil Th2 modificado (Ilic et al., 2012), que ha sido asociado como mecanismo de tolerancia (Martins et al., 2019). En este sentido, las ratas que experimentaron solo la restricción de alimentos, sin el desafío añadido de la coinfección por *Tri. spiralis*, podrían haber visto debilitadas su condición de salud y la regulación de su respuesta inmune (Telfer et al., 2010). En cambio, cuando se consideró la enzima AST como indicador de enfermedad, la tolerancia a *Try. cruzi* fue mayor en el grupo con restricción alimentaria, independientemente de la coinfección, lo cual podría deberse al efecto de la dieta sobre los niveles de enzimas hepáticas como AST (Huang et al., 2023).

En cuanto a *Tri. spiralis*, la tolerancia fue mayor en las ratas sometidas a restricción alimentaria y en las coinfectadas. La presencia del nematodo podría inducir respuestas Th2 y reguladoras, promoviendo la tolerancia (Pedersen y Fenton, 2007; Hananeh et al., 2022). Además, la restricción alimentaria podría aumentar la tolerancia debido a la anorexia inducida por la infección, la cual podría tener efectos adaptativos al limitar el acceso del patógeno a nutrientes esenciales y mejorar la asignación de recursos fisiológicos (Ayres y Schneider, 2009; Budischak y Cressler, 2018; Hite et al., 2020).

Finalmente, la tolerancia a *Tri. spiralis* fue menor en ratas monoinfectadas y expuestas al conflicto social en comparación con otros grupos. Considerando que la resistencia fue mayor en monoinfección y conflicto social, esto sugiere un cambio fisiológico en el que los individuos enfrentados a dichos desafíos adoptan una estrategia de defensa dirigida hacia la resistencia, en detrimento de la tolerancia. La resistencia y la tolerancia son rasgos defensivos complementarios, esenciales para la protección del hospedador frente a los parásitos.

En resumen, los hallazgos de esta tesis proporcionan una visión integral de cómo los desafíos ambientales y la coinfección modulan la respuesta inmune y las estrategias de defensa en roedores. Aunque muchos de los resultados requieren mayor evidencia empírica para su mejor interpretación, esta investigación ofrece una base valiosa para futuras estudios que busquen comprender mejor la dinámica de las defensas inmunes en contextos de coinfección y desafíos ambientales.

## **CAPÍTULO VI: Conclusiones y perspectivas**

## Conclusiones y perspectivas

La presente tesis doctoral se enfocó en investigar cómo diversos desafíos ambientales influyen en las estrategias de defensa (resistencia y/o tolerancia) de roedores frente a dos modelos de parásitos distintos: *Trypanosoma cruzi*, un protozoo, y *Trichinella spiralis*, un nematodo. Se abordaron tres aspectos principales: primero, el impacto de la exposición crónica a desafíos ambientales en la respuesta inmune humoral y celular ante desafíos antigénicos (capítulo III); segundo, si la exposición a desafíos ambientales afecta la estrategia de defensa y su eficacia en ratas sometidas a desafíos antigénicos (capítulo IV); y tercero, si los cambios en estas estrategias de defensa influyen en la capacidad de los parásitos para infectar, ya sea en forma individual o combinada (capítulo IV). Para cumplir con los objetivos planteados, se diseñaron cuatro experimentos no simultáneos en ratas de laboratorio, cada uno determinado por diferentes combinaciones de desafíos antigénicos. En cada uno, los animales enfrentaron diversas combinaciones de desafíos ambientales comunes en la naturaleza, como la restricción alimentaria y el conflicto social.

Para el análisis del impacto de la exposición crónica a desafíos ambientales en la respuesta inmune frente a dos especies de parásitos, se emplearon dos enfoques analíticos: un análisis longitudinal para evaluar la variación de la respuesta inmune a lo largo del tiempo y un análisis de la inversión en diferentes parámetros seleccionados para evaluar el efecto de los desafíos ambientales y la coinfección en dichos indicadores.

Se observó que los niveles de anticuerpos naturales y específicos para ambos parásitos no experimentaron variaciones significativas en respuesta a los desafíos ambientales, a diferencia de lo observado en un estudio previo con ratas juveniles. Se sugiere que estas diferencias pueden deberse a cambios intrínsecos en el sistema inmunológico relacionados con la edad. En términos de respuesta inmune humoral específica, se observó un aumento en los niveles de anticuerpos específicos contra ambos parásitos desde la primera semana después de la infección, sin diferencias notables entre la infección única y la coinfección. En cuanto a los indicadores de la respuesta inmune celular, se encontró un aumento significativo sobre los mismos en animales infectados

con *Try. cruzi* o *Tri. spiralis* en comparación con aquellos no infectados. Se sugiere que estos parásitos pueden desencadenar respuestas inmunes exacerbadas debido a su capacidad para interactuar con el sistema inmunológico del hospedador. Asimismo, se observó que tanto las infecciones como los desafíos ambientales influyeron en la inversión en diferentes tipos celulares, como linfocitos, neutrófilos y monocitos. Estos cambios podrían estar relacionados con la complejidad de las interacciones entre los parásitos y el sistema inmunológico del hospedador.

Respecto a la modulación de las estrategias de defensa implementada, los resultados de esta tesis evidencian un impacto significativo de los desafíos examinados sobre la resistencia, particularmente para *Tri. spiralis*, y la tolerancia a ambos parásitos en ratas. Es probable que estas alteraciones tengan consecuencias tanto en la dinámica sanitaria como en la dinámica de la infección. Además, aquí presentamos pruebas de un cambio que favorece la resistencia frente a la tolerancia en presencia de uno de los retos, lo que refleja una decisión fisiológica adaptativa.

Algunos de los resultados aquí presentados pueden ser alteraciones patológicas carentes de cualquier beneficio adaptativo tanto para el parásito como para el hospedador (por ejemplo, cambios en ALB en respuesta a *Try. cruzi* en animales coinfectados). Mientras tanto, otros resultados podrían representar adaptaciones del hospedador para aliviar o contrarrestar los efectos adversos sobre la aptitud inducidos por la infección (por ejemplo, la transición de la tolerancia a la resistencia a *Tri. spiralis* en animales con exposición a conflictos sociales y monoinfección).

Se observó un efecto positivo del conflicto social tanto en las estrategias de defensa (en ALT y PTR como indicadores de condición de salud en el caso de la tolerancia a *Try. cruzi*) como en la inversión en inmunidad. Es posible que su efecto positivo en la inversión en ambos indicadores esté vinculado a una mayor activación de la respuesta inmunitaria, resultado de la exposición a situaciones de alta densidad poblacional donde el riesgo de enfermedad es más elevado. Es interesante destacar, que en algunos casos se evidenció una interacción entre el conflicto social y la coinfección, poniendo de manifiesto una posible plasticidad fenotípica en estos casos.

La restricción alimentaria también mostró efectos similares en algunos de los indicadores de salud relacionados con la tolerancia y en indicadores de la respuesta inmune celular. Esto sugiere que los organismos bajo dieta limitada tienden a asignar más recursos a la inmunidad celular inespecífica que aquellos con acceso ilimitado al alimento, una dinámica que cambia en presencia de infección. En entornos favorables, donde los recursos son abundantes, los organismos deberían poder mantener todas sus funciones vitales simultáneamente. Sin embargo, en situaciones de recursos limitados, los organismos enfrentan desafíos significativos y deben establecer prioridades para sobrevivir estos períodos difíciles.

Además, se observó un impacto significativo de la coinfección en ciertos casos, tanto de forma independiente como en combinación con desafíos ambientales. Esto puede atribuirse a una regulación de la respuesta inmune, donde la inversión en un aspecto suele ocurrir a expensas de la inversión en otro, lo que se conoce como compensación. Sin embargo, también existen estrategias de evasión y manipulación de la respuesta inmune por parte de los parásitos, que no fueron evaluadas en el marco de esta tesis. En la naturaleza, es común que los organismos se vean afectados por múltiples especies de parásitos, por lo que investigar el efecto de las coinfecciones en estudios ecoepidemiológicos resulta de particular relevancia.

Por otra parte, los resultados aquí presentados pueden ser analizados no solo desde el punto de vista de las estrategias implementadas por el hospedador, sino también desde la perspectiva del éxito de los parásitos. La tercera predicción planteada en la tesis sugiere que la productividad de los parásitos se incrementaría debido a la restricción alimentaria y al conflicto social, especialmente cuando ambos factores se combinan, y también debido a la coinfección, particularmente en exposición a desafíos ambientales. Sin embargo, esta predicción no se cumplió. En primer lugar, la restricción alimentaria no tuvo ningún efecto sobre la productividad de ninguno de los parásitos, ya sea por sí sola o en combinación con el conflicto social. Respecto a la productividad de *Try. cruzi*, no se vio influenciada por ninguna de las variables evaluadas. Por otro lado, la productividad de *Tri. spiralis* mostró diferencias significativas entre los tratamientos, observándose un aumento en la coinfección, pero únicamente en animales expuestos a conflicto social.

Aunque los experimentos se llevaron a cabo sin inconvenientes notables, se identificaron aspectos del modelo que podrían ser mejorados en futuros ensayos. Entre estas mejoras se encuentran: aumentar el número de animales por grupo o simplificar el diseño experimental; aumentar las dosis infectivas; perfeccionar la cuantificación de la intensidad parasitaria de *Try. cruzi*; realizar la inoculación de cada especie de parásito en diferentes días para el grupo de coinfección (considerando el ciclo de cada especie); y evaluar parámetros inmunológicos más específicos, entre otros aspectos. La atención a estos puntos adicionales complementaría los resultados obtenidos hasta ahora y optimizaría la realización de los experimentos. Otro aporte valioso sería evaluar el efecto de la edad, dadas las diferencias evidenciadas respecto a los resultados obtenidos por Cuervo et al., (2018). Además, sería interesante replicar un diseño experimental similar, pero con alguna especie de roedores silvestres para obtener perspectivas adicionales sobre estas interacciones.

Los hallazgos presentados en esta tesis aportan nuevos conocimientos sobre la compleja relación entre las estrategias de defensa, los desafíos ambientales y las infecciones en roedores. Dicha relación es un fenómeno complejo que requiere la contribución de estudios adicionales para una comprensión más completa del mismo. Mejorar nuestra comprensión de este fenómeno es fundamental para la salud pública, dada la creciente prevalencia de enfermedades zoonóticas transmitidas por roedores.

## **Bibliografía**

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2022. Inmunología celular y molecular. 10ª ed. Barcelona: Elsevier.

Acevedo GR, Girard MC, Gómez KA. 2018. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front Immunol.* 9:1929.

Adamo SA. 2010. Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain Behav Immun.* 24:194-200.

Adelman JS, Hawley DM. 2017. Tolerance of infection: A role for animal behavior, potential immune mechanisms, and consequences for parasite transmission. *Horm Behav.* 88:79-86.

Agostini I, Vanderhoeven E, Di Bitetti MS, Beldomenico PM. 2017. Experimental testing of reciprocal effects of nutrition and parasitism in wild black capuchin monkeys. *Sci Rep.* 7:12778.

Ahmed N, French T, Rausch S, Kühl A, Hemminger K, Dunay IR, Steinfelder S, Hartmann S. 2017. *Toxoplasma* Coinfection Prevents Th2 Differentiation and Leads to a Helminth-Specific Th1 Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:341.

Alaidrous W, Villa SM, De Roode JC, Majewska AA. 2022. Crowding does not affect monarch butterflies' resistance to a protozoan parasite. *Ecol Evol.* 12:e8791.

Albery GF, Newman C, Ross JB, MacDonald DW, Bansal S, Buesching C. 2020. Negative density-dependent parasitism in a group-living carnivore. *Proc R Soc B.* 287:20202655.

Amoroso CR. 2021. Integrating Concepts of Physiological and Behavioral Resistance to Parasites. *Front Ecol Evol.* 9:635607.

- Aranzamendi C, De Bruin A, Kuiper R, Boog CJP, Van Eden W, Rutten V, Pinelli E. 2013. Protection against allergic airway inflammation during the chronic and acute phases of *Trichinella spiralis* infection. *Clin Exp Allergy*. 43:103-115.
- Armitage SAO. 2016. Maximising fitness in the face of parasites: a review of host tolerance. *Zoology*. 119:281-289.
- Ayres JS, Schneider DS. 2009. The Role of Anorexia in Resistance and Tolerance to Infections in *Drosophila*. *PLoS Biol*. 7:e1000150.
- Babayan SA, Sinclair A, Duprez JS, Selman C. 2018. Chronic helminth infection burden differentially affects haematopoietic cell development while ageing selectively impairs adaptive responses to infection. *Sci Rep*. 8:3802.
- Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, Rajeev M, Rasambainarivo F, Rice BL, Takahashi S, Tatem AJ, Wagner CE, Wang L-F, Wesolowski A, Metcalf CJE. 2022. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol*. 20:193-205.
- Balard A, Heitlinger E. 2022. Shifting focus from resistance to disease tolerance: A review on hybrid house mice. *Ecol Evol*. 12:e8889.
- Balard A, Jarquín-Díaz VH, Jost J, Mittné V, Böhning F, Ďureje Ľ, Piálek J, Heitlinger E. 2020. Coupling between tolerance and resistance for two related *Eimeria* parasite species. *Ecol Evol*. 10:13938-13948.
- Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet ED, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, Carvalho-Pinto CED, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, et al. 2015. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLoS Negl Trop Dis*. 9:e0003849.
- Bartoń K. 2022. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1471.

- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J Stat Soft. arXiv preprint arXiv:1406.5823.
- Beck L, Van-Lüme DSM, Souza JR, Domingues ALC, Favre T, Abath FGC, Montenegro SML. 2008. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. Acta Trop. 108:229-233.
- Becker DJ, Czirájk GÁ, Volokhov DV, Bentz AB, Carrera JE, Camus MS, Navara KJ, Chizhikov VE, Fenton MB, Simmons NB, Recuenco SE, Gilbert AT, et al. 2018. Livestock abundance predicts vampire bat demography, immune profiles and bacterial infection risk. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 373:20170089.
- Beldomenico PM, Begon M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? Trends Ecol Evol. 25:21-27.
- Beldomenico PM, Begon M. 2016. Stress-host-parasite interactions: a vicious triangle? FAVE Cienc Vet. 14:6-19.
- Bernardo MA, Singer MS. 2017. Parasite-altered feeding behavior in insects: integrating functional and mechanistic research frontiers. J Exp Biol. 220:2848-2857.
- Best A, Long G, White A, Boots M. 2012. The implications of immunopathology for parasite evolution. Proc R Soc B. 279:3234-3240.
- Biard C, Monceau K, Motreuil S, Moreau J. 2015. Interpreting immunological indices: The importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds *Turdus merula*. Methods Ecol Evol. 6:960-972.
- Binning SA, Shaw AK, Roche DG. 2017. Parasites and host performance: incorporating infection into our understanding of animal movement. Integr Comp Biol. 57:267-280.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. Physiol Behav. 73:261-271.

- Bolker B, Robinson D. 2022. broom.mixed: tidying methods for mixed models. R package version 0.2.9.4.
- Bonneaud C, Sepil I, Wilfert L, Calsbeek R. 2017. *Plasmodium* infections in natural populations of *Anolis sagrei* reflect tolerance rather than susceptibility. *Integr Comp Biol.* 57:352-361.
- Bonneaud C, Tardy L, Giraudeau M, Hill GE, McGraw KJ, Wilson AJ. 2019. Evolution of both host resistance and tolerance to an emerging bacterial pathogen. *Evol Lett.* 3:544-554.
- Boonstra R. 2013. Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Funct Ecol.* 27:11-23.
- Boonstra R, Dantzer B, Delehanty B, Fletcher QE, Sheriff MJ. 2014. Equipped for Life in the Boreal Forest: The Role of the Stress Axis in Mammals. *ARCTIC.* 67:82-93.
- Bozinovic F, Pörtner H. 2015. Physiological ecology meets climate change. *Ecol Evol.* 5:1025-1030.
- Brooks M E, Kristensen K, Benthem K J ,van, Magnusson A, Berg C W, Nielsen A, Skaug H J, Mächler M, Bolker B M. 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal.* 9:378.
- Bruschi F. 2021. *Trichinella* and Trichinellosis. London: Academic Press.
- Bruschi F, Ashour DS, Othman AA. 2022. *Trichinella*-induced immunomodulation: Another tale of helminth success. *Food Waterborne Parasitol.* 27:e00164.
- Bruschi F, Korenaga M, Watanabe N. 2008. Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? *Trends Parasitol.* 24:462-467.

- Buck JC, Lutterschmidt WI. 2017. Parasite abundance decreases with host density: evidence of the encounter-dilution effect for a parasite with a complex life cycle. *Hydrobiologia*. 784:201-210.
- Budischak SA, Cressler CE. 2018. Fueling Defense: Effects of Resources on the Ecology and Evolution of Tolerance to Parasite Infection. *Front Immunol*. 9:2453.
- Budischak SA, Sakamoto K, Megow LC, Cummings KR, Urban JF, Ezenwa VO. 2015. Resource limitation alters the consequences of coinfection for both hosts and parasites. *Int J Parasitol*. 45:455-463.
- Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP. 2011. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behav Ecol Sociobiol*. 65:23-35.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *J Parasitol*. 83:575-583.
- Cain DW, Cidlowski JA. 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 17:233-247.
- Caldas S, Caldas IS, Diniz LDF, Lima WGD, Oliveira RDP, Cecílio AB, Ribeiro I, Talvani A, Bahia MT. 2012. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop*. 123:170-177.
- Campbell WC (Editor). 1983. *Trichinella* and Trichinosis. Boston, MA: Springer US.
- Coretta S. 2023. tidymv: Tidy Model Visualisation for Generalised Additive Models. R package version 342.
- Cornet S, Bichet C, Larcombe S, Faivre B, Sorci G. 2014. Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *J Anim Ecol*. 83:256-265.

Creel S, Dantzer B, Goymann W, Rubenstein DR. 2013. The ecology of stress: effects of the social environment. *Funct Ecol.* 27:66-80.

Cressler CE, Nelson WA, Day T, McCauley E. 2014. Disentangling the interaction among host resources, the immune system and pathogens. *Ecol Lett.* 17:284-293.

Cuervo PF. 2017. Estudio de marcadores del sistema inmune en roedores en un contexto de estrés. Su aplicación a estudios eco-epidemiológicos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. 263 págs.

Cuervo PF, Beldomenico PM, Sánchez A, Pietrobon E, Valdez SR, Racca AL. 2018. Chronic exposure to environmental stressors enhances production of natural and specific antibodies in rats. *J Exp Zool.* 329:536-546.

Cummings KL, Tarleton RL. 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 129:53-59.

Davies C, Poma RH, Marino Cardozo R, Mora MC, Ramos F, Rajal VB, Basombrío MÁ. 2014. Detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 48:421-428.

Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol.* 22:760-772.

De Araujo-Jorge TC, Telleria J, Rios-Dalenz J. 2010. History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research.* Elsevier. p 3-23.

De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ÂCV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ. 2006. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2:e24.

De Souza W, De Carvalho TMU, Barrias ES. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology. 2010. 2010:295394.

Delignette-Muller ML, Dutang C. 2015. fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. J Stat Soft.

Demas GE, Zysling DA, Beechler BR, Muehlenbein MP, French SS. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts: Assessing vertebrate immune function across ecological contexts. Journal of Animal Ecology. 80:710-730.

Dharmarajan G, Li R, Chanda E, Dean KR, Dirzo R, Jakobsen KS, Khan I, Leirs H, Shi Z-L, Wolfe ND, Yang R, Stenseth NC. 2022. The Animal Origin of Major Human Infectious Diseases: What Can Past Epidemics Teach Us About Preventing the Next Pandemic? Zoonoses. 2:1-13.

Díaz A, Allen JE. 2007. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. Eur J Immunol. 37:3319-3326.

Docampo R, Casellas AM, Madeira ED, Cardoni RL, Moreno SNJ, Mason RP. 1983. Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi* -stimulated human neutrophils. FEBS Letters. 155:25-30.

Eberhardt AT, Costa SA, Marini MR, Racca A, Baldi CJ, Robles MR, Moreno PG, Beldomenico PM. 2013. Parasitism and Physiological Trade-Offs in Stressed Capybaras. PLoS One. 8:e70382.

Ekstrøm CT. 2023. MESS: Miscellaneous Esoteric Statistical Scripts. R package version 0.5.12.

Fabrino DL, Leon LL, Parreira GG, Genestra M, Almeida PE, N. Melo RC. 2004. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. Nitric Oxide. 11:166-174.

- Fahrmeir L, Lang S. 2001. Bayesian Inference for Generalized Additive Mixed Models Based on Markov Random Field Priors. *J R Stat Soc Series C Appl Stat.* 50:201-220.
- Fainboim L. 2012. Introducción a la inmunología humana. 6a edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Falduto GH, Vila CC, Saracino MP, Calcagno MA, Venturiello SM. 2015. *Trichinella spiralis*: killing of newborn larvae by lung cells. *Parasitol Res.* 114:679-685.
- Fasiolo M, Nedellec R, Goude Y, Capezza C, Wood S. 2020. Scalable visualisation methods for modern Generalized Additive Models. *J. Comput. Graph. Statist.* 29:78-86.
- Franssen F, Swart A, Van Knapen F, Van Der Giessen J. 2016. Helminth parasites in black rats (*Rattus rattus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*) from different environments in the Netherlands. *Infect Ecol Epidemiol.* 6:31413.
- French SS, Moore MC, Demas GE. 2009. Ecological immunology: The organism in context. *Integr. Comp. Biol.* 49:246-253.
- Furze RC, Hussell T, Selkirk ME. 2006. Amelioration of Influenza-Induced Pathology in Mice by Coinfection with *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 74:1924-1932.
- Gause WC, Wynn TA, Allen JE. 2013. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nat Rev Immunol.* 13:607-614.
- Gellesch E, Hein R, Jaeschke A, Beierkuhnlein C, Jentsch A. 2013. Biotic Interactions in the Face of Climate Change. En: Lüttge U, Beyschlag W, Francis D, Cushman J (Editores). *Progress in Botany.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 321-349.
- Gervasi SS, Civitello DJ, Kilvitis HJ, Martin LB. 2015. The context of host competence: a role for plasticity in host–parasite dynamics. *Trends Parasitol.* 31:419-425.

- Gozzelino R, Andrade BB, Larsen R, Luz NF, Vanoaica L, Seixas E, Coutinho A, Cardoso S, Rebelo S, Poli M, Barral-Netto M, Darshan D, et al. 2012. Metabolic Adaptation to Tissue Iron Overload Confers Tolerance to Malaria. *Cell Host Microbe*. 12:693-704.
- Graham AL, Allen JE, Read AF. 2005. Evolutionary Causes and Consequences of Immunopathology. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 36:373-397.
- Guivier E, Galan M, Salvador AR, Xuéreb A, Chaval Y, Olsson GE, Essbauer S, Henttonen H, Voutilainen L, Cosson J-F, Charbonnel N. 2010. Tnf- $\alpha$  expression and promoter sequences reflect the balance of tolerance/resistance to Puumala hantavirus infection in European bank vole populations. *Infect Genet Evol*. 10:1208-1217.
- Gupta V, Vale PF. 2017. Nonlinear disease tolerance curves reveal distinct components of host responses to viral infection. *R Soc Open Sci*. 4:170342.
- Hananeh WM, Radhi A, Mukbel RM, Ismail ZB. 2022. Effects of parasites coinfection with other pathogens on animal host: A literature review. *Vet World*. 15:2414-2424.
- Hartig F. 2020. DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. R package version 03. 3.
- Hirahara K, Vahedi G, Ghoreschi K, Yang X-P, Nakayamada S, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. 2011. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics: Helper T-cell differentiation and plasticity. *Immunol*. 134:235-245.
- Hite JL, Pfenning AC, Cressler CE. 2020. Starving the Enemy? Feeding Behavior Shapes Host-Parasite Interactions. *Trends Ecol Evol*. 35:68-80.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biom J*. 50:346-363.
- Howick VM, Lazzaro BP. 2014. Genotype and diet shape resistance and tolerance across distinct phases of bacterial infection. *BMC Evol Biol*. 14:56.

- Huang H, Qiu Y, Tang A, Li W, Yao W, Zhong M, Yang T, Zou T. 2023. The impact of food restriction on liver enzyme levels: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev.* 81:939-950.
- Huang L, Appleton JA. 2016. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol.* 32:798-807.
- Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. 2012. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunol Res.* 52:111-119.
- Jackson JA. 2015. Immunology in wild nonmodel rodents: an ecological context for studies of health and disease. *Parasite Immunol.* 37:220-232.
- Jackson JA, Hall AJ, Friberg IM, Ralli C, Lowe A, Zawadzka M, Turner AK, Stewart A, Birtles RJ, Paterson S, Bradley JE, Begon M. 2014. An Immunological Marker of Tolerance to Infection in Wild Rodents. *PLoS Biol.* 12:e1001901.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 451:990-993.
- Knutie SA, Wilkinson CL, Wu QC, Ortega CN, Rohr JR. 2017. Host resistance and tolerance of parasitic gut worms depend on resource availability. *Oecologia.* 183:1031-1040.
- Kutzer MAM, Armitage SAO. 2016. The effect of diet and time after bacterial infection on fecundity, resistance, and tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol.* 6:4229-4242.
- Kutzer MAM, Kurtz J, Armitage SAO. 2019. A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. *J Anim Ecol.* 88:566-578.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. 2017. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J Stat Softw.* 82:1-26.

- Labocha MK, Schutz H, Hayes JP. 2014. Which body condition index is best? *Oikos*. 123:111-119.
- Larrieu E, Molina V, Albarracín S, Mancini S, Bigatti R, Ledesma L, Chiosso C, Krivokapich S, Herrero E, Guarnera E. 2004. Porcine and rodent infection with *Trichinella*, in the Sierra Grande area of Río Negro province, Argentina. *Ann Trop Med Parasitol*. 98:725-731.
- Lazzaro BP, Little TJ. 2009. Immunity in a variable world. *Philos. Trans. R. Soc. B*. 364:15-26.
- Lefèvre T, Roche B, Poulin R, Hurd H, Renaud F, Thomas F. 2008. Exploiting host compensatory responses: the ‘must’ of manipulation? *Trends Parasitol*. 24:435-439.
- Leiby DA, Duffy CH, Murrell KD, Schad GA. 1990. *Trichinella spiralis* in an Agricultural Ecosystem: Transmission in the Rat Population. *J Parasitol*. 76:360.
- Lenth R. 2022. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.8.3.
- Lin W, Li L, Chen J, Li D, Hou J, Guo H, Shen J. 2018. Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol*. 80:540-545.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*. 88:87-98.
- Loffler SG, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, Romero G, Brihuega B. 2014. Genotypes of pathogenic *Leptospira spp* isolated from rodents in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109:163-167.
- Lüdecke D, Makowski D, Waggoner P, Patil I. 2020. Performance: assessment of regression models performance. R package version 04. 4.

Luna-Gomes T, Filardy AA, Rocha JDB, Decote-Ricardo D, LaRocque-de-Freitas IF, Morrot A, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, DosReis GA, Nunes MP, Freire-de-Lima CG. 2014. Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase. PLoS One. 9:e90582.

Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. 2004. Helminth parasites – masters of regulation. Immunol Rev. 201:89-116.

Malkmus G. 2006. Manual de Bioseguridad En El Laboratorio. World Health Organization.

Manzoli DE, Saravia-Pietro Paolo MJ, Antoniazzi LR, Barengo E, Arce SI, Quiroga MA, Beldomenico PM. 2018. Contrasting consequences of different defence strategies in a natural multihost–parasite system. Int J Parasitol. 48:445-455.

Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. 2006. Refining approaches and diversifying directions in ecoimmunology. Integrative and Comparative Biology. 46:1030-1039.

Martins R, Carlos AR, Braza F, Thompson JA, Bastos-Amador P, Ramos S, Soares MP. 2019. Disease Tolerance as an Inherent Component of Immunity. Annu Rev Immunol. 37:405-437.

Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. Vet. Parasitol. 163:264-280.

Mazé-Guilmo E, Loot G, Páez DJ, Lefèvre T, Blanchet S. 2014. Heritable variation in host tolerance and resistance inferred from a wild host–parasite system. Proc R Soc B. 281:20132567.

McNew SM, Knutie SA, Goodman GB, Theodosopoulos A, Saulsbury A, Yépez RJ, Bush SE, Clayton DH. 2019. Annual environmental variation influences host tolerance to parasites. Proc R Soc B. 286:20190049.

- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. 2012. Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science*. 335:936-941.
- Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol*. 35:221-270.
- Melo RCN, Fabrino DL, D'Ávila H, Teixeira HC, Ferreira AP. 2003. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biol Int*. 27:853-861.
- Michel J, Ebert D, Hall MD. 2016. The trans-generational impact of population density signals on host-parasite interactions. *BMC Evol Biol*. 16:254.
- Miller CVL, Cotter SC. 2018. Resistance and tolerance: The role of nutrients on pathogen dynamics and infection outcomes in an insect host. *J Anim Ecol*. 87:500-510.
- Moleón MS, Parachú Marcó MV, Pietrobon EO, Jahn GA, Beldomenico PM, Siroski PA. 2018. Corticosterone levels and immunological indices in stressed juvenile broad-snouted caimans. *J Zool*. 304:151-158.
- Møller A, Martín-Vivaldi M, Merino S, Soler J. 2006. Density-dependent and geographical variation in bird immune response. *Oikos*. 115:463-474.
- Monje L, Varayoud J, Luque EH, Ramos JG. 2007. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor  $\alpha$  transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol*. 194:201-212.
- Mulenga GM, Namangala B, Chilongo K, Mubamba C, Hayashida K, Henning L, Gummow B. 2021. Challenges in the Diagnostic Performance of Parasitological and Molecular Tests in the Surveillance of African Trypanosomiasis in Eastern Zambia. *Tropical Med*. 6:68.
- Murphy K, Weaver C. 2017. *Janeway's immunobiology*. 9th.Ed. New York and London: Garland science. 904 p.

Murrell KD, Pozio E. 2011. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986–2009. *Emerg Infect Dis.* 17:2194-2202.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease: T. cruzi persistence in Chagas disease. *Cell. Microbiol.* 14:634-643.

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria. 2024. Trichinellosis. URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html>.

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria. 2024. American Trypanosomiasis. URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

Nöckler K, Kapel C. 2007. En J. Dupouy-Camet & K. D. Murrell (Eds.), FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health (OIE). 69-97.

Nussey DH, Watt K, Pilkington JG, Zamoyska R, McNeilly TN. 2012. Age-related variation in immunity in a wild mammal population. *Aging Cell.* 11:178-180.

Orozco MM, Enriquez GF, Cardinal MV, Piccinali RV, Gürtler RE. 2016. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals from a protected and a disturbed area in the Argentine Chaco. *Acta Trop.* 155:34-42.

Orozco MM, Piccinali RV, Mora MS, Enriquez GF, Cardinal MV, Gürtler RE. 2014. The role of sigmodontine rodents as sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* in the Argentinean Chaco. *Infect. Genet. Evol.* 22:12-22.

Owen JC. 2011. Collecting, processing, and storing avian blood: a review: Avian Blood Collection Techniques. *J Field Ornithol.* 82:339-354.

- Pascutti MF, Bottasso OA, Hourquescos MC, Wietzerbin J, Revelli S. 2003. Age-Related Increase in Resistance to Acute *Trypanosoma cruzi* Infection in Rats is Associated with an Appropriate Antibody Response. *Scand J Immunol.* 58:173-179.
- Pedersen AB, Fenton A. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 22:133-139.
- Pérez AR, Bertoya AA, Revelli S, García F. 2011. A high corticosterone/DHEA-s ratio in young rats infected with *Trypanosoma cruzi* is associated with increased susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106:416-423.
- Pozio E. 2000. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Vet. Parasitol.* 93:241-262.
- Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS. 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect Genet Evol.* 9:606-616.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Råberg L. 2014. How to Live with the Enemy: Understanding Tolerance to Parasites. *PLoS Biol.* 12:e1001989.
- Råberg L, Graham AL, Read AF. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Phil Trans R Soc B.* 364:37-49.
- Råberg L, Sim D, Read AF. 2007. Disentangling Genetic Variation for Resistance and Tolerance to Infectious Diseases in Animals. *Science.* 318:812-814.
- Ramírez JC, Cura CI, Da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, et al. 2015. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification

of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn.* 17:605-615.

Ramsay C, Rohr JR. 2021. The application of community ecology theory to co-infections in wildlife hosts. *Ecology.* 102:e03253.

Refardt D, Ebert D. 2007. Inference of parasite local adaptation using two different fitness components. *J Evol Biol.* 20:921-929.

Ribicich M, Gamble HR, Bolpe J, Scialfa E, Krivokapich S, Cardillo N, Betti A, Cambiaggi Holzmann ML, Pasqualetti M, Fariña F, Rosa A. 2010. *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res.* 107:377-380.

Ribicich M, Gamble HR, Rosa A, Sommerfelt I, Marquez A, Mira G, Cardillo N, Cattaneo ML, Falzoni E, Franco A. 2007. Clinical, haematological, biochemical and economic impacts of *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Vet Parasitol.* 147:265-270.

Ribicich MM, Fariña FA, Aronowicz T, Ercole ME, Bessi C, Winter M, Pasqualetti MI. 2020. A review on *Trichinella* infection in South America. *Vet Parasitol.* 285:109234.

Ríos-López AL, Hernández-Bello R, González GM, Sánchez-González A. 2022. *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens selectively inhibit the release of extracellular traps from neutrophils without affecting their additional antimicrobial functions. *Cell Immunol.* 382:104630.

Rovenolt FH, Tate AT. 2022. The Impact of Coinfection Dynamics on Host Competition and Coexistence. *Am Nat.* 199:91-107.

Rovira-Diaz E, El-Naccache DW, Reyes J, Zhao Y, Nasuhidehnavi A, Chen F, Gause WC, Yap GS. 2022. The Impact of Helminth Coinfection on Innate and Adaptive Immune Resistance and Disease Tolerance during Toxoplasmosis. *J Immunol.* 209:2160-2171.

Rutledge RG. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31:e93-e93.

Rynkiewicz EC, Clerc M, Babayan SA, Pedersen AB. 2019. Variation in Local and Systemic Pro-Inflammatory Immune Markers of Wild Wood Mice after Anthelmintic Treatment. *Integr Comp Biol.* 59:1190-1202.

Sánchez CA, Becker DJ, Teitelbaum CS, Barriga P, Brown LM, Majewska AA, Hall RJ, Altizer S. 2018. On the relationship between body condition and parasite infection in wildlife: a review and meta-analysis. *Ecol Lett.* 21:1869-1884.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr. Rev.* 21:55-89.

Schad GA, Duffy CH, Leiby DA, Murrell KD, Zirkle EW. 1987. *Trichinella spiralis* in an Agricultural Ecosystem: Transmission under Natural and Experimentally Modified On-Farm Conditions. *J Parasitol.* 95-102.

Schmunis GA, Yadon ZE. 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115:14-21.

Schoenle LA, Moore IT, Dudek AM, Garcia EB, Mays M, Haussmann MF, Cimini D, Bonier F. 2019. Exogenous glucocorticoids amplify the costs of infection by reducing resistance and tolerance, but effects are mitigated by coinfection. *Proc R Soc B.* 286:20182913.

Schultner J, Kitaysky AS, Welcker J, Hatch S. 2013. Fat or lean: adjustment of endogenous energy stores to predictable and unpredictable changes in allostatic load. *Funct Ecol.* 27:45-55.

Sears BF, Rohr JR, Allen JE, Martin LB. 2011. The economy of inflammation: when is less more? *Trends Parasitol.* 27:382-387.

Sequeira GJ, Zbrun MV, Soto LP, Astesana DM, Blajman JE, Rosmini MR, Frizzo LS, Signorini ML. 2016. Quantitative Risk Assessment of Human Trichinellosis Caused by Consumption of Pork Meat Sausages in Argentina. *Zoonoses Public Health.* 63:167-176.

- Shen S-S, Qu X-Y, Zhang W-Z, Li J, Lv Z-Y. 2019. Infection against infection: parasite antagonism against parasites, viruses and bacteria. *Infect Dis Poverty*. 8:1-12.
- Siegel A, M. Walton R. 2020. *Hematology and Biochemistry of Small Mammals. Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Elsevier. p 569-582.
- Singh P, Best A. 2023. A Sterility–Mortality Tolerance Trade-Off Leads to Within-Population Variation in Host Tolerance. *Bull Math Biol*. 85:1-18.
- Soeters PB, Wolfe RR, Shenkin A. 2019. Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *J Parenter Enteral Nutr*. 43:181-193.
- Sousa-Rocha D, Thomaz-Tobias M, Diniz LFA, Souza PSS, Pinge-Filho P, Toledo KA. 2015. *Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS One*. 10:e0139569.
- Spence AR, Tingley MW. 2020. The challenge of novel abiotic conditions for species undergoing climate-induced range shifts. *Ecography*. 43:1571-1590.
- 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.
- Telleria J, Tibayrenc M (editores). 2017. *American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research*. 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 826 p.
- Teng T-S, Ji A, Ji X-Y, Li Y-Z. 2017. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res*. 2017:1-14.
- Thompson RCA. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int J Parasitol*. 43:1079-1088.
- Tizard I. 2019. *Inmunología veterinaria*. 10<sup>a</sup> ed. Ed. Barcelona, España: Elsevier.

- Vadell MV, Gómez Villafaña IE. 2016. Environmental Variables Associated with Hantavirus Reservoirs and Other Small Rodent Species in Two National Parks in the Paraná Delta, Argentina: Implications for Disease Prevention. *EcoHealth*. 13:248-260.
- Vale PF, Little TJ. 2009. Measuring parasite fitness under genetic and thermal variation. *Heredity*. 103:102-109.
- Varshney A, Ahmad B, Rabbani G, Kumar V, Yadav S, Khan RH. 2010. Acid-induced unfolding of didecameric keyhole limpet hemocyanin: detection and characterizations of decameric and tetrameric intermediate states. *Amino Acids*. 39:899-910.
- Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M. 2015. The importance of multiparasitism: examining the consequences of coinfections for human and animal health. *Parasites Vectors*. 8:1-13.
- Villalba-Alemán E, Justinico DL, Sarandy MM, Novaes RD, Freitas MB, Gonçalves RV. 2019. Haematological alterations in non-human hosts infected with *Trypanosoma cruzi*: a systematic review. *Parasitology*. 146:142-160.
- Vincent CM, Sharp NP. 2014. Sexual antagonism for resistance and tolerance to infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc B*. 281:20140987.
- Walberg J. 2001. White blood cell counting techniques in birds. *Semin Avian Exot Pet Med*. 10:72-76.
- Walls RS, Carter RL, Leuchars E, Davies AJ. 1973. The immunopathology of trichiniasis in T-cell deficient mice. *Clin Exp Immunol*. 13:231-242.
- Wang J, Tang B, You X, Cai X, Jia W, Liu X, Liu M, Jin X, Ding J. 2023. *Trichinella spiralis* excretory/secretory products from adult worms inhibit NETosis and regulate the production of cytokines from neutrophils. *Parasites Vectors*. 16:1-13.

- Washington IM, Van Hoosier G. 2012. Clinical Biochemistry and Hematology. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. p 57-116.
- Webster JP, Gower CM, Knowles SCL, Molyneux DH, Fenton A. 2016. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol Appl.* 9:313-333.
- Weil ZM, Martin LB, Workman JL, Nelson RJ. 2006. Immune challenge retards seasonal reproductive regression in rodents: evidence for terminal investment. *Biol Lett.* 2:393-396.
- Weiss DJ, Wardrop JK. 2011. Schalm's veterinary hematology. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA.
- West-Eberhard MJ. 2003. Developmental plasticity and evolution. Oxford, New York: Oxford University Press. 794 p.
- Wickham H, Wickham H. 2016. Data analysis. Springer.
- Wiedermann CJ. 2021. Hypoalbuminemia as Surrogate and Culprit of Infections. *Int J Mol Sci.* 22:4496.
- Wood S. 2012. mgcv: Mixed GAM Computation Vehicle with GCV/AIC/REML smoothness estimation. R package version.
- Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, Maekawa Y. 2016. Practical methods for collecting *Trichinella* parasites and their excretory-secretory products. *Parasitol Int.* 65:591-595.
- Xu D, Bai X, Xu J, Wang X, Dong Z, Shi W, Xu F, Li Y, Liu M, Liu X. 2021. The immune protection induced by a serine protease from the *Trichinella spiralis* adult against *Trichinella spiralis* infection in pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 15:e0009408.

Yefi-Quinteros E, Muñoz-San Martín C, Bacigalupo A, Correa JP, Cattán PE. 2018. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. *Parasites Vectors*. 11:171.

## ANEXO I

### Ensayo piloto

Previo a los ensayos definitivos con *Try. cruzi* se ejecutó un ensayo piloto de 4 semanas de duración con el objetivo de evaluar diferentes dosis infectivas y de poner a punto los procedimientos concernientes a la inoculación y posterior cuantificación de *Try. cruzi*.

#### Infección experimental

Se utilizaron 8 ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar/Cmedc) machos de 16 semanas de edad en una sala experimental, bajo condiciones controladas. Los animales se organizaron en tres grupos: DB (dosis baja): 3 animales, infectados con 100,000 trypomastigotes; DA (dosis alta): 3 animales, infectados con 400,000 trypomastigotes; C: 2 animales, grupo control.

El inóculo estuvo compuesto por *Try. cruzi*, cepa Tulahuen, utilizando la vía intraperitoneal. El ensayo se desarrolló en un período de 4 semanas, donde semanalmente se realizó la extracción de sangre -de la vena coccígea- para su posterior estudio hematológico. Al término de este periodo los animales fueron eutanasiados y se tomaron muestras de órganos y tejidos para su posterior evaluación histopatológica.

#### Determinación de parámetros hematológicos

Las muestras de sangre con anticoagulante se procesaron en el laboratorio de Análisis clínicos del Hospital de Salud, FCV. Semanalmente mediante la utilización del contador hematológico BC 2800 Vet, (Mindray®) se realizó el conteo total de leucocitos.

#### Evaluaciones histopatológicas

Las muestras de tejidos se fijaron en formol bufferado al 10%. Luego se redujeron y se colocaron en *cassettes* plásticos y se procedió a la deshidratación en alcoholes de graduación creciente (70°, 96° y 100°), se aclararon en xilol y se impregnaron en parafina a 56-58°C. Los tacos realizados se cortaron con micrótopo a 4-5  $\mu$  y luego se colorearon

con Hematoxilina y Eosina. Se evaluaron histopatológicamente los siguientes órganos y tejidos: Hígado, bazo, músculo esquelético, corazón.

Se utilizaron los criterios de clasificación según los grados de lesión propuestos por Pérez et al. (2011). LEVE: infiltración leve con daño de 1 o 2 fibras musculares. MODERADA: agregados de infiltrados con compromiso de 2 a 5 fibras musculares. SEVERA: gran acumulación de células mononucleares con destrucción de más de 5 fibras musculares.

## Resultados

Como resultado, no se encontraron diferencias significativas en indicadores de condición de salud como los parámetros hematológicos entre la dosis alta (400,000 trypomastigotes) y la dosis baja (100,000 trypomastigotes). Debido a esto se definió utilizar una dosis infectiva intermedia de 250,000 trypomastigotes (Tabla A1).

**Tabla A1.** Conteo total de eritrocitos y leucocitos a lo largo de las 4 semanas de tratamiento.

Tratamiento	Eritrocitos ( $10^{12}/L$ )		Leucocitos ( $10^9/L$ )	
	Media	Rango	Media	Rango
Dosis alta	9,22	8,73-9,85	11,28	6,7-21,8
Dosis baja	9,378	8,03-10,14	11,22	7,4-16,8
Control	9,86	9,24-11,1	7,3	6-8,5

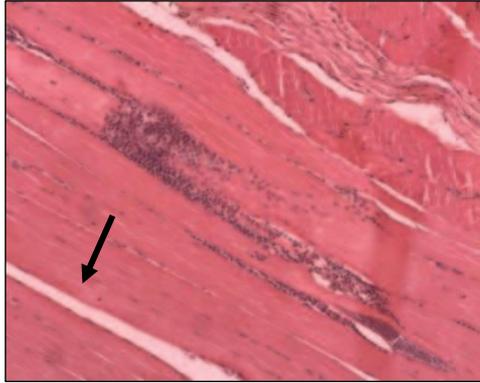
En cuanto al análisis histopatológico, se observaron alteraciones inespecíficas tanto en hígado (alteraciones degenerativas moderadas, vacuolización citoplasmática, moderada congestión central, portal y sinusoidal) como en bazo (congestión difusa de pulpa roja, pigmento hemosiderina, pulpa blanca sin lesiones), de similares características en todos los animales. Por otro lado, se hallaron lesiones de distinto grado en tejido muscular estriado y cardíaco de todos los animales infectados (Tabla A2).

Asimismo, como técnicas de cuantificación se utilizaron la técnica Pizzi-Brenner modificada para el seguimiento de la parasitemia en el tiempo y el examen histológico de órganos para la identificación de nidos amastigotes. La técnica Pizzi-Brenner no resultó eficiente ya que se trata de una técnica con baja sensibilidad y la parasitemia en ratas suele ser menor que en otras especies. Respecto a la búsqueda de nidos, se halló un nido amastigote en el tejido muscular cardíaco de un individuo y un nido en tejido muscular esquelético de otro individuo (Fig. A1).

El hallazgo de un nido amastigote en dos individuos diferentes, expuestos a dosis altas, no es suficiente para concluir que hubo diferencias significativas entre dosis. El hecho de haber observado lesiones moderadas o severas en ambos tejidos musculares de todos los individuos, independiente de la dosis, reforzaría esta afirmación. En consecuencia, para los ensayos definitivos se optó una dosis infectiva intermedia.

**Tabla A2.** Clasificación de los grados de lesión. L (leve); M (moderada); S (severa); S/L (sin lesión); NA (nido amastigote). Los números indican la cantidad de animales que presentaron cada tipo de lesión. n=8

Grado de lesión	CORAZÓN					MUCSULO ESQUELETICO				
	L	M	S	S/L	NA	L	M	S	S/L	NA
<b>DB</b>	0	2	1	0	0	0	2	1	0	0
<b>DA</b>	0	3	0	0	1	0	1	2	0	1
<b>C</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Fig. A1**, Músculo cardíaco H-E 10x. Miocarditis linfocitaria multifocal severa, con presencia de un nido de amastigotes en el interior de una fibra muscular (flecha).

## ANEXO II

### Resúmenes de los modelos estadísticos

**Tabla A3.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos naturales. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

Términos	edf	Ref.df	F	Valor p
s(jaula)	0,00001	1	0,00	0,53
<b>s(Sem.inf.blood):Tspi[0]</b>	<b>2,63</b>	<b>3</b>	<b>6,58</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>s(Sem.inf.blood):Tspi[1]</b>	<b>2,88</b>	<b>3</b>	<b>25,81</b>	<b>&lt;0,0005</b>
s(Sem.inf.blood):Tcru[0]	0,00014	3	0,00	0,62
<b>s(Sem.inf.blood):Tcru[0]</b>	<b>2,47</b>	<b>3</b>	<b>7,00</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A4.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_AcNs (área bajo la curva de los niveles de AcNs en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Términos	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	0,170	0,142	1,192	0,236
R[1]	0,044	0,114	0,383	0,703
CS[1]	-0,080	0,114	-0,700	0,485
<b>Tspi[1]</b>	<b>1,335</b>	<b>0,164</b>	<b>8,116</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tcru[1]</b>	<b>1,456</b>	<b>0,160</b>	<b>9,084</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tspi[1]:Tcru[1]</b>	<b>-1,429</b>	<b>0,229</b>	<b>-6,245</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A5.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos anti-Tspi. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	F	Valor p
<b>s(jaula)</b>	<b>0.863</b>	<b>1</b>	<b>6.691</b>	<b>0.006</b>
<b>s(Sem.inf):Tcru[0]</b>	<b>2.947</b>	<b>3</b>	<b>94.337</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>s(Sem.inf):Tcru[1]</b>	<b>2.927</b>	<b>3</b>	<b>79.105</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A6.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_anti-Tspi (área bajo la curva de los niveles de anti-Tspi en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	2,686	0,254	10,591	<0,0005
R[1]	0,013	0,252	0,052	0,959
CS[1]	-0,144	0,252	-0,573	0,569
Tcru[1]	0,092	0,252	0,367	0,715

**Tabla A7.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el nivel de anticuerpos anti-Tcru. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	F	Valor p
s(jaula)	0.0001	1	0.00	0.54
<b>s(Sem.inf):Tspi[0]</b>	<b>2.29</b>	<b>3</b>	<b>59.21</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>s(Sem.inf):Tspi[1]</b>	<b>2.79</b>	<b>3</b>	<b>57.12</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A8.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_anti-Tcru (área bajo la curva de los niveles de anti-Tcru en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	5,880	0,424	13,878	<0,0005
R[1]	-0,505	0,437	-1,156	0,260
CS[1]	-0,409	0,441	-0,927	0,365
Tspi[1]	-0,086	0,437	-0,196	0,846

**Tabla A9.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de leucocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	F	Valor p
s(jaula)	0	1	0	0,62
s(Sem.inf):Tspi[0]	0,03	3	0,01	0,24
s(Sem.inf):Tspi[1]	0	3	0	0,66
s(Sem.inf):Tcru[0]	0,89	3	0,81	0,08
<b>s(Sem.inf):Tcru[1]</b>	<b>2,50</b>	<b>3</b>	<b>26,04</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A10.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de linfocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	Chi.sq	Valor p
s(jaula)	0,0002	1	0,0001	0,46
s(Sem.inf):Tspi[0]	0,0002	3	0,0001	0,58
s(Sem.inf):Tspi[1]	0,0006	3	0,0001	0,71
s(Sem.inf):Tcru[0]	0,3923	3	0,56	0,23
<b>s(Sem.inf):Tcru[1]</b>	<b>2,6425</b>	<b>3</b>	<b>98,78</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A11.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	41011,079	2279,214	17,994	<0,0005
R[1]	2772,993	2276,694	1,218	0,226
CS[1]	431,492	2272,630	0,190	0,850
<b>Tspi[1]</b>	<b>-7883,121</b>	<b>2290,655</b>	<b>-3,441</b>	<b>0,001</b>
<b>Tcru[1]</b>	<b>28674,214</b>	<b>3216,036</b>	<b>8,916</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tcru[1]:R[1]</b>	<b>-8044,646</b>	<b>3105,519</b>	<b>-2,590</b>	<b>0,011</b>
<b>Tcru[1]:CS[1]</b>	<b>6195,107</b>	<b>3107,812</b>	<b>1,993</b>	<b>0,049</b>
<b>Tcru[1]:Tspi[1]</b>	<b>9946,757</b>	<b>3119,382</b>	<b>3,189</b>	<b>0,002</b>

**Tabla A12.** Análisis *post hoc* de AUC\_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término R\*Tcru.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
R0 Tcru0 - R1 Tcru0	-2772,99	2306,48	-9008,75	3462,76	0,630
R0 Tcru0 - R0 Tcru1	-36745,15	2272,75	-42906,09	-30584,20	<0,0005
R0 Tcru0 - R1 Tcru1	-31473,49	2249,52	-37575,82	-25371,17	<0,0005
R1 Tcru0 - R0 Tcru1	-33972,15	2192,81	-39920,77	-28023,54	<0,0005
R1 Tcru0 - R1 Tcru1	-28700,50	2168,72	-34588,41	-22812,59	<0,0005
R0 Tcru1 - R1 Tcru1	5271,65	2145,60	-614,51	11157,82	0,091

**Tabla A13.** Análisis *post hoc* de AUC\_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término CS\*Tcr.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
CS0 Tcr0 - CS1 Tcr0	-431,49	2281,96	-6589,09	5726,11	0,998
CS0 Tcr0 - CS0 Tcr1	-29625,27	2264,96	-35597,33	-23653,21	<0,0005
CS0 Tcr0 - CS1 Tcr1	-36251,87	2173,44	-42151,56	-30352,18	<0,0005
CS1 Tcr0 - CS0 Tcr1	-29193,78	2244,80	-35253,39	-23134,16	<0,0005
CS1 Tcr0 - CS1 Tcr1	-35820,38	2152,42	-41940,28	-29700,48	<0,0005
CS0 Tcr1 - CS1 Tcr1	-6626,60	2122,39	-12399,85	-853,35	0,020

**Tabla A14.** Análisis *post hoc* de AUC\_linfocitos (área bajo la curva de los niveles de linfocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi\*Tcr.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
Tspi0 Tcr0 - Tspi1 Tcr0	7883,12	2316,78	1636,72	14129,52	0,009
Tspi0 Tcr0 - Tspi0 Tcr1	-27749,44	2171,35	-33661,29	-21837,60	<0,0005
Tspi0 Tcr0 - Tspi1 Tcr1	-29813,08	2106,91	-35564,14	-24062,02	<0,0005
Tspi1 Tcr0 - Tspi0 Tcr1	-35632,57	2338,09	-41936,44	-29328,70	<0,0005
Tspi1 Tcr0 - Tspi1 Tcr1	-37696,20	2278,36	-43847,93	-31544,47	<0,0005
Tspi0 Tcr1 - Tspi1 Tcr1	-2063,64	2151,72	-7964,96	3837,69	0,773

**Tabla A15.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de neutrófilos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	Chi.sq	Valor p
s(jaula)	0,0003	1	0,0001	0,53
s(Sem.inf):Tspi[0]	0,6527	3	1,17470	0,14
s(Sem.inf):Tspi[1]	0,0012	3	0,00007	0,91
s(Sem.inf):Tcru[0]	0,58	3	1,03297	0,14
<b>s(Sem.inf):Tcru[1]</b>	<b>2,33</b>	<b>3</b>	<b>16,45501</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A16.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	12037,60	709,48	16,97	<0,0005
<b>R[1]</b>	<b>4204,90</b>	<b>772,40</b>	<b>5,44</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>CS[1]</b>	<b>1303,59</b>	<b>526,41</b>	<b>2,48</b>	<b>0,015</b>
Tspi[1]	-673,80	777,82	-0,87	0,388
<b>Tcru[1]</b>	<b>6872,02</b>	<b>915,46</b>	<b>7,51</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tcru[1]:R[1]</b>	<b>-6356,77</b>	<b>1053,66</b>	<b>-6,03</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tcru[1]:Tspi[1]</b>	<b>-4074,22</b>	<b>1058,67</b>	<b>-3,85</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A17.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi\*Tcru.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru0	673,80	786,66	-1444,09	2791,70	0,827
Tspi0 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	-3693,63	740,88	-5715,17	-1672,09	<0,0005
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	1054,39	719,98	-910,24	3019,02	0,471
Tspi1 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	-4367,44	796,06	-6514,66	-2220,21	<0,0005
Tspi1 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	380,59	776,42	-1713,50	2474,68	0,961
Tspi0 Tcru1 - Tspi1 Tcru1	4748,02	729,82	2750,36	6745,69	<0,0005

**Tabla A18.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término R\*Tcru.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
R0 Tcru0 - R1 Tcru0	-4204,90	782,25	-6316,48	-2093,32	<0,0005
R0 Tcru0 - R0 Tcru1	-4834,91	774,04	-6936,78	-2733,04	<0,0005
R0 Tcru0 - R1 Tcru1	-2683,04	766,71	-4764,93	-601,14	0,007
R1 Tcru0 - R0 Tcru1	-630,01	748,24	-2658,55	1398,52	0,834
R1 Tcru0 - R1 Tcru1	1521,86	740,12	-484,70	3528,43	0,190
R0 Tcru1 - R1 Tcru1	2151,87	728,26	158,17	4145,58	0,031

**Tabla A19.** Análisis *post hoc* de AUC\_neutrófilos (área bajo la curva de los niveles de neutrófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término CS.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
CS0 - CS1	-1303,59	527,79	-2377,42	-229,77	0,019

**Tabla A20.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo total de monocitos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	F	Valor p
s(jaula)	0,0002	1	0,0001	0,62
s(Sem.inf):Tspi[0]	0,0003	3	0,0001	0,44
s(Sem.inf):Tspi[1]	0,0018	3	0,0005	0,36
s(Sem.inf):Tcru[0]	0,59	3	0,40	0,15
s(Sem.inf):Tcru[1]	0,0003	3	0,00004	0,56

**Tabla A21.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	4203,66	370,18	11,36	<0,0005
R[1]	127,83	308,15	0,41	0,681
CS[1]	63,77	308,79	0,21	0,838
Tspi[1]	-1013,12	449,82	-2,25	0,030
<b>Tcru[1]</b>	<b>5130,23</b>	<b>430,92</b>	<b>11,91</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>Tcru[1]:Tspi[1]</b>	<b>-4018,85</b>	<b>618,30</b>	<b>-6,50</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A22.** Análisis *post hoc* de AUC\_monocitos (área bajo la curva de los niveles de monocitos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi\*Tcru.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru0	1013,12	452,36	-199,32	2225,57	0,130
Tspi0 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	-5130,23	434,21	-6300,74	-3959,71	<0,0005
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	-98,25	423,33	-1241,13	1044,63	0,996
Tspi1 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	-6143,35	455,21	-7364,47	-4922,23	<0,0005
Tspi1 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	-1111,38	445,52	-2307,95	85,19	0,077
Tspi0 Tcru1 - Tspi1 Tcru1	5031,97	426,85	3878,11	6185,84	<0,0005

**Tabla A23.** Modelo aditivo generalizado mixto que describe el efecto de los desafíos antigénicos sobre el conteo de eosinófilos. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). La letra “s” delante de cada variable indica un smooth o suavizado de las curvas. Edf: grados de libertad efectivos. Ref.df: grados de libertad de referencia.

	edf	Ref.df	F	Valor p
s(jaula)	0,16	1	0,19	0,28
s(Sem.inf):Tspi[0]	0,0001	3	0,000001	0,96
<b>s(Sem.inf):Tspi[1]</b>	<b>2,79</b>	<b>3</b>	<b>6,66</b>	<b>0,0002</b>
s(Sem.inf):Tcru[0]	0,0003	3	0,00004	0,58
s(Sem.inf):Tcru[1]	0,0001	3	0,00001	0,62

**Tabla A24.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de desafíos ambientales y de infección en AUC\_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ).

Término	Coefficiente	Std. Error	Valor-t	Valor p
Intercepto	671,06	96,04	6,99	<0,0005
R[1]	-40,58	78,41	-0,52	0,606
CS[1]	39,81	78,50	0,51	0,613
<b>Tspi[1]</b>	<b>848,12</b>	<b>115,99</b>	<b>7,31</b>	<b>&lt;0,0005</b>
Tcru[1]	44,98	108,76	0,41	0,680
<b>Tcru[1]:Tspi[1]</b>	<b>-482,06</b>	<b>157,89</b>	<b>-3,05</b>	<b>0,003</b>

**Tabla A25.** Análisis *post hoc* de AUC\_eosinófilos (área bajo la curva de los niveles de eosinófilos en sangre periférica post-inmunización) con el test de Tukey. Evaluación de la diferencia de medias para el término Tspi\*Tcru.

Contraste	Diferencia de medias	Error estándar	Intervalo de confianza		Valor p
			95%		
			Límite inferior	Límite superior	
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru0	-848,12	117,27	-1163,17	-533,06	<0,0005
Tspi0 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	-44,98	110,37	-345,43	255,46	0,977
Tspi0 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	-411,04	107,34	-703,21	-118,88	0,003
Tspi1 Tcru0 - Tspi0 Tcru1	803,13	118,47	484,31	1121,95	<0,0005
Tspi1 Tcru0 - Tspi1 Tcru1	437,07	115,72	125,61	748,53	0,003
Tspi0 Tcru1 - Tspi1 Tcru1	-366,06	108,72	-662,85	-69,27	0,011

**Tabla A26.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de desafíos ambientales en la resistencia a *Tri. spiralis*. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Valor-z	Valor p
Intercepto	6,877	0,362	19,022	<0,0005
<b>CS [1]</b>	<b>-1,197</b>	<b>0,450</b>	<b>-2,659</b>	<b>0,008</b>
R [1]	-0,029	0,310	-0,093	0,926
<i>Try. cruzi</i> ocurrencia	-0,237	0,433	-0,547	0,584
<b>CS [1] * <i>Try. cruzi</i> ocurrencia</b>	<b>1,249</b>	<b>0,620</b>	<b>2,016</b>	<b>0,044</b>

**Tabla A27.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de desafíos ambientales en la resistencia a *Try. cruzi*. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Valor-z	Valor p
Intercepto	-6,827	0,347	-19,665	<0,0005
R [1]	0,107	0,255	0,418	0,676
CS [1]	-0,136	0,259	-0,525	0,600
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	0,260	0,280	0,928	0,354

**Tabla A28.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en PTR. Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	0,007	9,43E-05	64,000	69,106	<0,0005
CS [1]	1,41E-04	1,20E-04	37,410	1,177	0,246
<b>R [1]</b>	<b>0,003</b>	<b>1,19E-04</b>	<b>72,570</b>	<b>22,648</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<i>Try. cruzi</i> intensidad	1,54E-05	5,25E-05	108,000	0,293	0,770
<b><i>Tri. spiralis</i> ocurrencia</b>	<b>-1,98E-04</b>	<b>8,50E-05</b>	<b>37,810</b>	<b>-2,332</b>	<b>0,025</b>
<b>CS [1] * R [1]</b>	<b>-0,001</b>	<b>1,71E-04</b>	<b>38,050</b>	<b>-3,924</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b><i>Try. cruzi</i> intensidad * CS [1]</b>	<b>2,10E-04</b>	<b>8,76E-05</b>	<b>98,440</b>	<b>2,402</b>	<b>0,018</b>

**Tabla A29.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en alanina amino transferasa (ALT). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Valor-z	Valor p
Intercepto	2,455	0,050	48,690	<0,0005
CS [1]	-0,077	0,053	-1,450	0,146
<b><i>Try. cruzi</i> intensidad</b>	<b>0,221</b>	<b>0,053</b>	<b>4,170</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	1,70E-04	0,052	0,00E+00	0,997
R [1]	0,043	0,052	0,830	0,407
<b><i>Try. cruzi</i> intensidad * CS [1]</b>	<b>-0,250</b>	<b>0,062</b>	<b>-4,010</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A30.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en aspartato amino transferasa (AST). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	t-value	Valor p
Intercepto	4,369	0,066	65,808	<0,0005
<i>Try. cruzi</i> intensidad	-0,006	0,022	-0,253	0,800
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	0,093	0,072	1,288	0,198
CS [1]	0,022	0,079	0,273	0,785
R [1]	-0,075	0,072	-1,044	0,297
<b><i>Try. cruzi</i> intensidad * R [1]</b>	<b>-0,125</b>	<b>0,039</b>	<b>-3,177</b>	<b>0,001</b>

**Tabla A31.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en albúmina (ALB). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	3,650	0,056	47,869	65,486	<0,0005
CS [1]	0,024	0,058	36,176	0,415	0,681
<b>R [1]</b>	<b>-0,124</b>	<b>0,057</b>	<b>41,138</b>	<b>-2,184</b>	<b>0,035</b>
<i>Try. cruzi</i> intensidad	<b>0,134</b>	<b>0,059</b>	<b>102,253</b>	<b>2,283</b>	<b>0,025</b>
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	<b>-0,164</b>	<b>0,057</b>	<b>41,504</b>	<b>-2,860</b>	<b>0,007</b>
<i>Try. cruzi</i> intensidad * <i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	<b>-0,204</b>	<b>0,064</b>	<b>106,479</b>	<b>-3,206</b>	<b>0,002</b>

**Tabla A32.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Try. cruzi* intensidad y desafíos ambientales en cambio en IMC post infección ( $\Delta$ IMC). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	1,547	0,429	42,158	3,607	0,001
CS [1]	-0,718	0,499	26,197	-1,437	0,162
<b>R [1]</b>	<b>-4,130</b>	<b>0,591</b>	<b>39,625</b>	<b>-6,992</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<i>Try. cruzi</i> intensidad	0,382	0,702	100,831	0,544	0,588
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	0,475	0,515	32,233	0,921	0,364
<b>R [1] * CS [1]</b>	<b>1,645</b>	<b>0,705</b>	<b>25,945</b>	<b>2,332</b>	<b>0,028</b>
<i>Try. cruzi</i> intensidad * R [1]	-1,524	0,844	88,432	-1,806	0,074
<i>Tri. spiralis</i> ocurrencia * R [1]	1,233	0,709	30,439	1,738	0,092
<i>Try. cruzi</i> intensidad * <i>Tri. spiralis</i> ocurrencia	-0,261	0,726	100,472	-0,360	0,720
<b><i>Try. cruzi</i> intensidad * <i>Tri. spiralis</i> ocurrencia * R [1]</b>	<b>2,196</b>	<b>0,929</b>	<b>94,571</b>	<b>2,364</b>	<b>0,020</b>

**Tabla A33.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en cambio en IMC post infección ( $\Delta$ IMC). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	1,243	0,400	49,872	3,106	0,003
CS [1]	-0,069	0,420	39,239	-0,165	0,870
<i>Tri. spiralis</i> intensidad	-0,185	0,187	114,361	-0,991	0,324
<i>Try. cruzi</i> ocurrencia	0,365	0,414	43,961	0,880	0,384
<b>R [1]</b>	-2,785	0,409	42,888	-6,805	0,000
<b><i>Tri. spiralis</i> intensidad * <i>Try. cruzi</i> ocurrencia</b>	0,687	0,276	117,955	2,485	0,014

**Tabla A34.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en albúmina (ALB). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	3,565	0,063	47,014	56,432	<2e-16
CS [1]	0,027	0,067	37,546	0,398	0,693
<b>R [1]</b>	-0,126	0,066	42,348	-1,913	0,063
<b><i>Tri. spiralis</i> intensidad</b>	-0,086	0,033	115,744	-2,588	0,011
<i>Try. cruzi</i> ocurrencia	-0,005	0,065	41,778	-0,079	0,938
<b><i>Tri. spiralis</i> intensidad * R [1]</b>	0,101	0,044	115,115	2,263	0,026

**Tabla A35.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en Peso testicular relativo (PTR). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	0,006	9,90E-05	113	62,894	<0,0005
CS [1]	2,55E-05	1,37E-04	113	0,185	0,853
<b>R [1]</b>	<b>0,003</b>	<b>1,09E-04</b>	<b>113</b>	<b>24,789</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<i>Tri. spiralis</i> intensidad	-1,59E-05	5,11E-05	113	-0,312	0,755
<b><i>Try. cruzi</i> ocurrencia</b>	<b>4,15E-04</b>	<b>1,13E-04</b>	<b>113</b>	<b>3,665</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<b>CS [1] * R [1]</b>	<b>-0,001</b>	<b>1,54E-04</b>	<b>113</b>	<b>-4,045</b>	<b>&lt;0,0005</b>
<i>Tri. spiralis</i> intensidad * CS [1]	-2,41E-04	1,47E-04	113	-1,642	0,103
<i>Try. cruzi</i> ocurrencia * CS [1]	7,47E-05	1,59E-04	113	0,469	0,640
<i>Tri. spiralis</i> intensidad * <i>Try. cruzi</i> ocurrencia	-1,50E-04	9,00E-05	113	-1,665	0,099
<b><i>Tri. spiralis</i> intensidad * <i>Try. cruzi</i> ocurrencia * CS [1]</b>	<b>3,92E-04</b>	<b>1,75E-04</b>	<b>113</b>	<b>2,239</b>	<b>0,027</b>

**Tabla A36.** Modelo lineal mixto que describe el efecto de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en aspartato amino transferasa (AST). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Df	t-value	Valor p
Intercepto	73,967	2,822	53,383	26,209	<0,0005
CS [1]	1,444	2,787	38,067	0,518	0,608
R [1]	-4,230	2,778	38,506	-1,522	0,136
<i>Tri. spiralis</i> intensidad	2,437	1,277	97,391	1,908	0,059
<b><i>Try. cruzi</i> ocurrencia</b>	<b>18,346</b>	<b>2,793</b>	<b>39,579</b>	<b>6,568</b>	<b>&lt;0,0005</b>

**Tabla A37.** Modelo lineal generalizado mixto que describe el efecto de la intensidad de *Tri. spiralis* desafíos ambientales en alanina amino transferasa (ALT). Las variables significativas aparecen en negrita (valor  $p < 0,05$ ). Las variables explicativas numéricas se estandarizaron antes del análisis.

Términos	Coefficiente	Std. error	Valor-z	Valor p
Intercepto	2,297	0,042	54,220	<0,0005
CS [1]	-0,058	0,043	-1,350	0,177
R [1]	0,037	0,043	0,860	0,387
<i>Tri. spiralis</i> intensidad	-0,003	0,018	-0,150	0,881
<b><i>Try. cruzi</i> ocurrencia</b>	<b>0,281</b>	<b>0,043</b>	<b>6,590</b>	<b>&lt;0,0005</b>