

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

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS**

TEMA:

RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE *CAVIA APEREA*
FRENTE A DIFERENTES DENSIDADES POBLACIONALES

AUTORA:

Mvz. Sandra Patricia Robalino Nieto

Esperanza, Santa-Fe, Argentina

-2022-

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

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS**

TEMA:

RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE *CAVIA APEREA*
FRENTE A DIFERENTES DENSIDADES POBLACIONALES

DIRECTORA:

Dra. Andrea Laura Racca

CODIRECTORA:

Dra. María Ayelen Teresita Eberhardt

TRIBUNAL EVALUADOR DEL PLAN DE TRABAJO FINAL INTEGRADOR:

Titulares:

Dra. Cecilia María Camussone (INTA – Rafaela)

Dra. Antonela Florencia Stassi (CONICET - UNL)

Mgter. Sebastián Recce (FCV – UNL)

Suplentes:

Dra. Carina Porporatto (CONICET-UNVM)

Dra. María Sol Renna (ICIVET – UNL - CONICET)

Esperanza, Santa-Fe, Argentina

-2022-

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mis hijos Samantha y Raúl, que son mi fortaleza
y alegría para seguir día a día...*

A mis padres, Victoria y Rodrigo por creer en mí...

AGRADECIMIENTO

A mis hijos por la espera incansable de que su mamá llegue pronto a casa, por ese amor que me dan el cual me hace sentir especial y por acompañarme siempre ya que nuestro amor es “*hasta el infinito y más allá*” ...

A mis papas porque nunca dejan de ayudarme y me dan fuerza cuando más la necesito, sin ustedes no sería lo que soy...

A mi familia venezolana Yese, Sra. María Elena y Luna gracias chicas por estar siempre pendientes, hacen que mis días acá sean más fáciles, los quiero mucho...

A Melissa por invitarme al campo a vivir una experiencia inolvidable y por darme clases de argentinismo, eres una dosis de alegría siempre...

A Nadia por no negarse a estudiar conmigo y darme ese empuje que muchas veces necesito ...

A mis familiares y amigos que desde muy lejos me apoyan, me alientan, para terminar todo este recorrido pronto.

A mi directora Andrea Racca y codirectora Ayelen T. Eberhardt por ser mi fuente de conocimiento, compartirme sus experiencias y apoyarme en cada momento, gracias a ustedes por hacerme sentir parte de este grupo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología de Enfermedades por abrirme las puertas y darme la oportunidad de trabajar con un gran equipo, cada uno de ustedes son increíbles.

A todos los docentes y compañeros de la Maestría, cada uno aportaron información valiosa para formarme como profesional.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias –Universidad Nacional del Litoral, por involucrarme en su campus de estudio.....

"Es justamente la posibilidad de realizar un sueño

lo que hace que la vida sea interesante".

Paulo Coelho en su libro el Alquimista

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac: anticuerpos

AcN: anticuerpos naturales

AcT: anticuerpos Totales

Ag: antígenos

ASB: albumina sérica bovina

anti-Igs: anti- inmunoglobulinas

BCR: receptor del linfocito B

CAID: Curso de Acción para la Investigación y Desarrollo

DO: densidad óptica

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

GLMM: modelos mixtos lineales generalizados

H: hembra

HCl: ácido clorhídrico

HPA: eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

ID: identificación de cada individuo

IgA: inmunoglobulina A

IgD: inmunoglobulina D

IgE: inmunoglobulina E

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

Igs: inmunoglobulinas

IL: interleucina

KLH: hemocianina de la lapa californiana

LMM: modelo lineal

M: macho

M & M: marco teórico y metodológico

NP: no preñada

pH: potencial de hidrógeno

PBS: buffer fosfato salino

PBS-T: tampón fosfato salino

PIC: Proyectos de Innovación Curricular

P. Te: preñada temprana

P. Ta: preñada tardía

rpm: revoluciones por minuto

TMB: tetrametilbencidina

γ : gamma

μ : alpha

α : delta

ε : epsilon

k: kappa

Λ : lamda

μ l: microlitro

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	iv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
Objetivos General:	4
Objetivos específicos:	4
HIPÓTESIS.....	4
MARCO TEÓRICO Y METODOLÓGICO	5
Marco teórico.....	5
Figura 1	7
Materiales y métodos.	8
<i>Descripción del experimento con animales</i>	8
<i>Variables independientes</i>	9
Figura 2. Total de individuos observados en cada recaptura discriminado por clausuras. Clausuras de baja densidad: En rojo, clausura I y en celeste clausura III. Clausuras de alta densidad: en verde clausura II y en lila clausura IV.....	10
Figura 3. Total de animales observados en cada recaptura a lo largo del experimento, discriminado por clausuras (I, I I, II, IV). Las líneas rojas corresponden a individuos hembras y las azules a individuos machos.....	11
<i>Evaluación y determinación de las respuestas inmunes humorales</i>	11
<i>Análisis estadístico</i>	12
DESARROLLO/ RESULTADOS.....	14
Evaluación de Anticuerpos totales	14
Figura 4	14
Evaluación de Anticuerpos Naturales	15
Figura 5	15
Evaluación de Anticuerpos Anti-albúmina	16
Figura 6	16
Tabla 1.....	17
Resultados de los diferentes anticuerpos evaluados.....	17
Tabla 2.....	17
Anticuerpos Totales.....	17
Figura 7	18
Tabla 3.....	18
Tabla 4.....	19
Figura 8	20

Tabla 5.....	20
Figura 9.....	20
Tabla 6.....	21
Anticuerpos Naturales.....	21
Tabla 7.....	22
Figura 10.....	23
Tabla 8.....	23
Tabla 9.....	24
Anticuerpos Específicos.....	24
Tabla 10.....	24
DISCUSIÓN.....	26
Respuesta inmune y densidad poblacional.....	26
Respuesta inmune, edad y condición corporal del individuo.....	27
Respuesta inmune y estado reproductivo.....	28
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

En poblaciones naturales, la respuesta inmune está involucrada en la regulación de interacciones hospedador-parásito, donde la producción de anticuerpos estaría influenciada por factores ecológicos y ambientales. El presente trabajo tuvo como objetivo general contribuir a dilucidar los mecanismos humorales de defensa del cuis común (*Cavia aperea*) expuestos a diferentes escenarios de densidad poblacional. Para ello se evaluaron componentes del sistema inmune y sus asociaciones con diferentes características del hospedador. Entre 2017 y 2018 se realizaron 15 recapturas de cuis mantenidos en semicautiverio en 4 clausuras (2 de alta y 2 de baja densidad). Se muestrearon 107 individuos (56 hembras) y se obtuvieron 535 muestras de plasma.

Los resultados mostraron que los niveles de anticuerpos totales en ambos sexos dependieron de: edad, condición corporal y densidad. A mayor edad, condición corporal y densidad, los individuos tuvieron mayores niveles. Considerando el estado reproductivo, los machos activos (testículos escrotales) tuvieron mayores niveles que los no activos (testículos abdominales) y las hembras lactantes mayores que las no lactantes. Independientemente de la densidad, las hembras tuvieron mayores niveles de anticuerpos naturales que los machos, pero dependió de la edad y condición corporal. Considerando el estado reproductivo, los machos activos tuvieron menores niveles que los no activos y las hembras con preñez temprana menores que las hembras no preñadas. La producción de anticuerpos específicos, fue mayor en hembras, pero dependió de la condición corporal: a mayor condición de los machos la diferencia entre sexos desapareció. La inversión en los diferentes tipos de inmunidad dependió del sexo, las demandas fisiológicas y el contexto.

ABSTRACT

In natural populations, the immune response is involved in the regulation of host-parasite interactions, where antibody production would be influenced by ecological and environmental factors. The goal of this study was to contribute to elucidate the humoral defense mechanisms of wild guinea pig (*Cavia aperea*) exposed to different population density scenarios. For this purpose, components of the immune system and their associations with different host characteristics were evaluated. Between September 2017 and June 2018, 15 recaptures of wild guinea pigs kept in semi-captivity in 4 enclosures (2 high and 2 low density) were performed. During this period, 107 individuals (56 females) were sampled and 535 plasma samples were obtained.

The results showed that total antibody levels in both sexes depended on: age, body condition and density. At higher age, body condition and density, individuals had higher levels. Considering reproductive status, scrotal males (scrotal testicles) had higher levels than inactive males (abdominal testicles) and lactating females had higher levels than non-lactating females. Regardless of density, females had higher levels of natural antibodies than males, but it depended on age and body condition. Considering reproductive status, active males and early pregnant females had lower levels than inactive males and non-pregnant females, respectively. Finally, specific antibodies production was higher in females than males, but this difference depended on body condition: when males had higher body condition, the difference between both sexes tended to disappear. The investment in the different types of immunity depended on sex, physiological demands and context.

INTRODUCCIÓN

Es necesario conocer la enfermedad desde un punto de vista ecológico y patogénico para realizar vigilancia epidemiológica y sanitaria, ya que así se podrá detectar la presencia, recurrencia o dispersión de los diferentes parásitos. Este interés origina una nueva disciplina denominada ecoinmunología, definida como el estudio del entendimiento de la complejidad de las causas y consecuencias de la respuesta inmune, con amplia perspectiva empírica y conceptual (Schulenburg y col., 2009; Schoeenle y col., 2018). Esta disciplina trata de comprender cómo los organismos responden a procesos infecciosos y enfermedades que conducen a cambios, reflejados generalmente por una modulación de la respuesta inmune, logrando entender la susceptibilidad a la enfermedad en una amplia gama de especies en un contexto ecológico y evolutivo (Demas y Nelson, 2011). Además, el conocimiento desde la ecoinmunología puede ayudar a la comprensión del riesgo de infección dado por el contacto directo e indirecto entre individuos infectados y susceptibles, lo cual indica que esta interacción entre ambos, podría dar como resultado el deceso de la infección o el progreso de la misma (Beldomenico y Begon, 2015).

El sistema inmunitario, ha evolucionado y continúa evolucionando, en respuesta a la presión de selección que ejercen las infecciones sobre los animales en sus entornos naturales (Malagoli y Ottaviani, 2014). Este sistema es muy importante dentro del estudio de poblaciones silvestres, ya que contribuye a dilucidar la ecoepidemiología de enfermedades que afectan la salud del hombre y los animales. Las poblaciones silvestres a menudo están expuestas a múltiples infecciones y distintas circunstancias tanto de origen natural como antropogénicas, que afectan a su vez, las interacciones entre parásitos y hospedadores (Irvine, 2006; Lochmiller, 1996; Beldomenico y Begon, 2010; Eberhardt, 2014). El efecto y las consecuencias de estas interacciones, pueden ser evaluadas a través del estudio del sistema inmune de las especies.

El sistema inmune se ha convertido en un campo importante de investigación como un medio para comprender, relacionar e interpretar los cambios que ocurren en el individuo como consecuencia de la interacción con sus parásitos. Este sistema involucra infinitas redes interactivas de células y moléculas, en donde ninguna respuesta inmunitaria se limita a un único mecanismo (Tizar, 2019), consta de una respuesta temprana (inmunidad innata) y una respuesta tardía (inmunidad adquirida) que son altamente coordinadas (Cadavid, 2009).

La inmunidad innata responde de inmediato a un invasor a través del reconocimiento de moléculas ampliamente conservadas y distribuidas en la naturaleza, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (Abbas y col., 2012; Delves, 2018). Así las respuestas innatas son relativamente rápidas, inespecíficas, y se comportan como defensa inicial contra los parásitos invasores. Esta defensa incluye barreras anatómicas (mucosas y piel), microbiota (bacterias no patógenas), factores humorales (lisozima, complemento, proteínas) y células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas inmaduras, las cuales además pueden mediar la inflamación (Murphy y Weaver, 2016). En este proceso de inflamación, también puede participar el sistema de complemento, a través de enzimas que median la eliminación de microorganismos y células que han modificado sus antígenos de

superficie. La actividad del sistema de complemento puede estar mediada, además, por anticuerpos y a través de la opsonización de parásitos y células infectadas (Demas y Nelson, 2011).

Se ha demostrado que ciertos componentes de la inmunidad humoral innata, como anticuerpos naturales (AcN), ciertas citocinas y componentes del sistema complemento, están involucrados en la supervivencia de organismos al participar activamente en la resistencia temprana a la infección (Lochmiller y Deerenberg, 2000). Los AcN son únicos entre las inmunoglobulinas, ya que su síntesis no requiere exposición previa a un antígeno (Ag), son codificados por el genoma de la línea germinal y durante su ontogénesis no existe recombinación genética (reordenamiento de genes que codifican para la inmunoglobulina) ni hipermutación somática (mutaciones que llevan a la maduración de la afinidad de los anticuerpos) (Casali y Schettino, 1996).

Si el sistema inmune innato no consigue eliminar la infección, se pone en marcha la respuesta inmune adquirida, la cual genera una respuesta específica contra los parásitos y memoria inmunológica. La unidad anatómico-funcional de ese sistema son las células T y B (Murphy y Weaver, 2017). Las células B, son aquellas que, al transformarse en células plasmáticas, producen anticuerpos que pueden neutralizar parásitos y sus toxinas, activar el complemento, funcionar como opsoninas y además pueden mediar citotoxicidad celular. Por otra parte, las células T producen citocinas que modulan las funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune y median además citotoxicidad frente a células infectadas, estresadas o tumorales (Kourilsky y Truffa-Bachi, 2001).

Al producirse una estimulación de la respuesta inmune adquirida, se produce un conjunto heterogéneo de glicoproteínas denominado anticuerpos, los cuales poseen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor (Rojas, 2017). En mamíferos, existen 5 diferentes isotipos de anticuerpos llamados también inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que se diferencian por la conformación de las cadenas pesadas, las cuales son conocidas como *gamma*, *mu*, *alpha*, *delta* y *epsilon* (γ , μ , α , δ , ϵ), respectivamente. Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo (al menos de mamíferos) pueden clasificarse como tipo *kappa* (K) o *lambda* (λ), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas (García-Merino, 2011). La inmunoglobulina que se encuentra más concentrada en suero y en fluidos corporales es la IgG y en segundo orden la IgM. Cuando se produce la respuesta inmune, aparece en primera instancia IgM y luego IgG. La IgA predomina en las secreciones de los diferentes tejidos linfoides asociados a mucosas, como por ejemplo en saliva, lágrimas y leche materna. La IgD es un receptor de antígenos del linfocito B (BCR) y raramente se encuentra en fluidos corporales. Por último, la IgE que se localiza en piel y membranas mucosas (principalmente pulmonar), es la de menor concentración en el suero, pero sus valores aumentan en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y también frente a parásitos pluricelulares, en donde juegan un rol relevante (Tizard, 2019).

Las respuestas inmunes modulan las diferentes etapas de la interacción hospedador-parásito: establecimiento, desarrollo y proliferación o reproducción sexual del parásito (Beldomenico y Begon, 2015). Se asume, desde el punto de vista del costo fisiológico y energético, que las defensas de un organismo, la ejecución y el mantenimiento de las mismas, tienen costos variables

y substanciales los cuales pueden ser modificados por diversos contextos (Schoenle y col., 2018). La inversión de recursos en la inmunidad dependerá de la disponibilidad de nutrientes y demandas fisiológicas, donde existen compensaciones de intercambio (*trade-off*) para cumplir con el balance entre: el sistema inmune, la reproducción y el crecimiento (Eberhardt y col., 2013; Cuervo, 2017).

La importancia del estudio de la inmunidad en poblaciones silvestres radica principalmente, en discernir y comprender si los niveles de marcadores inmunológicos observados en un individuo son resultado de la exposición a ciertos parásitos, o de la capacidad diferencial de respuestas inmunes (Cuervo, 2017). Estas respuestas además requieren energía y al existir por lo general, pocos recursos en la naturaleza, las respuestas inmunes podrían estar limitadas. Además, estas respuestas, pueden verse afectadas por estresores como densidad poblacional, disponibilidad de alimento, factores ambientales, factores antropogénicos, entre otros (Viney y Riley, 2014;2017).

El aumento de densidad poblacional, por ejemplo, puede causar un aumento de la exposición del hospedador a los parásitos, además de tener un impacto directo sobre la condición del hospedador debido al estrés social y nutricional. Esto también afecta a la inmunocompetencia de los individuos (Beldomenico y col., 2008), al poner en marcha mecanismos neurofisiológicos que pueden ocasionar inmunosupresión, de esta forma los individuos se vuelven más susceptible a las infecciones (Beldomenico y Begon, 2010).

De acuerdo a lo anterior, la presente propuesta pretende contribuir al conocimiento del sistema inmune para generar herramientas que permitan evaluar la condición de salud de los animales silvestres. En particular, determinar el efecto de la densidad poblacional sobre ciertos compartimentos del sistema inmune del cuis común (*Cavia aperea*); una especie de roedor de la familia Caviidae ampliamente distribuida por Sudamérica (Escudero y Terzaghi, 2007).

OBJETIVOS

Objetivos General:

Contribuir a dilucidar los mecanismos humorales de defensa del cuis común (*Cavia aperea*) expuestos a diferentes escenarios de densidad poblacional.

Objetivos específicos:

1. Establecer el efecto de la densidad poblacional sobre parámetros inmunológicos: anticuerpos (naturales, totales y anti-albumina) del cuis común (*Cavia aperea*).
2. Relacionar los anticuerpos (naturales, totales y anti-albumina) con características del hospedador (sexo, condición corporal, edad y estado reproductivo) en el cuis común (*Cavia aperea*), bajo diferentes escenarios de densidad poblacional.

HIPÓTESIS

1. Al variar la densidad poblacional, los individuos de *C. aperea*, tendrán diferentes niveles de anticuerpos (naturales, totales y anti-albumina).
2. Las características del hospedador (sexo, condición corporal, edad y estado reproductivo) influyen sobre los parámetros inmunológicos (anticuerpos) de los individuos de *C. aperea*.

MARCO TEÓRICO Y METODOLÓGICO.

Marco teórico

Los animales silvestres se enfrentan a diferentes desafíos a lo largo de toda su vida: por ejemplo: la escasez de alimento, conflicto social y la exposición a parásitos. Estos desafíos pueden ocasionar variabilidad en algunos componentes del sistema inmune (Eberhardt y col., 2013; Beldomenico y Begon, 2015; Cuervo, 2017). A su vez, el sistema inmune, está altamente coordinado para que los individuos estén adecuadamente protegidos de las infecciones mientras se evita el daño inmunomediado (Viney y Riley, 2017).

De acuerdo a los desafíos y la carga parasitaria, se activa la función inmune la cual es responsable de modular varias etapas de la interacción hospedador-parásito: establecimiento, desarrollo, proliferación y reproducción sexual (Beldomenico y Begon, 2015). Dentro de las poblaciones, los diferentes mecanismos inmunes puestos en marcha de cada individuo, pueden diferir tanto debido a razones intrínsecas (ej. genéticas), como extrínsecas (ej. diferente exposición a infecciones y demás desafíos a lo largo de la vida) (Viney y Riley, 2017). Es aquí donde el sistema inmune se adapta y actúa optimizando la forma y las respuestas inmunitarias, maximizando la aptitud de los individuos (Graham, 2013).

El *trade-off* de la disposición de recursos entre diversos aspectos fisiológicos determina la existencia de variabilidad fenotípica entre los individuos, teniendo consecuencias en el crecimiento, supervivencia y reproducción (Bolnick y col., 2011). El crecimiento es influenciado por varios factores en el transcurso de la vida del individuo: disponibilidad de alimento, densidad poblacional, competencia, salud y desafíos ambientales (English y col., 2012; Lee y col., 2012; Schmidt y col., 2012). A su vez, el crecimiento del individuo puede verse afectado de forma diferencial si los desafíos ambientales se dan en etapas tempranas o tardías de su vida (Kriengwatana y col., 2013). Ha sido demostrado, que el tamaño corporal, es un parámetro clave en la historia de vida de un organismo, ya que, en conjunto con la edad influencia la madurez sexual, por lo tanto, puede condicionar el potencial y éxito reproductivo de los individuos (Griffiths y Brook, 2005; Berner y Blanckenhorn, 2007).

Es relevante además considerar el efecto de los estresores a nivel poblacional; individuos de la misma especie pueden presentar diferentes rangos de regulación, aunque se enfrenten a las mismas condiciones ambientales (Beldomenico y Begon, 2015). Los niveles de estrés pueden variar y pueden depender, por ejemplo: del sexo del individuo, de su condición fisiológica, estado reproductivo, etc. (Beldomenico y col., 2008)

Algunos estudios muestran que ciertos componentes del sistema inmune se estimulan por el estrés, de acuerdo a la edad (Martin, 2009). Sin embargo, está ampliamente aceptado que el estrés prolongado (crónico) disminuye la función inmune a través de varios mecanismos (eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y los glucocorticoides), dejando a los individuos más susceptibles a infecciones (Webster y col., 2002; Sapolsky y col., 2000). En estudios con especies de roedores, ratas (*Rattus norvegicus*) y

carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*), se observó lo contrario: ante un estrés crónico, algunos componentes del sistema inmune aumentaron (Cuervo y col., 2018; Eberhardt y col., 2013). En ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*, cep. Wistar, variedad albus) se encontró que los individuos bajo estrés por conflicto social crónico presentaron una inversión mayor de recursos en inmunidad humoral adquirida (a través de la evaluación de anticuerpos específicos) respecto al grupo control. Mientras que animales con limitada disponibilidad de alimento estimularon la inmunidad celular (recuento en eosinófilos) y humoral innata (AcN) ante la exposición a un antígeno. Al mismo tiempo, contrario a lo esperado, la combinación de ambos estresores produjo un efecto sinérgico en los niveles de la respuesta inmune humoral innata (AcN) y un aumento en la respuesta humoral adquirida (anticuerpos específicos) (Cuervo y col., 2018). Así mismo, en carpinchos, bajo una situación de estrés crónico por restricción de alimento y restricción física, se observó también, un aumento de la inmunidad humoral innata (AcN) y un aumento de la inmunidad celular (recuentos de eosinófilos) (Eberhardt y col., 2013).

El aumento de la densidad poblacional determina la existencia de conflicto social, uno de los principales estresores. Este conflicto ocurre tanto en especies sociales como en aquellas de hábitos solitarios (Blanchard, 2001). Los individuos de una especie social interactúan con el hábitat y entre ellos mismos. El estresor ocasionado por el conflicto social en estas especies no solo incluye interacciones físicas sino además involucra múltiples estímulos sensoriales (Chester y col., 2010). Por otra parte, la variación en el tamaño y la composición de cada grupo social puede causar modificaciones importantes en las interacciones, por ejemplo; en los sistemas de apareamiento y sistemas de cuidado parental (Panebianco, 2019).

El cuis silvestre (*Cavia aperea*), es un roedor caviomorfo (histicognato sudamericano), herbívoro con amplia distribución en los pastizales húmedos del sur de Sudamérica (Redford y Eisenberg, 1992). Es terrestre y de hábitos crepusculares, vive en grupos de 5 a 10 individuos llegando a formar colonias numerosas (Canevari y Vaccaro, 2007). El tiempo de gestación varía entre 60-71 días y su destete entre 20–25 días, con una camada de entre 1–7 crías precociales (Guenther y col., 2018; Schumann y col., 2014; Sobrero y Eberhardt, 2019). Esta especie es de estructura social poligínica, se caracteriza por formar grupos de un macho y de una a tres hembras (Sachser, 1986), donde la copulación se da según el orden jerárquico de dominancia, que se establece entre enfrentamientos violentos (Canevari y Vaccaro, 2007).

En Argentina, esta especie, posee una amplia distribución geográfica (Figura 1) y su estado de conservación es de preocupación menor, ya que es abundante y ha demostrado capacidad de adaptación a ambientes modificados por el hombre (Sobrero y Eberhardt, 2019). Estas características de la especie facilitan su estudio en la región.



Figura 1: Mapa de distribución actual de *Cavia aperea* en Argentina. (Extraído de Sobrero y Eberhardt, 2019)

Materiales y métodos.

Descripción del experimento con animales

Las muestras que se utilizaron en este trabajo final provienen de un estudio experimental que se desarrolló en el marco de los proyectos PICT-2014-2333 “Riesgo de infección a altas densidades: importancia relativa de la tasa de contacto y de la susceptibilidad en un roedor social” y CAID 50420150100042L. Los objetivos generales de dicho experimento fueron: establecer el efecto de diferentes escenarios de densidad sobre la prevalencia y la abundancia de distintos tipos de parásitos del cuis común (*Cavia aperea*) e instaurar el efecto de la alta densidad sobre patrones comportamentales de dicha especie, relevantes en la interacción parásito-hospedador.

El diseño experimental consto de dos tratamientos (alta y baja densidad) y sus réplicas. El mismo se llevó a cabo en clausuras cuyas dimensiones brindan condiciones de semicautividad a las poblaciones de *C. aperea*, permitiendo el comportamiento espacial característico de la especie y solo evitando la dispersión de los individuos.

Breve descripción del estudio experimental: en septiembre de 2017, en 4 clausuras (aproximadamente 0.13ha. cada una) se distribuyeron al azar individuos de *Cavia aperea*. Estos individuos fueron; capturados de la naturaleza, desparasitados (con fines que escapan a este trabajo de tesis) y mantenidos en cuarentena, con el fin de formar las poblaciones fundadoras. Estas poblaciones, al comienzo del experimento estuvieron formadas por: *-Baja densidad:* 5 hembras y 1 machos (en dos clausuras) y *-Alta densidad:* 15 hembras y 3 machos (en dos clausuras). A las dos semanas de iniciado el estudio, al momento de la recaptura y toma de muestras, se introdujeron individuos infectados naturalmente con endo y ectoparásitos específicos de la especie, mantenidos previamente en cuarentena para verificar el estado de infección. La distribución se realizó de la siguiente manera: clausuras de baja densidad: 1 hembra y 1 macho (llegando a $6+2=8$ cuises totales) y en las clausuras de alta densidad: 3 hembras y 3 machos (llegando a $18+6=24$ cuises totales). El criterio para establecer densidades se ajustó de acuerdo a resultados previamente publicados para tamaños de grupos y ámbitos de hogar de la especie, obtenidos mediante telemetría y captura-recaptura (Sachser, 1986; Asher y col., 2004).

A partir de la constitución de las poblaciones fundadoras con animales susceptibles y animales infectados, se realizaron recaptura de todos los animales, cada 2 y luego cada 3 semanas, en el período comprendido entre septiembre de 2017 y julio 2018. En cada recaptura (15 recapturas totales) se tomaron muestras de sangre para recuento de glóbulos y obtención de plasma, y las medidas morfométricas: masa corporal, estado reproductivo, largo total, largo de pata y se hizo el recuento de ectoparásitos. Se recolectaron, además, heces individuales para análisis coproparasitológicos y medición de corticosterona fecal.

La muestra de sangre se tomó sin la utilización de anestésicos y no superó el 1% del peso corporal en volumen. La misma se obtuvo mediante la punción de la vena safena externa con aguja 25 G (0.6 mm) y se recolectó inmediatamente de la gota de sangre que se genera en el lugar de la punción, con tubos capilares heparinizados (Hem y col., 1998). Las muestras se mantuvieron refrigeradas

a 4°C hasta su posterior procesado. En el laboratorio se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación (15 minutos a 7500 rpm) y a su almacenamiento a -20°C en tubos rotulados.

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune específica, 25 individuos fueron inmunizados con albúmina sérica bovina (ASB) en las semanas 35 y 37 posteriores al inicio del experimento (Tabla 2). En la semana 35 las clausuras de baja densidad tenían 3 (todas hembras) y 4 individuos (2 hembras) respectivamente y las de alta densidad: 9 (6 hembras) y 11 (7 hembras) individuos respectivamente. Las inmunizaciones se realizaron con 100 µg de albúmina sérica bovina (ASB, Fundación Universidad Nacional de San Luis, Argentina), suspendida en hidróxido de aluminio 15% como adyuvante (Alhydrogel® 2%) (Rivera-Aguilar y col., 2008). El volumen final de 200 µl se dividió en dos dosis y fue inyectado de manera subcutánea en cada uno de los flancos (Diehl y col., 2001). Las inmunizaciones con ASB ya que se trata de un antígeno T-dependiente (de características proteicas) utilizado en la evaluación de la respuesta inmune humoral (Dearman y col., 2000; Edwards y col., 1980; Rivera-Aguilar y col., 2008). La toma de muestra postinmunización fueron a los días 7, 14, 24 de la primera inmunización. En el día 14 se realizó la segunda inmunización.

Variables independientes

Densidad poblacional. Se tomó en cuenta los diferentes escenarios desde la formación de las poblaciones fundadoras y se fue corrigiendo según el número de individuos que se obtenía en cada recaptura, ya que a lo largo del experimento el número total de individuos por clausura fue variando debido a nacimientos y muertes de individuos (Figura 2 y 3).

Sexo. Machos y hembras.

Condición corporal. Para la medida de la condición corporal se utilizó un índice residual (Green, 2001), que se estimó a partir de la regresión lineal de la relación entre la masa corporal y la longitud total, e incluyó el ajuste por estado de preñez (factor de tres niveles = no preñada (aquí se incluye a los machos), preñez temprana y preñez tardía) (Eberhardt y col., 2015). Se tomó en cuenta el estado de preñez, ya que, en una hembra con preñez avanzada, una proporción sustancial de su masa corporal corresponde a la placenta y los fetos por lo que no refleja directamente la condición corporal de la misma (Megías y col., 2018).

Edad. La edad se tomó como una variable de tres categorías: 0, primer mes; 1, segundo mes y 2 de dos meses en adelante. Con los datos que se obtuvieron de los individuos que nacieron en las clausuras y bibliografía previa (Asher y col., 2004, Asher y col., 2008, Adrian y Sachser, 2011) se establecieron dichas categorías. El punto de corte para la categoría 2, fue el largo total de 22cm, a partir del cual todos los individuos fueron considerados adultos. Cabe aclarar que todos los individuos de las poblaciones fundadoras eran adultos y pertenecían a la categoría 2.

Estado reproductivo. Para hembras se tuvo en cuenta el estado de preñez, el cual se dividió en 3 categorías: no preñadas, preñez temprana y preñez tardía, además de una variable con 2 categorías: lactantes y no lactantes. Las categorías fueron determinadas a través de palpación y observación directa de cada individuo en cada recaptura y se determinaron en función del tamaño del feto (Aplin y col., 2003). Se consideró como preñez temprana, desde que comienzan a ser palpables los fetos hasta los 40-45 días aproximadamente (Turner y Trudinger, 2000), momento a partir del cual, los fetos presentan un crecimiento mayor y son observables de forma directa (datos no publicados de nuestro laboratorio; Turner y Trudinger, 2000; Aplin y col., 2003; Schumann y col., 2014). Esta última etapa, desde los 40-45 días hasta el parto se consideró preñez tardía. En machos el estado reproductivo se dividió en dos categorías: no activos y activos. “No activos:” aquellos individuos con testículos abdominales (dentro de la cavidad abdominal), y “activos”: individuos con testículos escrotales (descendidos en cavidad pélvica) (Aplin y col., 2003). Esto se obtuvo mediante observación directa y palpación.

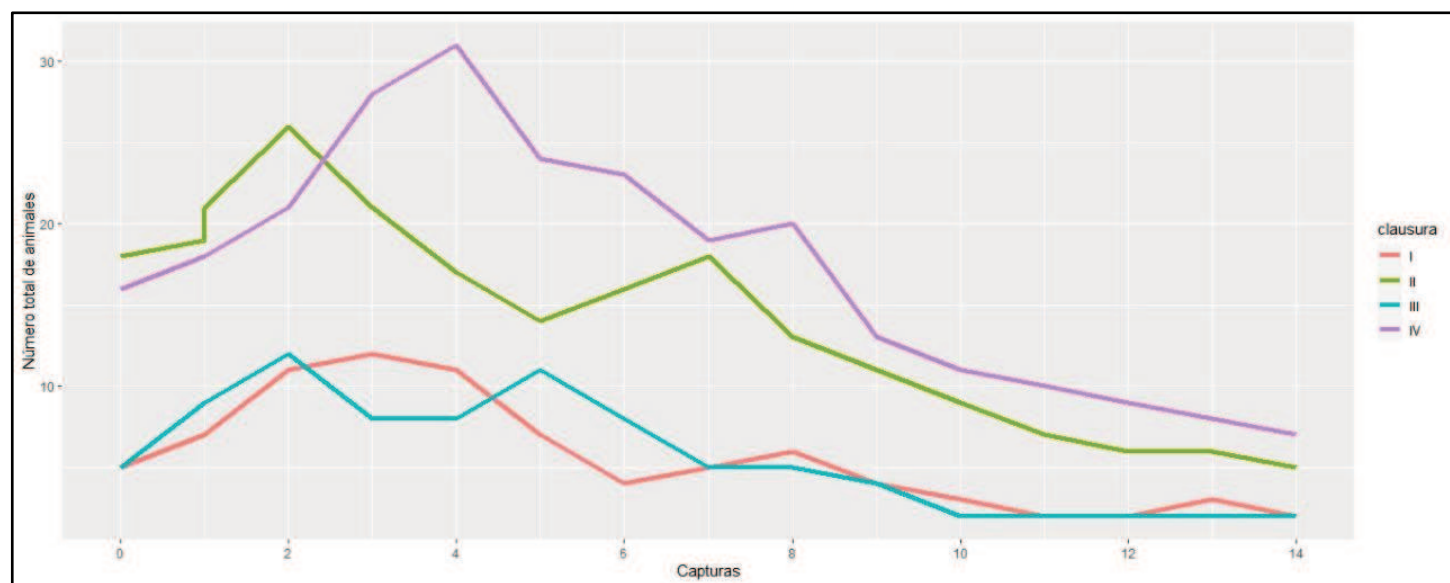


Figura 2. Total de individuos observados en cada recaptura discriminado por clausuras. Clausuras de baja densidad: En rojo, clausura I y en celeste clausura III. Clausuras de alta densidad: en verde clausura II y en lila clausura IV.

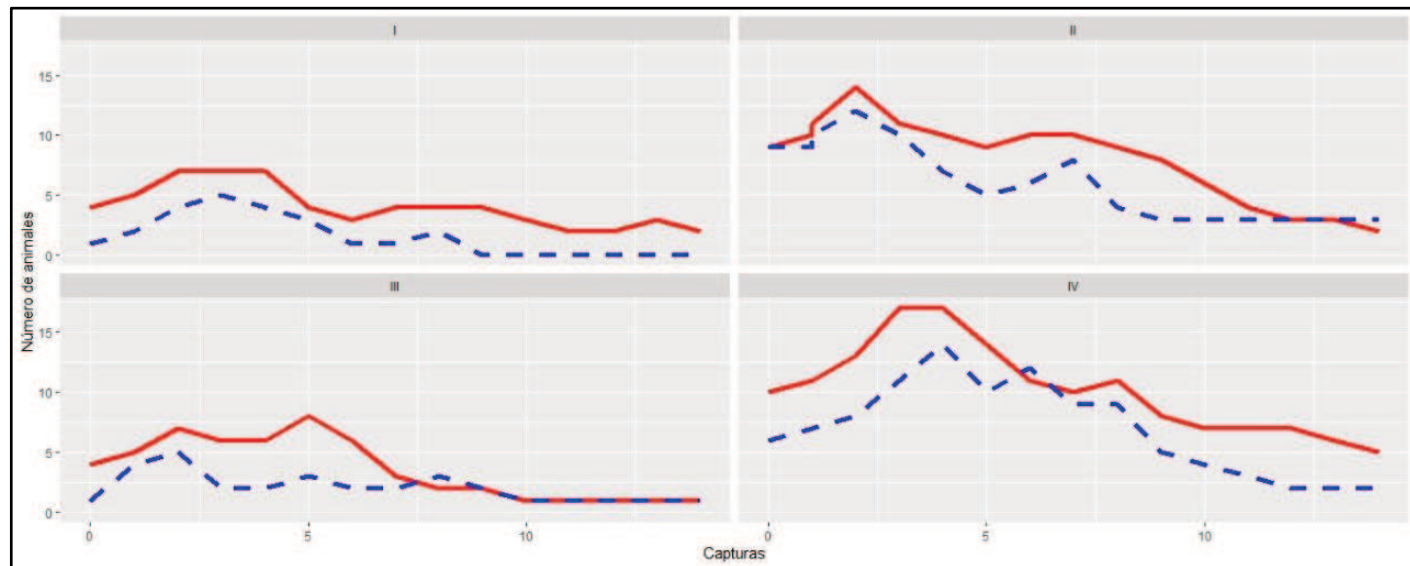


Figura 3. Total de animales observados en cada recaptura a lo largo del experimento, discriminado por clausuras (I, II, III, IV). Las líneas rojas corresponden a individuos hembras y las azules a individuos machos.

Evaluación y determinación de las respuestas inmunes humorales

Los niveles de anticuerpos -totales (AcT), naturales (AcN) y anti-albumina (Ac específicos)- se evaluaron mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: del inglés: *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), directo e indirecto (Engvall y Perlman, 1972).

Esta técnica se basa en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de anticuerpos a su antígeno (Ag) específico. Esta unión Ag-Ac se produce sobre una superficie, a la que previamente se ha unido el anticuerpo o el antígeno (quedando inmovilizado). Para su lectura, es necesario que uno de los componentes del ensayo (Ag o Ac) se encuentre unido a una enzima (conjugado), que al interactuar con el sustrato adecuado catalizará la reacción química, y en presencia del cromógeno formará un producto coloreado, observable a simple vista y cuantificado por espectrofotometría.

Anticuerpos totales. Para la evaluación de anticuerpos totales se utilizó un ELISA directo. Brevemente: las microplacas de poliestireno de 96 pocillo (de fondo plano y alto pegado, Grenier Bio-One®) se sensibilizaron con la dilución apropiada para cada una de las muestras de plasma en buffer de bicarbonato de sodio (pH = 9,6). A continuación, se realizaron 3 lavados y un bloqueo con leche descremada a modo de reducir las uniones inespecíficas. Posterior a la incubación, se realizaron nuevamente 3 lavados y se volvió a incubar, pero esta vez con el conjugado: anti-IgG de *C. aperea* marcado con peroxidasa obtenido en conejo. La reacción se visualizó con el agregado del sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA). Luego de cortar la reacción con ácido clorhídrico 1N, se leyó en un lector de absorbancia equipado con un filtro de 450 nm de

longitud de onda (SPECTROstar Nano, BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Germany) (Heinrich y col., 2017). Los tiempos de incubación y las diluciones de las muestras y solución de conjugado utilizadas se evaluaron empíricamente.

Anticuerpos naturales y anti-albumina. Para la evaluación de anticuerpos naturales y anti-albúmina sérica bovina (ASB) se utilizó un ELISA indirecto. Para tal fin, las microplacas de poliestireno (de fondo plano y de alto pegado, Grenier Bio-One®) se sensibilizaron con hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanina*) (Campo y col., 2011) o ASB - respectivamente- diluido en buffer de bicarbonato de sodio (pH = 9,6). Luego de la incubación del Ag, se realizó una serie de lavados con tampón fosfato salino (PBS-T del inglés phosphate buffered saline) lavados de 1 min, seguido del bloqueo con una solución de leche descremada en polvo en PBS para reducir uniones inespecíficas. A continuación, se realizó nuevamente una nueva serie de lavados con PBS-T y se agregó 100 µl/pocillo de cada muestra de plasma diluida. Posteriormente, las placas se incubaron con diluciones apropiadas de las muestras de plasma. Luego de 3 lavados nuevamente, se añadió el conjugado: anti-Igs de *C. aperea* marcado con peroxidasa obtenido en conejo y se procedió a incubar. Posteriormente, se agregó el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA). Una vez que se cortó la reacción con ácido clorhídrico 1N, se leyó en un lector de absorbancia equipado con un filtro de 450 nm de longitud de onda (SPECTROstar Nano, BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Germany).

En todos los ensayos de ELISA realizados, se evaluó una muestra control por placa, con el fin de disminuir la influencia que pudiera tener la variación en las determinaciones entre placas. La muestra control consistió en un pool de muestras provenientes de todos los individuos (en cada recaptura) del experimento. El análisis de los datos se realizó con la densidad óptica (DO) media de cada par de pocillos, considerando la proporción con respecto a la muestra control evaluada como control interno de la variación entre placas (Cuervo, 2017). Los tiempos de incubación y las diluciones de las muestras y soluciones utilizadas fueron obtenidos de forma empírica.

Análisis estadístico.

Para dar cuenta de falta de independencia de las observaciones de los individuos de una misma clausura y de las medidas repetidas de un mismo individuo, se utilizó modelos lineales mixtos (LMM por sus siglas en inglés) o modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) con “identificación de cada individuo (ID)”, “clausura” y “muestreo” como efectos aleatorios (Chavez, 2010; Paterson y Lello 2003). El tipo de modelo utilizado (LMM o GLMM) se decidió sobre la base de la distribución de la variable respuesta. Cuando la distribución de la respuesta fue una distribución aproximadamente normal se utilizó un LMM. En el caso de los anticuerpos naturales que tuvieron una distribución de Poisson, se utilizó GLMM. Para ello se modificó la variable multiplicando por 10 y redondeando al entero más próximo cada valor. Se utilizaron los paquetes *lmerTest* (Kuznetsova y col., 2017) y *lmer4* (Douglas y col., 2021). Para estos análisis se utilizó el programa R (The R-project for statistical founding; www.r-project.org). Para explicar la variación de las respuestas inmunes se consideraron el efecto de las variables independientes de interés: sexo,

estado reproductivo, condición corporal, edad y densidad poblacional. Además, se consideraron posibles interacciones entre dichos factores. Para los niveles de anticuerpos anti-albumina no se pudo evaluar el efecto de la densidad poblacional, ya que, la densidad poblacional en todas las clausuras era baja (clausura de baja densidad: 3 y 4 individuos respectivamente, clausura de alta densidad: 9 y 11 individuos respectivamente). Esto se debió a que las mismas no evitaban la depredación aérea.

DESARROLLO/ RESULTADOS

Con el fin de encontrar las diluciones y tiempos óptimos de trabajo, se realizaron pruebas de cada uno de los enzimo-inmunoensayos utilizados con diferentes diluciones de plasma y de conjugado. El resumen de los tiempos y diluciones finales utilizadas para cada ensayo se pueden observar en la Tabla 1.

Evaluación de Anticuerpos totales

Las placas de alto pegado de fondo plano fueron sensibilizadas con diluciones de plasma seriadas al medio en solución tampón (o buffer) de pegado (pH=9,6), comprendidas entre 1/200 y 1/25600, (37 °C durante 1 h, seguido de una incubación a 4 °C h toda la noche). A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (pH = 7,4) y 0,05% detergente Tween20 (PBS1X-T) y se bloqueó con una solución al 3% de leche descremada en polvo en PBS 1X con el fin de reducir uniones inespecíficas. Luego de incubar 1 h a 37°C y de realizar los lavados, a todas las diluciones comprendidas entre 1/200 y 1/25600 se les agregó una dilución de conjugado anti-inmunoglobulina de cuis marcado con peroxidasa (1/1000 o 1/5000). Luego de incubar 1 h a 37°C, se lavó con PBS-T y se añadió a cada pocillo 100 µl del sustrato cromógeno (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA). La reacción se detuvo con el agregado de ácido clorhídrico 1N, a los 5 minutos. En la Figura 4 se pueden observar las dos curvas obtenidas en base a dos diluciones de conjugado. A partir de la curva con mayores valores de densidad óptica (DO) y del rango de mayor pendiente (mayor sensibilidad), se seleccionó la dilución de plasma y conjugado utilizadas para evaluar cada una de las muestras.

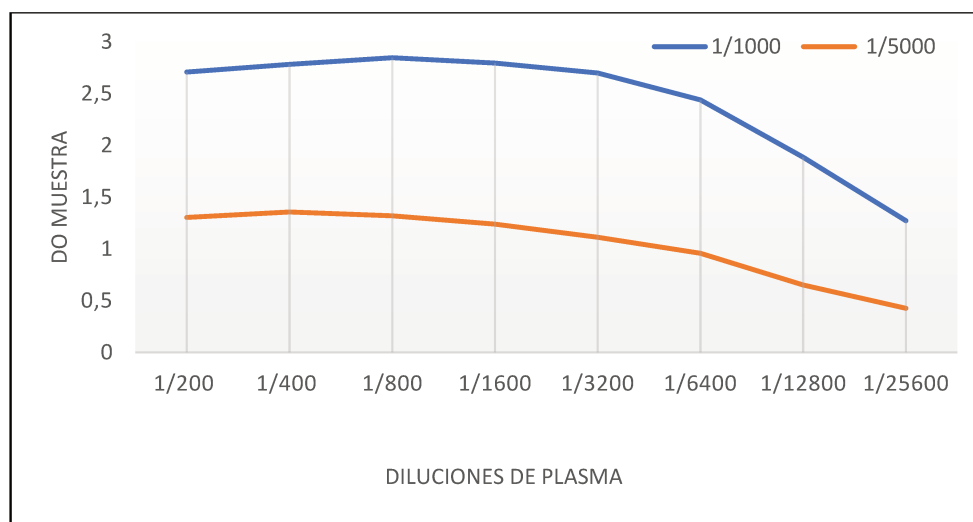


Figura 4. Valores de densidad óptica obtenidos de evaluar Anticuerpos Totales mediante ELISA directo, en función de diferentes diluciones de plasma provenientes de la muestra control para dos diluciones de conjugado: 1/1000 y 1/5000.

Evaluación de Anticuerpos Naturales

Se utilizó una concentración de KLH 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de solución de pegado (Cuervo, 2017). Para permitir el pegado del Ag a la placa se incubó a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS (pH = 7,4) y 0,05% de detergente Tween 20 (PBS1X-T). Luego de la serie de lavados, las placas se bloquearon con 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ 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 y se agregó por duplicado 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de muestra de plasma diluida en forma seriada al medio entre 1/50 y 1/3200. Luego de lavar, se probaron las diluciones 1/1000 y 1/5000 del conjugado anti- inmunoglobulina de cuiis marcado con peroxidasa como se menciona en el marco teórico y metodológico (M&M). Luego de incubar 1 h, se añadió a cada pocillo 100 μl del sustrato cromógeno (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA). La reacción se detuvo con el agregado de HCl 1N, a los 7 min y 30 s. Para la selección de dilución final de conjugado se tuvo en cuenta la pendiente de cada curva y el valor absoluto de DO (Figura 5).

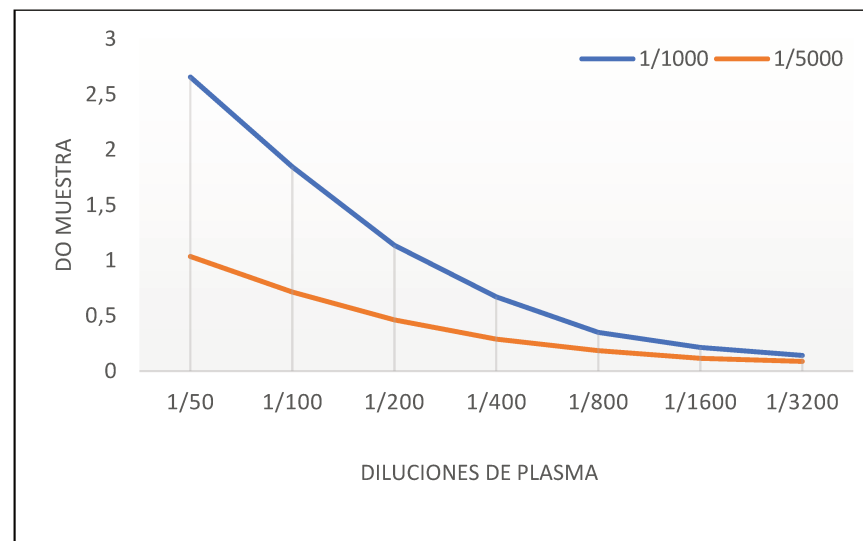


Figura 5. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos de evaluar Anticuerpos Naturales mediante ELISA indirecto, en función de diferentes diluciones de plasma provenientes de la muestra control para dos diluciones de conjugado: 1/1000 y 1/5000.

Evaluación de Anticuerpos Anti-albúmina

Se utilizó una concentración de ASB 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de solución de pegado (Cuervo, 2017). Para permitir el pegado de ABS a la placa, se incubó a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS (pH = 7,4) y 0,05% de detergente Tween 20 (PBS 1X-T). Luego de la serie de lavados, las placas se bloquearon con 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ 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 y se agregó por duplicado 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ con diluciones de plasma seriadas al medio, comprendidas entre 1/50 y 1/1600. Luego de lavar, se utilizó una dilución 1/1000 el conjugado anti- inmunoglobulina de cuis marcado con peroxidasa. Luego de incubar una hora, se añadió a cada pocillo 100 μl del sustrato cromógeno (TMB Single Solution, Life Technologies®; USA). La reacción se detuvo con el agregado de HCl 1N, a los 5min. La dilución de conjugado y el tiempo de corte fueron seleccionados según datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo a partir de evaluaciones de anticuerpos en otra especie de roedor (datos no publicados). En la Figura 6 se puede observar la curva obtenida, a partir de la cual se seleccionó la dilución de plasma final, teniendo en cuenta el rango de mayor pendiente de la curva (mayor sensibilidad).

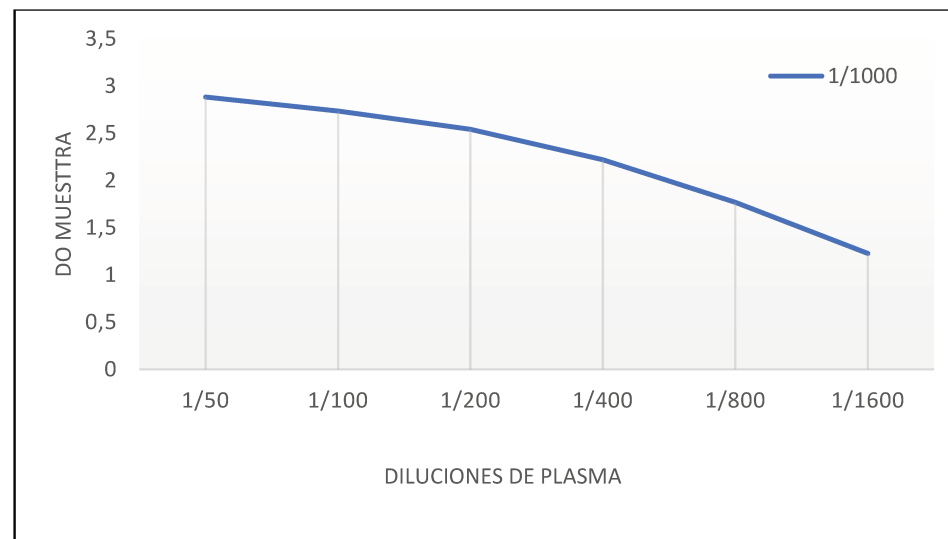


Figura 6. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos de evaluar Anticuerpos Anti-albumina mediante ELISA indirecto en función de diferentes diluciones de plasma provenientes de la muestra control para una dilución de conjugado: 1/1000.

Tabla 1. Resumen de las diluciones y tiempos finales utilizados en los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar los anticuerpos totales, naturales y anti-albúmina de *C. aperea*.

	Ac. Totales	Ac. Naturales	Ac. Anti-albuminas
Dilución de antígeno		KLH 0.5 ug/100 ul	ASB 0.5 ug/100 ul
Dilución de la muestra a evaluar	1/12800	1/100	1/800
Anticuerpo secundario (conjugado anti-Igs de <i>C. aperea</i> obtenido en conejo conjugado a peroxidasa)	1/1000	1/1000	1/1000
Punto de corte y lectura	5 min	7min y 30s	5 min

Resultados de los diferentes anticuerpos evaluados.

En la Tabla 2 se muestra la cantidad de individuos muestreados y de muestras de plasma obtenidas a largo de todo el experimento.

Tabla 2: Número de muestras obtenidas de individuos de *C. aperea* para la evaluación de anticuerpos naturales, totales y anti-albumina. Entre paréntesis, número de individuos muestreados.

Anticuerpos	Muestras	Machos	Hembras
Ac. Totales	533	209 (51)	324 (56)
Ac. Naturales	535	209 (51)	326 (56)
Ac. anti-albumina	94	34 (8)	60 (17)

Abreviaciones:
Ac: anticuerpos.

Anticuerpos Totales

Al analizar los resultados obtenidos de anticuerpos totales se observó un incremento significativo de estos en relación a la edad ($p < 0.001$): a mayor edad, mayores niveles de anticuerpos, tanto en machos como en hembras (Tabla 3). Sin embargo, este aumento fue de forma más lineal para las hembras: en el segundo mes de vida (categoría 1) se observaron niveles mayores que en el primer mes (categoría 0) y esta diferencia fue mayor en hembras adultas (categoría 2). En cambio, para los machos no se observaron diferencias significativas entre los meses 1 y 2 (categoría 0 y 1), no así para los meses posteriores (categoría 2) (Figura 7). Por otro lado, independientemente del sexo, se observó mayores niveles de anticuerpos totales (AcT) en los individuos que estuvieron

expuestos a mayores densidades (p-valor <0.001, Tabla 3), por cada individuo demás los niveles de AcT aumentaron en 0.00569 DO).

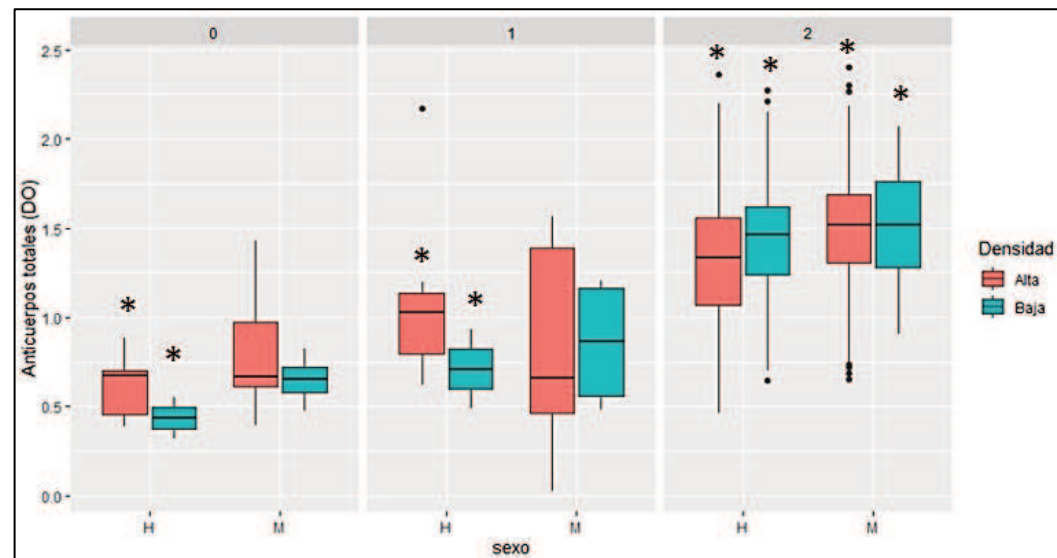


Figura 7. Niveles de anticuerpos totales, expresados como densidad óptica relativa al control interno en función del sexo (H: hembra; M: macho), edad (categorías 0, 1 y 2) y densidad poblacional (Alta y Baja). El diagrama de cajas representa la mediana (barra negra), 25-75% cuartiles (caja), 10-90% cuartiles (bigotes) y valores atípicos (puntos), DO: densidad óptica, asteriscos denotan diferencias significativas.

Tabla 3. Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos Totales en función de la edad y el sexo.

Modelo = Anticuerpos Totales ^a ~ Sexo * Edad + Densidad total + (1 id/clausura) + (1 captura)			
Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	0.704781	0.0873	<0.001
Sexo Macho	0.060164	0.109202	0.5819
Edad (dos meses)	0.373478	0.096503	<0.001
Edad (> dos meses)	0.611191	0.073333	<0.001
Densidad total	0.005693	0.001619	<0.001
Sexo Macho * Edad (dos meses)	-0.315497	0.135843	0.0206
Sexo Macho * Edad (> dos meses)	0.066333	0.101251	0.5126

^aNiveles de Anticuerpos Totales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio.

Nivel de referencia: Sexo: Hembras, Edad: un mes.

Teniendo en cuenta únicamente a las hembras con preñez temprana, la densidad no tuvo efecto sobre los niveles de AcT (p-valor > 0.05). Sin embargo, la densidad si afectó de manera positiva los niveles de anticuerpos totales en las hembras no preñadas y en las hembras con preñez tardía ($\beta= 0.009$, p-valor <0.001): a mayor densidad las no preñadas y las preñadas tardías tuvieron mayores valores de anticuerpos totales (Figura 8). No se encontraron diferencias significativas entre preñadas tardías y no preñadas (Tabla 4). A baja densidad (3-14 individuos) se observó que las hembras con preñez temprana tuvieron mayores niveles de AcT que las no preñadas y las preñadas tardías ($\beta= 0.1266$, p-valor =0.0462).

Teniendo en cuenta la lactancia, se observó una diferencia significativa entre las hembras lactantes y no lactantes, siendo mayor los niveles de los anticuerpos totales en las lactantes (p-valor =0.0237, Tabla 5 y Figura 9). Por otro lado, en machos se observaron diferencias significativas en cuanto al estado reproductivo (Tabla 6): los machos activos tuvieron mayores niveles de anticuerpos totales que los no activos pero esa diferencia dependió de la condición corporal: por cada unida de condición corporal que aumentan los machos activos, los niveles de AcT aumentaron en 1.015 DO, mientras que, en los no activos, el incremento es de 1.12 DO. A mayor condición corporal de los machos no activos esa diferencia disminuye y tiende a hacerse nula.

Tabla 4. Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos Totales en función al estado reproductivo de hembras y densidad poblacional.

Modelo = Anticuerpos Totales ^a ~ Preñez * Densidad total + (1 id/clausura) + (1 ts)			
Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	1.294	0.05983	<0.001
Preñez Temprana	0.1266	0.06319	0.0462
Preñez Tardía	-0.09592	0.00828	0.2477
Densidad total	0.00900	0.002249	<0.001
Preñez Temprana* Densidad total	-0.00903	0.004027	0.0258
Preñez Tardía* Densidad total	0.00097	0.004339	0.8222

^aNiveles de Anticuerpos Totales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio.
Nivel de referencia: Hembras no preñadas.

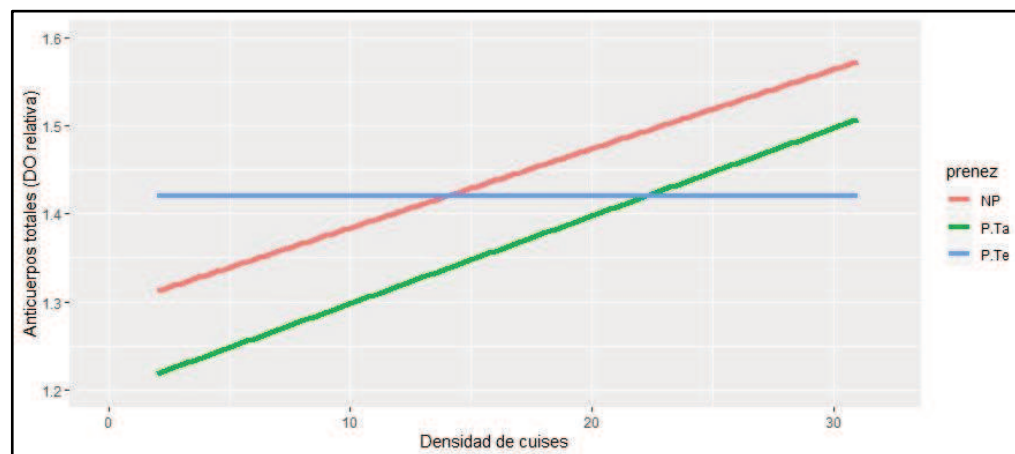


Figura 8. Niveles predictivos de anticuerpos totales, expresados como densidad óptica relativa al control interno, dependientes de la densidad total de cuses y el grado de preñez. no preñadas NP (NP línea roja), preñez tardía (P.Ta línea verde), preñez temprana (P.Te línea azul).

Tabla 5. Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos Totales en hembras lactantes en relación a las no lactantes.

Modelo = Anticuerpos Totales^a ~ Lactantes + (1 | idfijo/clausura) + (1 | ts)

Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	1.40960	0.04986	<0.001
Lactantes	0.06997	0.03071	0.0237

^aNiveles de Anticuerpos Totales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio.

Nivel de referencia: Hembras no lactantes

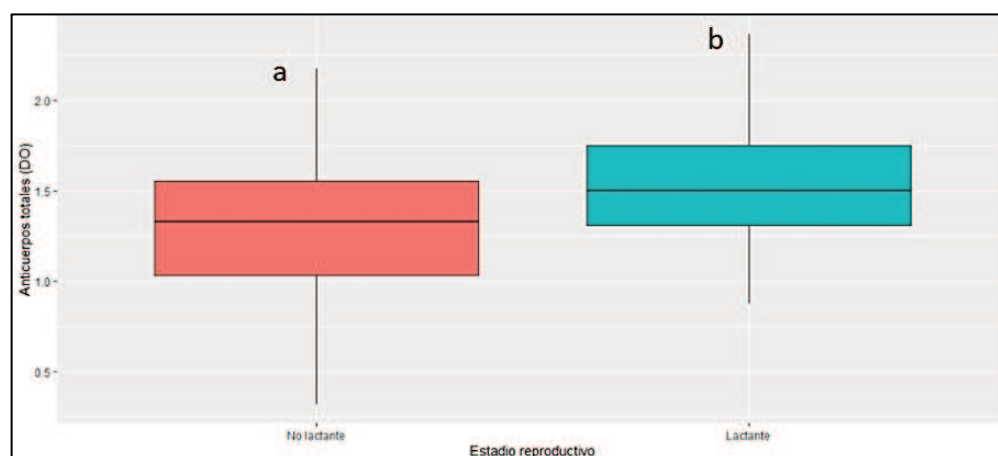


Figura 9. Niveles de anticuerpos totales en hembras lactantes y no lactantes. El diagrama de cajas representa la mediana (barra negra), 25-75% cuartiles (caja), 10-90% cuartiles (bigotes), DO: densidad óptica, diferentes letras denotan diferencias significativas.

Tabla 6. Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos Totales en machos activos en relación a no activos.

Modelo = Anticuerpos Totales ^a ~ Estado reproductivo* condición corporal + (1 id/clausura) + (1 ts)			
Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	1.40994	0.06237	<0.001
Estado Reproductivo _{Activos}	0.16532	0.04783	<0.001
Condición corporal	1.12423	0.05102	0.0159
Estado Reproductivo _{Activos} *Condición corporal	-0.10770	0.05157	0.0384

^aNiveles de Anticuerpos Totales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio.
 Nivel de referencia: Estado Reproductivo: machos activos vs machos no activos

Anticuerpos Naturales

Se vio un efecto negativo sobre los niveles de AcN independientemente del sexo. Aquellos individuos con mayor densidad tuvieron menores niveles (por cada individuo demás los niveles de anticuerpos naturales disminuyeron en 0.0078 DO (Tabla 7))

Las hembras tuvieron mayores niveles de anticuerpos naturales (AcN) que los machos (p-valor <0.001) pero esta diferencia dependió de la edad y la condición corporal (Tabla 7). Entre los individuos adultos la diferencia de los niveles entre hembras y machos fue menor. A su vez, a mayor condición corporal de los machos, menor fue la diferencia de los niveles de AcN entre ambos sexos.

Los niveles de anticuerpos naturales en función de la edad para ambos sexos tuvieron la misma dinámica (Figura 10): durante el primer mes de vida (categoría 0) las hembras presentaron mayores niveles que los machos. Luego los individuos de hasta 2 meses de edad (categoría 1), presentaron una disminución en los niveles de AcN, que fue observada para ambos sexos, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ellos. En los individuos adultos (categoría 2), las hembras presentaron niveles significativamente mayores que los machos, no obstante, se observaron valores mayores de AcN con respecto a los individuos de 2 meses (categoría 1) para ambos sexos. Las hembras de hasta 1 mes (categoría 0), presentaron mayores niveles de AcN que aquellas en edades más avanzadas (categoría 0, p-valor <0.001; categoría 2, p-valor =0.0134) y las hembras adultas (categoría 2) a su vez presentaron mayores valores que las de 2 meses (categoría 1) (Tabla 7).

La relación que hubo entre la condición corporal y los niveles de AcN en hembras fue negativo, las hembras con mayor condición corporal tuvieron menores niveles de AcN (p-valor <0.001, Tabla 7), al tener mejor condición corporal los niveles de AcN en hembras disminuyeron en 0.0905 DO).

Teniendo en cuenta el estado reproductivo: en machos, los individuos activos tuvieron menores niveles que los no activos (Tabla 8). En el caso de las hembras se observó una diferencia significativa entre las preñadas tempranas (p-valor =0.0331) y las no preñadas; las preñadas tempranas tuvieron menores niveles de AcN que las no preñadas y esto dependió de la condición corporal, a mejor condición corporal esta diferencia fue menor (Tabla 9). Además, se observó diferencia significativa en los valores de AcN entre las hembras no preñadas y las de preñez tardía, sólo cuando la condición de estas últimas fue menor (Tabla 9). No se observaron diferencias entre hembras lactantes y no lactantes.

Tabla 7: Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos Naturales de acuerdo a la edad, sexo y condición corporal.

Modelo = Anticuerpos Naturales ^a ~ Sexo * Edad + Sexo * Condición corporal + Densidad total + (1 id/clausura) + (1 captura)			
Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	3.240063	0.161861	<0.001
Sexo Macho	-0.853407	0.219308	<0.001
Edad (dos meses)	-0.726731	0.179968	<0.001
Edad (> dos meses)	-0.330723	0.133728	0.0134
Condición corporal	-0.090572	0.013979	<0.001
Densidad total	-0.007798	0.002164	0.0003
Sexo Macho * Edad (dos meses)	-0.175094	0.263149	0.5058
Sexo Macho * Edad (> dos meses)	0.362543	0.182885	0.0474
Sexo Macho * Condición corporal	0.112526	0.039691	0.0046

^aNiveles de Anticuerpos Naturales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio, multiplicada por diez y redondeado al entero más próximo.
Nivel de referencia: Hembras, Edad (un mes)

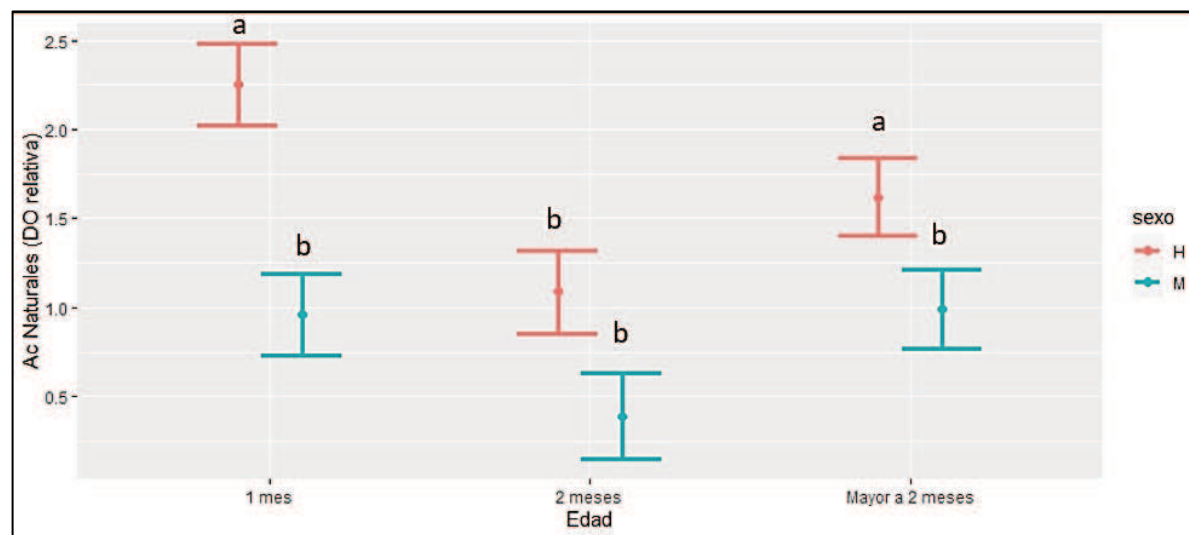


Figura 10. Relación entre concentración de Anticuerpos Naturales (AcN) en función de la categoría de edad, discriminado por sexo. Las simulaciones de los valores de AcN se realizaron con valores de densidad de cuises igual a la mediana (16 animales por recinto) y de condición corporal promedio (0), DO: densidad óptica, diferentes letras denotan diferencias significativas.

Tabla 8. Modelo lineal mixto que describe la variación de los niveles de Anticuerpos Naturales en relación al estado reproductivo de machos.

$$\text{Modelo} = \text{Anticuerpos Naturales}^a \sim \text{Estado Reproductivo} + (1|\text{idfijo}/\text{clausura}) + (1|\text{ts})$$

Término	Coefficiente	Error Estándar	Valor de Pr
Intercepto	2.54905	0.13559	< 0.001
Estado Reproductivo Activos	-0.20114	0.05157	<0.001

^aNiveles de Anticuerpos Naturales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio, multiplicada por diez y redondeado al entero más próximo.

Nivel de referencia: Estado Reproductivo: activos vs no activos

Tabla 9. Modelo lineal mixto que describe la variación de los niveles de Anticuerpos Naturales en relación al estado de preñez, la condición corporal y densidad total en hembras.

Modelo = Anticuerpos Naturales ^a ~ Preñez * Condición corporal + Densidad total + (1 idfijo/clausura) + (1 recaptura)			
Término	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercept	3.001522	0.117977	<0.001
Preñez _{Temprana}	-0.082012	0.038502	0.0331
Preñez _{Tardía}	0.076843	0.054385	0.1576
Condición corporal	-0.161715	0.024850	<0.001
Densidad total	-0.008986	0.003013	<0.001
Preñez _{Temprana} * Condición corporal	0.113271	0.039604	<0.001
Preñez _{Tardía} * Condición corporal	0.076409	0.035499	0.0313

^aNiveles de Anticuerpos Naturales: Densidad óptica media relativa al control interno promedio, multiplicada por diez y redondeado al entero más próximo.
Nivel de referencia: Hembras no preñadas.

Anticuerpos Específicos

La producción de anticuerpos anti-albúmina fue mayor en hembras (p-valor <0.001). Sin embargo, esta diferencia dependió de la condición corporal: a mayor condición de las hembras mayor es la diferencia entre ambos sexos, pero a mayor condición de los machos, la diferencia entre ambos sexos es menor (β -0.013907 y el p-valor =0.035059) (Tabla 10).

Tabla 10. Modelo lineal mixto que describe los niveles de Anticuerpos anti-albumina teniendo en cuenta los días post-inmunización y la condición corporal de los individuos.

Modelo= Anticuerpos Específicos ^a ~ Sexo * Días post-inmunización * Condición corporal + (1 idfijo/clausura) + (1 ts)			
Termino	Coefficientes	Error Estándar	P-valor
Intercepto	-0.057757	0.128254	0.664142
Sexo _{Macho}	0.023380	0.116540	0.842060
Días post-inmunización	0.059626	0.006964	<0.001
Condición corporal	-0.047795	0.095125	0.618556
Sexo _{Macho} * Días post-inmunización	-0.023527	0.005440	<0.001
Sexo _{Macho} * Condición corporal	0.047209	0.118073	0.691631
Días post-inmunización * Condición corporal	0.021223	0.005863	<0.001

Sexo Macho* Días post-inmunización* Condición corporal	-0.013907	0.006459	0.035059
--	-----------	----------	----------

^aNiveles de Anticuerpos Específicos: Densidad óptica media relativa al control interno promedio.
Nivel de referencia: Hembras adultas.
Condición corporal: correspondiente al día de inicio del plan de inmunización.

DISCUSIÓN.

En poblaciones naturales, la respuesta inmune está involucrada en la regulación de la interacción hospedador-parásito. Los anticuerpos constituyen un factor clave en la supervivencia individual y su producción estaría influenciada por factores ecológicos y ambientales. En el presente trabajo el objetivo general fue contribuir a dilucidar los mecanismos humorales de defensa del cuis común (*Cavia aperea*) expuestos a diferentes escenarios de densidad poblacional, en donde se evaluó componentes del sistema inmune (anticuerpos totales, anticuerpos naturales y anti-albumina) en relación a diferentes características del hospedador (sexo, condición corporal, edad y estado reproductivo).

Respuesta inmune y densidad poblacional

Al analizar los niveles de AcT los resultados hallados demostraron que independientemente del sexo, a mayor densidad, los individuos tuvieron mayores niveles y esto concuerda con los resultados esperados. Se ha demostrado que, a mayor densidad poblacional, la exposición a parásitos aumenta debido al aumento del contacto directo entre individuos y/o indirecto con formas evolutivas de los parásitos (huevos, larvas, ooquistes), por lo tanto, se espera mayores niveles de anticuerpos como respuesta a los parásitos (Arneberg y col., 1998; Arneberg, 2002; Torres y col., 2006; Kamiya y col., 2013, 2014; Corriale y col., 2013; Nunn y col., 2015). En este estudio, el aumento de AcT podría deberse al aumento de anticuerpos específicos y no al aumento de anticuerpos de la inmunidad innata (anticuerpos naturales: AcN), ya que los niveles de AcN fueron menores a mayor densidad.

Si bien el aumento de la densidad poblacional favorece el contacto de los individuos y como consecuencia un mayor contacto con los parásitos, es necesario tener en cuenta la sociabilidad de esta especie. El grado de sociabilidad de cada individuo, también podría influir en la relación que hay entre carga parasitaria, densidad y respuesta inmune. En este experimento (con los mismos individuos) cuando se analizó la correlación entre el grado de sociabilidad (evaluado a través de la centralidad) y la carga de ectoparásitos (análisis que excede a este trabajo de tesis) se observó que, a baja densidad, la magnitud de esta correlación es mayor que a alta densidad (Goggi 2020). Además, en el mismo estudio cuando se evaluó el efecto de las estaciones sobre la carga de ectoparásitos se observó que durante las estaciones primavera-verano los individuos en posiciones centrales tienden a tener una mayor carga parasitaria, independientemente de la densidad. Sin embargo, durante el otoño aquellos individuos con mayor carga ectoparasitaria fueron los periféricos (Sobrero y col., 2021). Por lo mencionado anteriormente, se podría inferir que no solo la densidad puede influir en la transmisión de los parásitos y la respuesta inmune, sino que también el grado de sociabilidad de la especie y la estación del año.

El aumento de la densidad de los hospedadores puede causar una mayor exposición a los parásitos favoreciendo su transmisión, lo cual podría ser el mecanismo responsable del aumento de AcT en los individuos que se encontraban a mayores densidades, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, también se ha observado que a altas densidades el aumento de las interacciones intraespecíficas podría producir un impacto negativo en la condición fisiológica de los individuos (Huitu y col., 2007; Beldomenico y col., 2008). Además, se podrían desatar mecanismos neurofisiológicos que podrían inducir inmunosupresión (Webster y col.,

2002; Sapolsky, 2002). Contrario a esto, en nuestro trabajo se observaron mayores niveles de AcT en individuos que se encontraban a altas densidades. Un estudio que coincide con nuestro resultado es el realizado en ratas (*Rattus norvegicus*) donde bajo diferentes estresores, conflicto social y restricción alimentaria (Cuervo, 2017), los individuos presentaron un aumento de diferentes compartimentos del sistema inmune: inmunidad humoral (aumento de anticuerpos específicos), e inmunidad celular (aumento de recuento de eosinófilos).

También, estudios con *Cavia aperea* han demostrado que la presencia del macho dominante o de la hembra de un mismo harén, brindan un soporte social ante desafíos estresantes. La presencia de un compañero proporciona seguridad y conduce a una reducción del estrés agudo de ambos (Kaiser, 2003), lo cual además podría evitar cambios significativos (inmunosupresión) del sistema inmune. Estos resultados y los encontrados en nuestro estudio, aportan evidencia a que las respuestas frente a ciertos estresores, dependen de las características de la especie y de su historia de vida. El cuis es un roedor social y las características de su comportamiento y estructura social, son variables que podrían influir también en los resultados obtenidos en este estudio.

Respuesta inmune, edad y condición corporal del individuo

La edad y la condición corporal son factores que afectan la susceptibilidad a infecciones. Esto puede deberse a que también afectan al sistema inmune (Beldomenico y Begon, 2010). Por lo general se espera que individuos adultos, con mayor tamaño y mejor condición corporal, estén mejor preparados para competir por recursos, sean menos propensos a ser depredados y puedan enfrentar cualquier tipo de infección (Berner y Blanckenhorn, 2007; Muñoz y Bonal, 2008; Beldomenico y Begon, 2010; Preisser y Orrock, 2012).

En el presente estudio, los individuos, desde los primeros días de vida, presentaron niveles de AcN y en edades adultas estos niveles aumentaron. Los anticuerpos naturales poseen una secreción constitutiva a través de la activación de las células B1 (células productoras de anticuerpos naturales) por parte de IL-5 e IL-6 producida por células de la respuesta inmune innata (Moro y col., 2010). El aumento de estos anticuerpos también podría deberse a una activación *by stander* (activación inespecífica) de estas células B1. Esto puede producirse por una activación de la respuesta inmune hacia ciertos parásitos (lo cual aumenta a medida que los individuos crecen) con la consiguiente producción de IL-5 que puede activar las células B1 (Tran y col., 2017). Esta activación *by stander*, podría explicar nuestros resultados, donde se observó el aumento de los niveles de AcN de los individuos muestreados.

Por otro lado, a medida que los individuos alcanzan la madurez, ofrecen una mayor superficie corporal y mayor posibilidad de encuentro con una comunidad parasitaria (debido al aumento de la exposición a parásitos por su dispersión y comportamientos de apareamiento) (Šimková y col., 2008; DeVeale y col., 2004), aumentando así la memoria inmunológica (Zinkernagel, 2002). Ha sido observado, en individuos adultos (oveja soay) una disminución en la proporción de linfocitos T vírgenes frente a linfocitos T de memoria (Watson y col., 2016), es decir, un cambio de respuesta inmunitaria no específica a específica (Martin y col., 2006).

Lo expresado anteriormente también podría explicar el aumento de AcT en los individuos mayores de 2 meses (categoría 2) y la disminución de los niveles de AcN observados en este trabajo.

Respuesta inmune y estado reproductivo

Ha sido demostrado que situaciones estresantes (alta densidad poblacional, falta de recursos, parasitismo, etapa de reproducción, y desgaste diario por luchas de dominancia), son factores que pueden influir en las respuestas inmunitarias (Beldomenico y col., 2008, Beldomenico y Begon, 2015). En este estudio, se observó mayores niveles de AcT en hembras con preñez tardía, hembras lactantes y machos activos, lo cual además dependió de la densidad y la condición corporal. Estos resultados son contrarios a lo esperado: los individuos a altas densidades podrían presentar inmunosupresión debido al efecto de este estresor (Beldomenico y Begon, 2010) y además en momentos de alta demanda fisiológica como la reproducción y la lactancia (energéticamente costosos), se esperaría una reducción en la inversión energética del sistema inmune (Trillmich, 2020). Esto podría deberse al hecho, de que al ser una especie social y mientras no exista una falta de recurso alimenticio, los individuos pueden afrontar ambas demandas fisiológicas (reproducción y sistema inmune). Además, al estar en contacto con una rica comunidad parasitaria, evolutivamente se favorecería la inversión en la producción de anticuerpos específicos.

En nuestro experimento, las diferencias de los niveles de AcT, AcN y Ac específicos entre los individuos de diferentes sexos, tendieron a disminuir o igualarse cuando éstos tuvieron mejor condición corporal, sin embargo, las hembras presentaron mayores niveles de anticuerpos que los machos en general. Para explicar esto, el principio de Bateman's establece que las hembras maximizan su fitness mediante una mayor inversión en las respuestas inmunes favoreciendo así una mayor descendencia, mientras los machos maximizan su fitness apostando al éxito de apareamiento (Rolff, 2002). Por lo tanto, las hembras invertirían más en inmunidad que los machos como medio de supervivencia ya que su esfuerzo reproductivo es mucho mayor.

Una hipótesis establecida que explica por qué las tasas de infección observadas empíricamente poseen un sesgo masculino, es que los machos son más susceptibles a los parásitos porque la hormona masculina testosterona es inmunosupresora (Folstad y Karter, 1992). Sin embargo, no siempre se ha encontrado evidencia que confirme la misma. Esto podría deberse a que, los machos reproductivamente activos y con mayores niveles de testosterona, estarían inmunosuprimidos, pero a su vez la testosterona impacta en el comportamiento de los machos que influye en las tasas de contacto (Grear y col., 2009). Un mayor contacto con otros individuos, ya sean con hembras u otros machos, por apareamiento o competencia, respectivamente, podría aumentar la exposición a los parásitos, lo que llevaría a que aumenten los niveles de anticuerpos. Como se planteó anteriormente, los mayores niveles de AcT, estarían relacionados a mayores niveles de anticuerpos específicos (inmunidad adquirida) ya que se observaron menores niveles de los AcN en machos activos comparados con machos no activos.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a nuestros resultados la densidad influyó sobre la respuesta inmunológica de esta especie social, pero no de igual forma para los diferentes compartimientos: aumentando la inmunidad adquirida (anticuerpos totales) y disminuyendo la inmunidad innata (anticuerpos naturales), además dependió de factores como el estado reproductivo.
- Contrario a lo esperado, en este estudio se observó que los individuos activos reproductivamente presentaron una mayor inversión en componentes de la respuesta inmune adquirida, a pesar de la demanda fisiológica que ocurre durante la preñez y/o época reproductiva.
- Se observó un aumento de la inmunidad adquirida en relación a la edad, lo que estaría de acuerdo con la sociabilidad de la especie y por lo tanto con un mayor contacto de patógenos.
- La inversión de la inmunidad innata posee una dinámica particular, esto podría deberse a que son individuos precociales, aunque existe la necesidad de conocer más mecanismos moleculares.
- La mayor inversión inmunológica en general se observó en hembras, puede deberse a la necesidad de favorecer la descendencia como se planteó en el principio de Bateman's, en el cual maximizan su fitness como medio de supervivencia.

A partir de los resultados de este experimento en *Cavia aperea* se aporta evidencia para pensar que la inversión en los diferentes tipos de inmunidad depende, de las demandas fisiológicas de los individuos, del contexto que los rodea y características propias de la especie como la sociabilidad. Donde se puede observar la necesidad de estudiar más a fondo los distintos tipos de anticuerpos en estas y demás especies silvestres, analizando relación inmunológica con las diferentes características del hospedador y la interacción con diferentes densidades poblacionales. De esta manera los diferentes tipos de anticuerpos conformarían una herramienta importante para el estudio de la dinámica de la salud de estas poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular 7ma ed. by S.A. Elsevier España. 555p
- Adrian O y Sachser. N. 2011. Diversity of social and mating systems in cavies: a review. *Journal of Mammalogy* 92:39–53.
- Aplin KP, Brown PR, Jacob J, Krebs CJ, Singleton GR. 2003. Field methods for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. ACIAR Monograph No. 100. 223 pp.
- Arneberg P. 2002. Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. *Ecography*. 25: 88-94.
- Arneberg P, Skorping A, Grenfell B, y Read A. 1998. Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 265:1283-1289.
- Asher M, De Oliveira E, Sachser N. 2004. Social system and spatial organization of wild guinea pigs (*Cavia aperea*) in a natural population. *Journal of Mammalogy*. 85, 788-796.
- Asher M, Lippmann T, Epplen J, Kraus C, Trillmich F, Sachser N. 2008. Large males dominate: ecology, social organization, and mating system of wild cavies, the ancestors of the domestic guinea pig. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62:1509–1521.
- Beldomenico P, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proceeding of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1644), 1753–1759.
- Beldomenico P, Begon M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends Ecol. Evol.* 25, 21-27.
- Beldomenico P, Begon, M. 2015. Stress-host-parasite interactions: a vicious triangle? *Rev. FAVE. Sección Ciencias Vet.* 14, 6-19.
- Berner D, Blanckenhorn. W. 2007. An ontogenetic perspective on the relationship between age and size at maturity. *Funct. Ecol.* 21, 505-512.
- Blanchard R, McKittrick C, Blanchard D. 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* 73, 261-271.
- Bolnick D, Amarasekare P, Araújo M, Bürger R, Levine J, Novak M, Rudolf V, Schreiber S, Urban M, Vasseur D. 2011. Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 26, 183-192.

- Cadavid L. 2009. La evolución de sistemas complejos: el caso del sistema inmune en animales. *Acta Biológica Colombiana*, 14,247-254. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028030005>
- Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., González, A., Moltedo, B., Ioannes, P., Ferreira, J., Manubens, A. y Becker, M. 2011. Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/128831>
- Canevari M, Vaccaro O, Carrizo, G. 2007. Guía de Mamíferos del Sur de América del Sur. 1ª. Ed. – Buenos Aires: L.O.L.A. 424p.; 22 x 15 cm.
- Casali P, Schettino EW. 1996. Structure and Fuction of Natural Antibodies. In: PotterM., Rose N.R. *Immunology of Silicones. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 210: 167-179.
- Chavez L. 2010. An Entomologist Guide to Demystify Pseudoreplication: Data Analysis of Field Studies with Design Constraints. *J Med Entomol* 47:291-298.
- Chester E, Bonu T, Demas G. 2010. Social defeat differentially affects immune responses in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Physiol. Behav.* 101, 53-58.
- Corriale M, Orozco M, Jiménez P. 2013. Parámetros poblacionales y estado sanitario de carpinchos (*hydrochoerus hydrochaeris*) en lagunas artificiales de los esteros del Iberá. *Mastozoología Neotropical*. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=45728549003>
- Cuervo B. 2017. Estudios de marcadores del sistema inmune en roedores en un contexto de estrés- su aplicación a estudios eco-epidemiológicos. Esperanza Santa Fé: Tesis UNL. Pag. 201
- Cuervo B, Beldomenico P, Sánchez A, Pietrobon E, Valdez S, Racca A. 2018. Chronic exposure to environmental stressors enhances production of natural and specific antibodies in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 329(10) .
- Dearman R, Caddick H, Basketter DA, Kimber I. 2000. Divergent antibody isotype responses induced in mice by systemic exposure to proteins: a comparison of ovalbumin with bovine serum albumin. *Food Chem. Toxicol.* 38, 351-360.
- Delves PJ. 2018. Generalidades sobre el sistema inmunitario. University College London, London, UK. Manual MSD
- Demas GE, Nelson RJ. 2011. *Ecoimmunology*. Oxford: Oxford University Press. 609p
- DeVeale B, Brummel T, Seroude L. 2004 Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell.* Aug;3(4):195-208.

- Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J, Van De Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15-23.
- Douglas B, Martin M, Ben B. 2021. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and syntax. R package version 0.999999-2. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Eberhardt A, Costa S, Marini M, Racca A, Baldi C, Robles M, Moreno P, Beldomenico P. 2013. Parasitism and physiological trade-offs in stressed capybaras. *PloS one* 8, e70382.
- Eberhardt A. 2014. Evaluación de la dinámica de salud en poblaciones de *Hydrochoerus hydrochaeris* L. 1766 (RODENTIA: Caviidae): intensidad del parasitismo gastrointestinal. Buenos Aires. Tesis Doctoral UBA.
- Eberhardt A, Ruiz M, Beldomenico P, Racca A. 2015. Dynamics of health of wild capybaras: biochemical and physiologic parameters. *Mammalia* 80, 413-423.
- Edwards EA, Rahe RH, Stephens PM, Henry JP. 1980. Antibody response to bovine serum albumin in mice: the effects of psychosocial environmental change. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164, 478-481.
- English S, Bateman AW, Clutton TH. 2012. Lifetime growth in wild meerkats: Incorporating life history and environmental factors into a standard growth model. *Oecologia* 169, 143-153.
- Engvall E. y Perlman P. 1972. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-879
- Escudero S, Terzaghi M. 2007. El registro arqueofaunístico de *Cavia aperea* en el sitio Playa Mansa (Provincia de Santa Fe). Implicancias antrópicas y tafonómicas. Conference: XXVII° Encuentro de GeoHistoria Regional, At Asunción, Paraguay: 16, 17, 18 de agosto
- Folstad I, Karter AJ. 1992. Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* 139, 603–622 10.1086/285346
- Garcia-Merino A. 2011. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. Volumen 26. Issue 5. 301-306.
- Goggi J. 2020. “Relación entre sociabilidad, masculinización y parásitos en hembras de *Cavia aperea* en condiciones de semi-cautividad”. Esperanza. Santa fe. Tesina de licenciatura en biodiversidad. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de humanidades y ciencias. Pag. 26
- Graham AL. 2013. Optimal immunity meets natural variation: the evolutionary biology of host defence. *Parasite Immunol.*

- Green, A. (2001). Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82: 1473–1483.
- Grear DA, Perkins SE, Hudson PJ. 2009 Does elevated testosterone result in increased exposure and transmission of parasites? *Ecol Lett.* Jun;12(6):528-37.
- Griffiths AD, Brook BW. 2005. Body size and growth in tropical small mammals: examining variation using non-linear mixed effects models. *J. Zool.* 267, 211-220.
- Guenther A, Trillmich F, Czirják GÁ. 2018. Seasonal effects on behavior and immunity in a precocial rodent. *Behav Ecol Sociobiol* 72, 115
- Heinrich S, Hofer H, Courtiol A, Melzheimer J, Dehnhard M, Czirják G, Wachter B. 2017. Cheetahs have a stronger constitutive innate immunity than leopards. *Mar* 23; 7:44837.
- Hem A, Smith AJ, Solberg P. 1998. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim.* 32(4):364-368.
- Huitu O, Jokinen I, Korpimäki E, Koskela E, Mappes T. 2007. Phase dependence in winter physiological condition of cyclic voles. *Oikos* 116, 565-577.
- Irvine RJ. 2006. Parasites and the dynamics of wild mammal populations. *Animal Science* 82, 775.
- Kaiser S, Kirtzeck M, Hornschuh G, Sachser N. 2003. Sex-specific difference in social support—a study in female guinea pigs. *Physiology & Behavior*, 79, 297-303.
- Kamiya T, O'dwyer K, Nakagawa S, Poulin R, 2013. What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts. *Biol Rev.* 89: 123-134.
- Kamiya T, O'dwyer K, Nakagawa S, Poulin R. 2014. Host diversity drives parasite diversity: meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography.* 37: 689-697.
- Kourilsky P, Truffa-BP. 2001. Cytokine Fields and the polarization of the immune response. *Trends in Immunology*, volumen 22(9). 502-509p
- Kriengwatana B, Wada H, Macmillan A, MacDougall-Shackleton SA. 2013. Juvenile nutritional stress affects growth rate, adult organ mass, and innate immune function in Zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Physiol. Biochem. Zool.* 86, 769-781.

- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. 2017. “lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models.” *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1–26.
- Lee DE, Bettaso JB, Bond ML, Bradley RW, Tietz JR, Warzybok PM. 2012. Growth, age at maturity, and age-specific survival of the arboreal salamander (*Aneides lugubris*) on Southeast Farallon Island, California. *J. Herpetol.* 46, 64-71.
- Lochmiller RL. 1996 Immunocompetence and animal population regulation. *Oikos* 76, 594-602.
- Lochmiller R, Deerenberg Ch. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity. *Oklahoma State Univ., Stillwater, OK 74078, USA: Wiley. Oikos* 88, 87-98p
- Malagoli D, Ottaviani E. 2014. *Eco.immunology: Evolutive Aspects and Future Perspectives*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London: Springer Science and Business Media. 179p
- Martin LB, II, Weil ZM, Nelson RJ, 2006. Refining approaches and diversifying directions in ecoimmunology, *Integrative and Comparative Biology*, Volume 46, Issue 6, December, Pages 1030–1039
- Martin LB. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *Timing is everything.* , 163(1-2), 70–76.
- Megías P, Prados J, Rodríguez R, Sánchez J. 2018. El IMC durante el embarazo y su relación con el peso del recién nacido. *JONNPR.*;3(3):215-224.
- Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. 2010. Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺ Sca-1⁺ lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544.
- Mougeot F, Redpath SM, Piertney SB, Hudson PJ. 2005 Separating behavioral and physiological mechanisms in testosterone-mediated trade-offs. *Am Nat.* Aug;166(2):158-68.
- Murphy K, Weaver C. 2016. *Janeway’s Immunobiology. Comparative Endocrinology* 163, 70-76. New York: W.W Norton Incorporated. 9 ed. Garland Science. 924p
- Muñoz A, Bonal R. 2008. Are you strong enough to carry that seed? Seed size/body size ratios influence seed choices by rodents. *Anim. Behav.* 76, 709-715.
- Murphy K, Weaver C. 2017. *Janeway’s Immunobiology*. New York, NY, USA: Volumen 3. 9 ed. Garland Science . 904p
- Nunn C, Jordan F, McCabe C, Verdolin J, Fewell J. 2015. Infectious disease and group size: more than just a numbers game. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370,20140111.

- Panebianco A, Carmanchahi P, Pandolfi M. 2019. Aspectos comportamentales y fisiológicos involucrados en la sociabilidad de guanacos silvestres. Pag.186
- Paterson S, Lello J. 2003. Mixed models: getting the best use of parasitological data *Trends Parasitol* 19: 370-375.
- Preisser EL, Orrock JL. 2012. The allometry of fear: interspecific relationships between body size and response to predation risk. *Ecosphere* 3, art77.
- Redford KH, JF Eisenberg. 1992. *Mammals of the neotropics—the southern cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay*. 2nd ed. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Rivera-Aguilar V, Querejeta E, Jarillo-Luna RA, Reyna-Garfias H, Ponce-Franco D, Milliar-Garcia A, Quiñones-Cárdenas AR, Pacheco-Yepez J, Campos-Rodríguez R. 2008. Role of the striatum in the humoral immune response to thymus-independent and thymus-dependent antigens in rats. *Immunol. Lett.* 120, 20-28.
- Roberts M, Buchanan K, Evans M. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence, *Animal Behaviour*, Volume 68, Issue 2, Pages 227-239.
- Rojas EO. 2017. *Inmunología (de memoria)*. Buenos Aires: ed 4ta. Médica Panamericana. 556p
- Rolf J. (2002). Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1493), 867–872. doi:10.1098/rspb.2002.1959
- Sachser N. 1986. Different forms of social organization at high and low population densities in guinea pigs. *Behaviour* 97: 252–272.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* 21, 55-89.
- Sapolsky RM. 2002. Endocrinology of stress response. *Behavioral Endocrinology* (eds J.B.Becker, Breedlove.S.M., D.Crews, & M.M.McCarthy), pp 409-450. MT Press, Cambridge.
- Schoenle L, Downs C, Martin L. 2018. *An Introduction to Ecoimmunology*. Springer International Publishing A.G. part of Springer Natures. E.L. Cooper: 901-932
- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy MT. 2009. Introduction. *Ecological immunology*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1513): 3–14.

- Schmidt KL, Macdougall EA, Macdougall-SA. 2012. Developmental stress has sex-specific effects on nestling growth and adult metabolic rates but no effect on adult body size or body composition in song sparrows. *J. Exp. Biol*
- Schumann K, Guenther A, Göritz F, Jewgenow K. 2014. Characterization of fetal growth by repeated ultrasound measurements in the wild guinea pig (*Cavia aperea*). *Theriogenology* 82: 490–494.
- Šimková A, Lafond T, Ondračková M, Jurajda P, Ottová E, Morand S. 2008. Parasitism, life history traits and immune defence in cyprinid fish from Central Europe. *BMC Evol Biol* 8, 29.
- Sobrero R, Eberhardt A. 2019. *Cavia aperea*. En: SAyDS–SAREM (eds.) Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- Sobrero R, Eberhardt A, Goggi J, Antoniazzi L, Beldomenico, P. 2021. Ampliación del fenotipo social del cuis (*Cavia aperea*) y su relación con la densidad, estacionalidad y carga ectoparasitaria en el litoral argentino. Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet- Litoral), UNL. CONICET. Libro de resúmenes jornadas argentinas e mastozología virtuales 16-18-noviembre.
- Tizard I 2019. *Inmunología Veterinaria*. 10ma ed.: Elsevier, Barcelona, España 539p.
- Torres J, Miquel J, Casanova J, Ribas A, Feliu C, Morand S. 2006. Endoparasite species richness of Iberian carnivores: influences of host density and range distribution. *Biod Conserv.*15: 4619–4632
- Tran G, Wilcox P, Dent L, Robinson C, Carter N, Verma N, Hall B, Hodgkinson S. 2017. Interleukin-5 Mediates Parasite-Induced Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Association with Induction of Antigen-Specific CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology*, 8, 1453.
- Trillmich F, Guenther A, Jäckel M, Czirják GÁ. 2020 Reproduction affects immune defenses in the guinea pig even under ad libitum food. *PLoS One*. Mar 16;15(3):e0230081.
- Turner A, Trudinger B. 2000. Ultrasound measurement of biparietal diameter and umbilical artery blood flow in the normal fetal guinea pig. *Comp Med*. Aug;50(4):379-84.
- Viney ME, Riley EM. 2014. From immunology to eco-immunology: more than a new name. In: Malagoli D, Ottaviani E, editors. *Eco-Immunology: Evolutive Aspects and Future Perspectives*. UK: Springer p. 1–19.
- Viney M, Riley EM. 2017. The Immunology of Wild Rodents: Current Status and Future Prospects. *Front Immunol*. Nov 14; 8:1481.

Watson RL, McNeilly TN, Watt KA, Pemberton JM, Pilkington JG, Waterfall M, Hopper PR, Cooney D, Zamoyska R, Nussey DH. 2016. Cellular and humoral immunity in a wild mammal: Variation with age & sex and association with overwinter survival. *Ecol Evol.* Nov 15;6(24):8695-8705.

Webster J, Tonelli L, Sternberg E. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Rev. Immunology* 20, 125-163.

Zinkernagel RM. 2002. On differences between immunity and immunological memory., 14(4), 523–536.