



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

Caracterización del sistema del complemento e
identificación de componentes del sistema inmune innato
del yacaré overo (*Caiman latirostris*)

AUTOR: Pablo A. Siroski

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
Nacional del Litoral en el área de Ciencias Veterinarias

Esperanza, 19 de mayo de 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

Caracterización del sistema del complemento e identificación de
componentes del sistema inmune innato del yacaré overo
(*Caiman latirostris*)

AUTOR: Bioq. Pablo A. Siroski

DIRECTOR: PhD. Mark Merchant (McNeese State
University, Louisiana, USA)

CO-DIRECTOR: Dr. Hugo H. Ortega (FCV-UNL)

JURADO:

Prof. Dr. Pablo M. Beldomenico (UNL - CONICET).

Prof. Dr. Enrique J. R. Caviedes Vidal (UNSL - CONICET).

Prof. Dra. Marta D. Mudry (UBA - CONICET).

Esperanza, 19 de mayo de 2011

Agradecimientos

A mi hijo, personaje, compañero en las buenas y malas, de quien aprendí que luchando es la única manera de alcanzar las cosas. Gracias y perdón por las ausencias. ESTO ES POR Y PARA VOS.

A mi mamá, papá y al resto de mi familia, por ser LOS QUE SIEMPRE ESTAN...gracias por el apoyo incondicional; y los que no están, se que también están...ahí va, abue!!!

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme la oportunidad de realizar esta carrera.

A mi Co-Director Dr. Hugo Ortega, por darme la posibilidad, por compartir sus conocimientos, demostrarme que este camino no termina nunca y que solo es necesario tener ganas, ideas y un buen asado.

A mi Director Dr. Mark Merchant, por colaborar y brindarme todos sus conocimientos, indispensables, para el desarrollo de este trabajo.

Al amigo, ejemplo y jefe Alejandro Larriera, por permitirme trabajar junto a él en este mundo tan particular de los cocodrilianos.

A mis compañeros y a mis amigos del Proyecto Yacaré

A las Dras. Patricia y Gisela, por la amistad, el aguante, la estimulación, el incentivo permanente, y por encontrarle siempre el lado práctico para que las cosas menos pensadas se conviertan en trabajos científicos importantes.

A Lucia, Gisela Sch., Agustina y Evelyn por su colaboración en los experimentales a pesar de que les tocó la parte más dura.

A mis compañeros de la Dirección General de Manejo Sustentable de Fauna y Flora de la Provincia de Santa Fe.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, por la tolerancia y la buena predisposición.

Al Dr. Jose Di Conza, por el puntapié inicial de este trabajo.

Al Grupo de Especialistas en Cocodrilos (CSG/SSC/IUCN) por el financiamiento de una parte de este trabajo.

A mis amigos de Caimanes de Formosa, Yacaré Porá y Proyecto Caimán.

A mis amigos en general y en particular.

Gracias a todos los que, con mucho o poco, permitieron que este anhelo sea realidad.

Índice general

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	viii
<u>1. Introducción</u>	1
<u>1.1 Generalidades del sistema inmune</u>	1
1.1.1. Desarrollo integral de una respuesta inmune a las infecciones.....	2
<u>1.2 Sistema inmune innato y adaptativo</u>	4
1.2.1 Sistema complemento.....	9
1.2.1.1 Activación del sistema complemento.....	10
1.2.1.2 Vía clásica.....	14
1.2.1.3 Vía alternativa.....	16
1.2.1.4 Vía de las lectinas.....	17
1.2.1.5 Etapa terminal de la cascada del sistema complemento.....	18
1.2.1.6 Regulación del sistema del complemento.....	23
1.2.1.7 Evasión de los microorganismos al sistema complemento.....	25
1.2.1.8 Sistema del complemento en animales ectotermos.....	27
<u>1.3 Dipeptidil peptidasa IV plasmática</u>	30
<u>1.4 Fosfolipasa A2 plasmática</u>	32
<u>1.5 Generalidades del orden Crocodylia</u>	35
1.5.1 Ectotermia.....	35
<u>1.6 Descripción de la especie, situación poblacional y actividades de uso sustentable del género Caimán en Argentina</u>	37
<u>1.7 Actividad antimicrobiana del plasma de los cocodrilianos</u>	50
<u>1.8 Sistema del complemento en cocodrilianos</u>	53
<u>1.9 Efecto de la radiación UV sobre el sistema del complemento</u>	54
<u>1.10 Efectos de la exposición a contaminantes sobre el sistema del complemento</u>	56
<u>2. Hipótesis y Objetivos</u>	63
2.1 Hipótesis.....	63
2.2 Objetivo general.....	63
2.3 Objetivos específicos.....	63
<u>3. Materiales y Métodos</u>	65
3.1 Consideraciones generales del modelo biológico.....	65
3.1.1 Técnicas de captura.....	65
3.1.2 Toma y procesamiento de muestras.....	70
3.2 Identificación de actividad antimicrobiana en el plasma de <i>C. latirostris</i>	71
3.2.1 Ejemplares.....	72
3.2.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	72

3.2.3 Ensayo de inhibición de crecimiento en placa.....	73
3.2.4 Análisis estadísticos.....	74
<u>3.3 Identificación y caracterización del sistema del complemento en <i>C. latirostris</i></u>	
<u>y <i>C. yacare</i></u>	74
3.3.1 Ejemplares.....	74
3.3.2 Prueba de hemólisis de glóbulos rojos de oveja.....	74
3.3.2.1 Descripción de la prueba de hemólisis de SRBC.....	75
3.3.2.2 Influencia de la temperatura sobre la actividad hemolítica del sistema del complemento.....	77
3.3.2.3 Influencia del tiempo de incubación del plasma sobre la actividad hemolítica del sistema complemento.....	77
3.3.2.4 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad hemolítica del sistema complemento.....	78
3.3.2.5 Análisis estadístico.....	78
<u>3.4 Comparación de la actividad hemolítica del sistema del complemento de <i>C. latirostris</i> con otras especies</u>	78
3.4.1 Ejemplares.....	78
3.4.2 Prueba de hemólisis comparativa entre animales de diferentes especies...	79
3.4.3 Análisis estadístico.....	80
<u>3.5 Evolución de la actividad del sistema del complemento de <i>C. latirostris</i> durante los primeros meses de vida</u>	80
3.5.1 Ejemplares.....	80
3.5.2 Determinación de la capacidad hemolítica del plasma de <i>C. latirostris</i> ...	80
3.5.3 Análisis estadístico.....	81
<u>3.6 Efecto de la radiación UV sobre el sistema complemento</u>	81
3.6.1 Ejemplares.....	81
3.6.2 Tratamientos de exposición a radiación UV.....	82
3.6.3 Determinación del crecimiento y de la actividad del sistema complemento.....	84
3.6.4 Análisis estadístico.....	84
<u>3.7 Inducción de la respuesta inmune luego de una exposición <i>in vivo</i> a plaguicidas</u>	85
3.7.1 Ejemplares.....	85
3.7.2 Tratamientos de exposición y concentraciones de plaguicidas.....	85
3.7.3 Inyección de lipopolisacáridos.....	87
3.7.4 Variables morfométricas.....	88
3.7.5 Determinación de la actividad del sistema del complemento.....	88
3.7.6 Recuento total y diferencial de glóbulos blancos.....	88
3.7.7 Análisis estadístico.....	89
<u>3.8 Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i></u>	89

3.8.1 Ejemplares.....	90
3.8.2 Descripción del ensayo para determinar DPPIV plasmática.....	90
3.8.3 Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima DPPIV.....	91
3.8.4 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad de la enzima DPPIV.....	92
3.8.5 Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima DPPIV.....	92
3.8.6 Análisis estadístico.....	92
<u>3.9 Fosfolipasa A2 (PLA2) en plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	<u>93</u>
3.9.1 Ejemplares.....	93
3.9.2 Cultivo bacteriano.....	93
3.9.3 Descripción del ensayo para la determinación de PLA2 plasmática.....	93
3.9.4 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de la enzima PLA2.....	94
3.9.5 Influencia de la concentración del plasma en la actividad de la enzima PLA2.....	95
3.9.6 Influencia del tiempo de incubación en la actividad de la enzima PLA2..	95
3.9.7 Análisis estadístico.....	95
<u>4. Resultados</u>.....	<u>97</u>
<u>4.1 Identificación de la actividad antimicrobiana en <i>C. latirostris</i> mediante el ensayo de inhibición de crecimiento en placa.....</u>	<u>97</u>
<u>4.2 Identificación y caracterización del sistema del complemento en <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	<u>98</u>
4.2.1 Identificación e inhibición de la actividad del sistema del complemento mediante la prueba de hemólisis de glóbulos rojos de oveja.....	98
4.2.2. Influencia de la temperatura de incubación del plasma sobre la actividad del sistema complemento.....	99
4.2.3 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad del sistema complemento.....	101
4.2.4 Determinación de la cinética de hemólisis del plasma sobre la actividad del sistema complemento.....	102
<u>4.3 Comparación del sistema de complemento con otras especies.....</u>	<u>103</u>
<u>4.4. Evolución del sistema del complemento durante los primeros 6 meses de vida.....</u>	<u>104</u>
<u>4.5 Efecto de diferentes tiempos de exposición a RUV, fotoperíodo natural y oscuridad total sobre el crecimiento y la actividad del sistema complemento...</u>	<u>106</u>
4.5.1 Efectos detectados sobre el crecimiento.....	106
4.5.2 Efectos detectados sobre la actividad del sistema del complemento.....	107

<u>4.6 Efectos de la exposición a plaguicidas sobre el crecimiento y la actividad del sistema del complemento.....</u>	108
4.6.1 Variables morfológicas.....	108
4.6.2 Determinación de la actividad del sistema del complemento.....	109
4.6.3 Recuento total y diferencial de glóbulos blancos.....	111
<u>4.7 Dipeptidil peptidasa IV en plasma de <i>C. yacare</i> y <i>C. latirostris</i>.....</u>	116
4.7.1 Identificación de la Dipeptidil peptidasa IV plasmática.....	116
4.7.2 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de DPPIV.....	117
4.7.3 Influencia del tiempo de incubación en la actividad de DPPIV.....	118
4.7.4 Influencia de la Concentración del plasma en la actividad de DPPIV.....	119
<u>4.8 Fosfolipasa A2 en plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	120
4.8.1 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de PLA2.....	120
4.8.2 Influencia de la concentración de plasma en la actividad de PLA2.....	121
4.8.3 Influencia del tiempo incubación en la actividad de PLA2.....	122
<u>5. Discusión</u>	125
<u>5.1 Actividad antimicrobiana en el plasma de <i>C. latirostris</i>.....</u>	125
<u>5.2 Identificación y caracterización del sistema del complemento en el plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	126
<u>5.3 Comparación del sistema de complemento entre especies silvestres y domésticas.....</u>	131
<u>5.4 Evolución del sistema del complemento durante los primeros 6 meses de edad.....</u>	133
<u>5.5 Efecto de la radiación UV sobre el sistema del complemento.....</u>	136
<u>5.6 Efectos de plaguicidas sobre el sistema complemento.....</u>	138
<u>5.7 Dipeptidil peptidasa IV en plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	143
<u>5.8 Fosfolipasa A2 en plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i>.....</u>	145
<u>6. Conclusiones</u>	149
<u>7. Referencias bibliográficas</u>	153

Resumen

Los reptiles han demostrado tener un sistema inmune inespecífico versátil y eficiente, adaptado al ambiente en que habitan. Los cocodrilianos exhiben comportamientos sociales fuertemente marcados y respuestas ante factores estresantes que pueden desencadenar serias disputas entre congéneres, predadores e, incluso, conflictos con actividades humanas. Como consecuencia, se pueden observar lesiones, heridas de consideración, y hasta la pérdida de miembros. Por lo general, estos animales habitan en ambientes que contienen una alta concentración de microorganismos patógenos tanto en los sistemas naturales como en cautiverio. En muchos casos, la combinación de estos factores podría desatar un proceso infeccioso local o sistémico, sin embargo, los cocodrilianos se sobrepone a estas situaciones sin demostrar, en general, signos de enfermedad.

En nuestro trabajo detectamos que el plasma de *Caiman latirostris* posee propiedades antibacterianas superiores al plasma humano y al de gallina (*Gallus gallus*) sugiriendo que el sistema complemento sería uno de los responsables de dicho efecto inhibitorio.

Mediante un ensayo colorimétrico se pudo detectar y caracterizar la actividad del sistema complemento y compararla con el de aves, mamíferos y otros reptiles. Asimismo, se determinó que dicha actividad está presente desde el nacimiento y tiene una dependencia estacional. Además se lo utilizó como indicador del efecto de plaguicidas y radiación ultravioleta. En ambos casos, el efecto observado radicó en la disminución de la actividad y fue dosis-dependiente. Por último, se realizó la detección y caracterización de dos enzimas intervinientes en el sistema inmune, DPPIV y PLA2, encontrándose que tienen actividades superiores comparadas con otras especies de vertebrados y similares a las de otros cocodrilianos estudiados.

En conclusión, podríamos sugerir que los caimanes estudiados tienen un sistema inmune innato eficiente y con un grado de adaptabilidad que le permitiría resistir el ataque de los microorganismos, siendo el potente sistema complemento uno de los componentes que colaboraría mayoritariamente. Dicha resistencia podría ser una de las razones de su éxito evolutivo y longevidad. La continuidad de este trabajo podría orientarse a la detección y caracterización de los componentes del sistema complemento con miras a una posible aplicación terapéutica en las ciencias veterinarias.

Palabras claves: cocodrilianos, *Caiman latirostris*, *Caiman yacare*, sistema inmune, sistema complemento, prueba de hemólisis, DPPIV, PLA2.

Summary

Reptiles have proved to have a versatile and efficient nonspecific immune system adapted to the environment where they commonly live. Crocodilians exhibit strongly marked social behaviors and responses to stressors that can trigger serious disputes between co-specifics, predators and, even, conflict with human activities. As a result, they could show trauma, serious injuries and the loss of members. Generally, these animals live in environments containing a high concentration of pathogenic microorganisms in both, natural and captive systems. In many cases, the combination of these factors could cause a local or systemic infectious process, however, crocodilians tolerate these situations and generally, without showing signs of illness.

In this work, it was found that *Caiman latirostris* plasma has antibacterial properties higher than human and chicken (*Gallus gallus*) plasma, suggesting that the complement system (CS) could be a cause of the inhibitory effects observed.

Colorimetric assay was used to detect and characterize complement system activity and compare it with that of birds, mammals and other reptiles. It was also determined that this activity was present in caimans from birth and has a seasonal variation. Moreover, the CS was used as an indicator of pesticide and ultraviolet radiation effects. In both cases, a dose-dependent decrease in the activity was observed. Finally, we performed the detection and characterization of two enzymes involved in the immune system, DPPIV and PLA2, demonstrating that both of them have higher activities in caimans compared with other vertebrates and similar to other crocodilians studied.

In conclusion, we might suggest that the caimans studied have efficient and well developed innate immune system that could resist the attack of some microorganisms. The powerful complement system would be one of the components mainly involved. Such resistance could be one of the reasons for the successful and longevity of crocodilians. This work should continue leading to the detection and characterization of the components of the complement system, taking into account a possible therapeutic application in the veterinary industry.

Keywords: Cocodrilians, *Caiman latirostris*, *Caiman yacare*, immune system, complement system, hemolysis assay, DPPIV, PLA2.

Índice de figuras

Figura 1. Principales acciones del sistema del complemento (SC). Los productos de la ruptura de C3 que se unen covalentemente a la superficie de las bacterias, aceleran el proceso de fagocitosis y la muerte del microorganismo. La vía lítica del SC forma un complejo con la capacidad para insertarse en la membrana del microorganismo y genera un poro para producir la lisis (Fujita, 2002).....	12
Figura 2. Esquema de la cascada sistema del complemento (SC), con el detalle de las tres vías de activación y de la vía efectora (Favoreel et al., 2003).....	14
Figura 3. La activación del complemento y la generación de C5 convertasa lleva a la liberación de los productos de C5 que son las bases del ensamblaje del complejo de ataque a membranas (CAM) (Fujita, 2002).....	19
Figura 4. Las anafilotoxinas son potentes moléculas proinflamatorias generadas a partir del clivaje de C4, C3 y C5 en C4a, C3a y C5a, respectivamente. La unión de las anafilotoxinas a sus receptores genera la liberación de las señales (Fujita, 2002).....	21
Figura 5. La generación de los fragmentos de C3b por las C3 convertasas de las tres vías de activación inicia la vía de opsonización del sistema del complemento comportándose como un importante efector para la eliminación de los microorganismos (Fujita, 2002).....	22
Figura 6. Esquema de la hidrólisis producida por las fosfolipasas A1 y A2.....	33
Figura 7. Yacaré negro, <i>Caiman yacare</i> (izquierda) y yacaré overo, <i>Caiman latirostris</i> (derecha).....	38
Figura 8. Mapa de la distribución geográfica de las especies de yacarés en la República Argentina. Tomado de Larriera et al., 2008. Barra = 100 Km.....	40
Figura 9. Imágenes registradas en los momentos en que los animales son reintroducidos a su habitat natural con un tamaño marcadamente superior al de los animales que han pasado el mismo tiempo en la naturaleza.....	42
Figura 10. Ejemplos de la fisonomía de los animales adultos (1,80 m, aproximadamente) de <i>C. yacare</i> (izquierda) y <i>C. latirostris</i> (derecha).....	43
Figura 11. Diferencias en los ambientes de preferencias entre ambas especies. La especie <i>C. latirostris</i> prefiere ambientes densamente vegetados y de escasa profundidad (izquierda arriba y abajo), en cambio, <i>C. yacare</i> , suele encontrarse en ambientes más abiertos como ríos y lagunas (derecha arriba y abajo).....	44
Figura 12. Diferentes tipos de nidos construidos por los yacarés. Estos actúan como incubadoras naturales ofreciendo las condiciones de temperatura y humedad para el desarrollo de los embriones. De izquierda a derecha, se pueden observar los nidos en los diferentes ambientes y materiales: estero, monte y sabana.....	45
Figura 13. Los incendios causados accidental o intencionalmente, son una causa frecuente de mortalidad embrionaria (izquierda-arriba) junto a la predación o destrucción de los nidos por animales silvestres o domésticos (izquierda-abajo, y derecha). La presencia de predadores y las bajas temperaturas, son otras causas de decesos en la etapa perinatal.....	46

Figura 14. Ejemplos de heridas producidas por peleas entre congéneres.....	47
Figura 15. Ejemplos de pérdidas de los extremos de las colas en <i>C. yacare</i>	48
Figura 16. Las altas densidades pueden observarse tanto en cautiverio como en la naturaleza y podrían desencadenar peleas entre animales por competencias ante diversos factores o simplemente por estrés.....	49
Figura 17. Ejemplos de ambientes en los que suelen encontrarse los yacarés. En estos lugares, existen altas concentraciones de microorganismos patógenos, por lo que podríamos suponer que estos animales tienen un sistema de defensa adaptado para vivir en estos ambientes.....	51
Figura 18. Curso de agua que puede ser utilizados por los neonatos de yacaré contiguo a un cultivo de soja.....	61
Figura 19. Técnica de cosecha en la cual se marcan la posición de los huevos en el nido que será respetado cuando los mismos sean ubicados en bateas dentro de la incubadora artificial a temperatura y humedad controlada.....	66
Figura 20. Corte en las crestas caudales que se realizan para identificar con un código a los animales que pertenecen a un mismo nido. Luego del corte, se realiza un botón cicatrizal que permanecerá para toda la vida.....	66
Figura 21. Instalaciones con piletas calefaccionadas para mantener una temperatura constante durante todo el año. De esta manera, y con el complemento de un alimento balanceado húmedo, los animales alcanzarán un tamaño superior al de los animales que han pasado los meses fríos en la naturaleza.....	67
Figura 22. Imagen satelital de los sitios donde fueron capturados los animales silvestres para los estudios realizados.....	69
Figura 23. Extracción de sangre de los animales recién nacidos y en la naturaleza.....	71
Figura 24. En esta imagen se puede observar coloración rojiza de la hemoglobina que posee el sobrenadante del tubo de la derecha como consecuencia de la hemólisis provocada por el plasma de yacaré. En el mismo, se puede apreciar el botón formado por las membranas de los globulos rojos de oveja (SRBC) resuspendidas que se formó luego de la centrifugación a diferencia del otro en el cual no se detectó actividad hemolítica.....	76
Figura 25. Identificación individual de los animales con dos caravanas metálicas numeradas.....	82
Figura 26. Metabolización de Glifosato (GFT) en agua correspondiente a los grupos de baja concentración (RU1) y alta concentración (RU2) de plaguicida caracterizado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Las concentraciones iniciales y finales de cada grupo experimental se muestran en la Tabla 3.....	86
Figura 27. Esquema del ensayo utilizado para la determinación de la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en plasma de yacaré.....	91
Figura 28. Esquema del ensayo utilizado para la determinación de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) en plasma de yacaré.....	94

Figura 29. Actividad antibacteriana del plasma de yacaré overo, gallina y humano expuesto a <i>E. coli</i> en función del tiempo de incubación. Las unidades formadoras de colonias se expresan como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) y corresponden a la media de las UFC contadas en las diluciones seriadas que contenían entre 30 y 300 UFC. El cálculo de UFC/ml se obtiene en base a la fórmula expresada en la sección 3.2.3. En todos los tiempos evaluados, el plasma de <i>C. latirostris</i> tuvo una mayor actividad antibacteriana que el plasma de <i>G. gallus</i> y humano (* p < 0,001). A = no fue detectada.....	98
Figura 30. Efecto del tratamiento del plasma con EDTA (50 mM) y calor (56°C 30 min) sobre la hemólisis de glóbulos rojos de oveja (SRBC). El plasma no tratado demostró una capacidad muy superior (* p < 0,001) para lisar los SRBC respecto al tratado con EDTA y calor.....	99
Figura 31. El plasma de ambas especies de yacaré fue incubado con una solución de glóbulos rojos de ovejas (SRBC) al 1 % (v/v) a diferentes temperaturas (5°C a 45°C, con intervalos de 5°C). Los resultados registrados para las dos especies demostraron una correlación positiva entre la temperatura y el porcentaje de máxima hemólisis (p < 0,001; r ² = 0,98 y r ² = 0,92 para el plasma de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i> , respectivamente).....	100
Figura 32. La incubación de una solución de glóbulos rojos de oveja (SRBC) al 1 % (v/v) demostró una relación positiva con volúmenes crecientes de plasma de ambas especies de yacarés (p<0,001; <i>C. latirostris</i> : r ² = 0,96, <i>C. yacare</i> : r ² = 0,91).....	102
Figura 33. La incubación de 25 ml de plasma de yacaré con 25 ml de solución de SRBC al 1 % (v/v) se realizó para evaluar <i>in vitro</i> la cinética de la reacción hemolítica provocada por las proteínas plasmáticas del plasma. Los volúmenes leídos fueron retirados a diferentes intervalos de tiempo (p < 0,001, <i>C. latirostris</i> : r ² = 0,96, <i>C. yacare</i> : r ² = 0,82).....	103
Figura 34. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad del SC de diferentes especies de aves, reptiles y mamíferos. La actividad del plasma de <i>C. latirostris</i> fue superior (* p < 0,05) al de las demás especies evaluadas.....	104
Figura 35. Representación de la variación mensual de la actividad del SC durante los primeros seis meses de vida. Los nidos 172, 362, 174 y 167 demostraron una variación de dicha actividad en los distintos meses (p < 0,05). Se detectaron diferencias en los valores hallados en el mes de septiembre sólo en los nidos 172, 362, 174 y 294 (p < 0,05).....	106
Figura 36. Valores de incremento en la longitud hocico-cloaca (LHC) tomadas al comienzo y al final del experimento de exposición a diferentes tratamientos: 8 hs de radiación ultravioleta (RUV), 16 hs de RUV, fotoperiodo natural (FN) de luz solar y oscuridad total (OT) durante 90 días. El grupo FN evidenció un crecimiento superior (* p < 0,001) respecto de los demás grupos..	107
Figura 37. Diferentes capacidades de hemólisis demostradas por el plasma de los grupos de animales expuestos a distintos tratamientos: oscuridad total (OT), 8 hs de radiación ultravioleta (RUV), 16 hs de RUV y fotoperíodo normal (FN). La capacidad hemolítica de los animales del tratamiento FN (* p < 0,001) fue superior al resto de los grupos.....	108
Figura 38. Las diferencias observadas entre longitud hocico-cloaca (LHC) (izquierda) y longitud total (LT) (derecha) tomadas al inicio y al final del experimento de exposición a plaguicidas fueron menores en el tratamiento RU2 (* p < 0,05) que en el resto de los tratamientos.....	109

Figura 39. Gráfico de perfil de las variables “Tratamiento con plaguicida” y “Tratamiento con lipopolisacáridos (LPS)”. Se observa que no hay interacción entre las variables ($p > 0,05$) y que los resultados de porcentaje de máxima hemólisis (%MH) de los animales inyectados con solución fisiológica (SF) o con LPS se comportan de igual manera en los diferentes tratamientos, evidenciándose un descenso en el %MH en los grupos tratados con Roundup® (RU) respecto del control normal (CN), tanto en los inyectados con SF como en aquellos inyectados con LPS ($p < 0,05$).....	110
Figura 40. Demostración del porcentaje de máxima hemólisis (%MH) obtenido de los animales expuestos a las diferentes concentraciones de plaguicidas Roundup® (RU1 y RU2) y al control normal (CN) que fueron posteriormente inyectados con solución fisiológica (SF) y lipopolisacáridos (LPS). Se observó que el grupo RU2 inyectado con LPS demostró un (%MH) significativamente inferior ($* p < 0,05$) respecto del grupo inyectado con SF en el control normal..	111
Figura 41. Recuento total de leucocitos en los animales expuestos a los diferentes tratamientos con Roundup® (RU1 y RU2) e inyectados posteriormente con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF).. El recuento total de leucocitos de los animales pertenecientes a los tratamientos CN y RU2 inyectados con LPS fueron mayores que los inyectados con SF ($* p < 0,05$).....	112
Figura 42. Porcentaje de heterófilos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de heterófilos fue mayor en los animales inyectados con LPS que en SF dentro los tratamientos RU1 ($* p < 0,05$), RU2 ($* p < 0,001$) y CN ($* p < 0,001$).....	113
Figura 43: Porcentaje de linfocitos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de linfocitos entre los grupos inyectados con LPS fue inferior a los inyectados con SF dentro de los tratamientos RU2 y CN ($* p < 0,01$).....	114
Figura 44. Porcentaje de monocitos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). Se encontró que el porcentaje de los monocitos fue inferior en los animales inyectados con LPS que los inyectados con SF en los grupos expuestos a Roundup® ($* p < 0,05$).....	115
Figura 45. Porcentaje de eosinófilos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de eosinófilos en RU2 fue mayor en los animales inyectados con LPS que los inyectados con SF ($* p < 0,01$).....	116
Figura 46. La actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en el plasma de ambas especies fue inhibida por diferentes concentraciones de diproteína A incubadas durante 60 min a 25°C ($p < 0,05$). La fluorescencia del producto de la hidrólisis fue medida espectrofluorométricamente.....	117
Figura 47. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa (DPPIV) durante la reacción con el sustrato fluorescente. El efecto de la temperatura fue similar entre las especies (<i>C. yacare</i> : $r^2 = 0,99$, $p < 0,001$; <i>C. latirostris</i> : $r^2 = 0,95$, $p < 0,05$) excepto a 5 °C ($p > 0,05$).....	118

Figura 48. Cinética de la actividad plasmática de dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en el plasma de las especies <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacare</i> durante 120 min. La actividad de DPPIV en el plasma de <i>C. latirostris</i> aumentó rápidamente entre 0 y 10 min ($r^2 = 0,99$, $p = 0,07$), y más lentamente entre los 15 y 60 min ($r^2 = 0,93$, $p = 0,01$). En el caso de <i>C. yacare</i> , entre los 0 y 30 min aumentó ligeramente ($r^2 = 0,99$, $p < 0,001$), entre los 30 y 60 min, la tasa de incremento disminuyó en un 35 % ($r^2 = 0,99$, $p < 0,05$).....	119
Figura 49. El ensayo de la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) a diferentes concentraciones de plasma demostró comportamientos similares entre ambas especies. La actividad de la enzima fue detectada en varias concentraciones de plasma, luego de la incubación durante 60 min a 25 °C ($p < 0,001$).....	120
Figura 50. Actividades registradas de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) durante el incremento en la temperatura de incubación entre el plasma de yacaré con las bacterias marcadas con BODYPY (<i>C. yacare</i> : $r^2=0,964$; $p < 0,001$; <i>C. latirostris</i> : $r^2=0,968$; $p < 0,001$).....	121
Figura 51. Los efectos del aumento de la concentración de plasma de <i>C. latirostris</i> y de <i>C. yacare</i> provocó un incremento en el producto de la reacción causado por fosfolipasa A2 (PLA2), que se refleja en la intensidad de fluorescencia registrada (<i>C. latirostris</i> : $r^2=0,531$; $p < 0,05$; <i>C. yacare</i> : $r^2=0,611$; $p < 0,05$).....	122
Figura 52. El ensayo de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) a diferentes tiempos de plasma demostró comportamientos similares pero con una mayor actividad en el plasma de <i>C. latirostris</i> (<i>C. latirostris</i> : $r^2 = 0,886$; <i>C. yacare</i> : $r^2 = 0,804$; $p < 0,01$).....	123
Figura 53. Toma de muestras de fluido corioalantoideo (a y b) y de la boca (b y c) de neonatos de <i>C. latirostris</i>	134

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes principales del sistema inmune.....	8
Tabla 2. Resumen de la cantidad de radiación recibida en los tratamientos de exposición a radiación ultravioleta (UVR), oscuridad total (OT) y fotoperíodo normal (FN), con y sin media sombra.....	83
Tabla 3. Grupos experimentales de neonatos de <i>C. latirostris</i> y tratamientos aplicados en el Ensayo de exposición <i>in vivo</i> a Roundup®.....	87
Tabla 4. Distribución y cantidad de animales inyectados con la solución de LPS y solución salina post-exposición a GFT <i>in vivo</i>	87
Tabla 5. Resultados de la determinación de la capacidad hemolítica del plasma de <i>C. latirostris</i> extraído mensualmente durante seis meses desde el nacimiento. Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.....	105



Introducción

1. Introducción

1.1 Generalidades del sistema inmune

Las respuestas inmunes en las diferentes especies animales han evolucionado desde mecanismos innatos hasta los más elaborados y adaptativos para el reconocimiento del material no propio y es justamente la discriminación entre lo propio y lo no propio el aspecto central para la integridad del hospedador (Medzhitov & Janeway, 2002).

El concepto tradicional de Inmunología se definía como la resistencia que un organismo ofrece a la agresión de un parásito. El concepto actual, la define como la resistencia en el sentido de rechazo que ofrece un organismo a cualquier otro agente externo que altere seriamente la integridad inmunológica del individuo. Todos los invertebrados y vertebrados estudiados han demostrado tener un rango amplio de respuestas inmunes que permite reconocer y eliminar el material extraño.

Una respuesta inmune es el resultado de una cascada de eventos múltiples que convergen conduciendo, en el mejor escenario, a la eliminación de la señal que provoca la reacción de reconocimiento. La multiplicidad de mecanismos puede ser muy grande dentro de un individuo, dentro de varias clases o dentro del *phyla*. Esta multiplicidad es una consecuencia de la importancia de la tarea a cumplir y, aunque es raro que una función tan importante se lleve a cabo por un mecanismo simple en un individuo, en algunos casos existen alternativas cuando algunos de los mecanismos no funcionan de manera adecuada (Du Pasquier, 2001).

La increíble complejidad del sistema inmune (SI) es necesaria para proveer una adecuada defensa en función de la gran cantidad de patógenos y hospedadores, sus interrelaciones y los procesos que pueden causar una enfermedad. Actualmente, el término inmunología abarca no sólo el carácter invulnerable sobre cualquier enfermedad infecciosa, sino que también engloba otros fenómenos como la hipersensibilidad, la hemoaglutinación, e incluso, el rechazo a trasplantes.

En los vertebrados superiores se ha establecido un SI efectivo y altamente sofisticado con el objetivo combatir partículas extrañas y mantener la integridad de los

tejidos. Sobre la base del potencial tóxico, el SI tiene la necesidad de discriminar entre las células del hospedador y las extrañas. De esta manera, podemos enumerar 4 funciones centrales del SI: i) reconocimiento de células propias y extrañas; ii) discriminación entre células propias y extrañas; iii) protección de las células propias; y iv) muerte o eliminación de las partículas extrañas (Tizard, 2009).

1.1.1. Desarrollo integral de una respuesta inmune a las infecciones

Los organismos están expuestos diariamente a millones de patógenos a través del contacto, la ingestión y la inhalación (Hancock & Scott, 2000). El SI también evoluciona en el reconocimiento de componentes de los microorganismos como por ejemplo: lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteichoico (LTA), peptidoglicanos (PG), lipoproteínas (LP), proteínas flagelares, ciertas secuencias de ADN no metiladas (CpG), entre otros, y que son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, llamados PAMP (del inglés “Patogens associated to molecular patterns”). Estos pueden generar rápidamente una respuesta inmune no específica (inmunidad innata), como también poseen la capacidad de estimular a las células inmunes específicas que reconocen discretamente las características individuales de los agentes patógenos y desarrollan una respuesta inmune específica, eficaz, duradera y protectora (inmunidad adaptativa).

Básicamente, la respuesta inmune de los vertebrados frente a una infección, en forma general y sin tener en cuenta algunas consideraciones o variaciones existentes entre especies, se divide en 3 fases:

1.- Dentro de las primeras 4 horas se activan los mecanismos de defensa del hospedador para detectar a un patógeno, constituyendo la denominada respuesta inmune innata o constitutiva. Si los mecanismos clásicos de la respuesta inmune innata son insuficientes, existen algunos otros mecanismos no adaptativos, como por ejemplo, el reclutamiento de células inflamatorias que pueden controlar la infección hasta que se desarrolle la respuesta inmune adaptativa. En primera instancia, los individuos se defienden de agentes extraños que aparecen en la superficie del cuerpo por medio de los

epitelios, que proporcionan barreras mecánicas, químicas, microbiológicas contra los patógenos potenciales (Song et al., 2000). Las barreras mecánicas están ligadas por "uniones estrechas" de células epiteliales, y en los casos en que esta continuidad se rompe, como por ejemplo en las heridas o quemaduras, o en personas cuya superficie mucociliar se ve comprometida, la eficiencia de estas barreras está en peligro. El epitelio superficial también produce sustancias químicas que pueden inhibir muchas bacterias. Por ejemplo, las lizosimas están presentes en las lágrimas y la saliva, y son eficaces en matar muchas especies de bacterias, también el bajo pH del estómago y las defensinas (pequeños péptidos bactericidas) presentes en la mucosa respiratoria e intestinal cumplen funciones similares (Bevins, 1999; Thammasirirak et al., 2006). Además, algunas superficies mucosas están colonizadas por bacterias que componen la flora normal y pueden prevenir la colonización por bacterias patógenas.

2.- Las respuestas inmunológicas adaptativas están mediadas por los linfocitos B y T. Se desarrollan y responden en un plazo de alrededor de diez días a las características específicas expresadas por el patógeno invasor (inmunógenos) y funcionan casi exclusivamente contra el patógeno contra el cual se generaron dada la especificidad de sus determinantes antigénicos (Robert & Ohta, 2009). Por otro lado, la respuesta a una reinfección es rápida. La inmunidad tiene un comportamiento protector si los anticuerpos preformados o los linfocitos T efectoros están presentes. Por lo tanto, el patógeno podría ser eliminado sin que se establezca una infección. En este caso, la reinfección por un patógeno en particular puede ser imperceptible. Otro caso es de la memoria inmunológica cuando los anticuerpos o los linfocitos T disponibles son insuficientes para prevenir la reinfección. En esta situación, las células con memoria serán activadas y la respuesta adaptativa será inducida en un tiempo más corto y con mayor intensidad que en la infección primaria sin que aparezca algún signo o síntoma de infección (Ulevitch et al., 2004).

3.- Respuesta a la infección inducida no adaptativa. Existen algunos microorganismos que evaden los mecanismos de defensa constitutiva del huésped pero que pueden ser contenidos en una segunda instancia por mecanismos de defensa no adaptativos, pero inducidos. Se basan principalmente en el reclutamiento de células inflamatorias y productos solubles bactericidas hacia el sitio de la infección, e implican

mecanismos de reconocimiento de moléculas relativamente constantes (PAMP). Esta respuesta se caracteriza por ser de corta duración, no genera una inmunidad protectora y por lo general, entra en acción para mantener el patógeno bajo control hasta que se establezca una respuesta inmune adaptativa (Tizard, 2009).

1.2 Sistema inmune innato y adaptativo

Para el conocimiento de muchos componentes del sistema inmune innato en los vertebrados, incluso para entender las estrategias exitosas de detección y de eliminación de los patógenos a nivel de la evolución de los animales, podríamos remontarnos hasta los urocordados, pero el hecho de dónde y cómo emerge el sistema inmune adaptativo permanece aún con muchos puntos aún no esclarecidos (Khalturin et al., 2004). El sistema inmune (SI) en los vertebrados está compuesto de 2 grandes subsistemas que se interrelacionan: el SI innato (SII) y el adaptativo (SIA). Existen numerosas hipótesis, suposiciones y ejemplos en los que se intenta mostrar una transición gradual entre el SII y el SIA desde múltiples puntos de vista. A pesar de que continúan los estudios sobre la interacción entre ambos, algunos conocimientos elementales mencionan que mientras el SII responde rápidamente a la presencia de agentes patógenos, el SIA puede tomar varios días o semanas en activarse por completo y además, requiere una exposición previa a un antígeno para generar una respuesta inmunológica integral, utilizando la respuesta humoral y la mediada por células (Coico et al., 2003).

El SIA, tiene un repertorio extremadamente amplio de receptores que reconocen específicamente los antígenos y posee una flexibilidad superior al SII en su adaptación a los cambios moleculares que presentan los diferentes patógenos. Sin embargo, las reacciones con moléculas o partículas desconocidas son lentas, debido a que lleva de tres a siete días hasta que se produce la selección clonal para que luego la expansión de los linfocitos asegure una respuesta inmune específica. Entre otras numerosas cualidades y en referencia al nombre que se le ha asignado, la respuesta se va adaptando de manera tal de asegurar una respuesta inmune satisfactoria, generando una memoria inmunológica de gran vigencia en el tiempo contra posibles reinfecciones (Anderson et al., 1981). En general, el SIA se pueden dividir en dos tipos: 1) la inmunidad humoral (anticuerpos) y 2) la inmunidad mediada por células (IMC). La respuesta inmune

humoral es más eficaz contra los patógenos extracelulares y los anticuerpos específicos cumplen tres funciones principales en la defensa del hospedador (Janeway & Medzhitov, 2002):

i) *Neutralización*: La unión de anticuerpos al agente extraño les impide interactuar en la célula hospedadora. Este complejo puede ser ingerido y degradado por los macrófagos. La neutralización también implica la unión de los anticuerpos específicos con adhesinas bacterianas que median la adhesión de la bacteria patógena a sus células diana o tejidos. Los anticuerpos unidos a estas adhesinas inhiben la colonización bacteriana (Soto & Hultgren, 1999).

ii) *Opsonización*: Los agentes patógenos ubicados en los espacios extracelulares pueden ser opsonizados (recubiertos con anticuerpos específicos). Estos patógenos opsonizados son reconocidos por los macrófagos y se produce la unión entre el receptor Fc en la superficie del macrófago y la porción Fc de la molécula del anticuerpo en la superficie de las bacterias, que luego son ingeridas y degradadas.

iii) *La activación del sistema del complemento (SC)*: El patógeno vinculado con un anticuerpo específico puede activar la vía clásica del complemento. Los componentes específicos del complemento (C) que reconocen los complejos antígeno-anticuerpo inducen la cascada del complemento que puede resultar en la muerte directa del organismo patógeno, a través de los componentes finales de la cascada (Complejo de ataque a membrana, CAM) o la ingestión y la degradación por los macrófagos (a través de los receptores del SC en la superficie de los macrófagos) (Schmidt & Colten, 2000).

Por el contrario, las respuestas IMC son más eficaces contra los patógenos intracelulares que pueden residir dentro de las vesículas fagocíticas o libres en el citoplasma de la célula hospedera. Dos tipos de respuestas IMC han evolucionado para hacer frente a estas dos estrategias:

i) Los patógenos que sobreviven dentro de las vesículas fagocíticas de los macrófagos, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, son controlados por un mecanismo de células T dependiente de la activación de los macrófagos.

ii) Las infecciones por patógenos citoplasmáticos, como los virus y ciertas bacterias (por ejemplo, *Shigella sp.* y *Listeria sp.*), están controladas por los linfocitos T CD8 + citotóxicos celulares (Lct).

Por otro lado, en el SII, que puede ser definido como todas las defensas inmunes que no tienen memoria inmunológica, la respuesta es rápida (desde algunos minutos a horas) y ha evolucionado a partir de las asociaciones entre el huésped y el patógeno (Medzhitov & Janeway, 2000).

En general, el SII fue relegado a aquellas funciones de inmunidad que estaban involucradas en la prevención y el confinamiento de la infección mientras que la inmunidad adaptativa proveía los efectores para “limpiar” la infección en forma definitiva. Generalmente, la inmunidad innata está basada en mecanismos activos y pasivos menos específicos y poco sofisticados de defensa de un hospedador. El SII es evolutivamente más antiguo que el SIA y es utilizado tanto por invertebrados (insectos y equinodermos) como por animales superiores. En esencia, parecer ser mucho más simple que la respuesta del SIA pero no hay que dejar de considerar que reconoce pequeñas características distintivas de los microorganismos patógenos (Medzhitov & Janeway, 2002), y además de proveer la primera línea de defensa, también juega un rol crítico en la activación e inducción de la respuesta inmune adaptativa (Tabla 1.1) (Fearon, 1997).

Mientras el SIA involucra receptores que son generados por mecanismos somáticos y se basan en la expansión clonal de subconjuntos de linfocitos T y B, la inmunidad innata utiliza los mecanismos fijos que están codificados en líneas germinales y son adquiridos por selección natural durante el curso de la evolución (Hoffmann et al., 1999).

Los peces, los primeros de los verdaderos vertebrados, han desarrollado una inmunidad adaptativa similar a la que presentan los vertebrados superiores. Todos los

datos disponibles indican que el SIA fue establecido en los inicios de la evolución de los vertebrados, en el momento en que aparecen los peces cartilagosos. De esta manera, los genes que codifican los elementos claves del SIA, tales como las inmunoglobulinas (Litman et al., 1993), los receptores de las células T (Rast et al., 1997), los complejos mayores de histocompatibilidad clase I (Hashimoto et al., 1992) y clase II (Kasahara et al., 1992) y RAG (del inglés “*Recombinant active gen*”) (Greenhalgh & Steiner, 1995) han sido identificados en los peces cartilagosos y en los vertebrados superiores.

En los animales superiores se consideraba al SII como una reliquia evolutiva cuyas funciones habían sido ampliamente superadas por el advenimiento de la inmunidad adaptativa. Dos componentes importantes del SII activo son las células fagocíticas (como los neutrófilos y macrófagos) y las células natural *killer*. Los macrófagos y los neutrófilos pueden reconocer directamente a los patógenos por medio de la identificación de componentes estructurales como la manosa y LPS (Ulevitch & Tobias, 1999). Estos componentes estructurales se refieren a los PAMPs y son compartidos por un gran grupo de patógenos debido a que realizan funciones esenciales en los microorganismos (Janeway & Medzhitov, 1997). El reconocimiento de los PAMPs por receptores específicos que se encuentran sobre los fagocitos lleva a la absorción de los microorganismos así como a la activación de las células fagocíticas, resultando en la liberación de proteínas bactericidas y enzimas que se encuentran prealmacenadas en gránulos dentro de los neutrófilos y también a la liberación de quimoquinas y citoquinas a partir de los monocitos y macrófagos. Mientras que los fagocitos actúan para combatir patógenos que existen libremente en el torrente circulatorio o los tejidos, las células natural *killer* luchan contra los virus que han tomado las células como residencia por medio de la destrucción de las células infectadas del huésped (Biron, 1997).

Debido a la falta de capacidad del SII para reconocer específicamente a los patógenos y proveer una inmunidad específica, se desarrolla la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas y los macrófagos ingieren a los microorganismos y presentan los antígenos derivados de los mismos a los linfocitos T. Todo esto desencadena una expansión clonal de linfocitos T específicos para cada antígeno (Ulevitch et al., 2004). A su vez, las citoquinas y quimoquinas de las células T regulan

la proliferación de células B y la producción de anticuerpos, así como la actividad de las células del SII. Estas intercomunicaciones entre el SIA y el SII facilitan una respuesta inmune robusta y flexible. En las fases iniciales de la infección, las respuestas inflamatorias se derivan exclusivamente del SII, mientras que conforme avanza el proceso infeccioso, las respuestas inflamatorias surgen del efecto cooperativo entre ambos sistemas.

Tabla 1. Componentes principales del sistema inmune.

Inmunidad innata	Celular	Fagocitos: monocitos, macrófago, neutrófilos Células dendríticas Células natural killer
	Humoral	Complemento: <ul style="list-style-type: none"> • Vía de activación de las lectinas • Vía de activación clásica • Vía de activación alternativa Proteínas de Fase Aguda Citoquinas: por ej. Interferón Quimoquinas
Inmunidad adquirida	Celular	Linfocitos T y B (LT y LB)
	Humoral	Anticuerpos (secretados por LB o células de memoria)

La preponderancia del SIA sobre el SII, y viceversa, no está definida debido a que la intervención de ambos genera un proceso interactivo de reacciones que es la clave para una respuesta inmune automática, regulada, dinámica y sostenible. De esta manera, es imperativo definir que tanto el concepto de la inmunidad innata como la adquirida

implican la consideración de un sistema amplio y continuo que actúa sobre agentes extraños, y no dos sistemas diferentes totalmente independientes uno de otro.

Históricamente, en los mamíferos se ha puesto mucho más énfasis en el estudio de la inmunidad adaptativa que en la innata. Sin embargo, en los últimos años, se produjo un resurgimiento del interés sobre el SII con un nuevo punto de vista sobre el mismo, por lo cual, se están profundizando algunos conocimientos y alcanzando otros nuevos de esta forma de inmunidad (Carroll & Janeway, 1999; Dunkelberger & Song, 2010).

La convergencia de estudios desde diferentes enfoques ha revelado una marcada similitud en los mecanismos moleculares y las vías de traducción de señales de la inmunidad innata entre las diversas formas de vida, desde aquellos organismos en los cuales no existe inmunidad adaptativa (tales como insectos y plantas) hasta aquellos que poseen un SIA altamente desarrollado (Borregaard et al., 2000).

Una vez que un organismo patógeno ha cruzado las barreras físicas, o incluso antes, en el caso de patógenos de mucosas, se encontrarán con los componentes del SC. El inicio de la cascada del SC se produce cuando el patógeno es reconocido por los componentes iniciales de la cascada, algunas de cuyas proteínas pueden directamente identificar las características específicas de la superficie de las células bacterianas.

1.2.1 Sistema complemento

El SC se compone de una serie de elementos vitales de gran alcance y representa uno de los mayores mecanismos efectores del SII. La existencia de este mecanismo fue descubierto a fines del siglo XIX cuando se observó que la sangre poseía un efecto bactericida que desaparecía cuando se calentaba a 55 °C. Alrededor del 1900, Paul Erlich propuso un esquema para la inmunidad humoral en donde se identificó un componente inmune sensibilizador termoresistente del suero como “antibactericida” (anticuerpo) mientras que al factor termolábil se lo denominó “complemento” (Sunyer & Lambris, 1999). Esta denominación le fue adjudicada por la habilidad de “complementar” las propiedades antibacterianas de los anticuerpos en la fracción termoestable del suero. Actualmente se conoce que el SC es una compleja red de

proteínas plasmáticas y asociadas a membranas que pueden generar, con elevada eficiencia, una respuesta inflamatoria regulada y citolítica hacia organismos infecciosos (bacterias, virus y parásitos), tejidos dañados por agentes químicos, componentes neoplásicos y otros substratos identificados como “no propios” (Dunkelberger & Song, 2010).

Mucho tiempo después de su descubrimiento, el rol del SC en la inmunidad fue confinado a las respuestas inmunes innatas sin impacto en la respuesta inmune adaptativa. Posteriormente, se comprobó que la capacidad del SC no sólo interviene en el SII sino que también está involucrado en la biología de las células B y T y en las respuestas inmunes adaptativas. Como se discutirá durante el desarrollo de la Tesis, el SC es más que una primera línea de defensa.

El SC representa una parte importante del sistema inmune natural en los animales vertebrados e invertebrados (Song et al., 2000) que puede ser secuencialmente activado en una reacción en cascada realizada por numerosos pasos y por diferentes vías (Götze & Müller-Eberhard, 1976; Loos, 1982). La síntesis de las proteínas del SC se realiza principalmente en el hígado, y en los monocitos y macrófagos.

Durante el transcurso de la evolución, el SC obtuvo un grado suficiente de sofisticación, permitiéndole interactuar eficientemente con otros sistemas efectores de la inmunidad innata como también de la adaptativa (Nonaka & Yoshizaki, 2004). Brevemente, se puede mencionar que existen 3 vías de activación, la vía alternativa sería la más primitiva al no necesitar la presencia de anticuerpos en su activación, la vía de la lectina se cree que apareció más tarde, mientras que la más evolucionada sería la vía clásica, denominada así porque fue la primera que se descubrió (Morgan, 2008)

1.2.1.1 Activación del sistema complemento

En la activación del SC se pone en marcha una serie de reacciones consecutivas y en cascada, de forma tal que a partir de cada una de ellas se genera un producto activo que, además de determinar que la reacción consecutiva prosiga, puede tener diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo. Muchas actividades

biológicas dependientes del SC fueron asignados a proteínas específicas y a los productos de su activación. Por ejemplo, la lisis de la membrana celular, la primera actividad biológica identificada del C, resulta de la activación de las proteínas del mismo por varias proteólisis y subsecuentes ensamblajes de un complejo de multiproteínas que forman lesiones discretas en las membranas (Schmidt & Colten, 2000).

Como se mencionó previamente, el SC es activado por tres diferentes vías, hay quienes mencionan la existencia de una cuarta, la vía de ataque a la membrana (vía lítica) (Morgan, 2008). Sin embargo, esta última no es otra cosa que el resultado de la acción de las vías clásica y alternativa que activan la C5 convertasa y resultan en la producción de C5b, que conduce finalmente a la activación de la vía de ataque a la membrana. Alrededor de 1960 comenzaron a estar disponibles algunas técnicas de separación biológica que permitieron purificar y caracterizar la función de los componentes involucrados en la vía clásica dependiente de anticuerpos y las vías alternativas independiente de anticuerpos.

Un cierto número de reglas son aplicadas para mencionar al SC (Schevach, 2005). Los componentes de la vía clásica son designados en letras mayúsculas y seguido por un número (C1, C2, etc.). Los números se adjudican en orden de actividad, excepto para C4, que actúa antes que C2. Los componentes que actúan solamente en la vía alternativa son designados con letras mayúsculas. Las proteínas regulatorias son nombradas por sus propiedades (por ej. C4-proteína ligante) o si la función primaria es en la vía alternativa, por letras (por ej. Factor H). Los componentes o complejos de componentes que tienen actividad enzimática son designados con una barra sobre las letras mientras que los que han perdido esa capacidad se les agrega la letra i en minúscula (por ej. iC3b).

Las 3 vías se activan de manera independiente pero secuencialmente, o sea, la activación de uno de los componentes conduce a la activación del siguiente (Figura 1). La activación del SC a través de cualquiera de las 3 vías es llevada a cabo por la activación del C3, que es la proteína central del SC. La molécula C3 tiene la capacidad para interactuar con más de 20 proteínas, incluso algunas no pertenecientes al SC.

La activación de C3 en C3a y C3b es mediada por la proteína llamada C3 convertasa que es el producto de cualquiera de las tres vías de activación. C3 nativa no es una molécula funcional y todos los sitios de uniones para los ligandos están ocultos hasta que la molécula esté activada (principalmente en su forma C3b). La generación de C3 convertasa, ya sea por la vía alternativa o por la de las lectinas, eventualmente llevará al ensamblaje del complejo de ataque de membrana sobre la superficies de los microorganismos invasores (Lambris & Holers, 2000).

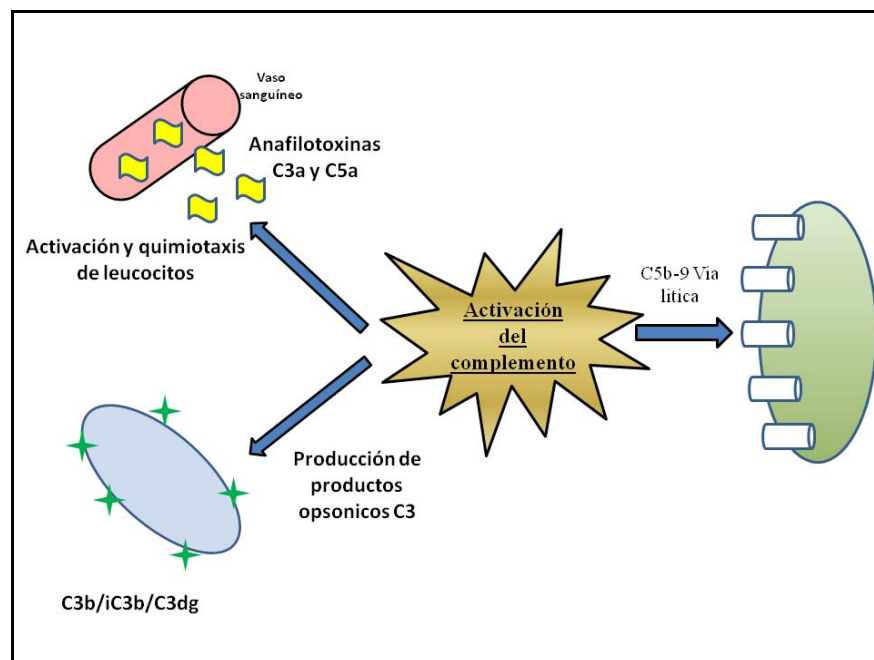


Figura 1. Principales acciones del sistema del complemento (SC). Los productos de la ruptura de C3 que se unen covalentemente a la superficie de las bacterias, aceleran el proceso de fagocitosis y la muerte del microorganismo. La vía lítica del SC forma un complejo con la capacidad para insertarse en la membrana del microorganismo y generar un poro para producir la lisis (Fujita, 2002).

La activación y la amplificación del SC hacen que sus fragmentos cubran de forma eficaz la superficie de las partículas como las bacterias y los inmunocomplejos. Los fagocitos y otras células tienen receptores para estos fragmentos del SC y, por tanto, son capaces de unirse a los objetivos, desencadenando la ingestión y la activación celular. La amplificación inherente del sistema asegura que las bacterias y otras

superficies de activación se cubran rápidamente con C3b y su producto de degradación iC3b (opsonización). Seguidamente, los fagocitos atraídos por los factores quimiotácticos derivados del complemento se activan para aumentar la expresión de los receptores para C3b e iC3b (CR1 y CR3, respectivamente), se unen a la partícula de activación y la ingieren para destruirla en el sistema de fagosomas (Lambris et al., 1993). Los elementos claves aquí son los fragmentos unidos a la superficie de C3 y la familia de los receptores de los fragmentos de C3, que una vez unidos, desencadenan una serie de respuestas biológicas (Lambris et al., 1988; Becherer et al., 1990).

Cuando C3 está activado, se expone un grupo éster muy reactivo que transforma a C3 en una proteína altamente funcional con la capacidad de unirse a material extraño (virus, bacterias, hongos), complejos de carbohidratos e inmunocomplejos (Sunyer & Lambris, 1999). Luego de la activación, los péptidos biológicamente activos C5a y C3a generan una número de efectos proinflamatorios tales como la quimiotaxis de leucocitos, la degranulación de células fagocíticas, mastocitos y basófilos, una leve contracción muscular y un aumento de la permeabilidad vascular (Köhl, 2001). En el caso del control de las infecciones virales mediado por el SC, el mismo no está restringido a la destrucción por el CAM de las células infectadas o viriones envueltos. La activación de alguna de las tres vías genera la producción de varias anafilotoxinas (C3a, C4a y C5a) y estas moléculas llevan al reclutamientos de anticuerpos, SC y leucocitos al sitio de la infección. Asimismo, la opsonización de las células infectadas por depósito de C3b podrían ser fagocitados por leucocitos (Favoreel et al., 2003). Además, la interacción de componentes del SC con la superficie de virus ha sido reportada por ser neutralizadora de ciertos virus (Ikeda et al., 1998; Kase et al., 1999).

Una vez producida la activación del C, todas reacciones subsiguientes se llevan a cabo por un *proceso multiplicador*, de tal forma, que aunque la activación comienza por un número limitado de moléculas, son muchos los factores con actividad biológica que aparecen en el curso de las reacciones. La acción de las moléculas puede ser local, en el sitio de su producción, pero también puede ejercerse a distancia por dispersión a otras zonas. El esquema general de las reacciones del SC en su conjunto es complejo (Figura 2).

En líneas generales, y por lo mencionado anteriormente, el SC, como parte de la inmunidad innata, puede ser capaz por si mismo de defender al hospedador contra la invasión de patógenos sin la participación de componentes de la inmunidad adaptativa.

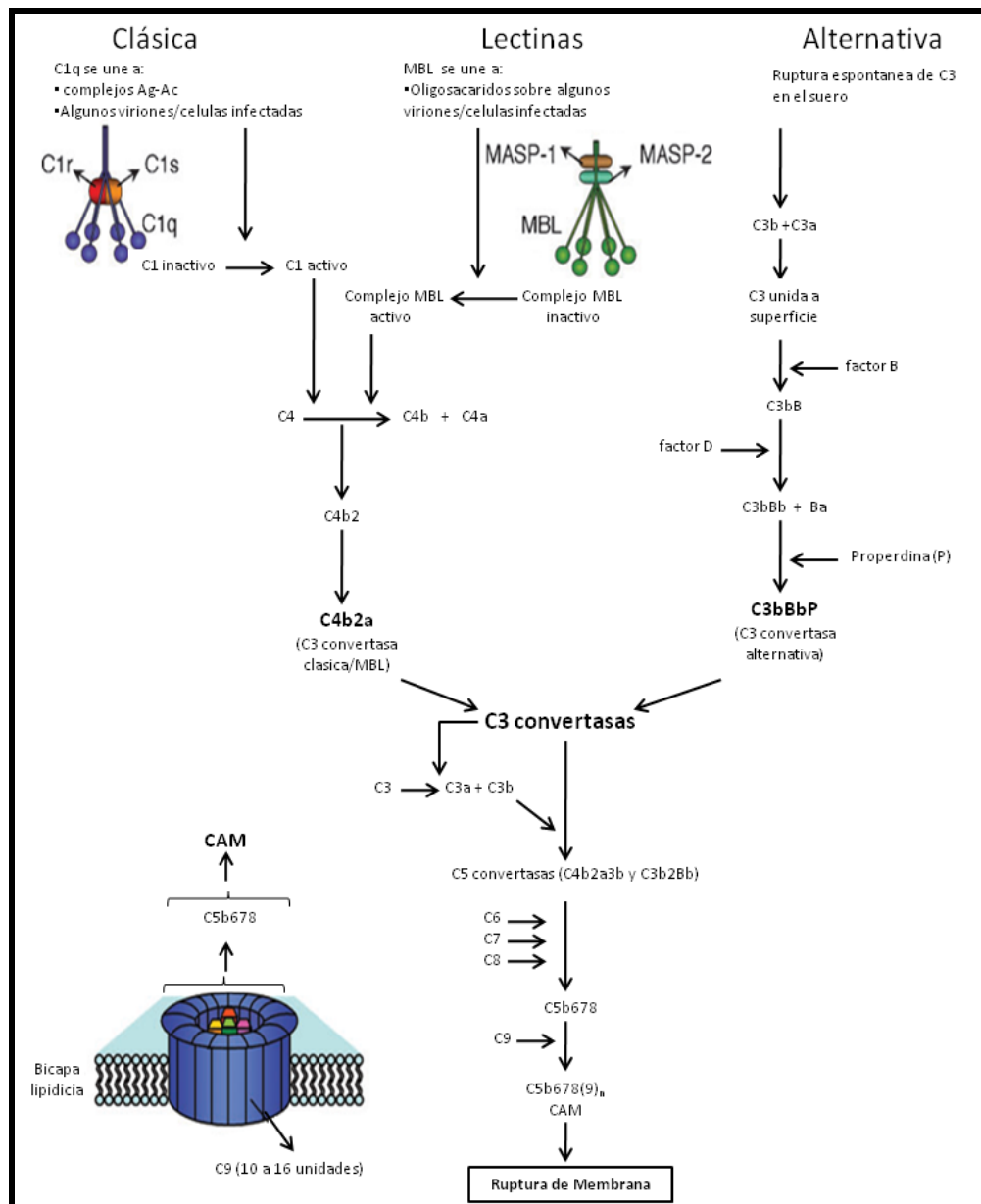


Figura 2. Esquema de la cascada sistema del complemento (SC), con el detalle de las tres vías de activación y de la vía efectora (Favoreel et al., 2003).

1.2.1.2 Vía clásica

La vía clásica (VC) de activación, denominada de esa manera porque fue la primera en ser descrita, se desencadena por la unión de un anticuerpo a un antígeno (Morgan, 2008). Se inicia con la unión de C1q (Loos, 1988), un subcomponente del primer componente del complemento (C1), a la región Fc de las inmunoglobulinas unidas a los antígenos (Kishore & Reid, 2000). La activación *in vivo* involucra la unión de C1q a agregados o complejos inmunes unidos a anticuerpos IgG o IgM. C1 es un gran complejo heterooligomérico (PM 800 KDa) que consiste en una sola molécula de C1q y dos de C1r y C1s asociadas no covalentemente en un complejo dependiente de Ca^{2+} (Ca^{2+} : $\text{C1r}^2\text{-C1s}^2$ unido a C1q). C1q no tiene actividad enzimática pero sufre cambios conformacionales por los agregados de IgG o de las moléculas multivalentes IgM, que es lo que inicia la activación de los otros componentes del complejo C1 (tiene sitios de unión de la región Fc de IgM e IgG). Debido a requerimientos estructurales, C1q no reconoce a estas Igs en forma soluble, con lo que se limita la activación indiscriminada de la cascada del C.

El siguiente componente que se activa en esta cadena es C4, que está formado por 3 cadenas unidas por puentes bisulfuros (α , β y γ) y da lugar a dos variantes isotípicas, C4a y C4b, que difieren solamente en seis aminoácidos que son causantes de la diferencia en las funciones. Cuando C1s desdobla el C4 en el plasma, libera los dos fragmentos, proceso en el cual expone un grupo tioéster que es crucial para la función de C4 y C3. En el C4 nativo, el grupo tioéster está inmerso dentro de un paquete hidrofóbico que lo hace no reactivo; es extremadamente lábil y muy propenso a ser inactivado por hidrólisis. El C4b unido a la membrana provee un receptor para el siguiente componente de la VC, C2. C4, en presencia de iones Mg^{2+} , permanece unido a C2a en la forma de complejo C4b2a, que va a actuar como la siguiente enzima en la VC.

C3 es el más abundante de los componentes del SC y es esencial para la actividad de las vías clásica y alternativa. Está compuesto por dos cadenas unidas por puentes bisulfuro (α y β) (Lambris, 1988). C3 se une no covalentemente a C2a en el complejo C4b2a y luego es desdoblado liberando los fragmentos C3a y C3b (un lábil tioéster).

Solamente C3b unido al complejo C4b2a seguirá con el siguiente paso además de cumplir con otros roles importantes como el de mediar en la activación de células fagocíticas. La enzima formada C4b2a3b es la C5 convertasa de la VC.

El siguiente componente, C5, está estructuralmente relacionado a C3 y C4 pero le falta un grupo tioéster. C5 se une no covalentemente a un sitio sobre C3b en la C4b2a3b convertasa y es presentada por el clivaje por C2a en el complejo. Este clivaje libera un pequeño fragmento C5a y expone un fragmento más grande C5b, un sitio lábil hidrofóbico de unión a superficie y un sitio para la unión de C6.

1.2.1.3 Vía alternativa

El SC puede ser directamente activado en respuesta al encuentro con algunos patógenos. Esta activación sólo puede ser alcanzada a través de la vía alternativa o de la vía de las lectinas. En cualquiera de los dos casos, la presencia de residuos de azúcares patógeno-específicos sobre la superficie de los microorganismos (por ej. Manosa) o la ausencia de residuos de galactosa y de ácido siálico, que normalmente “decoran” las glicoproteínas de los mamíferos, contribuyen a la activación del SC (Matshusita, 1996).

La vía alternativa (VA) provee una ruta rápida, independientemente de los anticuerpos, para la activación y amplificación del SC sobre superficies extrañas. El C3 es el componente clave de la VA pero también se requieren otras tres proteínas: factor B (fB), factor D (fD) y la properdina. El fB es una proteína plasmática muy relacionada a C2, se une con C3b en una unión dependiente de Mg^{2+} . La unión logra que fB sea susceptible al clivaje por fD (presente en el plasma en su forma activa), generando un fragmento Bb. El complejo C3bBb corresponde a la C3 convertasa de la VA. La properdina se une y estabiliza el complejo C3bBb prolongando tres o cuatro veces la vida media de la convertasa activa (Fearon et al., 1980).

La properdina es una glicoproteína básica formada por oligómeros, principalmente dímeros, trímeros y tetrámeros. La VA requiere iones Mg^{2+} para el ensamblaje del complejo C3bBb mientras que en la VC requiere iones Mg^{2+} para

ensamblar el complejo C4b2a y iones Ca^{2+} para ensamblar el complejo C1. Esto provee una de las maneras más útiles para distinguir las 2 vías en una muestra de suero.

Al igual que en la VC, el C3b unido actúa como un receptor esencial para C5, permitiendo el clivaje de C5 por Bb en un complejo adyacente C3bBb.

En algunos casos, la eliminación de ciertos microorganismos del género *Borrelia* puede activar 2 mecanismos del C, la VC y la VA (Kochi & Johnson, 1988). En ambos casos, la lisis posterior es inducida cuando el CAM altera la superficie de la membrana externa de la espiroqueta. Consecuentemente, la eficiencia de la muerte de algunos microorganismos por una vía de activación u otra, podría variar dependiendo del hospedador (Kuo et al., 2000).

1.2.1.4 Vía de las lectinas

Las estrategias primitivas de la inmunidad innata relacionadas a la vía de las lectinas se encuentran tanto en invertebrados como en vertebrados. La presión evolutiva ha permitido que las lectinas desarrollen una poderosa capacidad para activar el SC, eliminando efectivamente los patógenos del hospedador (Fujita, 2002). La identificación de varios componentes de la vía de las lectinas en ascidias provee nuevos puntos de vista en la investigación del SC, particularmente en términos evolutivos (Nonaka & Yoshizaki, 2004).

Esta vía de activación es uno de los descubrimientos recientes más destacados en la investigación del SC y representa una segunda ruta independiente de anticuerpos para la activación del SC sobre bacterias y otros microorganismos. En los animales, las lectinas solubles funcionan como armas contra los patógenos y el mecanismo de acción es por agregación y opsonización.

Las lectinas se definen simplemente como proteínas que se unen específicamente a los hidratos de carbono. La vía de las lectinas involucra el reconocimiento por receptores de patrones de reconocimiento tales como MBP (*mannose-binding protein* o también llamado MBL: *mannose-binding lectin*) y ficolinas, junto a la activación

subsecuente de enzimas únicas asociadas que son conocidas como serino proteasas asociadas a MBL (MASPs). MBL es una molécula del grupo de las colectinas (proteínas con colas de colágeno y dominios globulares de tipo lectina) (Morgan, 2008).

Esta proteína reconoce dominios carbohidratos (Dahl et al., 2001) en distintos microorganismos y, en el caso de las ficolinas, tienen la especificidad de unión al extremo con residuos N-acetyl glucosamina presente en las paredes celulares de las bacterias. Ambas, permiten unirse a ellos y tienen la capacidad de sustituir a C1q en la activación de C1r y C1s, pudiendo iniciar de esta forma la vía clásica. A su vez, las MASPs pueden sustituir a C1r y C1s en la activación de la vía clásica y aquí es donde surge la estrecha similitud con la VC.

Desde luego, las ficolinas han sido identificadas en seres humanos (Matsushita et al., 1996; Lu et al., 1996; Harumiya et al., 1996), roedores (Fujimori et al., 1998), cerdos (Ohashi & Erickson, 1997), erizos (Omori-Satoh et al., 2000) y ascidias (Kenjo et al., 2001).

MBL es una proteína muy similar a C1q y al igual que ella, es una colectina de seis cabezas que interactúa con dos MBL asociadas a serino-proteasas (MASP-1 y -2, estrechamente relacionado con C1s y C1r) para formar un complejo MBL. MBL se une a varios monosacáridos, a la manosa principalmente, y la estructura cuaternaria del complejo MBL permite la unión con alto grado de avidez a carbohidratos presentes en las superficies de muchos patógenos (Fujita, 2002). En las células de los vertebrados, sin embargo, estos hidratos de carbono son recubiertos por grupos de azúcares, especialmente ácido siálico, que inhiben la unión de MBL. Dicha unión, conduce a un cambio conformacional en el complejo que activa las proteasas asociadas y resulta en el clivaje de C4 (Sasaki et al., 2000; Hakozaki et al., 2002.).

1.2.1.5 Etapa terminal de la cascada del sistema complemento

La activación del complemento, independientemente de la vía, converge en la generación de tres vías efectoras amplias que sirven para que el SC cumpla su papel en la defensa del hospedador:

(A) Lisis directa de superficies por medio del ensamble CAM. El complejo de ataque a membrana involucra la asociación no covalente de C5b con los cuatro componentes terminales del SC para formar un complejo anfipático que se inserta en la membrana. Mientras C3b está unida a la convertasa, C5b se une a C6. Esta unión expone un sitio para que se una C7, que tiene una estructura homóloga a C6. El sitio hidrofóbico de unión en C5b67 le permite al complejo unirse fuertemente a la membrana (Figura 3).

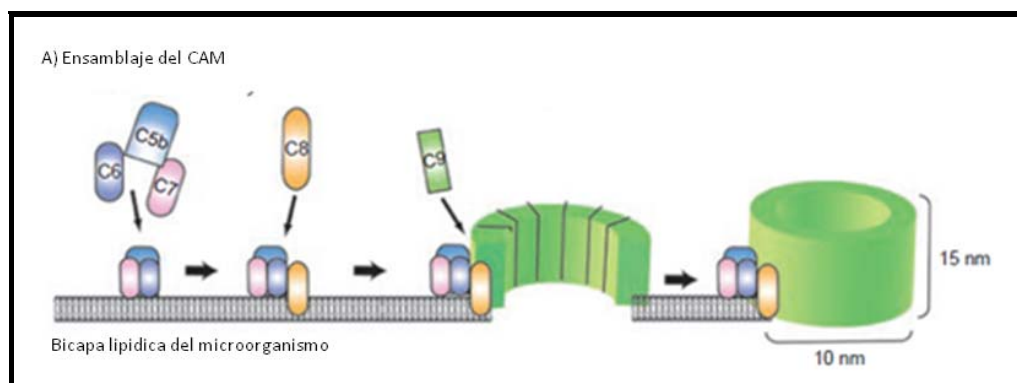


Figura 3. La activación del complemento y la generación de C5 convertasa lleva a la liberación de los productos de C5 que son las bases del ensamblaje del complejo de ataque a membranas (CAM) (Fujita, 2002).

El componente C8 es una molécula formada por 3 cadenas (α , β y γ). La cadena β se une a C7 en el complejo C5b67 y el complejo resultante C5b-8 comienza a penetrar más profundamente en la membrana y forma pequeños poros provocando unas pequeñas fugas de los componentes celulares citosólicos (Tamura, 1972). C9, es una cadena simple que se une al complejo C5b-8 y experimenta un importante cambio conformacional desde una forma globular hidrofílica a una alargada anfipática, que atraviesa la membrana e incrementa la permeabilidad (Morgan, 2008). Más moléculas de C9 son reclutadas hacia el complejo para formar un poro (CAM, complejo de ataque a la membrana) que puede causar la lisis de la célula diana (Figura 3).

La actividad lítica del CAM se caracteriza por un rápido aumento de Ca^{2+} , seguido por la pérdida de polaridad mitocondrial y de nucleótidos de adenina (por

ejemplo, ADP, ATP) (Cragg et al., 2000). Si la muerte celular es apoptótica o necrótica parece ser una función de la cantidad de C5b-9, y la fragmentación de ADN se ha detectado en tan sólo 30 minutos después del tratamiento con una dosis lítica del C, que ilustra el potencial destructivo de su vía terminal de activación (Esser, 1994; Cragg et al., 2000)

El montaje de CAM y la lisis específica son efectores vitales de las actividades antipatogénicas del SC pero, como fue mencionado oportunamente, algunos patógenos han desarrollado mecanismos de auto-protección que pueden limitar el potencial destructivo y permitir al patógeno, evitar la persecución (Frank, 2001).

(B) Alerta y preparación del sistema inmunológico por medio de la generación de potentes anafilotoxinas proinflamatorias. Es crucial para la activación del SC reclutar a otros componentes del sistema inmune a través de la generación de potentes moléculas proinflamatorias que sirven como una señal de alerta al sistema inmunológico en su conjunto y también como potentes quimiotácticos para ciertas clases de leucocitos. Las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a son moléculas proinflamatorias muy relacionadas en tamaño (aprox. 9 kDa), generadas como productos de la proteólisis de C3, C4 y C5. Las anafilotoxinas están evolutivamente relacionadas entre sí, y comparten un alto grado de homología, así como una superposición de funciones en la generación de la respuesta inmune (Sunyer et al., 2005) (Figura 4).

Las anafilotoxinas son moléculas potentes que incluyen una gran cantidad de actividades preinflamatorias, como por ejemplo, aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, reclutamiento de leucocitos, aumento de la quimiotaxis, migración y fagocitosis, así como de la producción y liberación de otros mediadores de la inflamación (por ejemplo, la histamina) (Wetsel, 1995; Haas & Strijp, 2007).

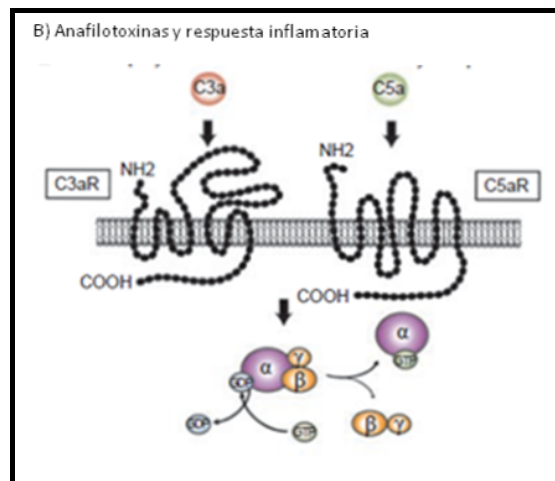


Figura 4. Las anafilotoxinas son potentes moléculas proinflamatorias generadas a partir del clivaje de C4, C3 y C5 en C4a, C3a y C5a, respectivamente. La unión de las anafilotoxinas a sus receptores genera la liberación de las señales (Fujita, 2002).

Las actividades de anafilotoxinas están confinadas por los tipos de células que expresan sus receptores, sobre todo las células de origen mieloide, incluyendo granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), monocitos / macrófagos, células cebadas, y algunos células dendríticas, aunque hay numerosos reportes de expresión de receptores en tipos de células no mieloides (Wetsel, 1995; Monk et al., 2007; Rabiet et al., 2007). La inactivación de las anafilotoxinas es un importante factor determinante de la duración y el alcance de sus funciones y representa un mecanismo alternativo para controlar la activación del C.

(C) Oponización de las superficies de los microorganismos por las opsoninas del sistema del complemento (C4b, C3b, C3bi). El tercero y último de los efectores de la cascada del SC activada para proteger al hospedador de la infección se encuentra en la capacidad de las células fagocíticas de reconocer, ingerir, y eliminar las células recubiertas con opsoninas generadas como resultado de la activación del SC (Figura 5).

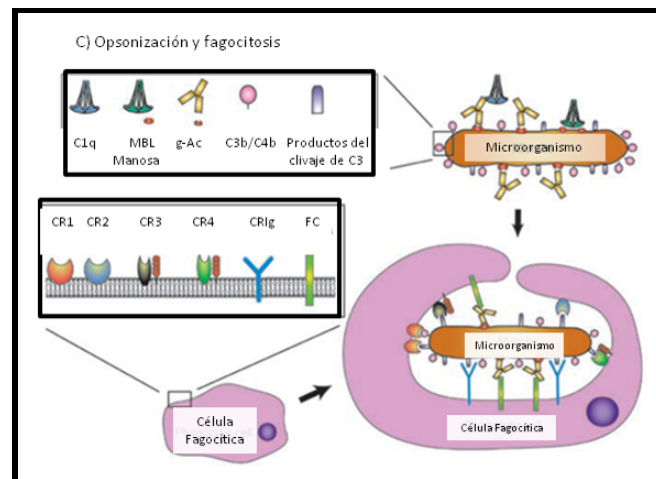


Figura 5. La generación de los fragmentos de C3b por las C3 convertasas de las tres vías de activación inicia la vía de opsonización del sistema del complemento comportándose como un importante efector para la eliminación de los microorganismos (Fujita, 2002).

El reconocimiento por parte de las células fagocíticas de fragmentos opsonínicos del C, incluyendo el fragmento proteolítico factor I generado de C3b (iC3b, C3c y C3dg), se lleva a cabo a través de tres familias de receptores, CR1 y CR2 (módulos cortos repetidos), CR3 y CR4 (miembros de la familia de las $\beta 2$ integrinas) y CR1g (miembro de la superfamilia de la inmunoglobulinas) (Ross & Medof, 1985).

CR1 (CD35) es un receptor multifuncional que se expresa en la mayoría de las células de sangre periférica y se une con alta afinidad a C4b y C3b, así como a iC3b, C3dg, C1q y MBP (Fearon, 1980). La unión de CR1 a fragmentos opsonina sirve para mediar en la liquidación de complejos inmunes, especialmente en eritrocitos, y para mediar en la fagocitosis por los neutrófilos y monocitos (Krych-Goldberg & Atkinson, 2001). Además, la interacción de CR1 con sus ligandos juega un papel mayor en la defensa del huésped contra la infección mediante la promoción de la secreción de moléculas proinflamatorias, tales como la interleuquina (IL)-1 α , IL-1 β y las prostaglandinas (Bacle et al., 1990). Por otra parte, CR1 desempeña un papel en la presentación de antígenos a las células B y es también un potente inhibidor tanto de la VC como de la VA de activación del C, descomponiendo las convertasas C3 y C5. CR2 (CD21) es estructuralmente similar a CR1 pero carece de varios dominios N-terminal

importantes para la unión de C3b/C4b, complementa las actividades de regulación y sólo se une a iC3b/C3d/C3dg (Molina et al., 1994). CR3 y CR4 son heterodímeros de transmembrana compuestos de una subunidad α -(CD11b o CD11c, respectivamente) y una cadena β común (CD18). Pertenecen a la familia de las integrinas y realizan funciones no sólo en la fagocitosis de las superficies opsonizadas, sino también en el tráfico de leucocitos, adhesión, migración, y la co-estimulación, que tienen consecuencias importantes en la defensa del huésped contra la invasión de patógenos (Ross, 2000). CrIg, es un receptor que se expresa en un subconjunto limitado de macrófagos residentes en un tejido, incluyendo las células de Kupffer en el hígado (Helmy et al., 2006). Puede representar un componente importante de la fagocitosis no sólo en el sistema retículo endotelial (en el cual las células de Kupffer son dominantes), sino también en otros tejidos macrófagos tales como el alveolar de los pulmones (van Lookeren Campagne et al., 2007).

Las tres vías terminales del SC trabajan en conjunto para proteger al hospedador de las invasiones patógenas comunes. Muchas de las funciones se llevan a cabo por medio de moléculas efectivas, que son capaces de actuar de inmediato y, por lo tanto, representan efectores importantes del sistema inmune innato (Dunkelberger & Wen-Chao, 2010).

1.2.1.6 Regulación del sistema del complemento

Debido al potencial destructivo que genera la activación del SC, todas sus acciones deben limitarse a efectos sobre las superficies de los patógenos. La generación de sus efectores está estrictamente regulada para evitar que se produzcan daños colaterales en los tejidos del hospedador. Por lo tanto, muchos pasos implicados en la activación del SC son regulados por inhibidores específicos, de modo que el sistema final represente un complejo equilibrio, una homeostasis entre la detección eficiente, la destrucción de patógenos y la minimización de daño tisular. El SC es rigurosamente controlado por proteínas presentes en el plasma y sobre las membranas celulares. La activación de este sistema es potencialmente peligrosa y por lo tanto debe ser cuidadosamente regulada. Las células normales están protegidas de la destrucción que

puede producir el SC por la actividad de sus proteínas reguladoras (Favoreel et al., 2003).

Se han descrito numerosas enfermedades que implican un SC sobreactivo (Morgan & Harris, 2003) y, a raíz de esto, se descubrieron varios inhibidores que actúan deteniendo ciertos pasos de la cascada. Esta regulación se produce en dos etapas dentro de las cascadas: a nivel de la convertasas, tanto en su formación como en su actividad enzimática, y durante el montaje del CAM (Figura 2) (Liszewski et al., 1996). Así, diversas proteínas reguladoras, plasmáticas y de membrana, controlan la cascada a diferentes niveles (Mollnes et al., 1988).

En el control de la vía clásica participan: C1-INH, factor J (López-Trascasa et al., 1989, Nicholson-Weller et al., 1991), C4b-BP, DAF (Lubin & Atkinson, 1989) y el factor I, en presencia de cualquiera de sus tres cofactores (C4b-BP, CR1 y MCP) (Seya & Atkinson, 1989). Varias de estas proteínas también modulan la vía alternativa: DAF, CR1 y el factor I con un cofactor diferente, el factor H, de acción opuesta a la properdina (Vik et al., 1989).

Por último, la formación del CAM es regulada por dos proteínas plasmáticas (S y SP-40) (Choi et al., 1989) y dos de membrana HRF/C8bp (Lachmann, 1990) y CD59 (Rollins & Sims, 1990). Estas últimas protegen del ataque lítico sólo si las proteínas del SC pertenecen a la misma especie, fenómeno conocido como restricción homóloga (Lachmann, 1991).

El propio CAM tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la formación de las convertasas (Bhakdi et al., 1988). Si bien la mayoría de microorganismos carecen de proteínas reguladoras de membrana que eviten la amplificación del C3b depositado sobre sus superficies, algunos han conseguido desarrollar proteínas antigénicas o genéticamente relacionadas con aquéllas, que les permite evadir la acción del SC (Cooper, 1991).

Un control posterior de las vías de activación es suministrado por fI, una serino-proteasa que, en presencia de cofactores esenciales, se unirá a C3b y C4b inactivando las convertasas (Vik et al., 1990). También CR1 es una proteína transmembrana que

inactiva la vía de activación de la convertasa causando la disociación, y actúa como un cofactor para la escisión por fl.

Una característica única de la VA es la existencia de una proteína que estabiliza el C3 y C5. La properdina (P) fue el primero de los componentes específicos de la VA en ser descubierto, se une a proteínas plasmáticas en la convertasa C3b e inhibe la descomposición espontánea y acelerada (Morgan, 2008).

El último nivel de control, necesario en situaciones en las que la activación del SC está fuera de control, intenta inhibir la formación del complejo lítico CAM (Turnberg & Botto, 2003). La vía de ataque a la membrana está estrechamente regulada por los inhibidores presentes en la fase fluida y en las membranas. El sitio de unión en la membrana hidrofóbica es el complejo C5b-7, la proteína S (vitronectina) y clusterina, proteínas que están presente en cantidades abundantes en el suero y que, entre sus muchas funciones, ayudan a regular la activación de SC (Lachmann, 1991).

Por lo tanto, un importante número de proteínas inhibitorias del SC sirve para controlar la activación en el hospedador y en la respuesta a la infección, limitando las actividades destructivas para minimizar el daño a los tejidos.

1.2.1.7 Evasión de los microorganismos al sistema complemento

La relación entre los microorganismos y el sistema inmune se basa en numerosas interacciones complejas. Algunos agentes infecciosos potencialmente patógenos viven como comensales en simbiosis con el hospedador y causan enfermedades sólo en determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando el sistema de defensa del hospedador disminuye considerablemente. Por otro lado, la discriminación entre lo propio y lo no propio juega un papel importante en la eliminación de una amplia gama de patógenos invasores e impide su difusión por el torrente sanguíneo a regiones distantes del lugar de ingreso inicial en el organismo.

La importancia del SC en la defensa del hospedador y el control de la infección como un todo, puede ser apreciada por las consecuencias observadas cuando las

funciones del SC se ven afectadas como resultado de deficiencias genéticas, interferencia de patógenos, o de otro tipo de mecanismos. Como se mencionó anteriormente, los animales deficientes en componentes o funcionalidad del SC tienen una variedad de fenotipos relacionados con deficiencias en la defensa del hospedador incluyendo una mayor susceptibilidad a la infección, deterioro de la respuesta de las células T y B, reducción de la actividad fagocítica, y de la capacidad para desactivar patógenos y otros complejos inmunes, entre muchas otras.

Teniendo en cuenta que el SC ha co-evolucionado con patógenos durante millones de años, no es sorprendente que estos desarrollaran mecanismos para inhibir la activación de este importante componente de la inmunidad innata y, de esa manera, aumentar la supervivencia y replicación en el hospedador. Existen muchas estrategias de virulencia utilizadas por bacterias y virus que evitan el reconocimiento o amortiguan la activación del sistema inmune a través de interacciones sofisticadas con las respuestas del hospedador (Hornef et al., 2002). Una estrategia consiste en camuflar la superficie del microorganismo o de la célula infectada de manera tal que no sea reconocida por los mecanismos de vigilancia. Otra estrategia puede ser la de amortiguar la respuesta inmune de manera tal de evitar que se desencadene integralmente (Finlay & McFadden, 2006). La antigenicidad de sus proteínas de superficie varía por medio de una diversidad de mecanismos que impide que el hospedador genere una respuesta inmune eficaz (Kotwal & Kulkarni, 2007). El éxito de cada patógeno es directamente dependiente de su habilidad para modular una respuesta anti-inmune efectiva dentro de un hospedador infectado, que puede provocar una enfermedad aguda, una infección crónica o la eliminación del patógeno.

Prácticamente todos los agentes patógenos que pueden infectar local o sistémicamente al hospedador, aplican al menos uno de los múltiples mecanismos que pueden ejecutar para evadir el reconocimiento o la erradicación, pero los estudios indican que por lo general utilizan varios de estos a la vez (Hilleman, 2004). La cascada del SC está bajo control estricto por las proteínas reguladores del hospedador y uno de los mecanismos que los microorganismos patógenos utilizan es el de actuar sobre algunas de ellas como sistema de defensa anticomplemento (Blom, 2004). La mayoría de los reportes, sin embargo, se han ocupado de la absorción de los reguladores del SC

en la fase fluida, como el factor H, FHL-1, la proteína de unión C4b (C4BP), que inhiben el control y la activación del SC directamente en la superficie del patógeno. Estos reguladores son utilizados para la evasión del SC por todos los grupos principales de patógenos, no sólo las bacterias, sino también los virus (Stoiber et al., 1996), hongos (Merino et al., 2004) y parásitos (Díaz et al., 1997).

La evolución ha obligado a varios virus a desarrollar mecanismos curiosamente ingeniosos y diversos para evitar o retardar la destrucción a causa de la respuesta inmune. El SC, de indiscutida importancia durante la respuesta inmune adaptativa y que evolucionó originalmente como parte de un sistema inmune más antiguo (SII), puede colaborar en la eliminación de una infección causada por virus de diversas formas. Las componentes del SC, junto a sus sofisticados y regulados pasos de activación y represión, pueden ser interferidos por alguna de las diversas proteínas codificadas por el virus, alterando así su activación (Favoreel et al., 2003). En otros casos, varios virus interactúan con el SC para mediar el ingreso.

Algunas proteínas que actúan como receptores virales están implicadas en la regulación del SC (por ejemplo, CD46, para virus del sarampión; CD55, de los picornavirus y CR 2, del virus del Ebola), mientras que la opsonización mediada por C3b del virus de inmunodeficiencia humana, facilita su ingreso (Stoiber et al., 2001).

Las interacciones de varios componentes entre los virus y la cascada del SC (y otras respuestas inmunes) establecidas en el tiempo, no sólo aportan una visión de cómo la evolución dio forma a los virus para adaptarse a los mecanismos de defensa del hospedador, y viceversa, sino que también ayuda en la comprensión de la compleja interacción entre los diferentes componentes del sistema inmunológico (Favoreel et al., 2003).

1.2.1.8 Sistema del complemento en animales ectotermos

Todos los animales, desde los protozoos hasta los humanos, resolvieron el riesgo de extinción involucrando estrategias de defensa inmune que aseguran la capacidad de reaccionar contra moléculas y microorganismos ajenos, para contrarrestar cualquier

intento de alteración del equilibrio homeostático (Cooper, 2002). El SI en los vertebrados es una red compleja de células y moléculas circulantes, de tejidos y de órganos. Todos los organismos multicelulares tienen algún tipo de inmunidad innata, que va desde pequeños péptidos antimicrobianos hasta grandes células fagocíticas (Medzhitov & Janeway, 2000). Como consecuencia de los hallazgos obtenidos de la investigación molecular, el origen evolutivo del SC demostró que es más antiguo que lo que se conocía (Nonaka & Kimura, 2006) y que emergió hace al menos 600-700 millones de años, mucho tiempo antes de la aparición de las inmunoglobulinas (Sunyer et al., 1998).

Algunos componentes del SC (C3, factor B y la MASP-1) fueron descritos en especies de invertebrados deuterostomas, los antecesores de todas las especies de vertebrados, tales como equinodermos, *Styela plicata* (Smith, 1997; Al-Sharif et al., 1998; Courtney Smith et al., 2001), y tunicados (Ji et al., 1997, Courtney Smith et al., 2001). Estos hallazgos confirmaron que dichos organismos poseen un SC simple y con menos componentes que los vertebrados superiores.

Los estudios evolutivos revelaron que las tres vías de activación del SC y la vía terminal están presentes en los peces cartilaginosos (tiburones, por ejemplo) y los vertebrados superiores; mientras que la VC y la terminal, no se detectaron en los vertebrados más primitivos existentes, como las agnatos (peces sin mandíbula) (Sunyer et al., 1998; Nonaka, 2001). El SC de los vertebrados ectotermos muestra una mayor diversidad y actividad que en formas superiores de vida (Sunyer et al., 1998). Por ejemplo, la vía alternativa en los peces es hasta diez veces más activa en comparación con los vertebrados superiores, por lo que pueden ofrecer una especie de compensación por la falta de inmunidad adaptativa (Koppenheffer, 1987; Sunyer & Tort, 1995).

La detección de C3 y de moléculas del factor B en los erizos de mar (equinoideos) sugiere que la VA es, al menos, tan antigua como la vía de las lectinas presente en los tunicados (Ji et al., 1997). Esto, sumado al descubrimiento de la homología de las proteínas C3 identificadas en estas especies, permite concluir que las mismas comparten numerosas características con los vertebrados (Nair et al., 2000). Además, la presencia

de las moléculas MASP en lampreas, tiburones y en anfibios demuestra que la vía de las lectinas también estaría presente en todas las especies (Matsushita et al., 1998).

El componente factor D de la VA se ha encontrado sólo en los peces óseos y en los organismos superiores evolucionados. Los únicos miembros conocidos de los reguladores de la activación del SC (RAC) que se encuentran en los vertebrados inferiores, como los peces teleósteos, son el factor H y proteínas SBp1 y SBCRP-1 (Krushkal et al., 2000). Los componentes terminales del SC C5b, C6, C7, C8a, C8B, C9 y homólogos están presentes en los peces óseos y en formas superiores de vida, pero no se detectaron en los peces más antiguos.

En las especies de ascidias estudiadas, no se encontraron los componentes C2 o C4, pero sí moléculas de C3 y homólogos de MASP, aunque todavía no se llevó a cabo ningún estudio funcional para demostrar la actividad de C3 de estos homólogos (Sunyer et al., 1998).

Por último, se seportaron MBL en invertebrados como el protocordado *Clavelina picta* (Vasta et al., 1999), el tunicado *Styela plicata* (Nair et al., 2000) y en insectos, como la cucaracha *Blaberus discoidalis* (Wilson et al., 1999). En conclusión, estos hallazgos proporcionan evidencia de que la vía de las lectinas del SC habría estado presente antes de la aparición de los vertebrados en la evolución (Zarkadis et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, el SC en los peces estudiados y otros poiquiloterms parece proporcionar una rápida, fuerte y variada capacidad inmune innata que es fundamental para la supervivencia de estas especies, con una característica importante, que se puede activar a temperaturas muy bajas. La actividad de la VA es cinco a diez veces mayor en los peces que en los vertebrados superiores (Sakai, 1992; Sunyer & Tort, 1995). Esta combinación de la diversidad, el alto título y la actividad a bajas temperaturas genera una expansión en la capacidad de reconocimiento del SII y se comporta como uno de los mecanismos inmunes más eficientes en estos animales (Sunyer et al., 1998).

Algunos estudios demostraron que el SC de los peces y otros vertebrados poiquiloterms es estructural y funcionalmente más diverso que el de los vertebrados

superiores debido a que contiene componentes con múltiples isoformas. Como se mencionó, las especies poiquilothermas, que comprenden desde los teleósteos hasta los reptiles, parecen tener un SC desde un punto de vista estructural, tan desarrollado como el de los vertebrados homeotermos (Zarkadis et al., 2001). De la misma manera, algunos estudios reportaron la presencia del SC en una variedad de reptiles (Koppenheffer, 1986). Merchant et al. (2005c) detectó la VA del SC en la sangre del alligator americano *Alligator mississippiensis* y, por otro lado, Merchant & Britton (2006) reportaron resultados similares en cocodrilos de agua dulce (*Crocodylus johnstoni*) y de agua salada (*Cr. porosus*).

A pesar de la existencia de estos conocimientos, la información sobre el funcionamiento del sistema inmune en vertebrados no mamíferos es muy inferior a la de los mamíferos (Zimmerman et al., 2010). Considerando las numerosas enfermedades provocadas por infecciones y la necesidad de nuevos y efectivos antibióticos para combatirlos, el estudio del SC y su papel en la defensa del hospedador tendría implicancias clínicas importantes.

La importancia del conocimiento del sistema inmune desde diferentes posiciones filogenéticas es trascendental para entender la evolución de dicho sistema y la relación con otros factores. La profundización de tales conocimientos podría ser útil, mediante el aprovechamiento de los recursos naturales de una manera diferencial o alternativa, para la producción de fármacos, la generación de modelos biológicos, producción de suplementos alimenticios y la aplicación de recursos para evitar o solucionar problemas con el medio ambiente.

1.3 Dipeptidil peptidasa IV plasmática

Las peptidasas de membrana son un grupo de ectoenzimas que poseen una amplia gama de funciones. Su importancia en el metabolismo de las proteínas ha sido bien documentada, especialmente en la degradación de péptidos y la recolección de residuos de aminoácidos (Scharpé & De Meester, 2001). Dipeptidil peptidasa IV (CD26/DPPIV) puede considerarse una proteína multifuncional, debido a que ejerce funciones diferentes según su localización: celular o intracelular (principalmente en la membrana

de las células) o extracelular (isoforma enzimáticamente activa en el plasma) (Boonacker & Van Noorden, 2003). DPPIV fue descubierta por primera vez en el hígado y el riñón de ratas (Hopsu-Havu & Glenner, 1966) y, posteriormente, fue encontrada en las glándulas salivales humanas (Oya et al., 1972), en el intestino delgado del cerdo (Svensson et al., 1978), en el suero humano (Hino et al., 1975) y en las células de sangre periférica humana (Lojda, 1977). La expresión *in vivo* de DPPIV en las células epiteliales, endoteliales y linfoides es compatible con su papel como regulador fisiológico de una serie de péptidos que actúan como reporteros bioquímicos, entre y dentro, de los sistemas inmune y neuroendocrino (Ludwig et al., 2002).

DPPIV, que es idéntica a la glicoproteína de superficie CD26 de los linfocitos, es la única entre estas peptidasas con capacidad para liberar dipéptidos Xaa-Pro y, con menor eficiencia, Xaa-Ala de los grupos N-terminal de péptidos reguladores (Boonacker et al., 2002). Desempeña un rol importante en la función inmune como una molécula co-estimuladora en la activación de células T y como regulador de los efectos funcionales de determinados factores biológicos. Su funcionalidad enzimática como proteasa ha sido bien caracterizada y se relaciona con la actividad de muchos péptidos bioactivos; por tal motivo, es que han sido identificados por lo menos 62 sustratos naturales (Chen, 2006). Estos sustratos incluyen neuropéptidos, hormonas péptido-circulantes como el péptido YY, el factor liberador de la hormona de crecimiento, los péptidos del tipo glucagón (GLP) -1 y -2, polipéptido inhibitorio gástrico, quimoquinas paracrina (regulan la activación normal de las células T, la expresión y la segregación), el factor derivado de células del estroma, así como eotaxina y quimoquinas derivadas de macrófagos (Mentlein, 1999; Gorrell, 2005), entre otros.

En base a las múltiples funciones, DPPIV se ha propuesto como un marcador para el diagnóstico o pronóstico de diversos tumores, neoplasias hematológicas, infecciones virales, así como desórdenes inmunológicos, inflamatorios y psico-neuroendocrinos (Lambeir et al., 2003).

Pocos estudios se han centrado en la detección de DPPIV en reptiles y la mayoría de ellos se limitan a las serpientes. La actividad de la enzima fue examinada en venenos de ofidios de 59 taxones según la distribución taxonómica (Aird, 2008), y en las

glándulas del veneno se investigó la especificidad de sustrato, la susceptibilidad a los inhibidores y el pH óptimo de la actividad de la enzima parcialmente purificada, (Ogawaa et al., 2006). Asimismo, la variación estacional de la actividad peptidasa se estudió en el tracto reproductivo de *Crotalus durissus terrificus* (en semen extraído del ducto deferente y en útero) (Marinho et al., 2009). Recientemente, un trabajo en cocodrilianos reportó y caracterizó las actividades de DPPIV en el plasma y sangre de *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2009b). Los valores hallados en este estudio fueron superiores a los reportados para otros animales y seres humanos, por lo que podría ser otra característica indicativa del eficiente sistema inmunológico que poseen los cocodrilianos.

1.4 Fosfolipasa A2 plasmática

Las células del sistema inmune innato pueden reconocer patógenos mediante una serie de receptores extracelulares e intracelulares, tales como los receptores para Fc, receptores de manosa y TLR. El reconocimiento de estos patógenos conduce a la síntesis de mediadores lipídicos de la inflamación conocidos bajo el nombre colectivo de eicosanoides. Estos derivan del ácido araquidónico (AA), un ácido graso ω -6 poliinsaturado que los mamíferos pueden incorporar directamente a través la dieta o sintetizar a partir de ácido linoleico. El AA no se halla nunca en forma libre, sino esterificando la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos de membrana. Por ello, antes de que se produzca la síntesis de eicosanoides, el AA tiene que ser liberado de los fosfolípidos. Las enzimas involucradas en tal liberación son las fosfolipasas A2 (PLA2) (Figura 6) (Astudillo et al., 2009), por lo tanto, las PLA2 catalizan la hidrólisis de los glicerofosfolípidos, generando un ácido graso libre y un lisofosfolípido siendo la fuente principal de liberación del AA durante la estimulación celular (Kudo & Murakami, 2002).

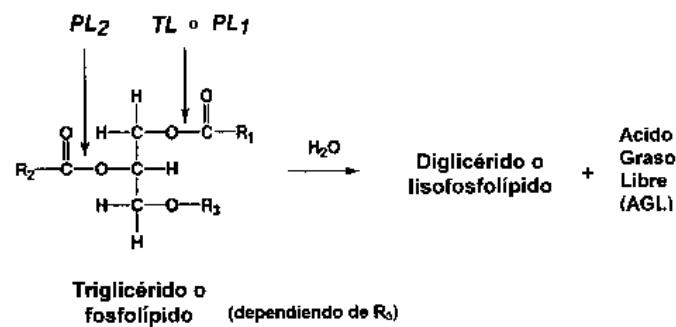


Figura 6. Esquema de la hidrólisis producida por las fosfolipasas A1 y A2.

El AA libre es el precursor de los eicosanoides, que incluyen las prostaglandinas, generados a través de reacciones catalizadas por ciclooxigenasa, y de los leucotrienos y lipoxinas, generados a través de reacciones catalizadas por la lipoxigenasa (Funk, 2001). Además, la reacción PLA2 genera un precursor del factor activante de plaquetas (PAF) cuando el producto lisofosfolípido posee un grupo colina como cabeza de grupo y un enlace alquilo en la posición *sn*-1. Por lo tanto, PLA2 son enzimas importantes que intervienen en la señalización, debido a que regulan la generación de diferentes tipos de mensajeros lipídicos secundarios que poseen roles significativos en las respuesta inmune innata. A su vez, la inhibición directa de la PLA2 tendría un potencial efecto bloqueante de las múltiples vías que generan lípidos como mensajeros. Las enzimas PLA2 han sido sistemáticamente clasificadas en varios tipos de grupos según su estructura primaria y, la mayoría de ellos, contienen subgrupos (Schaloske & Dennis, 2006; Burke & Dennis, 2009)

La familia PLA2 secretora (sPLA2), en la cual han sido identificadas 10 isoenzimas, son de bajo peso molecular, dependiente de Ca^{2+} y están implicadas en una serie de procesos biológicos, como la modificación de la generación de eicosanoides, la inflamación y defensa del hospedador. La familia PLA2 citosólica (cPLA2) se compone de tres enzimas y dentro de este grupo se encuentra cPLA2 α a la que se le ha puesto mayor atención por haber sido identificada como un componente esencial de la iniciación del metabolismo del AA (Ghosh et al., 2006; Kita et al., 2006). La activación de cPLA2 α (cPLA2 IVA) está estrechamente regulada por Ca^{2+} y por la fosforilación.

Aunque las rutas mensajeras que median la producción de eicosanoides por las células involucradas en inmunidad innata no están bien caracterizadas, se ha demostrado de modo concluyente que cPLA2 α es fundamental en este proceso y que, dependiendo del tipo celular y de las condiciones de estimulación, existen mecanismos reguladores de “cross-talk” entre la cPLA2 α y otras enzimas con actividad PLA2 presentes en las células (Astudillo et al., 2009). El grupo de PLA2 Ca²⁺ independiente (iPLA2) contiene dos enzimas que pueden desempeñar un papel importante en la remodelación de los fosfolípidos. Por último, el factor activador de plaquetas (FAP) acetilhidrolasa (FAP-AH) consta de cuatro enzimas que exhiben especificidad de sustrato hacia la FAP y/o fosfolípidos oxidados (Six & Dennis, 2000; Kudo & Murakami, 2002). Cada uno de estos grupos ha sido implicado en diversos tipos de metabolismo de los lípidos y en la progresión de la enfermedades; por lo que es de interés en la industria farmacéutica y la biotecnología en el desarrollo de inhibidores selectivos y potentes de cada uno de estos tipos (Burke & Dennis, 2009).

Sobre la base de sus estructuras y propiedades enzimáticas, está centrada la comprensión general de las posibles funciones regulatorias de cada isoenzima (Murakami et al., 1997). Un número de agentes que ejercen efectos sobre los receptores celulares del SII emite una serie de señales que conducen a un aumento de la actividad de PLA2. El esclarecimiento de estas señales está siendo objeto de estudios de los últimos 20 años (Astudillo et al., 2009).

Las PLA2 están ampliamente distribuidas en los tejidos animales y fluidos corporales, y han demostrado tener un papel importante en la inflamación y las enfermedades inflamatorias (Nevalainen et al., 2000; Six & Dennis, 2000), y en la efectividad para matar bacterias *in vitro* (Koduri et al., 2002) e *in vivo* (Laine et al., 1999).

PLA2 es un componente tóxico detectado y caracterizado en venenos de reptiles, que incluyen a la mayoría de las serpientes venenosas (Kini, 2003), a los lagartos del género *Heloderma* (Vandermeers et al., 1991) y a los de la familia Varanidae (Fry et al., 2006). A su vez, la presencia de PLA2 en los cocodrilianos ha comenzado a estudiarse recientemente. Merchant et al. (2009a) en *A. mississippiensis*, y Nevalainen et al. (2009)

en *Cr. siamensis*, *Cr. porosus* y *Cr. siamensis* híbridos con *Cr. porosus*, evaluaron la actividad de PLA2 en el suero de estos animales pero hasta el momento, no se ha comprobado la actividad de dicha enzima en los caimanes.

1.5 Generalidades del orden Crocodylia

La clase Reptilia está compuesta por 4 órdenes: Chelonia, Crocodylia, Rhynoncephalia y Squamata. Están presentes desde la Era Mesozoica, a la que también llamaron la “Era de los Reptiles”, donde existían 17 órdenes. Los miembros de esta clase se fueron modificando, reduciendo, e incluso desapareciendo, hasta llegar a la actualidad. Estos evolucionaron a partir de los anfibios y con los cuales comparten ciertas características morfológicas. Una de las diferencias fundamentales entre los reptiles primitivos y los ancestros anfibios, parece estar en su estrategia reproductiva: los anfibios producen huevos anamnióticos y los reptiles producen huevos amnióticos. Otras diferencias se observan en ciertas características morfológicas y fisiológicas, como por ejemplo: la tasa metabólica o la permeabilidad de los tegumentos.

Los reptiles son los únicos ectotermos amniotas por lo tanto los convierte en un grupo central de estudio para proveer conocimientos importantes sobre la evolución del sistema inmune como el funcionamiento del sistema en un contexto ecológico. Al ser animales ectotermos no pueden regular su temperatura interna, y se someten a fuertes cambios estacionales en el comportamiento asociados a temperaturas ambientales. Esto implica que el metabolismo es dependiente de la temperatura por lo que existe una relación directa entre la temperatura y la actividad. En este trabajo de tesis, y debido a la importancia que posee la temperatura en el comportamiento y en la fisiología de estos animales, se la desarrolló con mayor profundidad.

1.5.1 Ectotermia

Los animales buscan ambientes con temperaturas adecuadas o bien crean ambientes internos adecuados y el mantenimiento de una temperatura corporal constante

depende del equilibrio entre la ganancia y la pérdida de calor. Las dos fuentes primarias de ganancia de calor son la energía radiante del sol y el metabolismo celular. Los términos endotermo y ectotermo hacen referencia a la fuente generadora de calor de un animal. Los mamíferos, las aves y muy pocas especies de reptiles, peces e insectos son endotermos. En ellos, la fuente principal de producción de calor es interna, y se debe principalmente al alto metabolismo oxidativo. En cambio, la mayoría de los reptiles son poiquilotermos o ectotermos, es decir carecen de la capacidad para regular la producción sostenida de calor metabólico, y por ende, una temperatura corporal constante. Debido a esto, su temperatura interna tiene una relación directa con la temperatura del medio, dependiendo prácticamente así de una fuente de calor externo. Las divisiones entre endotermia y ectotermia -o entre homeotermia y poiquilotermia- representan extremos ideales y que rara vez se encuentran en la naturaleza.

El concepto de que la temperatura es un factor fundamental en la ecología de muchos reptiles, comenzó a desarrollarse desde hace mucho hasta que un tiempo más tarde se llegó a la demostración de que los patrones de actividad general de los reptiles puede ser predeterminado desde modelos físicos a partir de modelos biofísicos de calor y de intercambio de masa (Huey, 1982). La temperatura es uno de los más importantes factores ambientales que pueden inducir una variación fenotípica en los vertebrados ectotermos (Deeming, 2004).

Los ectotermos intercambian calor con el ambiente por medio de mecanismos físicos (radiación, convección, y conducción) mientras que el calor producido por “digestión” metabólica de las sustancias ricas en energía obtenida del alimento es despreciable. La disponibilidad de recursos, el clima, el riesgo de predación y la influencia social para adquirir “energía” por los individuos explica los patrones de distribución observados en las poblaciones naturales (Angilleta, 2001).

No es sorprendente que la temperatura ambiental sea mencionada como una de las causas en los rangos de distribución geográfica de los ectotermos. Por lo tanto es posible que los animales respondan a cambios en las condiciones ambientales por la modificación de características bioquímicas (Siroski et al., 2010) en los casos donde no se pueda mantener la temperatura corporal estable. Dicho comportamiento fenotípico

adaptativo se suele llamar “aclimatización” y han sido descritos tanto en vertebrados como en invertebrados (Wilson & Franklin, 1999; Guderley et al., 2001).

La temperatura es una variable ambiental que tiene un papel fundamental en la historia de vida de los cocodrilianos debido a que interviene en la determinación del sexo (Ferguson & Joanen, 1983; Webb et al., 1987; Campos, 1983; Piña et al., 2003), el crecimiento embrionario (Joanen et al., 1987, Iugman et al., 2008), el patrón de termorregulación (Lang, 1987; Merchant et al., 2007), entre otras características biológicas. En la regulación de la temperatura intervienen directamente el estado nutricional, la edad, las infecciones y las relaciones sociales (Lang, 1985). Dicha regulación de la temperatura corporal juega un rol muy importante asegurando que los procesos celulares y bioquímicos puedan llevarse a cabo con una tasa metabólica muy cercana a la óptima para cada especie (Feder et al., 2000, Siroski et al., 2010; 2011).

El efecto de la temperatura ambiental sobre la inmunidad específica ha sido demostrado (Rijkers et al., 1980; Miller & Clem, 1984) como también, que la inmunidad innata es más resistente a cambios en la temperatura ambiental (Le Morvan et al., 1998). Le Morvan et al. (1997) indicaron que la inmunidad innata tiende a reemplazar a la inmunidad específica a bajas temperaturas pero sin embargo existen otros estudios donde demuestran que el efecto de la temperatura ambiental es del mismo orden sobre ambas (Nikoskelainen et al., 2004).

Lo anteriormente expuesto, demuestra la relación directa entre casi todas las funciones orgánicas de los reptiles con la temperatura, y sobre todo, la importante influencia dinámica sobre el sistema inmune de los reptiles. De esta manera, la estructura y actividad funcional de los reptiles está ampliamente modulada por el medio ambiente.

1.6 Descripción de la especie, situación poblacional y actividades de uso sustentable del género Caiman en Argentina

Los cocodrilianos son considerados uno de los grupos que han sobrevivido con relativamente pequeños cambios evolutivos, debido a que mantuvieron las mismas

características morfológicas durante millones de años. El orden Crocodylia posee 23 especies que están divididas en 3 familias: Alligatoridae, Crocodylidae y Gavialidae. De todas estas especies 10 se encuentran en Latinoamérica, incluidas en cuatro géneros: *Caiman*, *Crocodylus*, *Melanosuchus* y *Paleosuchus* (Ross, 1998). Dos especies del género *Caiman* (familia Alligatoridae) están presentes en la República Argentina, *Caiman latirostris* (yacaré overo o ñato) y *Caiman yacare* (yacaré negro), aunque en tiempos geológicos, en la región litoral han existido otras especies (Medem, 1983). Ambas se pueden diferenciar con facilidad basándose en las estructuras craneanas y escutelares (Medem, 1983) entre otras características morfológicas y comportamentales (Figura 7).



Figura 7. Yacaré negro, *Caiman yacare* (izquierda) y yacaré overo, *Caiman latirostris* (derecha).

En el pasado la explotación de diversas especies de cocodrilianos representó una actividad económica relevante en algunas regiones del mundo, y debido a la extracción desmedida a la que fueron sometidos, muchas de ellas se vieron en serio peligro. Las especies argentinas también se aprovecharon comercialmente, generando preocupación en el ámbito local e internacional (Waller & Micucci, 1993). Desde principios del siglo XX, hubo una utilización diferencial entre estas especies de caimanes, ya que debido a la mayor osificación de los osteodermos que posee el *C. yacare*, la más buscada fue el *C. latirostris*, en función de su mayor calidad marroquinera, y por ende, valor económico superior. Es por este motivo, y por haber tenido una presión de caza mayor

debido a la calidad de su piel, que siempre se ha reportado que las poblaciones de *C. latirostris* se encontraban más disminuidas que las de la otra especie. No existen registros de aprovechamiento comercial de caimanes en Argentina desde fines de la década del '80 y principio de los '90, aunque no sólo la cacería fue el motivo de la depleción del número de caimanes, sino que también estuvo ligada la creciente pérdida de hábitat.

La existencia de los caimanes está indefectiblemente asociada al agua, aunque a diferencia de la mayoría de los *Crocodylia*, no son fáciles de observar en los grandes espejos o cursos de aguas limpias. Las dos especies habitan simpátricamente en gran parte de su distribución en Argentina (Figura 8), pero por su dispersión más austral y occidental, *C. latirostris* aparece en forma alopátrica en un área mayor. Se ha registrado la existencia de *C. yacare* en el Chaco, Corrientes, Formosa, Salta y Santa Fe, mientras que *C. latirostris* además habita las provincias de Entre Ríos, Misiones, Santiago del Estero y Jujuy (Yanosky, 1990; Larriera et al., 2008). La distribución más austral del *C. latirostris* respecto al negro estaría relacionada con una mayor tolerancia climática (Siroski, 2004), a diferencia de otras suposiciones que indican que podría deberse al uso de una mayor diversidad de humedales y cursos acuíferos (Prado, 2003).

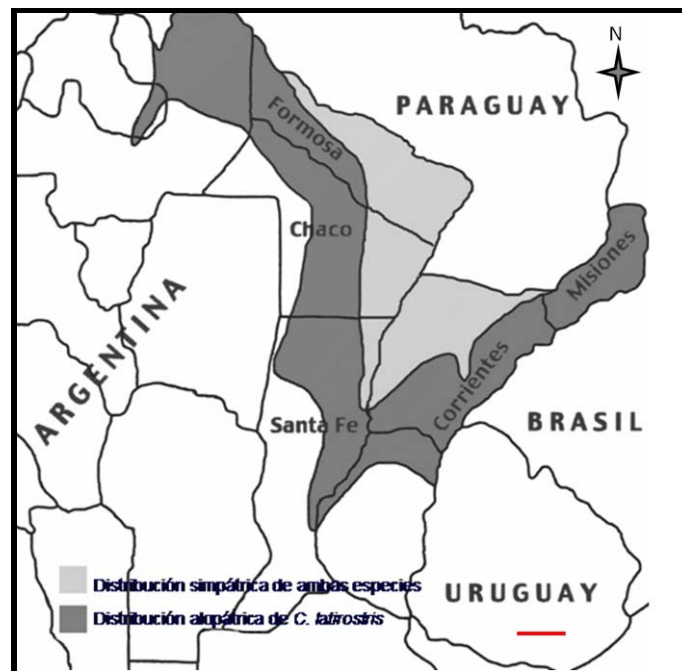


Figura 8. Mapa de la distribución geográfica de las especies de yacarés en la República Argentina. Tomado de Larriera et al., 2008. Barra = 100 Km.

La región centro-norte de nuestra provincia ha sido destacada por poseer virtudes territoriales y climatológicas para el desarrollo de una abundante flora y fauna y, en particular, de las poblaciones de yacarés (Siroski, 2004). En este sentido, se matizan una variedad de ambientes con determinadas características físicas y biológicas entre las que sobresale la abundancia de humedales donde se centraliza una riqueza incomparable de recursos naturales. En la provincia de Santa Fe, *C. latirostris* habita una diversa gama de ambientes acuáticos del valle de inundación del río Paraná, la cuenca del río Salado y de los Saladillos, (Larriera, 1995) siendo éstos generalmente, cuerpos de agua poco profundos, fuertemente vegetados y de difícil acceso (Larriera, 1992). En cambio, el *C. yacare* encuentra en el noreste de la provincia su límite sur de distribución y circunscripto al valle de inundación del río Paraná.

Durante los últimos 20 años ha habido un cambio favorable en la relación entre la conservación, la explotación y el comercio. Cuando en el año 1990 se iniciaron los trabajos de monitoreo y repoblamiento en la provincia de Santa Fe; *C. latirostris* estaba considerado en peligro de extinción, no así para la otra especie. La mayor parte de la

literatura no contemplaba a esta provincia en su área de distribución y muy poco se sabía de su estado y situación real en todo el rango nacional. Sin embargo, en los últimos tiempos, la población santafesina se transformó en la más estudiada de la especie, y luego se agregaron las de Entre Ríos, Chaco, Formosa y Corrientes. Todo el proceso histórico de los planes de manejo del país ha sido compilado recientemente por Larriera et al. (2008).

En la últimas décadas el interés por los cocodrilianos ha recobrado un impulso importante por dos razones fundamentales: la conservación de las especies y sus hábitats, y la utilización del recurso sustentablemente. Parece haberse alcanzado el uso sostenible y algunas de las especies más valiosas desde el punto de vista comercial, están hoy diseminadas y son nuevamente abundantes en vez de estar amenazadas con la extinción. La cosecha de huevos silvestres para cría en granja o rancheo, es una opción de beneficios ya comprobados (Larriera, 1990; 1992) para desarrollar con *C. latirostris*, sobre todo por sus características ecológicas y de abundancia. Como resultado del rancheo, una proporción equivalente o mayor a la que hubiera sobrevivido en condiciones naturales, es reincorporada al ecosistema de origen (Figura 9). El excedente es destinado para la producción de cuero y carne con un enfoque de producción económica y ambientalmente sustentable, sin que ello afecte a la biodiversidad o ponga en riesgo de extinción a las especies manejadas.



Figura 9. Imágenes registradas en los momentos donde los animales son reintroducidos a su hábitat natural con un tamaño marcadamente superior al de los animales que han pasado el mismo tiempo en la naturaleza.

Inicialmente visto como un problema en la conservación, el comercio se ha elegido como una solución. En la actualidad, han surgido modelos en los que se fomenta, a través de los mercados, la utilización de los ecosistemas silvestres. El uso sustentable de fauna y flora de interés comercial, basado en los beneficios económicos como estímulo para la conservación *in situ*, es uno de los enfoques más realistas para la conservación de los ecosistemas naturales (Larriera et al., 2008).

Dentro de los cocodrilianos, estas especies son de tamaño medio, ambas comparten algunas características morfométricas, por ejemplo: al momento del nacimiento los pichones pesan 40 gramos y miden 22 cm, aproximadamente, y en el caso de los machos adultos están en el orden de los 2,60 m de longitud y unos 80 kg de peso, aunque algunos registros mencionan animales de 3,20 m (Larriera & del Barco, 1992). Su cuerpo comprimido dorsoventralmente, la cola musculosa y afilada lateralmente, sumada a la piel prácticamente impermeable y con manchas de camuflaje, los transforman en nadadores perfectamente adaptados a lugares ricamente vegetados

donde, gracias a sus ojos y narinas de ubicación dorsal, pueden pasar desapercibidos tanto para potenciales presas como para predadores (Medem, 1983) (Figura 10).



Figura 10. Ejemplos de la fisonomía de los animales adultos (1,80 m, aproximadamente) de *C. yacare* (izquierda) y *C. latirostris* (derecha).

Las preferencias de hábitats entre las especies suelen ser diferentes, el *C. yacare* opta por ambientes abiertos con escasa vegetación como son los ríos y lagunas, en cambio, el *C. latirostris* prefiere los ambientes de menor profundidad, densamente vegetados, como son los esteros y bañados (Figura 11). Una fracción de la población suele permanecer cerca de los canales o cavas de erosión hídrica dentro del bosque y alejados varios kilómetros de los espejos de aguas permanentes (Larriera et al., 2008). Por lo general, estos lugares son de muy difícil acceso para la mayoría de los predadores-incluido el ser humano y con gran abundancia de alimento (Larriera & Imhoff, 2006).

Como fue mencionado anteriormente, los yacarés dependen de la temperatura exterior para desarrollar sus actividades (ectotermos), en invierno son mínimas y se limitan a la exposición al sol y a sumergirse hasta que en los meses más cálidos empiezan a incrementar la actividad en general conjuntamente con la alimentación. Uno

de estos eventos son las actividades reproductivas que comienzan con las disputas jerárquicas que se desarrollan hasta el momento de las cópulas. Una vez fecundadas, las hembras se alejan a lugares apartados, a veces a kilómetros de los ambientes de residencia habitual en aguas permanentes, incluso a la profundidad del bosque, para iniciar la construcción del nido (Yanosky, 1990).

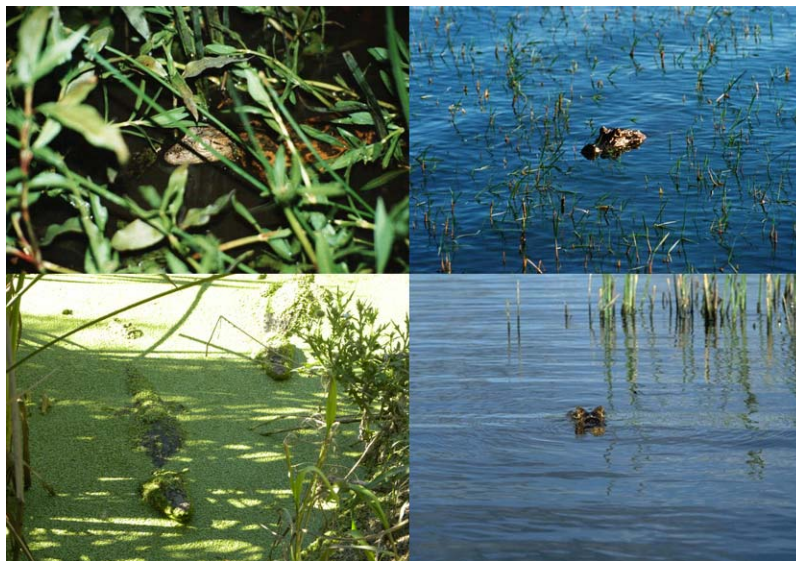


Figura 11. Diferencias en los ambientes de preferencias entre ambas especies. La especie *C. latirostris* prefiere ambientes densamente vegetados y de escasa profundidad (izquierda arriba y abajo), en cambio, *C. yacare*, suele encontrarse en ambientes más abiertos como ríos y lagunas (derecha arriba y abajo).

Existen varias clases de nidos que son clasificados en función del ambiente en el cual fueron contruidos (Montini et al., 2006). Estos montículos de materia vegetal, tierra, arena, ramas y deyecciones (el material predominante depende del lugar donde fueron contruidos), actúan como incubadoras naturales, especie de silos que por el calor del sol y la fermentación producen una temperatura interior casi uniforme durante todo el ciclo, que dura 70 días, aproximadamente (Figura 12). Las posturas se producen entre principios de diciembre y mediados de enero y, dependiendo del lugar y el carácter de la hembra, pueden observarse actitudes de defensa del nido, que se

manifiestan con marcada agresividad para con cualquier intruso en las cercanías (Larriera & Imhof, 2006).



Figura 12. Diferentes tipos de nidos construidos por los yacarés. Estos actúan como incubadoras naturales ofreciendo las condiciones de temperatura y humedad para el desarrollo de los embriones. De izquierda a derecha, se pueden observar los nidos en los diferentes ambientes y materiales: estero, monte y sabana.

Se estima que en condiciones naturales, al finalizar el período de incubación, sólo eclosionan entre el 30 y el 50% de los huevos puestos en la temporada y debido a algunos factores como el de las bajas temperaturas extremas y los predadores, aproximadamente el 10 % llega al año de vida. Esto fácilmente explica la estrategia reproductiva de la especie, que como en el caso de la mayoría de los reptiles, producen una frágil, pero abundante descendencia, lo que garantiza que al menos unos pocos lleguen al estado adulto (Larriera, 1991) (Figura 13).



Figura 13. Los incendios causados accidental o intencionalmente, son una causa frecuente de mortalidad embrionaria (izquierda-arriba) junto a la predación o destrucción de los nidos por animales silvestres o domésticos (izquierda-abajo, y derecha). La presencia de predadores y las bajas temperaturas, son otras causas de decesos en la etapa perinatal.

Los cocodrilianos tienen complejos comportamientos que incluyen interacciones sociales, comunicacionales y dominancias jerárquicas que se asemejan más a las aves y a los mamíferos que a otros reptiles. La comunicación entre congéneres es por medio de sonidos, posturas, movimientos, olores y tactos. Desde la etapa embrionaria a la adultez, utilizan diferentes sonidos para manifestar distintos estados como por ejemplo, cuando están por eclosionar, ante la presencia de predadores, durante el cortejo sexual, para demostrar signos de dominancia hacia otros adultos, etc. (Lang, 1989). Además de las señales sonoras, los machos manifiestan su dominancia para mantener su jerarquía dentro del grupo. Esta posición le permite a los machos obtener algunos beneficios como el de poder copular a varias hembras, mayor disponibilidad de alimentos, entre otras. En el caso de las hembras dominantes, comparten algunas de esos beneficios, además, podría mencionarse la elección de los sitios de nidificación y la defensa del nido más agresivamente. Algunos de estos comportamientos están sumamente

relacionados con la densidad de animales en algunos lugares, y se encuentra agravado en la estación reproductiva.

Las disputas jerárquicas, por lo general, se ponen de manifiesto a través de peleas entre animales de distinta o similar edad y sexo, o sea, la dominancia está planteada prácticamente en diferentes estratos. Por lo general, una característica regular de los cocodrilianos con dominancia individual, es que estos poseen un gran tamaño corporal y un temperamento agresivo. Luego de serias peleas y en el caso de machos adultos, el “vencedor” es el tendrá un acceso diferencial a la alimentación, a la posibilidad de copular a varias hembras, etc.. Esto último está siendo discutido debido a que se han detectado varios casos de multipaternidad, lo que indicaría que las hembras son copuladas por más de un macho (Amavet et al., 2008). En numerosas oportunidades, estas disputas sociales provocan serias heridas, la pérdida de miembros y en algunos casos hasta la muerte (Figura 14).



Figura 14. Ejemplos de heridas producidas por peleas entre congéneres.

Otro caso en los que se han detectado heridas en los cocodrilianos es a causa de peces predadores, particularmente pirañas (*Pygocentrus cariba*, *Serrasalmus irritans*, etc.), guabina (*Hoplias malabaricus*), entre otros. La mayor parte de las heridas encontradas (pérdidas de dedos y extremidades, mutilación de la punta de la cola, cicatrices redondeadas en el cuero) orientan hacia este tipo de depredador, sobre todo en animales pequeños (Seijas, 2007). Se han detectado cicatrices parecidas en los yacarés dentro de las piletas de crianza en los programas de *ranching* en Argentina. Este hecho fue observado solamente en las piletas donde se crían los animales pertenecientes a la especie *C. yacare* y se supone que ese tipo de lesiones se deben a que esta especie tiene comportamientos pesqueros y que pudieran confundir las extremidades de las colas con peces (Figura 15)



Figura 15. Ejemplos de pérdidas de los extremos de las colas en *C. yacare*.

De manera similar, en los criaderos, cualquiera sea la técnica de manejo empleada, suelen aparecer una serie de factores predisponentes que pueden provocar algún tipo de lesión. En muchos casos, por necesidad de optimización excesiva de espacios, se suele colocar un número de animales superior al que pueden tolerar las

piletas de crianza o los recintos destinados a reproducción. Esto no sólo implica una disminución de crecimiento en las piletas de crianza sino también una disminución del éxito reproductivo y de eclosión en el caso de los criaderos con reproducción en cautiverio. Más allá de esto, la elevada densidad es una causa de estrés (Poletta et al., 2008), que por lo general, desencadena varios conflictos como peleas, mordeduras, etc., e incluso, pueden provocar inmunosupresión. Tal como hemos mencionado, en muchos casos las heridas ocasionadas por estos problemas de manejo son de gravedad (Figura 16).



Figura 16. Las altas densidades pueden observarse tanto en cautiverio como en la naturaleza y podrían desencadenar peleas entre animales por competencias ante diversos factores o simplemente por estrés.

Asimismo, este tipo de situaciones suelen suceder también en los ambientes naturales. Por diferentes causas los animales están expuestos a situaciones similares, como por ejemplo, sequías extremas, modificaciones de ambientes por diferentes causas, incendios, etc.

Aunque en menores proporciones, se pueden citar algunos otros casos que pueden aparecer como causantes de lesiones serias o leves. Entre ellos podemos mencionar:

capturas de animales por relocalización en los casos considerados como animales problemas, movimientos de animales en los criaderos por traslados *in* y *ex situ*, capturas accidentales por dispositivos pesqueros, etc. Salvo casos extremos, estas lesiones transcurren sin síntomas aparentes de procesos infecciosos.

1.7 Actividad antimicrobiana del plasma de los cocodrilianos

A pesar de las diferencias existentes entre las distintas clases de animales, los reptiles y las aves poseen muchas similitudes en su sistema inmunológico (Rose, 1979). Asimismo, las granjas de pollos y los criaderos de cocodrilos poseen ciertas similitudes en el hecho de estar expuestos a factores estresantes, como por ejemplo, la alta densidad de cría y las condiciones poco higiénicas. A pesar de esto, los animales demuestran limitados signos consecuentes con tales exposiciones. Todas estas consideraciones sugieren que tanto las aves domésticas como los cocodrilianos tienen un sistema de defensa eficiente que les permite sobreponerse a tales condiciones.

Para sobrevivir en un ambiente con una elevada carga microbiana, los organismos dependen de una red de mecanismos de defensa con un alto grado de interacción (Figura 17). Desde la exposición inicial con los antígenos que se produce en las superficies internas o externas, comienzan a desencadenarse las reacciones inmunes. Como se ha mencionado, la inmunidad innata es la que actúa de manera inmediata en el reconocimiento de patrones moleculares microbianos, tales como PAMPs (por ejemplo LPS o componentes de las paredes celulares) por los receptores tipo Toll (TLR) para el inicio de la respuesta inmune del hospedador (Hoffman et al., 1999; Aderem & Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001). Este mecanismo puede eliminar directamente al patógeno sin tener la necesidad de la activación del siguiente paso, la respuesta inmune adaptativa (Bal, 2000).

Los mecanismos efectores del SII están regulados y tienen actividad antimicrobiana y mediadora hacia las células inflamatorias, junto a las del SIA (Barrington et al., 2001). Sobre todo en invertebrados, el sistema adaptativo es bastante

precario, lo que de alguna manera explicaría la versatilidad y eficiencia en el SII, ya que debe controlar la invasión de determinados agentes extraños por sí sólo (Otvos, 2000).

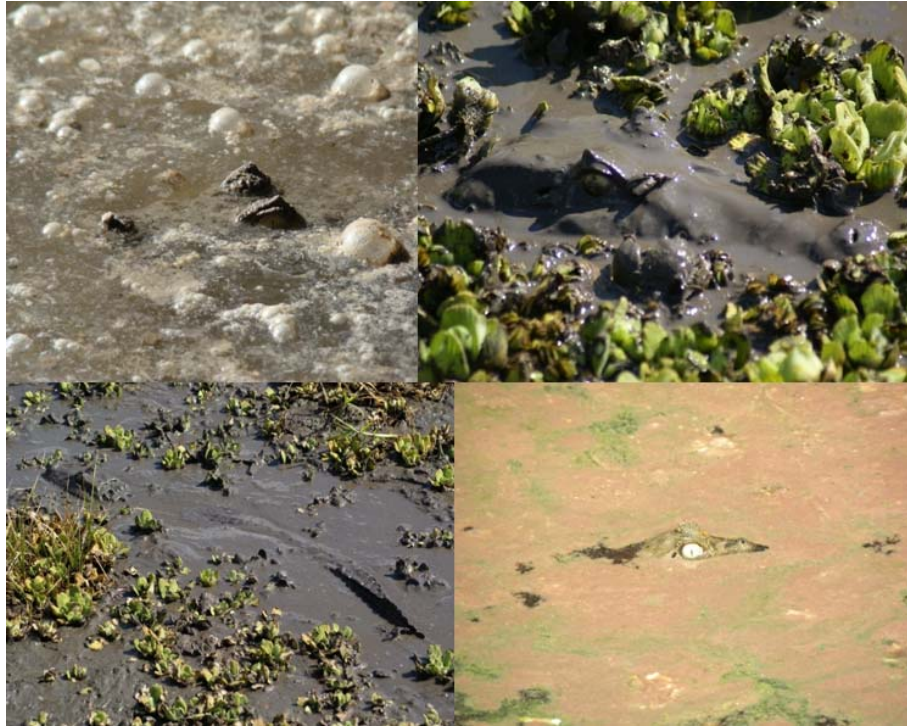


Figura 17. Ejemplos de ambientes en los que suelen encontrarse los yacarés. En estos lugares, existen altas concentraciones de microorganismos patógenos, por lo que podríamos suponer que estos animales tienen un sistema de defensa adaptado para vivir en estos ambientes.

Entre la variedad de componentes que actúan como una primera línea de protección no específica en los reptiles se pueden destacar las más importantes:

- ✓ Las lisozimas son enzimas que causan la lisis de las bacterias por hidrólisis de su pared celular y han sido aisladas de lagartos y de varias especies de tortugas (Araki et al., 1998; Thammasirirak et al., 2006).
- ✓ Los reptiles también tienen proteínas antimicrobianas que son similares a las defensinas en estructura y función. En los huevos de tortugas de mar (*Caretta caretta*) se encontraron pequeños péptidos catiónicos que se asemejan a una subfamilia de las defensinas, las β -defensinas, que exhibieron

una fuerte actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y antiviral contra *Chandipura virus* (Chattopadhyay et al., 2006). Otro péptido de la misma familia, la pelovaterina, también fue hallado en otra especie de tortuga (*Pelodiscus sinensis*) y familias de péptidos antimicrobianos han sido detectados en lampreas, teleósteos, aves y mamíferos (catelicidinas) (Tomasinsig & Zanetti, 2005). Algunos componentes de esta familia se encontraron en el veneno de la serpiente *Bungarus fasciatus* (Wang et al., 2008). Esta familia ha demostrado una importante actividad antimicrobiana frente a algunas cepas del género *Bacillus* y hongos incluyendo *Candida albicans*. Merchant et al. (2006b), a partir de un extracto ácido de leucocitos de *A. mississippiensis*, demostró una sustancial actividad antimicrobiana frente a algunas especies de *Candida*, bacterias y virus, proponiendo que los causantes de esos efectos son péptidos antimicrobianos sintetizados por los leucocitos. Por otro lado, una pequeña proteína catiónica que exhibió un efecto antibacteriano frente a varias especies de bacterias, fue aislada del cocodrilo siamés (*Crocodylus siamensis*) (Preecharram et al., 2008). Los péptidos antimicrobianos ofrecen una importante protección contra las infecciones como así también, están siendo investigados como una fuente de oportunidades tendientes a descubrir nuevos antibióticos para uso clínico humano y veterinario.

✓ Otro componente que demostró actividad antimicrobiana en cocodrilianos es el SC. En varios estudios, la actividad antimicrobiana en el suero de los cocodrilianos tuvo un efecto microbicida superior al obtenido por el suero humano. Esta propiedad del suero demostró tener efectos letales cuando fue expuesto *in vitro* a un número importante de bacterias (Merchant et al., 2003), a diferentes especies de amebas (Merchant et al., 2004), e incluso, sobre algunos virus (Merchant et al., 2005b). De todos estos estudios, existen evidencias claras de que la causa de dicha actividad es debida al SC.

✓ En los reptiles existen una serie de leucocitos no específicos: macrófagos, monocitos, heterófilos, basófilos y eosinófilos. Mondal & Rai (2001) reportaron la existencia de niveles altos de fagocitosis y toxicidad de los macrófagos esplénicos en el lagarto *Hemidactylus flaviviridis*. Los heterófilos,

cuyo tamaño puede variar mucho entre las especies de reptiles, son funcionalmente equivalentes a los neutrófilos de los mamíferos, ayudan a suprimir la invasión microbiana y participan en la respuesta inflamatoria (Montali, 1988). Los basófilos contienen receptores para la fracciones Fc de las Ig específicas para antígenos; cuando se activan, se produce una degranulación y una liberación de histamina dependiente de la temperatura y proporcional a la concentración del antígeno (Zimmermann et al., 2010). Por último, poco se conoce sobre la función de los eosinófilos en los reptiles.

Shaharabany et al. (1999) fueron los primeros en demostrar la actividad antibacteriana en tejidos de *C. niloticus*. Algunos estudios posteriores demostraron la actividad antimicrobiana del suero en varias especies de cocodrilianos (Merchant et al., 2003; 2004; 2005b; Merchant & Britton, 2006; Siruntawineti et al., 2004).

1.8 Sistema del complemento en cocodrilianos

En contraste con la inmunidad adaptativa que está restringida a los animales vertebrados, la inmunidad innata es utilizada por los invertebrados como insectos y equinodermos así como también por los animales superiores (Song et al., 2000). Los componentes del SII están intensamente conservados entre los mamíferos e insectos, sugiriendo de esta manera que poseen un origen ancestral común para esta rama de la inmunología (Hoffmann et al., 1999). Como se ha mencionado, el SC es un elemento importante de la defensa inmune innata de los animales vertebrados e invertebrados (Song et al., 2000) contra agentes infecciosos que aparenta estar muy conservado en los vertebrados, sin embargo, los trabajos sobre reptiles y anfibios son todavía muy escasos.

Algunos estudios demostraron que el SC de los peces y otros vertebrados poiquiloterms es más diverso que el de los vertebrados superiores y, por lo tanto, puede reconocer un rango de antígenos más amplio (Sunyer et al., 1998). Las especies poiquiloterms, que comprenden desde los teleósteos hasta los reptiles, parecen tener un sistema del complemento desde un punto de vista estructural, tan desarrollado como el de los vertebrados homeoterms (Zarkadis et al., 2001). De la misma manera, algunos

estudios reportaron la presencia del sistema del complemento en una variedad de reptiles (Koppenheffer, 1986), incluyendo a los cocodrilianos. Merchant et al. (2005c) detectó la vía alternativa del complemento en suero de *A. mississippiensis* y Merchant & Britton (2006) reportaron resultados similares en cocodrilos de agua dulce (*Cr. johnstoni*) y de agua salada (*Cr. porosus*).

Para detectar la actividad del SC se ha desarrollado y utilizado la prueba de hemólisis de glóbulos rojos de oveja o carnero (SRBC). Esta actividad fue medida y cuantificada usando pruebas hemolíticas con eritrocitos de oveja, anticuerpos anti-eritrocitos de conejos y la más frecuentemente utilizada, con sangre de cobayo (Schevach, 2005). Antiguamente ya se conocía que el suero de algunos peces posee la capacidad de lisar una variedad de eritrocitos (oveja, cabra, perro o conejo) por medio de la vía alternativa del complemento (Sunyer & Tort, 1995), en contraste con el suero humano que solamente ha demostrado su actividad lítica frente a eritrocitos de conejo (Pangburn & Muller-Eberhard, 1978). Además, el grado de hemólisis que demuestra el suero de los peces es aproximadamente 10 veces más alto que el de otros vertebrados (Sunyer & Tort, 1995). Merchant et al. (2006a) realizaron una adaptación al ensayo de lisis de SRBC descrito por Mayer (1967) para caracterizar la actividad del SC en cocodrilianos que luego fue aplicada en varias especies y utilizada para evaluar la diferencia de numerosos factores sobre dicho sistema.

1.9 Efecto de la radiación UV sobre el sistema del complemento

La luz solar es un factor clave en casi todos los ecosistemas y los amplios efectos ecológicos de las emisiones correspondientes a las longitudes ultravioleta (UV), visible e infrarrojo.

El espectro de radiación UV sobre la tierra es modificado por factores temporales, geográficos y metodológicos. Normalmente las regiones de longitudes de onda UV se clasifican de la siguiente manera: UVC (200–280 nm), UVB (280–315 nm) y UVA (315–400 nm), con algunas pequeñas variaciones en las definiciones puntuales de estos rangos de longitud de onda (Frederick et al., 1989).

Es frecuente encontrar una innumerable cantidad de estudios que demuestran cómo la radiación UV afecta muchas interacciones tróficas y, a su vez, influye en una variedad de funciones en los ecosistemas. Los amplios efectos del UV son clasificados en directos e indirectos, basados en la posibilidad de que la exposición a UV induzca modificaciones en los mecanismos fisiológicos en forma directa, o genere alteraciones en algunas estructuras o procesos que produzcan, más tardíamente y en forma indirecta, diferentes efectos en los organismos.

Los animales ectotermos tienen comportamientos termorregulatorios tales como el “asoleamiento” (Allen et al., 1994; Johnson et al., 2008), sin embargo, existen otros beneficios secundarios del mismo, en particular, el obtenido de la exposición a la radiación ultravioleta B (UVB), necesaria para la producción endógena de vitamina D.

Actualmente, el bienestar de los reptiles, entre muchos otros animales, ha cobrado un impulso importante, en los zoológicos, en innumerables proyectos de uso sustentable y de conservación y para las personas que han adoptado la tenencia de este tipo de animales como mascotas, incluso en los casos en que los reptiles son también utilizados como modelos biológicos de laboratorios para la investigación científica (Brames, 2007). En cualquiera de estos casos, para mantener a los animales en estado saludable, es importante proveerles del espectro de UVB necesario para los procesos fotoquímicos involucrados en la síntesis de vitamina D. Cuando esto no se realiza en forma apropiada, pueden producirse problemas metabólicos ya que la vitamina D actúa regulando la absorción de fósforo y calcio, dos minerales implicados directamente en el metabolismo relacionado con el crecimiento y mantenimiento de los huesos (Lian et al., 1999). Independientemente de que los animales reciban una dieta y temperatura óptimas, si no se les provee la radiación UVB necesaria para la síntesis de Vitamina D, no podrán incorporar estos minerales en forma adecuada (Brames, 2007).

Por lo general, en los casos que no es posible exponer a los animales a la emisión solar, se requiere suplementación de luz UV necesaria. Las lámparas que se recomiendan para estos fines contienen un espectro de luz visible, UVA y UVB.

Kubasova et al. (1995) reportaron que la luz visible no ejerce ningún efecto supresor, por el contrario, podría ejercer algún efecto modulador de la función inmune

(Roberts, 1995). En cambio, las radiaciones UV recibidas inapropiadamente, han demostrado tener efectos negativos sobre el sistema inmune.

Por otro lado, Liu et al. (2006) demostraron la importancia de la vitamina D en la respuesta inmune humana; con niveles insuficientes de vitamina D, es más difícil para las células activar los receptores TLRs. De la misma manera, hay evidencia considerable de que la radiación UV, particularmente en el rango UVB, tiene un efecto pronunciado sobre las principales funciones del SI. La exposición excesiva a la radiación UV interfiere con el funcionamiento normal del SI en los animales y los seres humanos. Ilyas (1986) y Jeevan & Kripke (1993) resaltaron el daño a largo plazo que podría provocar sobre el sistema inmune la radiación UVB en la salud de las poblaciones. Las propiedades inmunosupresivas de la radiación UV son de una relevancia clínica y biológica (Schwarz, 2005). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en el efecto de la radiación UV sobre el sistema inmune celular más que el humoral (Hersey et al., 1983). Sin embargo, Artyukhov et al. (2007) estableció que la luz UV puede modular la actividad del SC, como uno de los componentes de la inmunidad humoral.

Muchos estudios investigaron los efectos de la radiación UV en humanos (Marrot & Meunier, 2008) y en invertebrados marinos (Hader et al., 2007; Pruski et al., 2009), quizás por ser grupos apenas más vulnerables. Sin embargo, pocos esfuerzos han sido empleados para investigar los efectos de la exposición UV en otras especies silvestres; en consecuencia, la radiación UV raramente se considera cuando se hace referencia a la salud de una especie o población silvestre. A pesar de la importancia del SC como un componente relevante de la respuesta inmune innata en los cocodrilianos, aún no se han estudiado los efectos de la radiación UV sobre su funcionamiento.

1.10 Efectos de la exposición a contaminantes sobre el sistema del complemento

Muchas sustancias introducidas en el entorno por la actividad humana pueden perturbar varios sistemas metabólicos en los animales y seres humanos. Entre ellas, se encuentran las sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalógenas que incluyen

algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), las sustancias químicas industriales, otros productos sintéticos y algunos metales pesados. Las consecuencias de las alteraciones producidas pueden ser profundas debido al papel decisivo que pueden desempeñar en diferentes procesos biológicos. La actividad agro-industrial y los centros urbanos generan materiales de desecho que contaminan humedales y ríos, lo que afecta la salud de vida silvestre y los ecosistemas (Beldomenico et al., 2007).

La expansión e intensificación de la agricultura durante los últimos 50 años no registra precedentes en la historia de la humanidad. Como consecuencia de este incremento y sumado a los cambios en el uso de la tierra, se desencadenaron problemas ambientales a diferentes escalas, constituyendo la manifestación más evidente de la actividad humana. Tales transformaciones del territorio ocasionaron la pérdida de hábitat y biodiversidad, la alteración de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas y la disminución de su capacidad para sostener la provisión de recursos vitales.

Uno de los ejemplos más destacados es el resultado de la explosión del uso de la soja transgénica y la implementación de nuevas tecnologías en las regiones tropicales y subtropicales (Beldomenico et al., 2007). Las causas de esta expansión se deben buscar en los precios crecientes de la soja en el mercado internacional, sumamente rentables, los altos rendimientos de las variedades genéticamente modificadas adaptadas a condiciones edáficas y climáticas menos favorables, los tiempos cortos de rotación y los bajos costos de labranza por la implementación de la siembra directa (INTA, 2004; Satorre, 2005; Hang et al., 2010).

En Argentina, actualmente se pueden caracterizar como principales amenazas para la biodiversidad en general, el desmonte de bosques nativos y el secado de esteros con el objeto de destinar cada vez más tierras a la agricultura, particularmente al cultivo de soja (Larriera & Imhof, 2006). El modelo agrícola actual está directamente asociado con un alto consumo de formulaciones plaguicidas, mezclas químicas complejas y variables. Generalmente, los plaguicidas se comercializan como formulados complejos, no como sustancias simples. Los preparados comerciales, incluyen al principio activo (sustancia que posee la propiedad de matar a la plaga) junto a otros ingredientes, denominados

coadyuvantes o surfactantes, cuya función es facilitar la aplicación del producto y aumentar la eficacia del principio activo, favoreciendo su acción. Los surfactantes y/o coadyuvantes están presentes en grandes porcentajes en las formulaciones y son considerados ingredientes inertes, a pesar de que en muchos casos, su toxicidad supera la del principio activo (Cox, 1999; Poletta et al., 2009).

En relación al cultivo de soja en Argentina, el plaguicida más utilizado y posiblemente también lo sea en el mundo, es el glifosato. El Glifosato (N-fosfometil glicina) es un herbicida sistémico y de amplio espectro, extensamente utilizado en agricultura y también en ambientes forestales, acuáticos, jardines y en la industria de la madera, para el control no selectivo de malezas anuales y perennes, gamíneas y latifoliadas (USEPA, 1986; WHO, 1994). Su mecanismo de acción tiene lugar a través de la alteración de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Es un inhibidor de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3- fosfato sintetasa, que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de tres aminoácidos esenciales para la supervivencia de la planta: triptófano, fenilalanina y tirosina. Esta vía está presente en las plantas superiores y ciertos microorganismos, pero no en animales (Amrhein et al., 1980; Atkinson, 1985).

Una parte importante de los plaguicidas aplicados en agricultura se disipa en el ambiente por deriva, esorrentía y lixiviación, afectando a las poblaciones silvestres de flora y fauna de las áreas naturales circundantes y ocasionando graves problemas para la salud humana (Donald, 2004; Peruzzo et al., 2008). La exposición crónica de los organismos a bajas concentraciones de plaguicidas puede tener efectos deletéreos acumulativos, interferir con el desarrollo y el crecimiento, alterar parámetros fisiológicos y hematológicos, suprimir el sistema inmune y producir inestabilidad genética de los organismos que habitan en ambientes circundantes a cultivos (Moses et al., 1993; Ecobichon, 2005; Gluczac et al., 2006).

El campo de inmunotoxicología en la vida silvestre es relativamente nuevo, y los estudios con los reptiles son muy limitados. Algunos trabajos realizados en aves y mamíferos en vida libre proporcionan una base para el desarrollo de este campo y demuestran las implicancias a nivel poblacional del efecto depresivo sobre sistema inmunológico que causarían los tóxicos liberados, voluntaria o involuntariamente, al

medioambiente (Grasman et al., 1996; Ross et al., 1996; Grasman & Fox, 2001). Otros estudios confirman las sospechas de que la exposición en el medio ambiente a concentraciones importantes de contaminantes puede suprimir la función inmune en la fauna silvestre y puede llevar a una disminución de la resistencia del hospedador, mayor vulnerabilidad a la enfermedad, aumento de la mortalidad y, por ende, una reducción en el tamaño de las poblaciones (Keller et al., 2005).

La mayoría de los trabajos que reportan los efectos inmunotóxicos a distintos niveles están orientados principalmente al estudio sobre la inmunidad adaptativa, en cambio, escasos estudios se han realizado para identificar los efectos de estas sustancias sobre la inmunidad innata y menos aún sobre el SC. Algunos autores reportan la activación directa de la cascada del SC a causa de la exposición *in vitro* a hexaclorobenceno (compuesto organoclorado) y malatión (compuesto organofosforado) en suero humano. Con ambos compuestos se detectó una activación de la cascada del complemento a través de la VA aunque los mecanismos por lo cual se produce esta activación no han sido dilucidados (Banerjee et al., 1996). Otros estudios preliminares, tuvieron hallazgos similares frente a DDT y endosulfán (Das et al., 1988) los que concluyeron que el SC es uno de los focos de interacción entre los insecticidas y el sistema inmunológico. En estos casos, el efecto observado no sería inmunosupresor porque estaría generando un desencadenamiento descontrolado del SC, pero de igual manera, esta hiperactivación provocaría serias consecuencias como las que fueron mencionadas anteriormente. En referencia al papel extremadamente importante que desempeña la inmunidad innata en los reptiles y su relación con el incremento desmedido en la utilización de sustancias tóxicas, esta temática no se ha considerado aún con la preocupación que merece.

Los reptiles son muy sensibles a las condiciones ambientales y generalmente están estrechamente ligados a un hábitat limitado, situación que los hace más vulnerables a los cambios en el hábitat si se los compara con aves y mamíferos (Hopkins, 2005). A diferencia de la mayoría de las especies utilizadas para el estudio de la toxicología, los reptiles no exhiben típicamente tiempos cortos de generación, no producen gran cantidad de descendencia en corto tiempo y normalmente, son difíciles de mantener en cautividad por los requerimientos de crianza y espacio. Estas mismas características

hacen que los estudios en reptiles permitan establecer nuevos paradigmas y ecológicamente significativos en toxicología ambiental (Hopkins, 2000).

Como otros vertebrados, los reptiles están expuestos a los contaminantes por medio de diferentes vías: dérmica, inhalatoria u oral (ingestión) que dependen de numerosos factores que incluyen la ecología y fisiología del organismo, las características del contaminante, y el ambiente físico-químico en el cual el organismo queda expuesto al contaminante. Los cocodrilianos (alligatóridos, cocodrilos y gaviales) son componentes valiosos de los humedales en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, tanto en los aspectos ecológicos, fisiológicos y económicos (Messel et al., 1995). La diversidad de estrategias de vida y ciertas características como la ocurrencia en una gran variedad de hábitat, su posición en un nivel superior de la cadena alimenticia, los hábitos acuáticos, distribución geográfica amplia, longevidad y fidelidad al lugar donde viven los hace especialmente vulnerables a la exposición a plaguicidas (Campbell, 2003; Beldomenico et al., 2007).

Los cocodrilianos pueden estar expuestos a contaminantes en todos los estadios de su vida. En el caso del hábitat de *C. latirostris*, y probablemente suceda lo mismo para muchas otras especies, en los últimos años y como resultado de la expansión de las fronteras agrícolas, muchas áreas de su distribución geográfica en las provincias de Santa Fe, Chaco, Formosa y Corrientes han quedado en la proximidad de zonas con actividad agrícola intensa, donde innumerables formulaciones plaguicidas se utilizan en forma creciente como método estándar de control de plagas.

Los juveniles y adultos pueden estar expuestos mediante la alimentación, el agua y los sedimentos típicos del ambiente natural en el que viven, mientras que los contaminantes acumulados por la madre pueden llegar al embrión a través de la yema del huevo, afectando además el desarrollo embrionario *in ovo* (Hall & Henry, 1992). Del mismo modo, los embriones pueden verse afectados por dichos compuestos que atraviesan la cáscara del huevo desde el ambiente, durante la incubación. Cabe destacar que el período del año de máxima aplicación de plaguicidas coincide con la temporada reproductiva de esta especie (noviembre-marzo), implicando un riesgo de

contaminación particularmente importante para los embriones en desarrollo y los neonatos (Poletta et al., 2010) (Figura 18).



Figura 18. Curso de agua que puede ser utilizados por los neonatos de yacaré contiguo a un cultivo de soja.

Por lo tanto, la realización de investigaciones sobre los efectos de la exposición a plaguicidas en *C. latirostris* es de especial interés, no sólo para evaluar el impacto sobre las poblaciones de caimanes, sino también para promover la caracterización de la especie como un centinela de la salud del ecosistema, que podría permitir la detección de las regiones con alta cargas de contaminación.

A decorative, symmetrical, light-colored graphic element centered on the page. It features intricate, swirling patterns and a central circular motif, resembling a stylized floral or heraldic design.

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El yacaré overo (*Caiman latirostris*) tiene un sistema inmune innato eficiente y con un alto grado de desarrollo que le permitiría resistir el ataque de los microorganismos característicos de los ambientes en los que vive, siendo el sistema del complemento, uno de los componentes que colabora mayoritariamente en tal resistencia.

2.2 Objetivo General

Detectar y caracterizar el sistema complemento y otros componentes del sistema inmune innato de *C. latirostris*.

2.3 Objetivos Específicos

- Detectar la actividad antimicrobiana del plasma de *C. latirostris*.
- Detectar y comparar la actividad del sistema complemento del plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.
- Comparar la actividad del sistema del complemento de *C. latirostris* con otras especies de animales ectotermos y homeotermos.
- Analizar la evolución de la actividad del sistema del complemento de *C. latirostris* durante los primeros meses de vida.
- Determinar la influencia de plaguicidas sobre la actividad del sistema del complemento de *C. latirostris*.
- Determinar la actividad de los rayos ultravioletas sobre la actividad del sistema del complemento de *C. latirostris*.
- Identificar y caracterizar la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.
- Identificar y caracterizar la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.

A decorative, symmetrical, light-colored graphic element centered on the page. It features a central circular motif with intricate patterns, possibly a stylized eye or a seal, surrounded by ornate, scroll-like flourishes that taper outwards.

Materiales y métodos

3. Materiales y Metodos

3.1 Consideraciones generales del modelo biológico

Los protocolos experimentales incluidos en esta Tesis fueron revisados y aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad (CAES) de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) (Protocolo Número 069/2010).

3.1.1 Técnicas de captura

Se utilizaron animales provenientes de ambientes naturales, como así también ejemplares mantenidos en cautiverio, dentro de ambientes seminaturales y artificiales. Los animales en condiciones seminaturales se encuentran dentro de las instalaciones de la Estación Zoológica Experimental (E.Z.E.).

Los ejemplares que se encuentran en condiciones completamente artificiales, pertenecen al plantel del Proyecto Yacaré (PY, Convenio Gobierno de Santa Fe/MUPCN). Este proyecto de desarrollo sustentable se basa en la técnica de *ranching* que consiste, básicamente, en la cosecha de huevos silvestres de *C. latirostris* para cría en granjas. Los nidos son identificados por pobladores locales en los ambientes naturales y cuidadosamente recolectados por el personal del PY aplicando las técnicas estándar de cosecha (Figura 19). Posteriormente, son trasladados hacia la incubadora artificial en las instalaciones del PY donde son incubados a temperatura y humedad controladas (31 ± 1 °C y 95 %, respectivamente).



Figura 19. Técnica de cosecha en la cual se marcan la posición de los huevos en el nido que será respetado cuando los mismos sean ubicados en bateas dentro de la incubadora artificial a temperatura y humedad controladas.

Una vez nacidos, los animales son individualizados por combinaciones de cortes en las crestas caudales correspondientes a los nidos de origen y al año de cosecha (Figura 20), y trasladados a piletas diseñadas para obtener un crecimiento intensivo.



Figura 20. Corte en las crestas caudales que se realizan para identificar con un código los animales que pertenecen a un mismo nido. Luego del corte, se realiza un botón cicatrizal que permanecerá para toda la vida

Estas piletas se encuentran bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura 31 ± 2 °C para que los animales incrementen su tamaño durante todo el año. La alimentación se basa en una mezcla húmeda constituida por cabezas de pollo molidas y un alimento balanceado seco diseñado para reptiles en una proporción 60/40, respectivamente. Cabe destacar que no contiene ningún agregado de sustancias antimicrobianas ni promotores de crecimiento. La alimentación se realiza seis veces por semana y la limpieza cuatro veces por semana, evitando así el estrés sanitario para los animales (Larriera et al., 2008) (Figura 21).

Entre los 10 y 12 meses de edad, una porción de estos animales es reintroducido al lugar donde fueron cosechados los huevos (Figura 9). Bajo estas condiciones de crianza, se encuentran con un tamaño muy superior en relación a los que transcurrieron este tiempo en los ambientes naturales. Esto, los hace menos susceptibles a distintas adversidades climáticas, predadores, etc., aumentando su supervivencia.



Figura 21. Instalaciones con piletas calefaccionadas para mantener una temperatura constante durante todo el año. De esta manera, y con el complemento de un alimento balanceado húmedo, los animales alcanzarán un tamaño superior al de los animales que han pasado los meses fríos en la naturaleza.

Los ejemplares silvestres de *C. latirostris* provienen de diferentes zonas de la provincia de Santa Fe. Estos lugares tienen en común que contienen humedales extensos, públicos o privados, que tienen la particularidad de poseer grandes poblaciones de yacarés, siendo los principales lugares de cosecha de huevos del PY (Larriera & Imhof, 2006). Estas áreas han sido seleccionadas por estar poco o nada modificadas por actividades antrópicas para evitar cualquier tipo de sesgo en los resultados. Los sitios seleccionados para las capturas de animales fueron: la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (30°11'26"S, 61°0'27"O; Dpto. San Cristóbal, Santa Fe, Argentina; Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008) y Estancia “El Estero” (30° 2'51.04"S 59°57'51.98"O; Dpto. San Javier, Santa Fe, Argentina; Reserva Provincial de Uso Múltiple (Resolución 104/92, MAGIC, Provincia de Santa Fe). En los casos donde se utilizan animales recién nacidos, estos fueron seleccionados de nidos que provinieron de esos mismos lugares. Las muestras obtenidas de la especie *C. yacare*, fueron tomadas en todos los casos de animales silvestres capturados en la provincia de Corrientes, utilizando el mismo criterio de selección de los lugares para captura (con poca o escasa antropización). El lugar seleccionado fue la Laguna Tabe (27°38'55.87"S 56°32'0.26"O) en los Esteros del Iberá (Figura 22).



Figura 22. Imagen satelital de los sitios donde fueron capturados los animales silvestres para los estudios realizados.

En estado silvestre, incluso en los ambientes seminaturales, la manera más frecuente para capturar a los animales es durante la noche. Como fue explicado oportunamente, la accesibilidad a los ambientes acuáticos no es sencilla, por lo cual, en la mayoría de los casos es necesario hacerlo de a caballo, a pie o con embarcaciones.

Una de las técnicas más utilizadas para la identificación nocturna es la iluminación de los animales en donde son fácilmente detectables por la reflexión que producen los ojos utilizando linternas de mano, de cabeza o reflectores.

Se utilizaron métodos de captura convencionales incluyendo lazos fijos y móviles, a pesar de la existencia de otros elementos más complejos, como trampas de distintos tipos, que no fueron necesarios dada la práctica adquirida por el equipo de trabajo.

Una vez capturados, los animales fueron inmovilizados para manejarlos con seguridad sin necesidad de recurrir a anestésicos. Los animales fueron muestreados,

medidos y devueltos a su ambiente, dentro de la hora de capturados. Todos estos movimientos debieron realizarse con relativa rapidez porque luego de ese tiempo se produce un aumento de la concentración de corticosterona (hormona directamente relacionada con el estrés en cocodrilianos), que podría afectar los resultados obtenidos (Lance & Lauren, 1984; Turton et al., 1997).

El manejo particular de los animales para cada estudio está en relación al objetivo a cumplir y será detallado oportunamente.

3.1.2 Toma y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas en base a lo descrito por Zippel et al., 2003. La extracción se realizó de la vena espinal, erróneamente llamada “vena yugular interna”, a partir de un seno occipital sobre la médula y que se extiende a lo largo de la columna vertebral. En este caso, fue alcanzada a la altura de las placas óseas post occipitales (Figura 23).

La sangre fue extraída con jeringas de 3, 5 y 10 ml dependiendo del volumen necesario para cada estudio y en relación con el tamaño del animal. Las agujas utilizadas fueron 25 G 0,5 mm para los animales pequeños y 21 G 1 mm para los más grandes. En todos los casos, se usó heparina como anticoagulante debido a que ejerce su efecto acelerando la formación de complejos moleculares entre la antitrombina III y los factores II (trombina), IX, X, XI, XII, y no sobre los iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) que son considerados componentes esenciales de la cascada de activación del SC del suero humano (Morgan, 2008) y de *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2005a).



Figura 23. Extracción de sangre de los animales recién nacidos y en la naturaleza.

Inmediatamente extraída la sangre, fue sometida al proceso de centrifugación excepto cuando los muestreos en el medio silvestres en donde fueron previamente refrigeradas hasta el proceso de separación del plasma. Este se realizó a temperatura ambiente a 450 g durante 20 minutos. El plasma fue refrigerado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las determinaciones que se realizaron dentro de los siete días, y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para las determinaciones posteriores.

3.2 Identificación de actividad antimicrobiana en el plasma de *C. latirostris*

Fueron utilizados ensayos bactericidas *in vitro* para medir las actividades del plasma de *C. latirostris*, *Gallus gallus* y humano frente a *E. coli* ATCC 11105 a diferentes intervalos de tiempo (*Reference guidelines from the National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS*)

3.2.1 Ejemplares

La extracción de sangre fue realizada a partir de los animales que se encontraban dentro del plantel del PY, bajo las condiciones mencionadas. La extracción fue realizada a 16 yacarés de 18 meses de edad aproximadamente y con una longitud total entre 80 y 100 cm.

Las gallinas fueron cedidas por una granja comercial de producción de huevos. Se obtuvo muestras de sangre por punción cardíaca de 4 animales de 8 meses de edad aproximadamente y su peso varió entre 1,800 y 2000 g.

Las muestras de sangre humana fueron obtenidas a partir de un grupo de 3 voluntarios a los cuales se les realizó una extracción de sangre venosa de la vena cubital. Estas personas estaban aparentemente saludables y no se encontraban bajo ningún tratamiento antimicrobiano. Todas las muestras fueron manipuladas de la misma manera en que fueron descritas en la sección 3.1.2.

3.2.2 Cepas de *Escherichia coli*

La elección de *Escherichia coli* fue realizada en base a que es un microorganismo que posee cepas patógenas y otras que forman parte de la flora normal intestinal pero a su vez, cuando se producen ciertos desequilibrios, son agente causal de una variedad de enfermedades en humanos y animales (Doyle et al., 2006). De la misma forma, estos microorganismos son detectados en líquidos y objetos que han estado en contacto con materia fecal como sucede, por ejemplo, en el caso de las piletas de los criaderos de cocodrilianos, aves, etc.; y otras superficies relacionadas.

Para el ensayo antibacteriano fue utilizada la cepa de *E. coli* ATCC 11105. La cepa bacteriana *E. coli* estaba preservada en glicerol (25%) a -20°C. Se realizó un repique para enriquecer el cultivo en caldo LB (Luria-Bertoni). Este proceso de enriquecimiento se repitió cada vez que fueron llevados a cabo los ensayos en diferentes días. Paralelamente se realizaron las pruebas de coloración de GRAM y bioquímicas correspondientes para comprobar su pureza.

El cultivo de *E. coli* fue distribuido mediante la metodología de sembrado en cinco estrías sobre agar nutritivo (Britania, Argentina) en placas de Petri e incubado a 37 °C durante 18 horas para obtener los microorganismos en la fase exponencial de crecimiento.

3.2.3 Ensayo de inhibición de crecimiento en placa

A partir del cultivo en agar nutritivo de *E. coli* en fase logarítmica de crecimiento, se tomaron algunas colonias y se resuspendieron en solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala de turbidez Mc Farland (lo que corresponde a 10^8 células ml^{-1} , aproximadamente). El grado de turbidez fue comparado con estándares en la misma escala.

Se tomaron 100 μl de la solución salina con las bacterias y se le agregaron 900 μl de plasma de yacaré, gallina o humano. Para obtener diluciones seriales, se prepararon tubos con 900 μl de solución salina, se agregó 100 μl de la solución inicial, y así sucesivamente hasta alcanzar una dilución de 10^{-10} . Luego de diferentes tiempos (0, 1, 3 y 6 hrs), se tomaron 100 μl de cada dilución serial y se distribuyó sobre la superficie de agar nutritivo en placas de Petri y se los incubó a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron las placas en las que se pudo contabilizar entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC).

El tiempo 0 correspondió al momento en que la muestra de plasma y la solución salina con *E.coli* se pusieron en contacto e inmediatamente fueron vertidos sobre la superficie del agar.

Para testear el normal desarrollo de las etapas del experimento se llevaron a cabo controles paralelos con soluciones salinas de *E.coli* sin plasma. Los experimentos fueron llevados a cabo por cuadruplicado. La cantidad de UFC final fue calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{UFC/ml} = \text{Media UFC} \times \text{factor de dilución} \times 10 \text{ (dilución para la solución 0,5 McFarland)}$$

3.2.4 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron expresados como media \pm error estándar. El test estadístico aplicado fue el de Kruskal–Wallis para comparar CFU/ml entre las muestras de plasma, las réplicas y los individuos al mismo tiempo seguido por el post-test de Mann-Whitney en los casos donde fue necesario. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de $p \leq 0,05$.

3.3 Identificación y caracterización del sistema del complemento en *C. latirostris* y *C. yacare*

Este estudio se llevó a cabo para identificar y caracterizar el sistema del complemento en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* en función de la temperatura de incubación, concentración del suero y cinética de reacción, mediante la prueba del hemólisis de glóbulos rojos de oveja (SRBC del inglés “*sheep red blood cells*”).

3.3.1 Ejemplares

Se utilizaron cuatro ejemplares de *C. latirostris*, todos con una longitud total entre 142 y 168 cm, provenientes del ambiente semi-natural ubicado dentro de las instalaciones del PY. Los animales pertenecientes a la especie *C. yacare* fueron capturados en la provincia de Corrientes (ver sección 3.1.1), incluyendo cinco ejemplares con una longitud total entre 110 y 198 cm. El tratamiento realizado a las muestras de sangre extraída fue detallado en la sección 3.1.2.

3.3.2 Prueba de hemólisis de glóbulos rojos de oveja

El ensayo de hemólisis de SRBC se basa en la ruptura de los SRBC por las proteínas inmunológicas circulantes en el plasma. Estas proteínas reconocen a los SRBC como antígenos y provocan la activación de la cascada del SC, que culmina en la

formación de un complejo proteico que genera un poro (CAM) en la membrana de los SRBC y la posterior lisis de los mismos. La consecuente liberación de hemoglobina es registrada por espectrofotometría y se considera proporcional a la actividad del SC. Este ensayo es utilizado en forma rutinaria para evaluar el SC en los laboratorios clínicos (Kirschfink & Mollnes, 2003) y fue adaptado para el análisis del mismo en el suero de los cocodrilianos por Merchant et al. (2006a).

3.3.2.1. Descripción de la prueba de hemólisis de SRBC

Para caracterizar el SC de *C. latirostris*, los SRBC fueron obtenidos a partir de sangre entera heparinizada extraída de ovejas merino (*Ovis aries*) en la Estación Zoológica Experimental, ciudad de Santa Fe, Argentina.

La sangre de oveja fue centrifugada a 450 g durante 20 min y el sobrenadante fue descartado, realizándose lavados repetidos con una solución de *buffer* fosfato salino (PBS, pH 7.4) hasta clarificar el sobrenadante. Después del último lavado, se preparó una solución al 2% (v/v) de SBRC con el mismo *buffer* a partir del paquete globular.

Para evaluar la especificidad del método se detectó la actividad del plasma previamente tratado con dos inactivadores del complemento: el calor y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se prepararon tres soluciones: plasma de yacaré sin tratamiento, plasma de yacaré tratado con EDTA 50 mM y plasma de yacaré calentado a 56°C durante 30 min. A cada una de estas soluciones se le agregó 1 ml de SRBC 2% (v/v) durante 30 min.

Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente de laboratorio (25 °C ± 2 °C), a excepción del ensayo en el que se evaluó el efecto de la temperatura, para equiparar las condiciones con otros estudios realizados previamente en diferentes especies. Asimismo, en todos los ensayos realizados el plasma de yacaré se incubó con SRBC durante 30 minutos, excepto en el estudio en el que se evaluó la cinética de reacción del SC, donde se variaron los tiempos de incubación.

En todos los ensayos, luego de la incubación, la solución fue centrifugada a 2500 x g durante 5 minutos (Figura 24). Posteriormente, se tomaron 300 μ l de sobrenadante y se lo transfirió a una microplaca para medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 540 nm (Labsystem Multiskan RC, Helsinki, Finland).

Para obtener un control positivo, se agregó 2 μ l de Triton X-100 a 1 ml de solución de SRBC al 1% y se homogeneizó varias veces con una jeringa de tuberculina, hasta obtener la hemólisis completa. Esta fue confirmada por la observación a 400 X en un microscopio óptico (Olympus BH-2, Olympus Co., Japan). Las réplicas de esta solución fueron centrifugadas y se midió la densidad óptica del sobrenadante. El resultado obtenido fue considerado como la máxima hemólisis (MH).

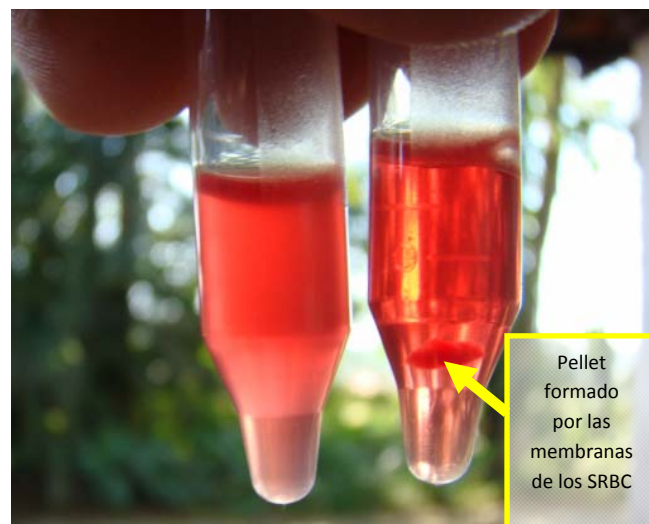


Figura 24. En esta imagen se puede observar coloración rojiza de la hemoglobina que posee el sobrenadante del eppendorf de la derecha como consecuencia de la hemólisis provocada por el plasma de yacaré. En el mismo, se puede apreciar el pellet formado por las membranas de los globulos rojos de oveja (SRBC) resuspendidas que se formó luego de la centrifugación a diferencia del otro en el cual no se detectó actividad hemolítica.

La concentración hemolítica (CH_{50}) se obtuvo por el método propuesto por Mayer (1967) y representa la concentración de plasma requerida para producir el 50 % de la MH de una solución de SRBC al 1% en un volumen de reacción de 1 ml.

Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado con diferentes muestras de plasma y el resultado de la hemólisis de SRBC en cada experimento se dividió por la absorbancia del control positivo para obtener el porcentaje máximo de hemólisis (%MH). Los resultados se expresan como el media del %MH \pm error estándar (E.E.).

3.3.2.2 Influencia de la temperatura sobre la actividad hemolítica del sistema del complemento

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el SC del yacaré, se tomaron alícuotas de plasma de yacaré y SRBC se sometieron a diferentes temperaturas (5 a 45 °C, con intervalos de 5 °C) durante 15 min. Luego, se combinaron 0,5 ml de plasma y 0,5 ml de la solución de SRBC al 2 % (v/v) y nuevamente se llevaron a la temperatura deseada durante 30 min. Con la finalidad de detener la reacción, una vez transcurrido el tiempo requerido, se colocaron las muestras en un baño con hielo y luego se midió la absorbancia, de acuerdo a la metodología ya descripta.

3.3.2.3 Influencia del tiempo de incubación del plasma sobre la actividad hemolítica del sistema complemento

Para caracterizar la cinética de la hemólisis producida por el plasma de yacaré, se incubaron 25 ml de plasma combinado con 25 ml de la solución de SRBC al 2 % (v/v). De esta combinación, se tomaron alícuotas de 300 μ l en diferentes intervalos de tiempo (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 min) y luego se midió la absorbancia.

3.3.2.4 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad hemolítica del sistema complemento

Para el estudio de la relación existente entre la concentración del plasma y la hemólisis de SRBC, se incubaron diferentes concentraciones de plasma de yacaré (desde 0 a 50%, con intervalos de 5 %) con 0,5 ml de solución de SRBC al 2 % SRBC (v/v) llevado a un volumen final de 1ml con PBS, durante 30 min.

3.3.2.5 Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se testeó con la prueba de Kolmogorov–Smirnov y la homogeneidad de varianza entre los grupos se verificó mediante el test de Levene. Para detectar diferencias entre el %MH del suero tratado (calor y EDTA) y no tratado se utilizó un ANOVA de una vía. Se emplearon análisis de regresión para describir los efectos de la temperatura, el tiempo y concentración sobre la hemólisis de SRBC de las dos especies de yacaré. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

3.4 Comparación de la actividad hemolítica del sistema del complemento de *C. latirostris* con otras especies

Con el objetivo de comparar la actividad hemolítica del plasma de *C. latirostris* con la de otras especies, se extrajeron muestras de sangre de aves, reptiles, y mamíferos domésticos y silvestres.

3.4.1 Ejemplares

Las muestras de *C. latirostris* se obtuvieron de los animales en cautiverio pertenecientes al plantel del PY (sección 3.1.1).

Las muestras de plasma de las otras especies utilizadas en este estudio comparativo fueron:

✓ Aves: pato crestón (*Netta peposaca*; n = 3), pato doméstico (*Anas domesticus*; n = 3) y ganso coscoroba (*Anser anser domesticus*; n = 4).

✓ Mamíferos: aguara guazú (*Chrysocyon brachyurus*; n = 2), mono araña (*Ateles chamek*; n = 2) y caballo (*Equus caballus*; n = 2).

✓ Reptiles: iguana overa (*Tupinambis merianae*; n = 5) y dos especies de tortugas acuáticas (*Phrynops hilarii*; n = 4, y *Trachemys dorbigni*; n = 3)

En el caso de las aves, la extracción se realizó de la vena braquial; en los mamíferos de la vena yugular y en el caso de las iguanas y tortugas, de la vena caudal.

El tratamiento de las muestras de sangre fue el mismo que fue descrito para yacarés en la sección 3.1.2.

3.4.2 Prueba de hemólisis comparativa entre animales de diferentes especies

Para realizar un estudio comparativo entre las propiedades hemolíticas de los plasmas de diferentes animales frente a SRBC, cada muestra fue tratada de manera independiente siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.2.1.

Nuevamente, se realizó el ensayo de validación del ensayo con el plasma de cada una de las especies tratadas con calor y EDTA, y no tratadas.

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente de laboratorio ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), colocando 0,5 ml de plasma de cada animal junto con 0,5 ml de la solución de SRBC al 2 % (v/v). Luego de 30 min de incubación, la mezcla se centrifugó y se tomaron 300 μl de sobrenadante que fue leído en el lector de microplacas.

3.4.3 Análisis estadístico

La normalidad y homogeneidad de varianza de los datos se verificaron mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov y de Levene, respectivamente. Para detectar diferencias en el %MH del plasma de cada especie tratado (con calor y EDTA) y no tratado, así como diferencias entre las especies, se utilizó un ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey para identificar los grupos diferentes. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

3.5 Evolución de la actividad del sistema del complemento de *C. latirostris* durante los primeros meses de vida

3.5.1 Ejemplares

Se tomaron al azar 40 pichones de *C. latirostris* correspondientes a 5 nidos diferentes (8 de cada nido) cosechados e incubados artificialmente como parte de las actividades del PY. Estos animales fueron mantenidos en las piletas de crianza de dicho proyecto, en condiciones controladas descritas previamente. Las primeras muestras se tomaron a las 48 hs de nacidos y luego cada 30 días hasta alcanzar los 6 meses de edad de los animales. El manejo de las muestras fue similar al descrito en la sección 3.1.2.

3.5.2 Determinación de la capacidad hemolítica del plasma de *C. latirostris*

Para este estudio, se realizó el mismo protocolo de ensayo y la expresión de los resultados se hicieron en base a lo descrito en la sección 3.4.2. Cabe destacar que todas las muestras fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la obtención de la última serie de muestras para realizar todas las determinaciones en forma simultánea.

3.5.3 Análisis estadístico

Al conjunto de datos obtenidos se le aplicó el test de Kolmogorov–Smirnov y el test de Levene para comprobar la normalidad y la homogeneidad de varianza, respectivamente. Se utilizó un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para detectar diferencias en el %MH entre nidos y a distintos meses de edad. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p \leq 0,05$.

3.6 Efecto de la radiación UV sobre el sistema complemento

Este estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto de la exposición a luz artificial UV/visible (UVR) y a luz solar sobre el crecimiento y el SC de *C. latirostris*.

3.6.1 Ejemplares

Se seleccionaron 96 pichones de *C. latirostris* de 5 meses de edad aproximadamente, provenientes de 4 nidos que formaban parte del PY. Todos los animales eran similares en tamaño y se encontraban aparentemente en buen estado de salud. Los mismos fueron mantenidos en las piletas de crianza del PY desde su nacimiento hasta el momento del experimento. Las condiciones durante el experimento fueron las mismas en las que se encontraban previamente los animales (temperatura, composición del alimento, frecuencia de alimentación y de limpieza, etc.), de manera de no introducir un factor de variación extra en los animales.

Cada animal se identificó con caravanas numeradas (Monel Natl Band and Tag CO., Newport, Kentucky, USA, 1005-1) en la membrana interdigital de ambas patas posteriores (Figura 25). Posteriormente, 3 animales de cada nido fueron aleatoriamente asignados a cada una de las 2 réplicas de cada tratamiento (12 yacaré por réplica).

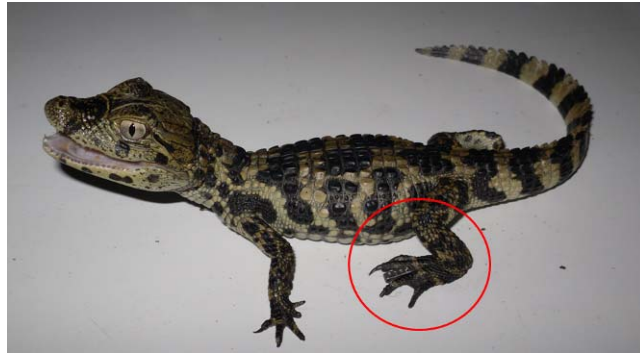


Figura 25. Identificación individual de los animales con dos caravanas metálicas numeradas.

3.6.2 Tratamientos de exposición a radiación UV

El estudio tuvo una duración de 100 días. Se llevó a cabo en 8 cámaras plásticas (96 cm de largo, 41 cm de ancho y 42 cm alto, superficie = 0.39 m²) que contenían alrededor del 60 % de la superficie seca y 40 % con agua. La temperatura interior se mantuvo a 31± 2 °C y se monitoreó con termómetros almacenadores de datos Hobo[®] (Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA).

Los tratamientos experimentales fueron diseñados de la siguiente manera:

- OT: oscuridad total
- 8h: ocho hs por día de exposición artificial a luz UVR.
- 16h: 16 hs por día de exposición artificial a luz UVR.
- FN: fotoperíodo normal con 9,5-10,5 hs de luz natural, aproximadamente.

Durante todo el estudio, en los tratamientos de 8 y 16 hs diarias de luz UVR, el tiempo restante hasta completar las 24 hs diarias los animales permanecieron en completa oscuridad hasta el período siguiente.

Este estudio se realizó en la provincia de Santa Fe, Argentina, donde la media de irradiancia solar durante la época del año en que se realizó el experimento fue de 150 W/m^2 , aproximadamente (Ceballos et al., 2005). Solamente el 1,3 % de la luz UV emitida por el sol alcanza la superficie de la tierra, a su vez, se compone por el 95 % de UVA y el 5 % de UVB mientras que el resto es fuertemente absorbido por el ozono atmosférico. Además, en el tratamiento FN, las cámaras estuvieron cubiertas con nylon de baja densidad (Agrotileno IPESA[®]) con un filtro de UV del 2%, para evitar la pérdida de la temperatura. Bajo estas condiciones, los animales del tratamiento FN estuvieron expuestos a una irradiancia de 147 W/m^2 (150 W/m^2 – el 2 % de lo que es filtrado por el nylon). La luz artificial UV/visible fue suministrada por una lámpara de luz visible/UV de 18 watt, frecuentemente utilizada en la crianza de reptiles (UVA 30% y UVB 5%; Sylvania Reptistar[®]) colocada a 0,45 m de altura desde la base de la cámara plástica. Bajo estas condiciones, la lámpara emite una irradiancia de $45,73 \text{ W/m}^2$ (Irradiancia = potencia de la lámpara /superficie de la cámara plástica).

En todos los tratamientos, las cámaras estuvieron cubiertas con tela media sombra (con 95 % de filtro de radiación solar) cubriendo la mitad de las mismas, proporcionando un área oscura en la parte seca y la parte con agua. La irradiancia recibida bajo esta superficie oscura en los tratamientos con UVR fue de $2,29 \text{ W/m}^2$ (95 % de la radiación UV fue filtrada), y en FN, a $4,5 \text{ W/m}^2$ (150 W/m^2 - 97 % que es filtrado por el nylon más la media sombra) (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de la cantidad de radiación recibida en los tratamientos de exposición a radiación ultravioleta (UVR), oscuridad total (OT) y fotoperíodo normal (FN), con y sin media sombra.

Tratamiento	Irradiancia (W/m^2)	Irradiancia superficie cubierta (W/m^2)
OT	0	0
8 h	45,73	2,29
16 h	45,73	2,29
FN	147	4,5

3.6.3 Determinación del crecimiento y de la actividad del sistema complemento

Para evaluar el crecimiento de los animales, se midió la longitud (precisión 0,1 cm) desde el hocico hasta la cloaca (LHC) de cada animal al inicio y al final del estudio. Se optó por esta medición por ser más conservadora debido a que en muchos casos se puede producir la pérdida del extremo de la cola, por lo tanto, la medida de la longitud total no sería representativa del crecimiento alcanzado.

La extracción de sangre sólo se realizó al final del experimento para evitar cualquier daño que pudiera resultar en secuelas o muerte de algún animal al inicio del mismo. Las muestras se trataron como se explicó en la sección 3.1.2.

Para evaluar los efectos de los diferentes períodos de exposición a UVR sobre el SC se utilizó la prueba de hemólisis de SRBC de la misma manera se detalló en la sección 3.4.2.

En este caso, se repitió el ensayo de validación de la técnica hemolítica de SRBC frente a los clásicos inhibidores del sistema complemento, el EDTA y el calentamiento previo del plasma a las temperaturas y tiempos mencionados previamente. Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado y los resultados se expresan como porcentaje de máxima hemólisis (%MH; media \pm E.E.).

3.6.4 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue testeada mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov y la homogeneidad de las varianzas fue verificada por el test de Levene. Para evaluar la diferencia de crecimiento (LHC final – LHC inicial) y el %MH de los animales expuestos a los tratamientos de luz artificial UVR, OT, y FN, así como del ensayo de validez del método, se utilizó ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para detectar las diferencias estadísticas entre los grupos. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.7 Inducción de la respuesta inmune luego de una exposición *in vivo* a plaguicidas

Tal como fue mencionado en la Introducción, existe una alta probabilidad de que los yacarés construyan los nidos cerca de cursos de agua contiguos a los cultivos. Por este motivo, tanto los embriones como las crías están expuestos a los plaguicidas utilizados en dichos cultivos. Para evaluar el efecto potencial de los plaguicidas, se realizó un ensayo de exposición subcrónica *in vivo* de neonatos de *C. latirostris* a Roundup® (RU, fórmula comercial de Glifosato [GFT]), en condiciones de laboratorio. Una vez finalizada la exposición, los animales fueron inyectados con una solución de LPS de *E. coli* para evaluar los parámetros de la respuesta inmune.

3.7.1 Ejemplares

Para este estudio se utilizaron 72 ejemplares de *C. latirostris* de 20 días de edad, provenientes de 3 nidos cosechados en la naturaleza, incubados artificialmente y mantenidos bajo condiciones controladas hasta el inicio del tratamiento en las instalaciones del PY. Todos los animales fueron individualizados con caravanas numeradas (Ver sección 3.6.1).

3.7.2 Tratamientos de exposición y concentraciones de plaguicidas

Los animales de cada nido fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales de 24 animales cada uno (ocho de cada nido y dos réplicas de 12 animales por grupo): un control negativo (CN), sin exposición, y dos grupos expuestos a RU, RU1 y RU2.

Los animales fueron mantenidos en bateas plásticas de 75 cm de largo por 35 cm de ancho y 37 cm de altura, inclinados para ofrecer una parte seca y una con agua, dentro de un ambiente calefaccionado (30 ± 1 °C). La temperatura de cada batea se registró mediante un almacenador de datos Hobbo Temp (Onset Computer Corporation, Pocasset, MA, USA), a fin de corroborar que se mantuviera en el rango previamente

establecido. El alimento estuvo compuesto por la misma mezcla ya descrita en 3.1.1 y fue suministrado *ad libitum* tres veces por semana.

La exposición a RU se llevó a cabo en agua (por inmersión) durante dos meses aproximadamente, con renovación cada dos días, alternando con la limpieza de las bateas. Se utilizó la concentración recomendada para la aplicación del RU a campo (al 3%: 3 l/100 l agua/ha) y el doble de la misma (al 6%), a fin de evaluar la relación concentración-efecto. Dicha concentración se aplicó en función de la superficie de base de la batea (0,2622 m²) y fue diluida luego en un volumen de agua constante (5 l). Para simular la metabolización del compuesto en agua a lo largo del tiempo, se fue disminuyendo progresivamente la concentración de RU agregada en cada renovación del agua. Esta determinación fue tomada en base a la cinética de metabolización del GFT, previamente determinada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés “*High Performance Liquid Chromatography*”) con derivatización pre-columna utilizando 9- fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl) como derivatizante (Hogendoorn et al., 1999; García de Llasera et al., 2005), en iguales condiciones que el experimental y durante el mismo tiempo (Figura 26).

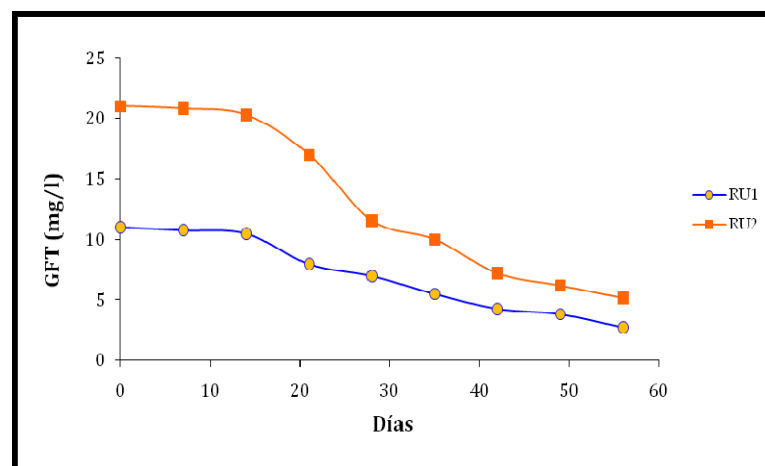


Figura 26: Metabolización de Glifosato (GFT) en agua correspondiente a los grupos de baja concentración (RU1) y alta concentración (RU2) de plaguicida caracterizado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Las concentraciones iniciales y finales de cada grupo experimental se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos experimentales de neonatos de *C. latirostris* y tratamientos aplicados en el Ensayo de exposición *in vivo* a Roundup®.

Grupo experimental	Compuesto	Conc. Inicial (mg/l)	Conc. Final (mg/l)
(CN)	Agua potable	0,00	0,00
RU1	Roundup®	11	2,6
RU2	Roundup®	21	5,0

3.7.3 Inyección de lipopolisacáridos

A los dos días de finalizada la exposición a RU los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de LPS de *E. coli* K-235 (Sigma) a una dosis de 1 mg/kg de peso (Merchant et al., 2006c) como se muestra en la Tabla 4.

Luego de la inyección, los animales fueron mantenidos por 72 hs. hasta el momento de la extracción de sangre bajo las mismas condiciones de exposición en que fue realizado el experimento. El tratamiento de la sangre se hizo de la misma manera como se describiera en la sección 3.1.2, excepto para las determinaciones en la que fue necesario el uso de sangre entera (recuento total y diferencial de leucocitos). El motivo por el cual sólo se realizó la extracción de sangre al final del experimento fue mencionado en la sección 3.6.3.

Tabla 4. Distribución y cantidad de animales inyectados con la solución de LPS y solución salina post-exposición a GFT *in vivo*.

Grupo experimental	Solución inyectada	Nº de neonatos/nido	N/tratam/replica
CN	Solución salina	4	12
CN	LPS	4	12
RU1	Solución salina	4	12
RU1	LPS	4	12
RU2	Solución salina	4	12
RU2	LPS	4	12

3.7.4 Variables morfológicas

Todos los animales fueron medidos en longitud total (LT) y LHC con una precisión de 0,1 cm, y pesados con una precisión de 0,1 gr al inicio y al final del estudio.

3.7.5 Determinación de la actividad del sistema del complemento

La actividad del SC se determinó por el método de hemólisis de SRBC siguiendo el protocolo de trabajo descrito en la sección 3.4.2.

3.7.6 Recuento total y diferencial de glóbulos blancos

El recuento del número total de leucocitos se realizó con sangre entera mediante el uso de la cámara de Neubauer. Se tomó una alícuota de sangre y se la diluyó con una solución de NaCl 0,6% (Lewis et al., 2008) en una proporción de 1:200. La solución de NaCl actúa como agente lisante de los hematíes sin intervenir en la integridad de los leucocitos. Se homogeneizó la mezcla para que actúe dicha solución, se cargó la cámara con el volumen necesario y se dejó reposar durante 5 min para que sedimenten las células; luego se observaron al microscopio óptico a 400x.

El número de leucocitos observados se expresan por mm^3 de sangre y se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucocitos/mm}^3 \text{ de sangre} = (A/V) * f$$

Donde:

A= número de leucocitos contados

V= volumen del cubo (en mm^3) que posee la cámara de Neubauer

f= factor de dilución

Por otro lado, para el recuento diferencial de leucocitos, se realizaron 2 frotis por animal, se fijaron con etanol durante 10 min y se tiñeron con solución de May Grunwald al 50% durante 3 min, y posteriormente, con una solución de Giemsa al 10% durante 20 min. Los preparados fueron codificados para lograr el máximo de objetividad al momento del análisis. Luego se observaron en microscopio óptico a 1000x y se contó la cantidad de cada subtipo de leucocitos clasificados como: heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos, cada 100 leucocitos contados y los resultados se expresaron en porcentajes.

3.7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se evaluaron en normalidad (test de Kolmogorov–Smirnov) y homogeneidad de varianza (test de Levene). Luego se realizó un ANOVA factorial de dos factores: exposición a RU e inyección con LPS. Cuando fue necesario se utilizó como test post-hoc el test de Tukey para identificar los grupos diferentes. Los tratamientos y los nidos se utilizaron como variables de agrupamiento en tanto que el %MH y el recuento total y diferencial de leucocitos como variables de respuesta. La relación entre esas variables y las de crecimiento se estableció mediante regresiones lineales. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p \leq 0,05$.

3.8 Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*

Sobre la base de las múltiples funciones mencionadas y su importante relación como mediador de la respuesta inmune en las especies estudiadas, se llevó a cabo la identificación, caracterización y comparación de la actividad de la enzima DPPIV entre las dos especies de cocodrilianos que habitan en Argentina.

3.8.1 Ejemplares

Las muestras de sangre fueron obtenidas de animales silvestres adultos *C. latirostris* (n= 13: 7 hembras y 6 machos; de 1,51 a 2,31 m de LT) y *C. yacare* (n= 14: 7 machos y 7 hembras de 1,44 a 2,11 m de LT). Los animales fueron capturados en los lugares descritos para *C. latirostris* y *C. yacare* en la sección 3.1.1. Cabe mencionar, que debido a la influencia de la temperatura ambiente en la fisiología de estos animales, en ambos casos el muestreo se realizó durante el verano con pocos días de diferencia entre las capturas de una especie y la otra.

Se mantuvo el mismo protocolo de extracción y procesamiento de las muestras que fue descrito en la sección 3.1.2 para los animales en estado silvestre.

3.8.2 Descripción del ensayo para determinar DPPIV plasmática

Para caracterizar la actividad de la enzima DPPIV, se utilizó como referencia el ensayo de determinación de DPPIV en plasma y sangre entera desarrollado para *A. mississippiensis* por Merchant et al. (2009b). Este se basa en la capacidad que posee la enzima para liberar dipéptidos a partir de la hidrólisis del sustrato Ala-Pro-AFC (Anaspec, San José, CA). La reacción comienza con la mezcla del plasma de yacaré con un *buffer* de iniciación (100 mM Tris HCl, pH 7.4) y finaliza con el agregado de un *buffer* de finalización (100 mM Tris HCl, pH 7.4, 15 mM EDTA). La enzima requiere cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) para ejercer su función. En base a este requerimiento, el *buffer* de finalización tiene el agregado de EDTA, como inhibidor de la proteasa, por su actividad quelante de esos cationes (Gherzi et al., 2006) (Figura 3.7).

Como en los casos anteriores, todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente de laboratorio para poder comparar los resultados con otros estudios previos reportados (excepto en los que se midió la variación de la temperatura) y la incubación se realizó durante 60 min (excepto en los ensayos que se evaluaron las variaciones de la enzima en función del tiempo). Luego del agregado del *buffer* de finalización, las mezclas se transfirieron a cubetas para medir la intensidad de fluorescencia en un

espectrofluorómetro. La actividad de DPPIV en las muestras de plasma de yacaré produjo el clivaje del sustrato en AFC y el dipéptido, generando diferentes intensidades de fluorescencia que se midieron en un fluorómetro a una λ de 395 nm de excitación y 530 nm de emisión.

Asimismo, se evaluaron los efectos de la Diproteína A (Leu-Pro-Leu, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) sobre la hidrólisis de Ala-Pro-AFC. Umezawa et al. (1984) reportaron que la Diproteína A es un potente inhibidor para la enzima DPPIV por competencia con el sustrato (Figura 27). A muestras de plasma se agregaron diferentes cantidades de Diproteína A y las combinaciones se trataron siguiendo los mismos pasos realizados cuando se determinó la actividad de la enzima DPPIV.

Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresan como nmol de producto creado (media \pm E.E.).

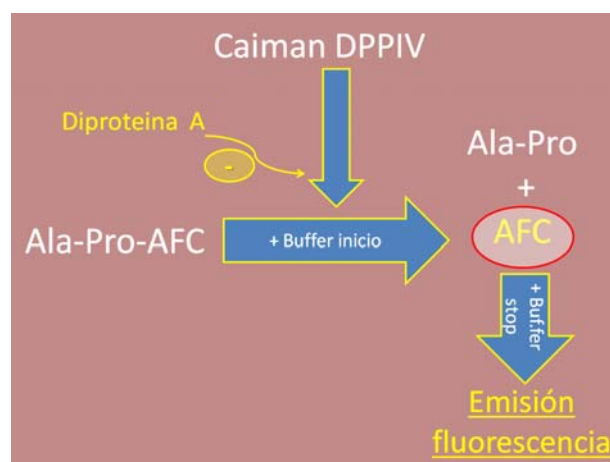


Figura 27. Esquema del ensayo utilizado para la determinación de la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en plasma de yacaré.

3.8.3 Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima DPPIV

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima DPPIV en el plasma *C. latirostris* y *C. yacare*, se llevó a cabo un ensayo a diferentes temperaturas

(desde 5°C a 40°C con intervalos de 5°C). Previo al agregado del sustrato, se colocaron 50 µl de plasma de yacaré junto a 700 µl del *buffer* de inicio y se llevaron a la temperatura deseada durante 15 min. Luego, se agregaron a esta mezcla preliminar 10 µl de Ala-Pro-AFC 2.5 mM y se incubaron a la misma temperatura. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregaron 700 µl del *buffer* de finalización.

3.8.4 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad de la enzima DPPIV

Para estudiar la dependencia de la concentración del plasma en la actividad DPPIV, se agregaron diferentes volúmenes de plasma de yacaré (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 o 200 µl), 10 µl de Ala-Pro-AFC 2,5 mM y *buffer* de iniciación (csp) hasta alcanzar un volumen final de 750 µl. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de 30 min, se detuvo la reacción mediante el agregado del *buffer* de finalización.

3.8.5 Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima DPPIV

Para determinar la cinética de la actividad de la enzima DPPIV, se realizó la incubación a diferentes intervalos de tiempo. Se mezclaron 2 ml de plasma de yacaré, 27,7 ml de *buffer* de ensayo y 400 µl de Ala-Pro-AFC 2.5 mM. A diferentes intervalos de tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 min), se retiraron 760 µl de esta mezcla y se les agregó 700 µl del *buffer* de finalización para detener la reacción.

3.8.6 Análisis estadístico

El efecto de la temperatura, la concentración y la cinética de reacción se analizaron por medio de regresiones lineales para cada especie. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p \leq 0,05$.

3.9 Fosfolipasa A2 (PLA2) en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*

Debido a la importante función que cumple la enzima PLA2 en la generación de mensajeros en la respuesta inmune innata. Se realizaron ensayos para identificar y caracterizar la actividad de esta enzima en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.

3.9.1 Ejemplares

Se utilizaron muestras de los mismos animales capturados como fuera detallado en la sección 3.8.1.

3.9.2 Cultivo bacteriano

Para esta determinación se utilizó la misma cepa *E. coli* ATCC 11105 como en la sección 3.2.2. Se realizó el mismo tratamiento de enriquecimiento con la excepción de que se tomó un ml del cultivo bacteriano en LB y se repicó en un l de caldo nutritivo. Posteriormente, se agregó a ese cultivo 1 mg de BODIPY[®] FL C₁₆ (ácido 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-hexadecanoico; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) disuelto en 1 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) y se llevó a incubación a 37 °C durante 18 hs. Luego, el cultivo se centrifugó a 8000 x g por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una solución de NaCl al 0,9 %. Este proceso se realizó 2 veces. Por último, se resuspendió el pellet con 30 ml *buffer* de ensayo (1 mM Ca²⁺ en 100 mM tris-HCl, pH 7,4).

3.9.3 Descripción del ensayo para la determinación de PLA2 plasmática

Este ensayo se desarrolló para medir la actividad de la enzima PLA2 secretada en el plasma. Se utilizó BODIPY para marcar fluorescentemente un ácido graso que se une en la posición sn-2 de los fosfolípidos. En presencia de estos, las bacterias en multiplicación incorporan esta macromolécula como parte de la membrana externa.

Cuando estas bacterias son sometidas a la actividad de la enzima PLA2, el ácido graso sn-2 marcado es hidrolizado quedando liberado de las membranas fosfolipídicas de las bacterias en el *buffer* de ensayo. El pellet formado contiene las bacterias con el ácido graso marcado en la membrana mientras que el liberado se encuentra en el sobrenadante y es medido por espectrofluorometría (Figura 28). La actividad de PLA2 se midió en un espectrofluorómetro a una λ de 500 nm de excitación y 510 nm de emisión.

Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se expresaron como unidades de fluorescencia (UF) \pm E.E.

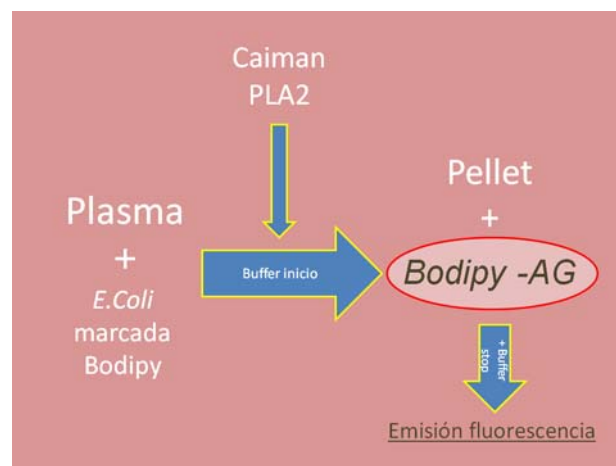


Figura 28. Esquema del ensayo utilizado para la determinación de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) en plasma de yacaré.

3.9.4 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de la enzima PLA2

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PLA2 se realizaron ensayos a diferentes temperaturas (desde 5°C a 40°C con intervalos de 5°C). Previo al inicio de la reacción, tubos con 950 μ l del *buffer* de iniciación, otros con 50 μ l de la solución que contiene la bacteria marcada y otros con 100 μ l de plasma de yacaré se llevaron por separado durante 15 min a la temperatura a estudiar. Luego, se

mezclaron los componentes de la reacción, se incubaron por 30 min en la misma temperatura y se les agregó 900 μ l del *buffer* de finalización (50 mM EGTA en 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Se centrifugaron a 16000 x g durante 5 min y el sobrenadante obtenido fue medido por espectrofluorometría.

3.9.5 Influencia de la concentración del plasma en la actividad de la enzima PLA2

Para la determinación del efecto de la concentración del plasma sobre la actividad PLA2, se agregaron diferentes cantidades de plasma de yacaré (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 μ l) y suficiente cantidad de *buffer* de ensayo hasta alcanzar un volumen final de 750 μ l; luego se agregó una cantidad fija de 100 μ l de la solución que contiene la bacteria *E. coli* marcada y se incubaron durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con el agregado de 750 μ l del *buffer* de finalización. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se colocó en cubetas plásticas para determinar la intensidad de fluorescencia de cada muestra.

3.9.6 Influencia del tiempo de incubación en la actividad de la enzima PLA2

Para evaluar la cinética de reacción de la actividad de la enzima se mezclaron 3,5 ml de suero, 1,75 ml de la solución que contiene la bacteria con el marcador fluorescente y 33,25 ml del *buffer* de iniciación. A distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 min) se extrajo 1,1 ml y se agregó a 900 μ l de *buffer* de finalización, se centrifugaron y el sobrenadante se midió espectrofluorométricamente.

3.9.7 Análisis estadístico

El efecto de la temperatura, la concentración y la cinética de reacción de la actividad de PLA2 fueron analizadas por medio de regresiones lineales para cada especie. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p \leq 0,05$.



Resultados

4. Resultados

4.1 Identificación de la actividad antimicrobiana en *C. latirostris* mediante el ensayo de inhibición de crecimiento en placa

En este estudio se detectó que los sueros de las tres especies demostraron tener actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 11105 con diferencias entre las especies y el tiempo (Figura 29).

Al tiempo 0, la actividad antibacteriana del plasma de *C. latirostris* demostró ser más rápida y potente comparada con el plasma de gallina y de humano ($p < 0,001$), siendo este último el de menor capacidad para impedir el crecimiento de *E. coli* de las tres especies estudiadas. Lo mismo se observó luego de 1 hora de exposición ($p < 0,001$).

A las 3 horas de exposición, no hubo diferencias entre las UFC contabilizadas en los cultivos con plasma humano y de gallina ($p > 0,05$) pero sí se encontraron diferencias entre éstos y el plasma de yacaré ($p < 0,001$).

Luego de las 6 hs de exposición, la cantidad de UFC de *E. coli* contabilizadas en el cultivo con plasma de yacaré fue menor de 30. El cultivo con plasma humano demostró tener un efecto menor sobre *E. coli* que aquel con plasma de gallina ($p < 0,001$). A su vez, no hubo diferencias en la actividad antibacteriana entre las réplicas ni entre los individuos de ninguna especie ($p > 0,05$).

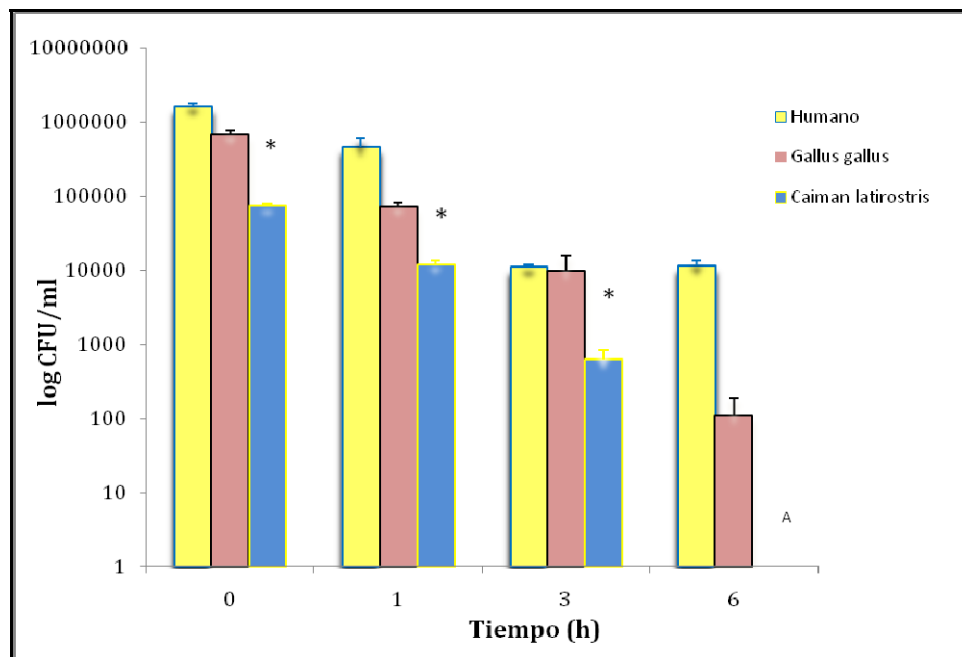


Figura 29. Actividad antibacteriana del plasma de yacaré overo, gallina y humano expuesto a *E. coli* en función del tiempo de incubación. Las unidades formadoras de colonias se expresan como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) y corresponden a la media de las UFC contadas en las diluciones seriadas que contenían entre 30 y 300 UFC. El cálculo de UFC/ml se obtiene en base a la fórmula expresada la sección 3.2.3. En todos los tiempos evaluados, el plasma de *C. latirostris* tuvo una mayor actividad antibacteriana que el plasma de *G. gallus* y humano (* $p < 0,001$). A = no fue detectada.

4.2 Identificación y caracterización del sistema del complemento en *C. latirostris* y *C. yacare*

4.2.1 Identificación e inhibición de la actividad del sistema del complemento mediante la prueba de hemólisis de glóbulos rojos de oveja

Los datos representados en la Figura 30, demuestran la capacidad que tiene el plasma de ambas especies de yacaré para destruir las membranas de los glóbulos rojos de oveja. En este caso, se comparan el %MH de SRBC provocado por el plasma de *C. latirostris* y el de *C. yacare* sin tratamiento ($92,8 \pm 4,15$ % y $90,9 \pm 3,85$ %, respectivamente), con los tratados con EDTA ($14,4 \pm 2,41$ %) y con calor ($17,2 \pm 2,17$ %), ambos factores considerados como inactivadores del SC (Morgan, 2008). La

absorbancia registrada indicó un importante descenso en el %MH cuando el plasma fue tratado con los inhibidores mencionados ($p < 0,001$).

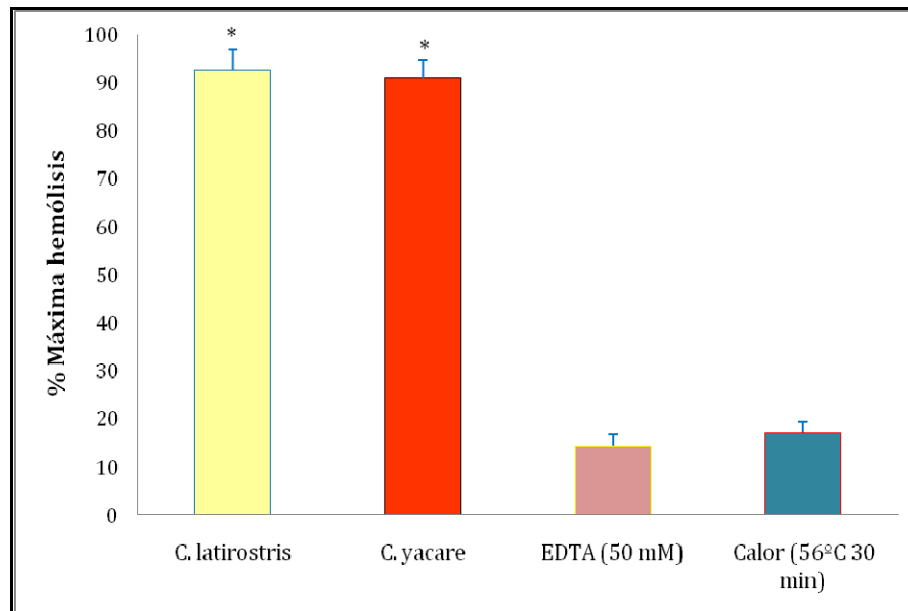


Figura 30. Efecto del tratamiento del plasma con EDTA (50 mM) y calor (56°C 30 min) sobre la hemólisis de glóbulos rojos de oveja (SRBC). El plasma no tratado demostró una capacidad muy superior (* $p < 0,001$) para lisar los SRBC respecto al tratado con EDTA y calor.

4.2.2. Influencia de la temperatura de incubación del plasma sobre la actividad del sistema complemento.

El efecto de la temperatura de incubación del plasma de ambas especies sobre la capacidad de hemólisis de SRBC se presenta en la Figura 31. El suero de yacaré demostró una fuerte correlación positiva entre la temperatura y el %MH ($p < 0,001$; $r^2 = 0,98$ y $r^2 = 0,92$ para el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*, respectivamente). En ambas especies, el %MH más alto se detectó cuando la combinación del suero con la solución de SRBC se incubó a 35°C (*C. latirostris*: $99,30 \pm 2,85$ %; *C. yacare*: $98,90 \pm 3,95$ %). Contrariamente, la actividad del plasma más baja detectada fue a los 5°C (*C. latirostris*: $13,64 \pm 0,61$ %; *C. yacare*: $9,26 \pm 1,72$ %). Esta capacidad que posee el

plasma para alterar la integridad de la membrana de los SRBC aumentó levemente con la temperatura (*C. latirostris*: 10°C: 15,44 ± 2,76 %; 15°C: 31,79 ± 2,55 y 20 °C: 60,05 ± 2,51; *C. yacare*: 10°C: 10,09 ± 3,81 %; 15°C: 20,33 ± 3,33 % y 20°C: 45,21 ± 2,65 %). Asimismo, se registró un aumento de alrededor del 20 % a las temperaturas de 25 a 35°C (*C. latirostris*: 25°C, 62,80 ± 1,94 %; 30°C, 95,53 ± 1,98 %; 35°C, 99,2 ± 1,1 % y *C. yacare*: 25°C: 69,72 ± 4,73 %; 30°C: 95,01 ± 1,13; 35°C, 98,9 ± 3,13 %). Luego de este pico, se observó una pequeña reducción en la hemólisis a 40 y 45°C (*C. latirostris*: 95,61 ± 2,20 % y 88,36 ± 1,10 %; *C. yacare*: 96,09 ± 2,58 % y 90,33 ± 3,13 %, respectivamente).

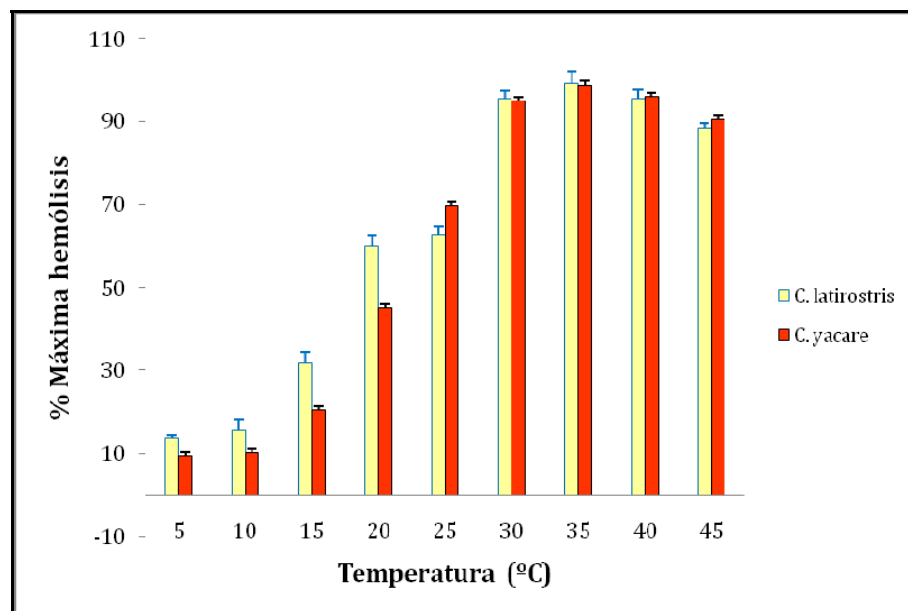


Figura 31. El plasma de ambas especies de yacaré fue incubado con una solución de globulos rojos de ovejas (SRBC) al 1 % (v/v) a diferentes temperaturas (5°C a 45°C, con intervalos de 5°C). Los resultados registrados para las dos especies demostraron una correlación positiva entre la temperatura y el porcentaje de máxima hemólisis ($p < 0,001$; $r^2 = 0,98$ y $r^2 = 0,92$ para el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*, respectivamente)

4.2.3 Influencia de la concentración del plasma sobre la actividad del sistema complemento

La capacidad del plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* para alterar la estructura normal de la membrana del SRBC provocando la hemólisis de los mismos demostró tener una relación positiva ($p < 0,001$) dependiente de la cantidad de plasma (Figura 32). La incubación de una solución de SRBC sin el agregado de plasma de yacaré, demostró una hemólisis a temperatura ambiente de $3,43 \pm 2,75$ %.

La hemólisis de SRBC aumentó progresivamente con una concentración de plasma de yacaré de 5 a 25 % en ambas especies, exhibiendo los siguientes porcentajes de hemólisis máximas: *C. latirostris*: 5 %: $17,64 \pm 2,67$ %, 10 %: $32,03 \pm 1,25$ %, 15 %: $53,44 \pm 3,64$ %, 20 %: $60,42 \pm 2,89$ %, 25 %: $79,39 \pm 4,71$ %; *C. yacare*: 5 %: $13,44 \pm 4,13$ %, 10 %: $33,71 \pm 3,99$ %, 15 %: $48,40 \pm 2,65$ %, 20 %: $51,88 \pm 3,01$ %, 25 %: $69,86 \pm 1,94$ %, respectivamente. A partir de la concentración de 30 % se produjo un *plateau* en el % MH en ambas especies, con un incremento leve a concentraciones mayores que alcanzó su máximo a 50 % de plasma (*C. latirostris*: 30 %: $85,94 \pm 1,75$ %, 35 %: $87,03 \pm 1,31$ %, 40 %: $87,88 \pm 3,20$ % y 45 %: $88,63 \pm 2,80$ %, 50 %: $92,08 \pm 2,80$ %; *C. yacare*: 30 %: $86,64 \pm 4,54$ %, 35 %: $88,15 \pm 3,92$ %, 40 %: $89,00 \pm 2,12$ %, 45 %: $88,52 \pm 3,09$ %, 50 %: $90,90 \pm 3,74$ %).

Por otro lado, valor de CH_{50} hallado para el plasma de *C. latirostris* fue $386 \mu\text{L}$ y para el de *C. yacare*, fue de $322 \mu\text{L}$.

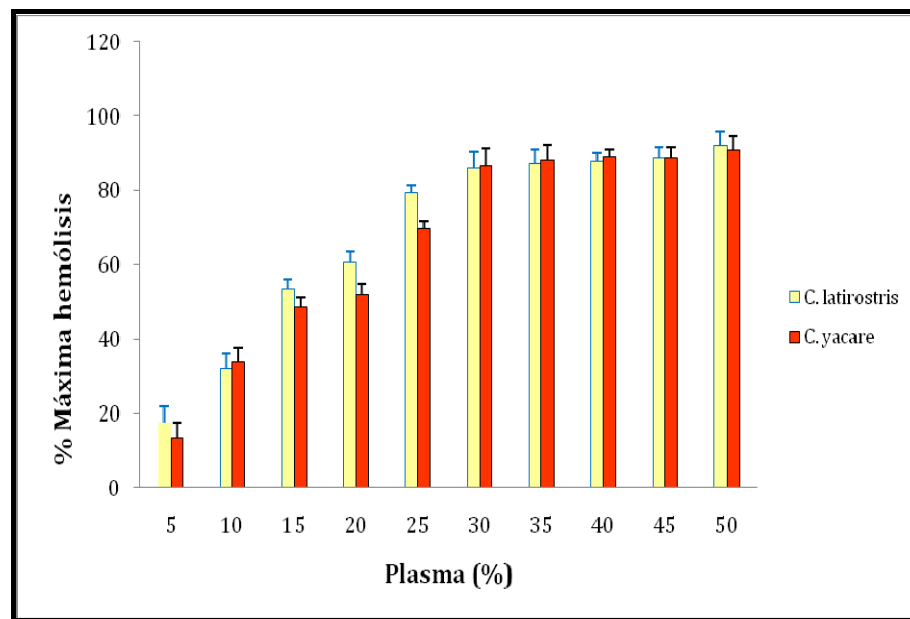


Figura 32. La incubación de una solución de glóbulos rojos de oveja (SRBC) al 1 % (v/v) demostró una relación positiva con volúmenes crecientes de plasma de ambas especies de yacarés ($p < 0,001$; *C. latirostris*: $r^2 = 0,96$, *C. yacare*: $r^2 = 0,91$).

4.2.4 Determinación de la cinética de hemólisis del plasma sobre la actividad del sistema complemento

Los resultados de %MH hallados luego de la exposición de la solución de SRBC con el plasma de las especies de yacaré estudiadas demostraron ser dependientes del tiempo de exposición en ambos casos (Figura 33) ($p < 0,001$, *C. latirostris*: $r^2 = 0,96$, *C. yacare*: $r^2 = 0,82$). Inmediatamente, a los 2 min de iniciada la exposición, se halló un %MH de $5,55 \pm 2,15$ % para el caso del plasma de *C. latirostris* y $5,95 \pm 3,63$ % para el de *C. yacare*. Esta capacidad creció lentamente desde los 5 min de exposición del plasma de *C. latirostris* ($24,20 \pm 3,67$ %) hasta los 30 min (10 min: $27,25 \pm 1,27$ %; 15 min: $31,16 \pm 2,65$ %; 20 min: $49,45 \pm 7,19$ %; y 30 min: $53,90 \pm 2,15$ %) y con una menor proporción ($p < 0,05$) de hemólisis para el plasma de *C. yacare* (5 min: $5,85 \pm 2,39$ %; 10 min: $5,49 \pm 3,21$ %; 15 min: $5,95 \pm 2,77$ %; 20 min: $9,46 \pm 4,88$ % y 30 min: $33,21 \pm 4,12$; $p < 0,05$). A su vez, la hemólisis continuó aumentando hasta los 45 min (*C. latirostris*, $73,37 \pm 9,47$ %; *C. yacare*, $70,29 \pm 5,82$ %) mientras que a los 60 min se

detectó la mayor respuesta hemolítica para *C. latirostris* ($96,16 \pm 5,54$ %) y para *C. yacare* ($90,80 \pm 6,19$ %).

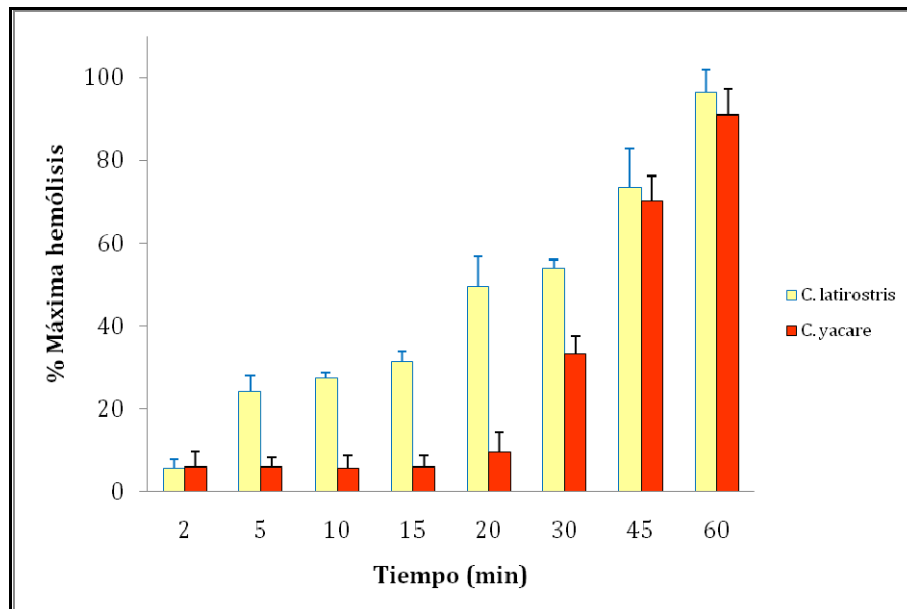


Figura 33. La incubación de 25 ml de plasma de yacaré con 25 ml de solución de SRBC al 1 % (v/v) se realizó para evaluar *in vitro* la cinética de la reacción hemolítica provocada por las proteínas plasmáticas del plasma. Los volúmenes leídos fueron retirados a diferentes intervalos de tiempo ($p < 0,001$, *C. latirostris*: $r^2 = 0,96$, *C. yacare*: $r^2 = 0,82$).

4.3 Comparación del sistema de complemento con otras especies

Los resultados obtenidos de la comparación entre los %MH de los plasmas provenientes de diferentes de animales silvestres y domésticos demuestran que el valor detectado para el plasma de *C. latirostris* ($86,38 \pm 5,1$ %) fue superior al de los demás plasmas ($p < 0,05$) (Figura 34). No se observaron diferencias entre los %MH generados por los plasma de las aves ($p > 0,05$) (*Netta peposaca*, $58 \pm 11,3$ %; *Anas domesticus*, $61,71 \pm 9,12$ % y *Anser anser domesticus*, $55,43 \pm 8,81$ %) ni entre los provocados por el plasma de los reptiles ($p > 0,05$) (*Phrynops hilarii*, $55,24 \pm 13,2$ %; *Trachemys dorbigni*, $58,76 \pm 7,3$ % y *Tupinambis merianae*, $67,81 \pm 6,75$ %). En cambio, el %MH obtenido con el plasma de los mamíferos fue acentuadamente menor que el resto

(*Equus domesticus*, $10,95 \pm 4,6$ %; *Ateles chamek*, $32,19 \pm 4,1$ %; *Chrysocyon brachyurus*, $10,66 \pm 4,430$ %).

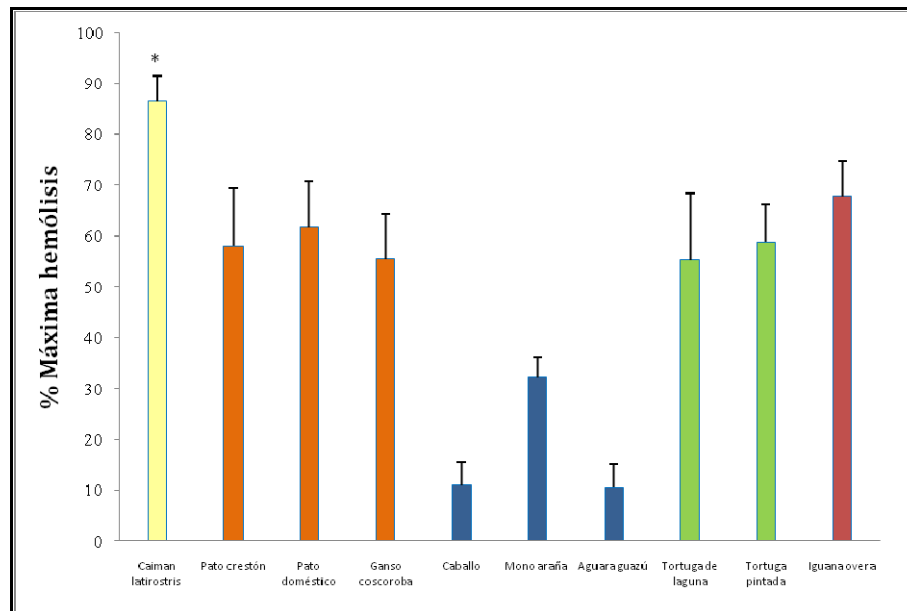


Figura 34. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad del SC de diferentes especies de aves, reptiles y mamíferos. La actividad del plasma de *C. latirostris* fue superior (* $p < 0,05$) al de las demás especies evaluadas.

4.4. Evolución del sistema del complemento durante los primeros 6 meses de vida

Los resultados obtenidos de la actividad del SC de *C. latirostris* de diferentes nidos durante los primeros seis meses de vida se detallan en la Tabla 5.

La actividad del sistema del complemento de los animales demostró ser diferente entre los nidos durante los meses evaluados ($p < 0,05$). Los nidos 172, 362 y 174 y 167 demostraron una variación de dicha actividad en los distintos meses ($p < 0,05$). La mayoría de los nidos demostraron un valor alto en el mes de abril con un descenso en el %MH durante los meses más fríos (mayo-julio), incrementándose nuevamente en agosto y septiembre.

Tabla 5. Resultados de la determinación de la capacidad hemolítica del plasma de *C. latirostris* extraído mensualmente durante seis meses desde el nacimiento. Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

Mes	NIDOS																	
	294		172		149		248		362		174		225		367		167	
	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE	%MH	EE
Abr	60,46	6,22	77,89	5,64	64,74	4,43	84,15	4,13	83,85	2,11	50,81	5,12	55,87	5,12	55,09	4,13	90,87	4,30
May	64,74	4,48	69,30	4,48	59,88	5,38	77,15	5,22	77,04	4,76	41,23	6,21	54,82	7,68	56,12	4,12	81,73	3,87
Jun	63,56	3,99	64,81	3,96	56,71	6,21	79,40	6,85	63,81	5,33	44,29	5,39	55,11	4,13	50,53	3,99	77,65	6,92
Jul	54,48	5,50	60,77	4,13	55,11	4,33	77,90	5,39	63,29	6,28	45,21	2,88	44,84	3,99	60,11	5,27	79,22	6,63
Ago	53,39	3,33	52,53	6,32	57,32	5,21	80,11	7,42	70,21	3,88	53,77	5,79	49,92	6,56	62,44	5,44	88,47	4,98
Sep	66,11	5,11	69,30	4,11	61,31	7,52	83,20	6,11	76,16	4,39	59,19	6,31	54,60	7,14	66,90	7,62	94,11	5,13

Los nidos 294 y 367 fueron los únicos que presentaron valores más altos en mayo que en abril pero sin diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores hallados en el mes de septiembre fueron superiores al resto de los meses en todos los nidos pero sólo se detectaron diferencias en los nidos 172, 362, 174 y 294 ($p < 0,05$, Figura 35). En todos los nidos, el comportamiento de las curvas de %MH estuvo asociado con las variaciones de temperaturas ambientales.

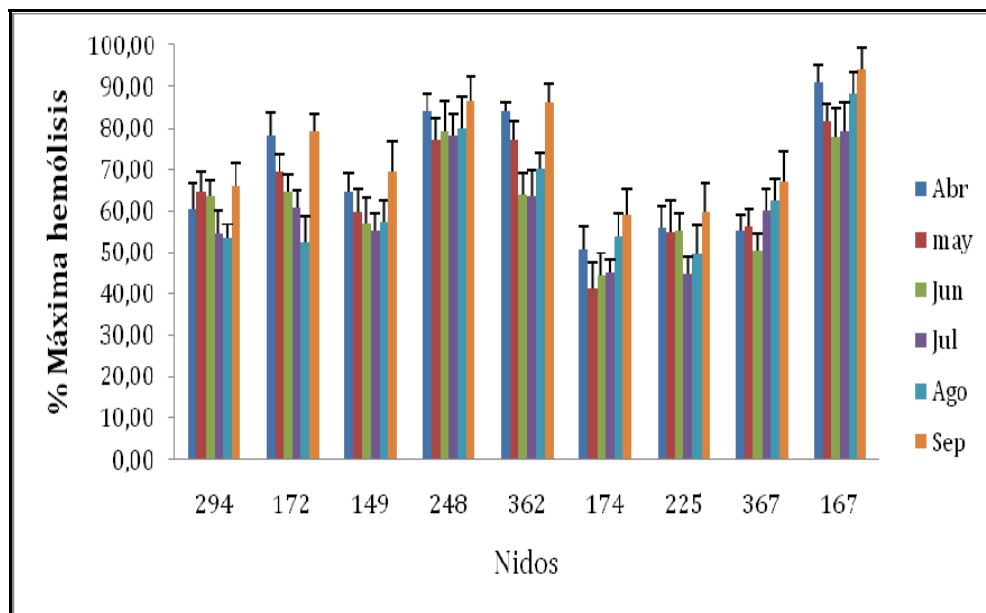


Figura 35. Representación de la variación mensual de la actividad del SC durante los primeros seis meses de vida. Los nidos 172, 362 y 174 y 167 demostraron una variación de dicha actividad en los distintos meses ($p < 0,05$). Se detectaron diferencias en los valores hallados en el mes de septiembre sólo en los nidos 172, 362, 174 y 294 ($p < 0,05$).

4.5 Efecto de diferentes tiempos de exposición a RUV, fotoperíodo natural y oscuridad total sobre el crecimiento y la actividad del sistema complemento

4.5.1 Efectos detectados sobre el crecimiento

Los resultados del crecimiento de los animales expuestos a los diferentes tratamientos de radiación UV, se muestran en la Figura 36. Los yacarés expuestos a FN crecieron más que los otros grupos ($11,54 \pm 0,89$ cm) ($p < 0,001$) pero no hubo diferencias en el crecimiento entre los expuestos a 8 hs ($5,84 \pm 0,42$ cm), 16 hs ($7,98 \pm 1,33$ cm) y OT ($6,39 \pm 0,52$ cm). A su vez, se detectó un claro efecto nido en dicha variable ($p < 0,001$).

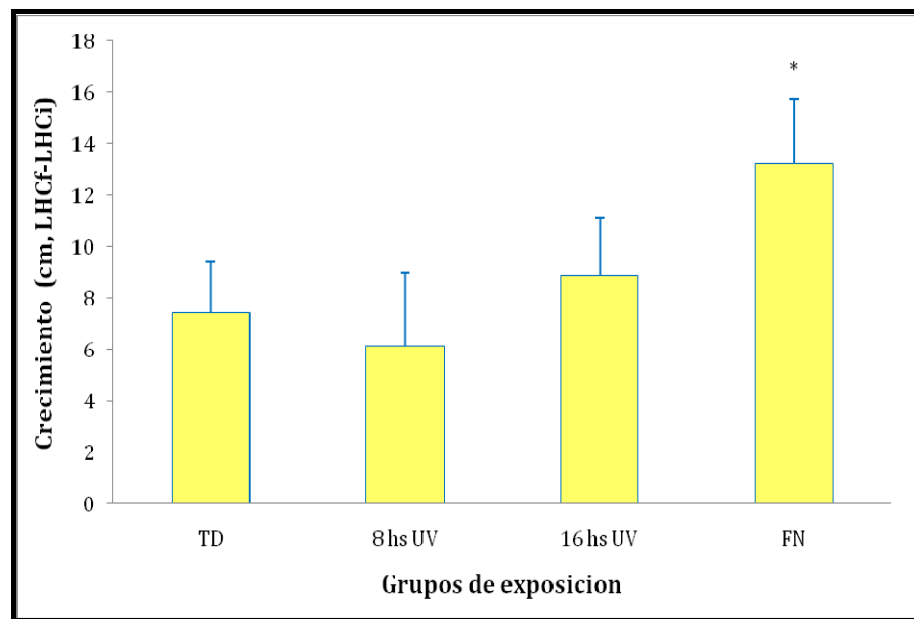


Figura 36. Valores de incremento en la longitud hocico-cloaca (LHC) tomadas al comienzo y al final del experimento de exposición a diferentes tratamientos: 8 hs de radiación ultravioleta (RUV), 16 hs de RUV, fotoperíodo natural (FN) de luz solar y oscuridad total (OT) durante 90 días. El grupo FN evidenció un crecimiento superior (* $p < 0,001$) respecto de los demás grupos.

4.5.2 Efectos detectados sobre la actividad del sistema complemento

Los ensayos con SRBC insensibilizados fueron llevados a cabo para caracterizar el SC de *C. latirostris* expuestos a los tratamientos de exposición a RUV, FN y OT.

Los resultados obtenidos no demostraron diferencias en la hemólisis de SRBC entre los yacarés provenientes de diferentes nidos como tampoco entre los individuos asignados a los distintos tratamientos ($p > 0,05$).

La Figura 37 hace referencia a los resultados de la hemólisis de los SRBC producida por el plasma de los yacarés expuestos a los tratamientos de OT, RUV y FN. Los efectos de los dos tratamientos de RUV, como los de oscuridad total, afectaron la capacidad del plasma para alterar la integridad de los SRBC ($p < 0,001$). La actividad más baja detectada fue la del grupo de animales expuestos a luz UV durante 16 h por día ($31,11 \pm 7,90$ %) seguida por el grupo que estuvo expuesto 8 h ($36,24 \pm 5,28$ %) y

luego el de oscuridad total ($59,20 \pm 7,31$ %). El grupo restante, que fue mantenido bajo regímenes de fotoperíodos normales demostró la capacidad hemolítica más elevada ($94,80 \pm 6,90$ %).

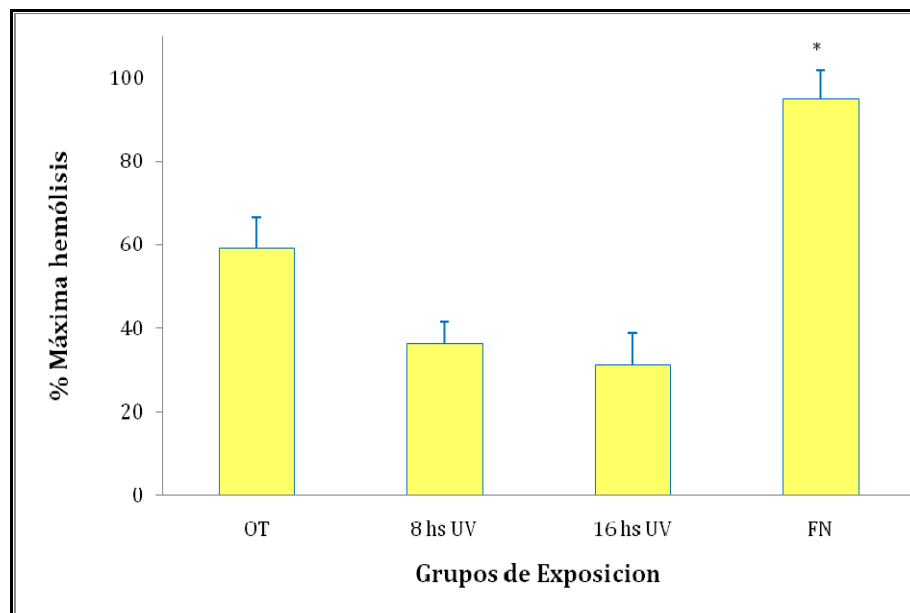


Figura 37. Diferentes capacidades de hemólisis demostradas por el plasma de los grupos de animales expuestos a distintos tratamientos: oscuridad total (OT), 8 hs de radiación ultravioleta (RUV), 16 hs de RUV y fotoperíodo normal (FN). La capacidad hemolítica de los animales del tratamiento FN (* $p < 0,001$) fue superior al resto de los grupos.

4.6 Efectos de la exposición a plaguicidas sobre el crecimiento y la actividad del sistema complemento

4.6.1 Variables morfométricas

Al finalizar el experimento, el incremento de LHC y LT de los animales expuestos a RU2 ($5,63 \pm 0,89$ cm y $2,80 \pm 0,36$ cm) fue menor que en el CN ($8,23 \pm 0,61$ cm y $4,17 \pm 0,29$, respectivamente) ($p < 0,05$), en cambio en el peso no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 38).

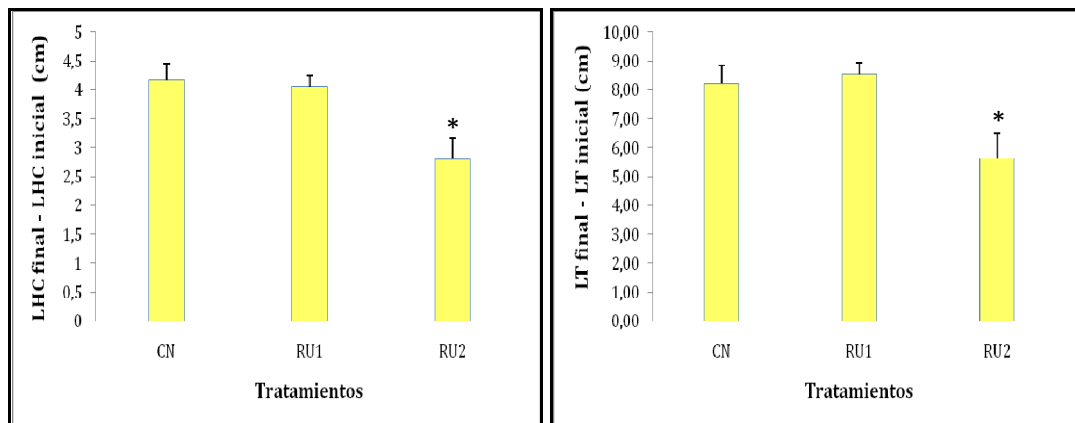


Figura 38. Las diferencias observadas entre longitud hocico-cloaca (LHC) (izquierda) y longitud total (LT) (derecha) tomadas al inicio y al final del experimento de exposición a plaguicidas fueron menores en el tratamiento RU2 (* $p < 0,05$) al resto de los tratamientos.

4.6.2 Determinación de la actividad del sistema del complemento

Los ensayos con SRBC insensibilizados se llevaron a cabo para caracterizar el SC de *C. latirostris* expuestos a las diferentes concentraciones de RU e inyectados con LPS y solución fisiológica (SF).

No se detectaron diferencias en el %MH entre las réplicas de los tratamientos ni entre los nidos utilizados en el experimental ($p > 0,05$). En cambio, se observó un efecto del plaguicida sobre SC de los animales tratados; el grupo de animales expuesto a RU2 tuvo una menor actividad del SC que los animales del CN ($p < 0,05$).

Por otro lado, %MH obtenido de los animales inyectados con SF o LPS no demostró ser influenciado por la exposición previa de los animales a las diferentes concentraciones de RU, es decir, no hubo interacción entre las variables ($p > 0,05$) (Figura 39).

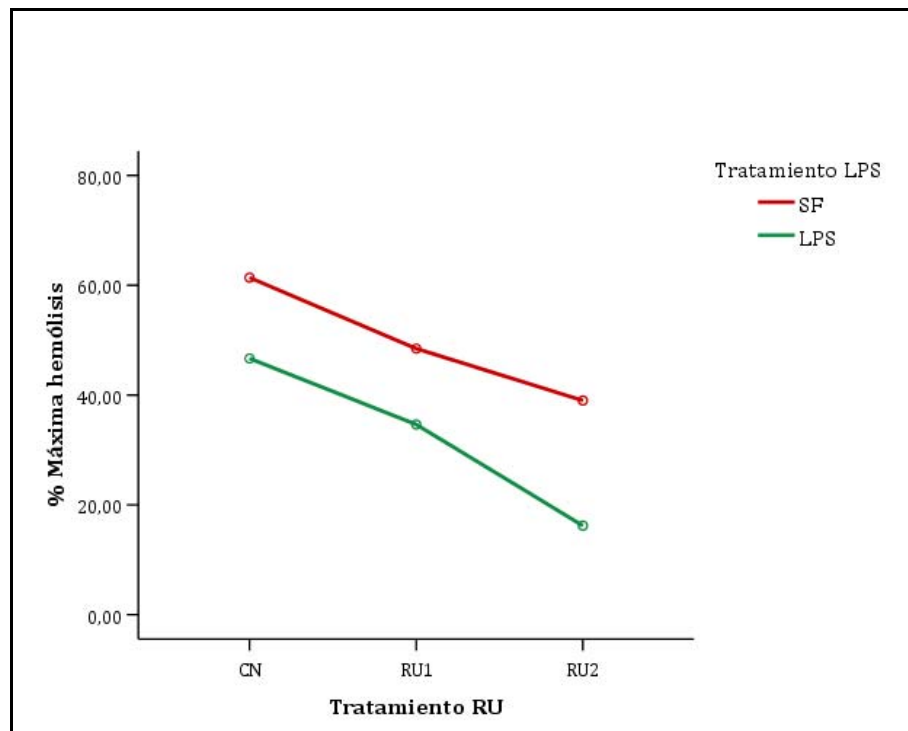


Figura 39. Gráfico de perfil de las variables “Tratamiento con plaguicida” y “Tratamiento con lipopolisacáridos (LPS)”. Se observa que no hay interacción entre las variables ($p > 0,05$) y que los resultados de porcentaje de máxima hemólisis (%MH) de los animales inyectados con solución fisiológica (SF) o con LPS se comportan de igual manera en los diferentes tratamientos, evidenciándose un descenso en el %MH en los grupos tratados con Roundup® (RU) respecto del control normal (CN), tanto en los inyectados con SF como en aquellos inyectados con LPS ($p < 0,05$).

La actividad del SC obtenida de los animales inyectados con SF (CN: $61,38 \pm 29,01$ %; RU1: $48,46 \pm 31,8$ % y RU2: $39 \pm 31,21$ %) fue mayor que la de los animales inyectados con LPS en todos los tratamientos (CN: $46,66 \pm 30,65$ %; RU1: $34,63 \pm 29,66$ % y RU2: $16,12 \pm 11,62$ %), siendo la diferencia estadísticamente significativa en el caso del grupo RU2 ($p < 0,05$) (Figura 40).

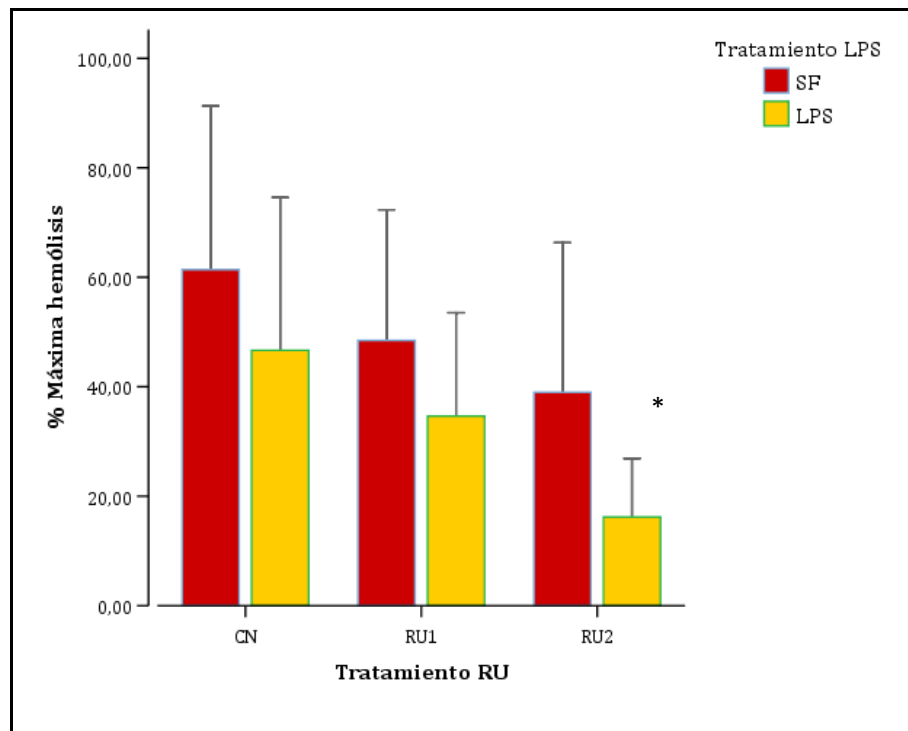


Figura 40. Demostración del porcentaje de máxima hemólisis (%MH) obtenido de los animales expuestos a las diferentes concentraciones de plaguicidas Roundup® (RU1 y RU2) y al control normal (CN) que fueron posteriormente inyectados con solución fisiológica (SF) y lipopolisacáridos (LPS). Se observó que el grupo RU2 inyectado con LPS demostró un (%MH) significativamente inferior (* $p < 0,05$) respecto del grupo inyectado con SF en el control normal.

4.6.3 Recuento total y diferencial de glóbulos blancos

El recuento total de leucocitos proveniente de los animales expuestos y no expuestos a plaguicidas mostró que, a pesar de que el tratamiento CN presentó valores superiores (38377 ± 8520 leuc./mm³) que los tratamientos expuestos a plaguicidas (RU1: 34163 ± 9862 leuc./mm³; RU2: 36283 ± 7321 leuc./mm³), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Teniendo en cuenta el recuento de los leucocitos luego de la inyección con LPS o SF los resultados indicaron que en el grupo CN, la cantidad de GB en los animales inyectados con LPS (44040 ± 6672 leuc./mm³) fue superior que en los animales inyectados con SF (31300 ± 3739 leuc./mm³) ($p < 0,05$). En los tratamientos RU1 y RU2, no se encontraron diferencias entre los animales inyectados con LPS (RU1: 37933 ± 7386 leuc./mm³; RU2: 40533 ± 7321 leuc./mm³) y

los inyectados con SF (RU1: 29640 ± 11316 leuc/mm³; RU2: 32033 ± 7299 leuc/mm³) (Figura 41).

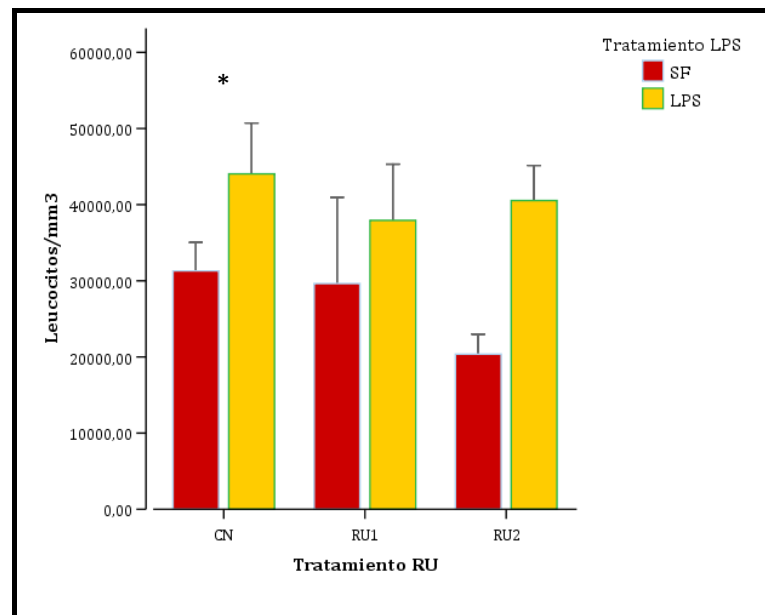


Figura 41. Recuento total de leucocitos en los animales expuestos a los diferentes tratamientos con Roundup® (RU1 y RU2) e inyectados posteriormente con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El recuento total de leucocitos de los animales pertenecientes a los tratamientos CN y RU2 inyectados con LPS fueron mayores que los inyectados con SF (* $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el recuento diferencial de leucocitos para cada caso fueron los siguientes:

Heterofilos: El porcentaje de esta clase de leucocito se vio afectado por el tratamiento de exposición a plaguicidas y por la posterior inyección de LPS o de SF ($p < 0,001$), pero no se encontró una interacción entre ellas (Figura 42). El grupo expuesto a RU2 mostró un porcentaje de heterófilos ($34,25 \pm 12,75$ %) significativamente menor ($p < 0,001$) que el CN ($49,33 \pm 11,06$ %). Asimismo, hubo diferencias significativas entre los grupos RU2 y RU1 ($43,66 \pm 9,35$ %), siendo en este último mayor la cantidad de heterófilos ($p < 0,05$). En el grupo CN, el porcentaje de heterófilos de los animales inyectados con LPS ($57,5 \pm 5,25$ %) fue significativamente superior al de los animales inyectados con SF ($41,16 \pm 9,04$ %; $p < 0,001$). El mismo resultado se obtuvo en los tratamientos con RU1 (LPS: $48,33 \pm 9,80$ %; SF: $39,0 \pm 6,66$ %; $p < 0,05$) y RU2 (LPS: $44,16 \pm 6,24$ %; SF: $24,33 \pm 9,11$ % $p < 0,001$).

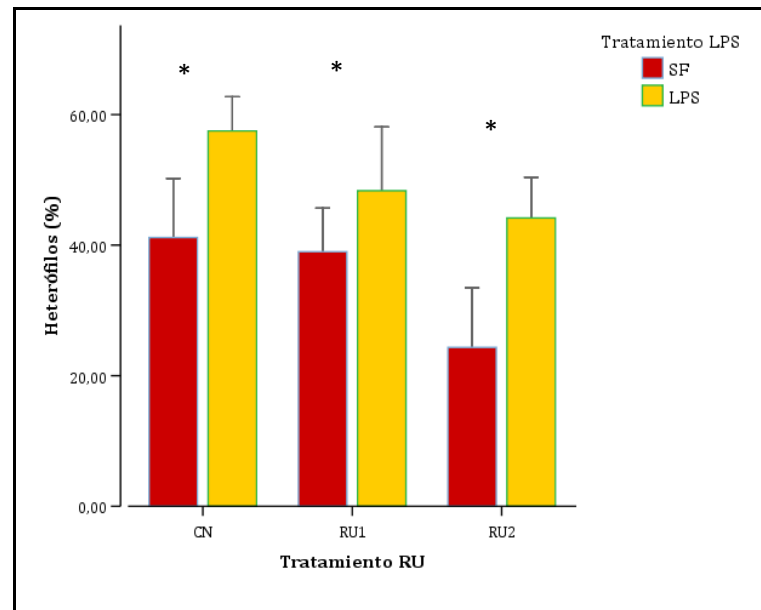


Figura 42. Porcentaje de heterófilos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de heterófilos fue mayor en los animales inyectados con LPS que en SF dentro los tratamientos RU1 (* $p < 0,05$), RU2 (* $p < 0,001$) y CN (* $p < 0,001$).

Linfocitos: de la misma manera que en la clase anterior, el porcentaje de linfocitos estuvo influenciado por la exposición a plaguicidas y la inyección con LPS, pero tampoco se observó una interacción entre las variables ($p > 0,05$)(Figura 43). Contrariamente a lo observado en el caso de heterófilos, el grupo RU2 ($61,83 \pm 10,55\%$) presentó una cantidad de linfocitos significativamente superior que el CN ($47,33 \pm 10,31\%$; $p < 0,001$) y el grupo RU1 ($51,50 \pm 7,77$; $p < 0,01$). A su vez, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en los animales inyectados con SF y LPS en los tratamientos CN ($54 \pm 10,09\%$ y $40,66 \pm 5,05\%$, respectivamente) y RU2 ($69,33 \pm 8,75\%$ y $54,33 \pm 5,75\%$, respectivamente) pero no en RU1 ($54,33 \pm 6,31\%$ y $48,66 \pm 8,59\%$, respectivamente).

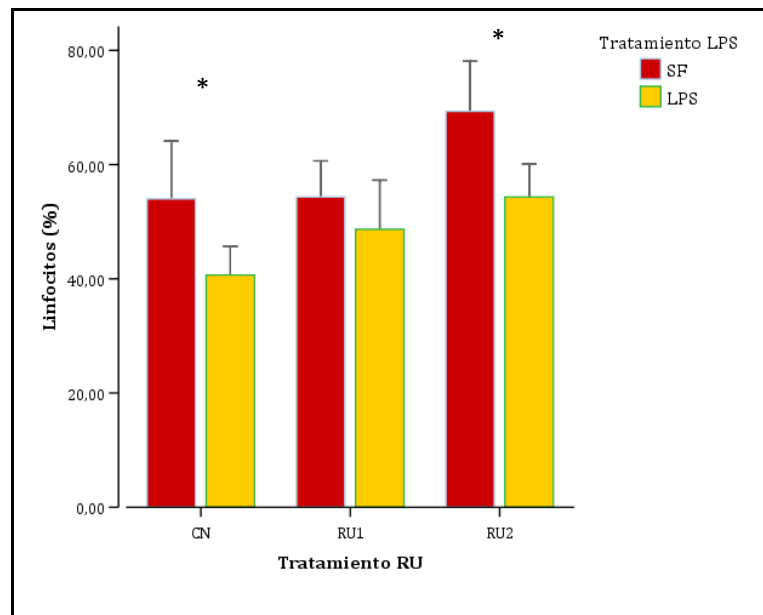


Figura 43: Porcentaje de linfocitos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisácaridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de linfocitos entre los grupos inyectados con LPS fue inferior a los inyectados con SF dentro de los tratamientos RU2 y CN (* $p < 0,01$).

Monocitos: A diferencia de los heterófilos y linfocitos, la exposición a plaguicidas no influyó el porcentaje de monocitos ($p > 0,05$) pero se detectó un efecto de la inyección con LPS. Dicha diferencia se evidenció sólo entre los tratamientos RU1 (LPS: $0,66 \pm 1,21$ %; SF: $2,5 \pm 1,87$ %; $p < 0,05$) y RU2 (LPS: $0,33 \pm 0,52$ %; SF: $2 \pm 1,55$ %; $p < 0,05$) pero no con el CN (LPS: $0,66 \pm 0,52$ %; SF: $1,83 \pm 1,33$ %). Por lo tanto, la exposición a los plaguicidas no generó un efecto sobre la población de este tipo de leucocitos independientemente de la inyección; sin embargo, el porcentaje de monocitos luego de la inyección de LPS, fue inferior en todos los tratamientos, siendo significativa en RU1 y RU2 (Figura 44).

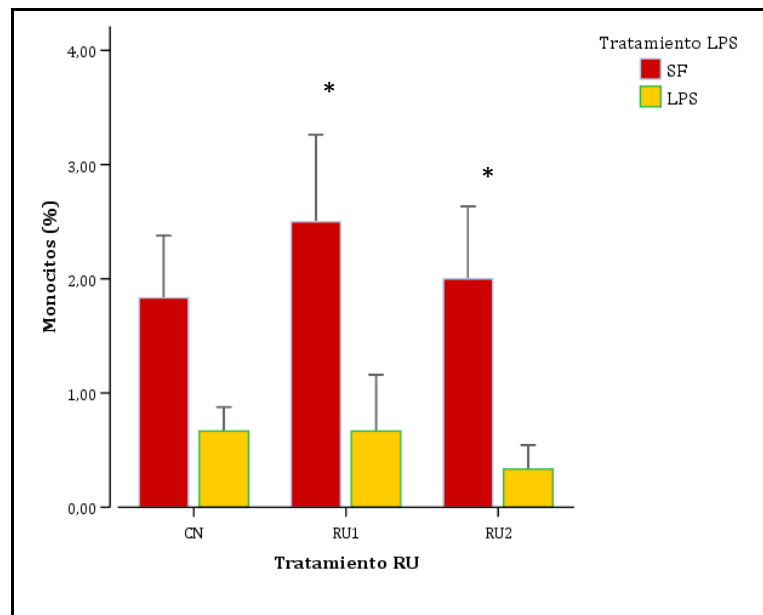


Figura 44. Porcentaje de monocitos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). Se encontró que el porcentaje de los monocitos fue inferior en los animales inyectados con LPS que los inyectados con SF en los grupos expuestos a Roundup® (* $p < 0,05$)

Eosinófilos: al igual que el grupo anterior, no hubo interacción entre las variables ni efecto de la exposición a plaguicidas sobre el porcentaje de eosinófilos ($p > 0,05$), sólo se detectó una influencia de la inyección con LPS (Figura 45). Esta diferencia se evidenció en RU2 (LPS: $1,16 \pm 1,33$ %; SF: $4,33 \pm 1,96$ %; $p < 0,01$) pero no en RU1 (LPS: $2,33 \pm 1,75$ %; SF: $4,16 \pm 2,64$ %) ni en CN (LPS: $1,16 \pm 1,17$ %; SF: $3 \pm 2,53$ %).

El recuento de basófilos dio en la mayoría de los casos un porcentaje de 0, por lo que se decidió no incluirlos en el análisis.

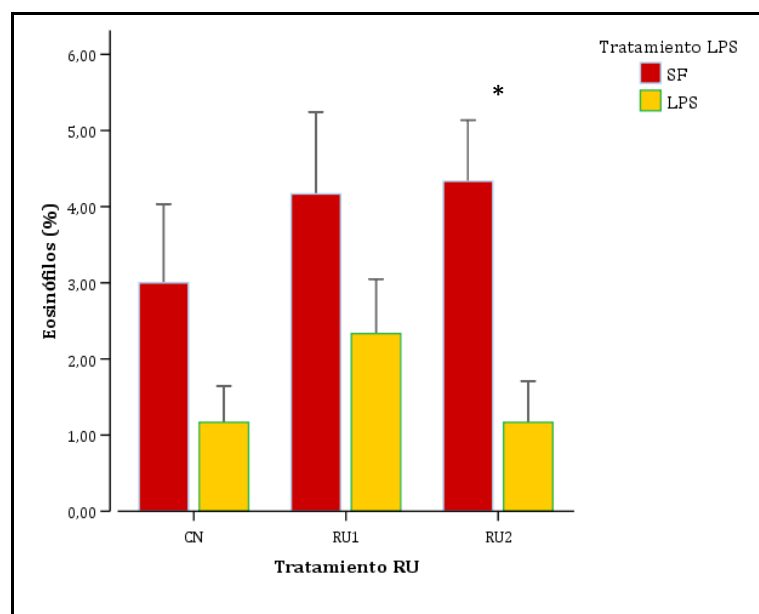


Figura 45. Porcentaje de eosinófilos en los distintos tratamientos de plaguicidas y en los animales inyectados con lipopolisacáridos (LPS) o solución fisiológica (SF). El porcentaje de eosinófilos en RU2 fue mayor en los animales inyectados con LPS que los inyectados con SF (* $p < 0,01$).

4.7 Dipeptidil peptidasa IV en plasma de *C. yacare* y *C. latirostris*

4.7.1 Identificación de la Dipeptidil peptidasa IV plasmática

Este ensayo se utilizó para la identificación de la enzima DPPIV mediante la acción de un inhibidor específico de DPPIV, la diproteína A, sobre la hidrólisis de Ala-Pro-AFC por el plasma de *C. yacare* y *C. latirostris*. El agregado de diproteína A 0,15 mM inhibió la actividad de DPPIV del plasma de *C. yacare* y *C. latirostris* en un 38% y 49%, respectivamente. Las concentraciones de 0,3 y 0,6 mM de diproteína A causaron una reducción de la actividad de la enzima en 53% y 78%, y 67% y 82% en el plasma de *C. yacare* y *C. latirostris*, respectivamente (Figura 46).

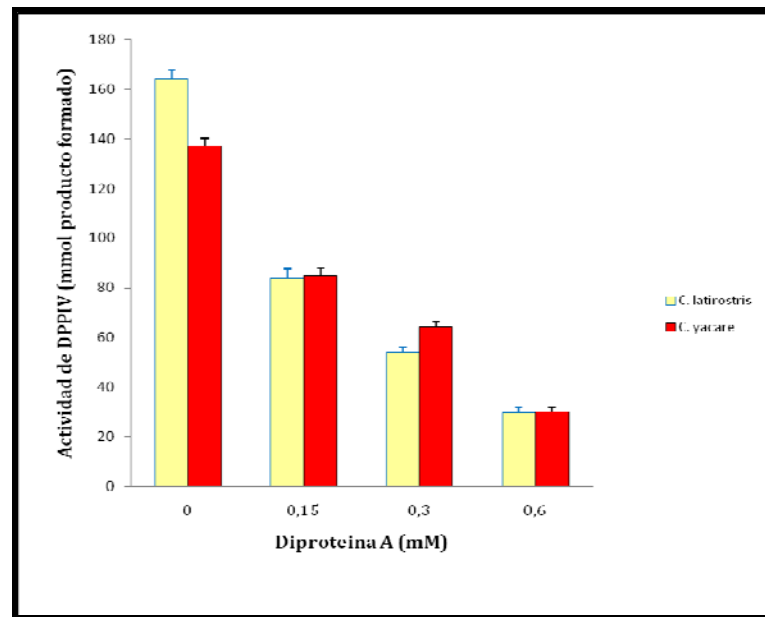


Figura 46. La actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en el plasma de ambas especies fue inhibida por diferentes concentraciones de diproteína A incubadas durante 60 min a 25°C ($p < 0,05$). La fluorescencia del producto de la hidrólisis fue medida espectrofluorométricamente.

4.7.2 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de DPPIV

Los efectos de la temperatura sobre la actividad plasmática de DPPIV en ambas especies de yacaré se presentan en la Figura 47. La actividad de DPPIV fue menor en *C. yacare* que en *C. latirostris* en todas las temperaturas estudiadas. A la temperatura más baja (5 °C), ambas especies presentaron una actividad de DPPIV similar ($p > 0,05$), en cambio el incremento de la actividad en función de la temperatura fue diferente entre las dos especies así como la actividad de la misma a cada una de las temperaturas entre 10 y 40 °C. La actividad de DPPIV en *C. yacare*, aumentó gradualmente desde los 5 °C, en una proporción de 2,63 nmol/°C ($r^2 = 0,99$, $p < 0,001$) con una actividad máxima de 177,98 nmol a los 40 °C.

En contraste, en el plasma de *C. latirostris* tuvo un marcado incremento de la actividad entre 5 y 10 °C, seguido por un aumento constante en una proporción de 3,64 nmol/°C entre 10 y 25 °C ($r^2 = 0,95$, $p < 0,05$), alcanzando una actividad estable entre 30 y 40°C ($p < 0,05$).

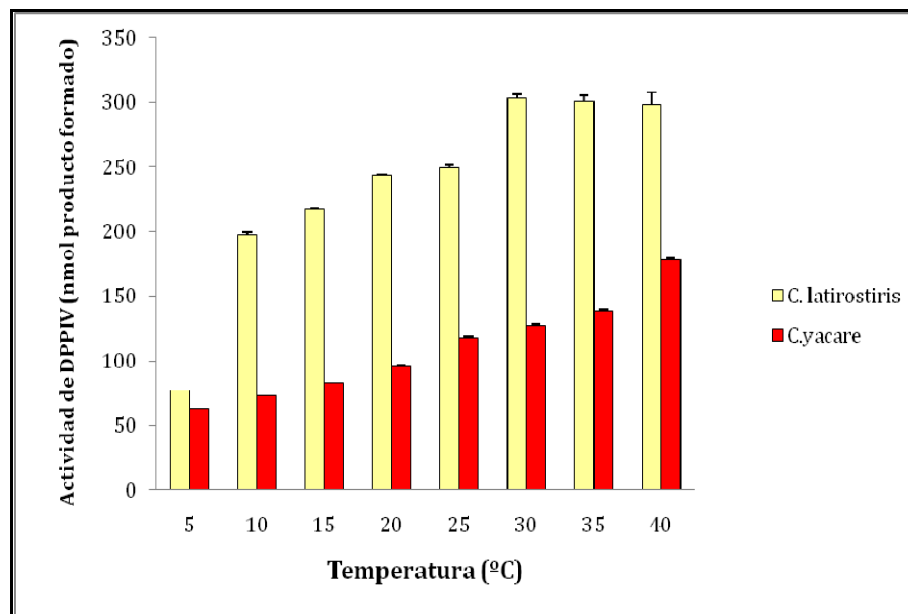


Figura 47. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa (DPPIV) durante la reacción con el sustrato fluorescente. El efecto de la temperatura fue similar entre las especies (*C. yacare*: $r^2 = 0,99$, $p < 0,001$; *C. latirostris*: $r^2 = 0,95$, $p < 0,05$) excepto a 5 °C ($p > 0,05$)

4.7.3 Influencia del tiempo de incubación en la actividad de DPPIV

El estudio de la actividad de DPPIV en el tiempo demostró que ambas especies tuvieron un patrón bifásico de actividad, pero a su vez, variaron significativamente con respecto a las proporciones en que aumentaron en los diferentes períodos de tiempo (Figura 48). La actividad de DPPIV en el plasma de *C. latirostris* aumentó rápidamente entre 0 y 10 min (25,22 nmol/min; $r^2 = 0,99$, $p = 0,07$), y se estabilizó entre los 15 y 60 min (2,5 nmol/min; $r^2 = 0,93$, $p < 0,01$). En el caso de *C. yacare*, la tasa inicial de incremento ocurrió entre los 0 y 30 min (1,94 nmol/min; $r^2 = 0,99$, $p < 0,001$), y luego esta tasa decreció en un 35 % entre los 30 y 60 min (1,26 nmol/min; $r^2 = 0,99$, $p < 0,05$). En ninguno de los dos casos la actividad de DPPIV tendió a estabilizarse.

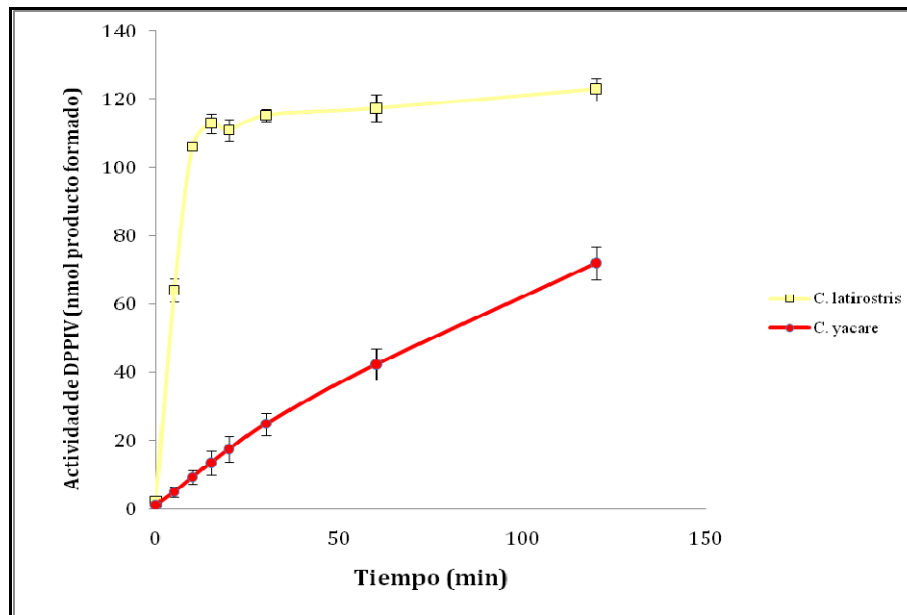


Figura 48. Cinética de la actividad plasmática de dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en el plasma de las especies *C. latirostris* y *C. yacare* durante 120 min. La actividad de DPPIV en el plasma de *C. latirostris* aumentó rápidamente entre 0 y 10 min ($r^2 = 0,99$, $p = 0,07$), y mas lentamente entre los 15 y 60 min ($r^2 = 0,93$, $p < 0,01$). En el caso de *C. yacare*, entre los 0 y 30 min aumentó ligeramente ($r^2 = 0,99$, $p < 0,001$), y entre los 30 y 60 min, la tasa de incremento disminuyó en un 35 % ($r^2 = 0,99$, $p < 0,05$).

4.7.4 Influencia de la Concentración del plasma en la actividad de DPPIV

La actividad de DPPIV en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* demostró una relación positiva a medida que aumentó la concentración del plasma (Figura 49; $p < 0,001$) sin manifestar diferencias en la forma de la curva hasta el agregado de 100 μ l de plasma. Luego, la actividad de DPPIV del plasma de *C. latirostris* alcanzó un *plateau* mientras que en el caso de *C. yacare* continuó aumentando pero a una tasa mucho más reducida que en las concentraciones menores a 100 μ l.

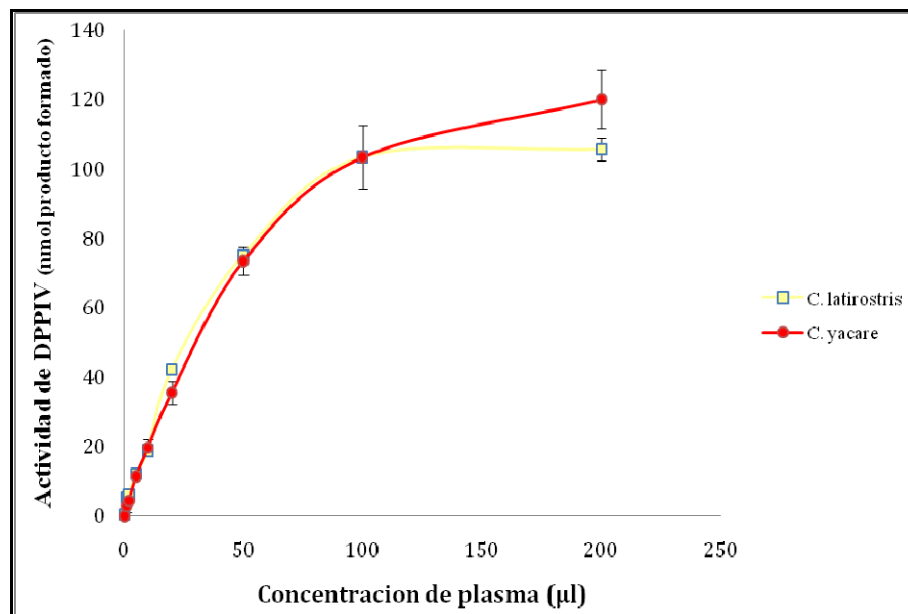


Figura 49. El ensayo de la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPiV) a diferentes concentraciones de plasma demostró comportamientos similares entre ambas especies. La actividad de la enzima fue detectada en varias concentraciones de plasma, luego de la incubación durante 60 min a 25 °C ($p < 0,001$).

4.8 Fosfolipasa A2 en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.

4.8.1 Influencia de la temperatura de incubación en la actividad de PLA2

La actividad de PLA2 plasmática en ambas especies de yacaré demostró una relación positiva con la temperatura (Figura 50) A excepción de la actividad de PLA2 registrada a la temperaturas más bajas (5, 10 y 15 °C), donde la misma fue mayor ($p < 0,05$) en *C. latirostris* (74267,75 \pm 3552,93 UF; 81582 \pm 1805,50 UF y 88225 \pm 3953,50 UF, respectivamente) que en *C. yacare* (61812,78 \pm 3258,34 UF; 76609 \pm 1805,51 UF y 82875,25 \pm 3953,55 UF, respectivamente), en el resto de las temperaturas estudiadas, la actividad registrada fue ligeramente superior en *C. yacare* (20 °C: 96237,08 \pm 1247,16; 25 °C: 97487,43 \pm 1863,9; 30 °C : 107084,20 \pm 5512,38; 35 °C: 115675,80 \pm 1991,25 y 40 °C: 116606,30 \pm 959,90 UF) que en *C. latirostris* (20 °C: 90349,5 \pm 4669,7; 25 °C: 92848,5 \pm 3822,71 UF; 30 °C : 105709,8 \pm 3588,37; 35 °C: 113351 \pm 4852,85 y 40 °C: 116305,3 \pm 5050,85 UF).

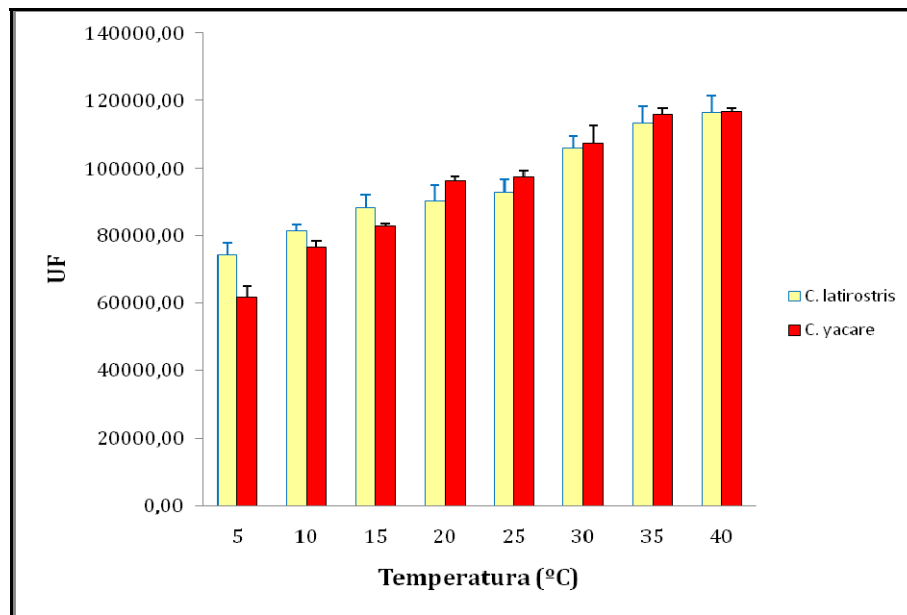


Figura 50. Actividades registradas de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) durante el incremento en la temperatura de incubación entre el plasma de yacaré con las bacterias marcadas con BODYPY (*C. yacare*: $r^2=0,964$; $p < 0,001$; *C. latirostris*: $r^2=0,968$; $p < 0,001$).

La actividad de PLA2 aumentó gradualmente en una proporción de 1209,663 UF/°C ($r^2=0,96$; $p < 0,001$) para *C. yacare*, y de 1554,20 UF/°C ($r^2=0,96$; $p < 0,001$) para *C. latirostris*. En ambas especies, a 40 °C se detectaron las actividades más altas.

4.8.2 Influencia de la concentración de plasma en la actividad de PLA2

La actividad de PLA2 en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* demostró una relación positiva a medida que aumentó la concentración del plasma (Figura 51; *C. latirostris*: $r^2=0,531$, $p < 0,05$; *C. yacare*: $r^2=0,61$, $p < 0,05$). La incubación de 100 μ l de bacteria marcada con 1, 2, 5, 10 μ l de plasma de *C. latirostris* demostró una mayor actividad (80824,68 \pm 1849,83 UF; 89639,50 \pm 2420,90 UF; 113669,50 \pm 1607,61UF y 114076,81 \pm 2475 UF, respectivamente), que el plasma de *C. yacare*, (69723,28 \pm 2526,84 UF; 77327,38 \pm 6603,48 UF; 98056,82 \pm 1806,63 UF y 120648,00 \pm 1413,51 UF, respectivamente). A partir del agregado de 20 μ l, la relación de la actividad de PLA2 se invirtió, hasta que, prácticamente, se igualó en el último volumen de plasma

agregado (*C. latirostris*, 20 μ l: $66469,18 \pm 5575,08$ UF; 50 μ l: $131182,82 \pm 3028,24$ UF; 100 μ l: $153989,15 \pm 606,75$; y *C. yacare*, 61977,89 \pm 5168,06 UF; 50 μ l: $141369,25 \pm 2066$ UF; 100 μ l: $155323 \pm 1804,06$ UF).

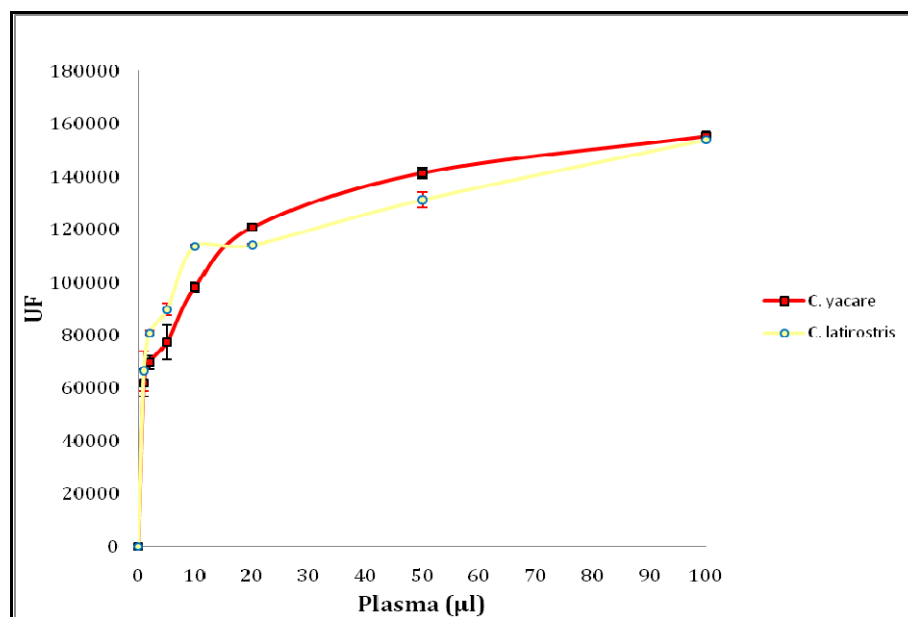


Figura 51. Los efectos del aumento de la concentración de plasma de *C. latirostris* y de *C. yacare* provocó un incremento en el producto de la reacción causado por fosfolipasa A2 (PLA2), que se refleja en la intensidad de fluorescencia registrada (*C. latirostris*: $r^2=0,531$; $p < 0,05$; *C. yacare*: $r^2=0,611$; $p < 0,05$).

4.8.3 Influencia del tiempo incubación en la actividad de PLA2

La actividad de PLA2 en el plasma de ambas especies demostró una relación positiva con el tiempo de incubación del plasma con el sustrato marcado (*C. latirostris*: $r^2 = 0,886$; *C. yacare*: $r^2 = 0,804$; $p < 0,01$; Figura 52). El plasma de ambas especies, demostró una actividad de PLA2 en forma inmediata, a los 5 min de la incubación con la bacteria marcada fluorescentemente (*C. latirostris*, $15897 \pm 913,69$ UF y *C. yacare*, $10905 \pm 893,69$ UF). En todos los tiempos medidos, la actividad de PLA2 en el plasma de *C. latirostris* (10 min: $26455,73 \pm 729,69$ UF; 15 min: $34238,13 \pm 1195,63$ UF y 20 min: $39870 \pm 1356,14$ UF) siempre fue superior a la de *C. yacare*

(10 min: $16934,25 \pm 671,12$ UF; 15 min: $21086,25 \pm 1611,14$ UF y 20 min: $24223,75 \pm 1416,64$ UF) observándose diferencias de 39 % a los 30 min (*C. yacare*, $27022,5 \pm 972,41$ UF y *C. latirostris*, $44080 \pm 1616,51$ UF), 37% a los 60 min (*C. yacare*, $38782,2 \pm 1575,14$ UF y *C. latirostris*, $60677,25 \pm 707,28$ UF) y 27% a los 120 min (*C. yacare*, $54510,75 \pm 972,87$ UF y *C. latirostris*, $75320 \pm 762,98$ UF), aproximadamente. La actividad de la enzima fue diferente pero la curva se mostró de manera similar entre las especies.

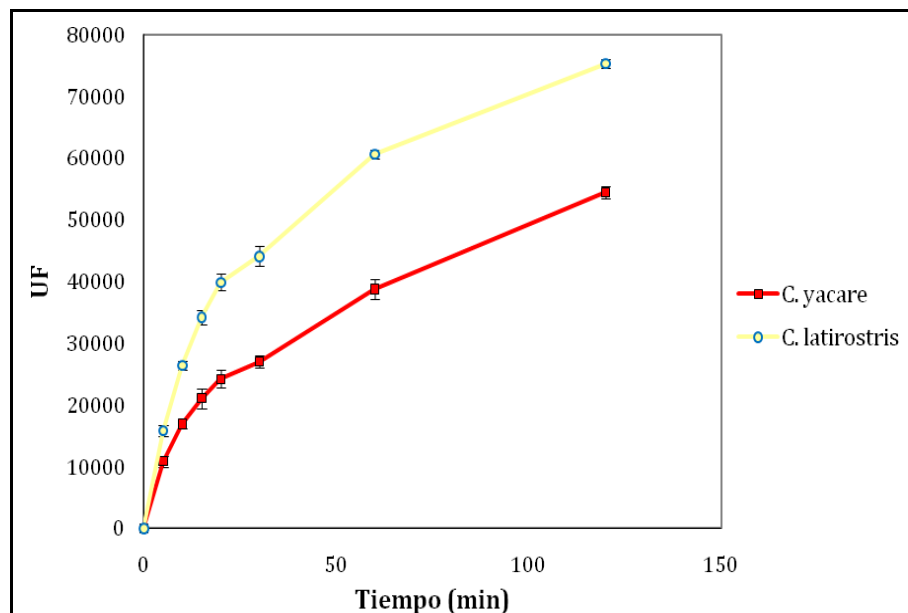


Figura 52. El ensayo de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) a diferentes tiempos de plasma demostró comportamientos similares pero con una mayor actividad en el plasma de *C. latirostris* (*C. latirostris*: $r^2 = 0,886$; *C. yacare*: $r^2 = 0,804$; $p < 0,01$).



Discusión

5. Discusión

5.1 Actividad antimicrobiana en el plasma de *C.latiostris*

La probabilidad de que los microorganismos puedan causar enfermedad en los cocodrilos aumenta bajo situaciones de estrés como temperaturas extremas, capturas y manejo/manipulación de los animales, alimentación inapropiada, entre otras (Shotts et al., 1972; Brisbin, 1982; Franklin et al., 2003). Con frecuencia, los cocodrilianos están expuestos a estas condiciones en mayor proporción en cautiverio que en estado silvestre.

En nuestro trabajo describimos la actividad antibacteriana del plasma de *C. latiostris*, *G. gallus* y humano frente a *E. coli* ATCC 11105 y se demostró que esta acción es dependiente de la especie y el tiempo en que estuvieron expuestos. Otros resultados similares fueron obtenidos por Merchant et al. (2003) con el suero de *A. mississippiensis* y por Siruntawineti et al. (2004) con el de *Cr. siamensis*. De la misma manera, el plasma de *G. gallus* inhibió el crecimiento de *E. coli*, en mayor medida que el suero humano. En este sentido, Taylor (1983) reportó la presencia de numerosos estudios realizados para determinar las actividades bactericidas o antibacterianas de diferentes sustancias resaltando que, en muchos de los casos, los datos generados han sido conflictivos por causas experimentales. Merchant et al. (2006a) describió las ventajas de un ensayo colorimétrico para medir la actividad del SC utilizando la hemólisis de los glóbulos rojos de carnero. Este método es muy útil para detectarlo y, aunque en ese estudio se atribuya a este mecanismo inmunológico como la causa de la actividad antimicrobiana, es imposible comprobar por dicho método el o los causantes de la misma. El ensayo usado en este trabajo es un método simple y válido para el estudio de la actividad independientemente del origen de la propiedad bactericida. Sin embargo, no es conveniente comparar valores absolutos con otros estudios similares realizados en otras especies porque el uso de diferentes metodologías puede resultar confuso (Merchant et al., 2003; Siruntawineti et al., 2004).

Las muestras de yacaré y de gallina exhibieron mecanismos de respuesta más determinantes y rápidos que los del plasma humano cuando fueron expuestos a *E. coli*.

Cuando estos animales están en cautiverio, se exponen a desafíos inmunológicos provocados por un gran número de patógenos, incluyendo la especie de microorganismo testeado. Inicialmente, las propiedades antimicrobianas de los cocodrilianos fueron atribuidas a péptidos que demostraron tener actividad antimicrobiana (Shaharabany et al., 1999). Asimismo, Merchant et al. (2006b), comprobó que péptidos catiónicos extraídos de leucocitos de *A. mississippiensis* poseen actividades antimicrobianas; pero por otro lado, también se atribuyó esta actividad al SC del suero (Merchant et al., 2003, 2004, 2005b). Muchos investigadores han demostrado la presencia del SC en el suero de los animales ectotermos (Koppenheffer, 1987; Sunyer et al., 1998; Zarkadis et al., 2001). Mastellos et al. (2004) describieron al complemento como un mecanismo filogenéticamente conservado del sistema inmune innato que funciona junto al sistema inmune adaptativo como un mediador inflamatorio importante de las interacciones antígeno-anticuerpo. En base a todos estos reportes, las propiedades antimicrobianas de los tejidos de los cocodrilianos podrían tener múltiples orígenes.

5.2 Identificación y caracterización del sistema del complemento en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*.

Como se mencionó previamente, los cocodrilianos están particularmente expuestos diariamente a la infección por patógenos potenciales. A pesar de la amenaza constante que representan los microorganismos en el ambiente en el que viven los cocodrilianos, a menudo estos no demuestran signos de infección (Manolis et al., 1991; Madsen, 1993; Madsen et al., 1998). Es posible que hayan evolucionado y diversificado en respuesta a muchos factores que están directamente asociados al ambiente que los alberga.

En los últimos años, se han incrementado los estudios filogenéticos relacionados al sistema inmune. Mastellos et al. (2004) describieron al SC como un componente importante del sistema inmune innato que se ha conservado desde el punto de vista filogenético. Carey et al. (1999) incluyeron al SC dentro de los componentes

importantes de los mecanismos de defensa de las subclases urodelos y anuros, junto a los péptidos antimicrobianos, las células *natural killer* y las células fagocíticas.

El SC de los peces y otros vertebrados poiquiloterms ha demostrado ser más “diverso” que el de los vertebrados superiores. Aparentemente, esta mayor amplitud se basa en que reconocerían una cantidad más amplia de antígenos (Sunyer et al., 1998). Estas particularidades podrían explicar la alta resistencia de los cocodrilianos a las infecciones. Como se mencionó en la sección 5.1, la mayoría de las actividades antimicrobianas detectadas en diferentes tejidos de cocodrilos (Shaharabany et al., 1999, Merchant et al., 2003; 2004; 2005b; Merchant & Britton, 2006; Siroski et al., 2009) se atribuyeron a las propiedades de un SC efectivo en las especies estudiadas. Hasta el momento de la realización de esta Tesis Doctoral, la detección y caracterización del SC de las especies de yacaré que habitan en Argentina, no habían sido investigadas.

Las pruebas de hemólisis se han utilizado tradicionalmente para detectar la actividad funcional del SC (Kirschfink & Mollnes, 2003). Frecuentemente, este tipo de ensayo se emplea en los laboratorios clínicos para evaluar la funcionalidad del SC e identificar pacientes humanos con deficiencias o alteraciones en dicho sistema. Con el mismo fundamento, se utilizó esta prueba hemolítica donde la incubación del plasma de *C. latirostris* o de *C. yacare* con una solución de SRBC al 1% (V/V) generó una hemólisis detectada por el aumento de la densidad óptica debido a la liberación de hemoglobina por la destrucción de la membrana de los eritrocitos.

Müller- Eberhard (1969) y Mollnes et al. (1988) demostraron que el EDTA es un potente quelante de los iones de metales divalentes, y en consecuencia, bloquea la activación del SC *in vitro* por la inhibición de las actividades que requieren Ca^{2+} y Mg^{2+} en la cascada del SC. La intervención de estos iones es esencial en el desencadenamiento de la cascada del SC en *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2005a). Por otro lado, la acción comúnmente llamada “decomplementación” (Morgan, 2008) que consiste en el calentamiento del plasma a 56°C durante 30 min, provocó un descenso importante en la actividad hemolítica del suero. Esto es consistente con la hipótesis de que la actividad hemolítica detectada, no se debe a los péptidos

antimicrobianos debido a son resistentes al proceso de calentamiento (Diamond et al., 1991). De la misma manera, las interferencias que pudiesen haber provocado la presencia de anticuerpos en el plasma, no fueron consideradas. Algunos resultados similares encontrados en suero humano normal (Morgan 2008) y en las distintas especies de cocodrilianos estudiadas (Merchant et al., 2005c; Merchant & Britton, 2006) sugieren firmemente que el SC tiene un papel fisiológico muy importante en la protección contra varios patógenos. En base a dichas suposiciones, la actividad hemolítica del plasma de ambas especies de yacarés hacia los SRBC fue caracterizada en términos de concentración, temperatura y cinética.

Los vertebrados ectotérmicos son considerados como modelos apropiados para realizar estudios destinados a evaluar la influencia de la temperatura sobre una variedad de funciones fisiológicas (Pxytycz & Zkowicz, 1994). En este sentido, se ha demostrado que la temperatura juega un rol fundamental en la homeostasis de vertebrados ectotérmicos incluyendo la formación de anticuerpos y la respuesta inmune en general (Klesius, 1990). Los cocodrilianos demostraron tener preferencias para mantener la temperatura corporal dentro de un rango de 28-33°C mediante la utilización de termogradientes naturales, interactuando entre la exposición al sol, la sombra, superficies calientes y aguas profundas más frías o más calientes (Huchzermeyer, 2002). Como lo demostraron nuestros resultados presentados en la Figura 31, la hemólisis de los SRBC provocada por el plasma del yacaré dependió de la temperatura de incubación durante la reacción. Dicha actividad, se detectó dentro del rango (30-40 °C) correspondiente a la temperatura de preferencia que los caimanes seleccionan durante la termorregulación para llevar adelante los procesos fisiológicos normales (Bassetti, 2002). La actividad hemolítica máxima se detectó entre los 30 y 40 °C. Debido a que la misma se midió con intervalos de 5 °C, no fue posible determinar con exactitud cuál fue la temperatura específica en la cual se produjo el pico máximo de hemólisis.

Asimismo, este rango de temperatura es el que se intenta mantener en los programas de crianza intensiva para lograr un crecimiento óptimo, y probablemente, también esté involucrado con la menor predisposición a las enfermedades (Larriera et al., 2008). En otras especies de cocodrilos estudiadas, el valor máximo observado fue a

30 °C en *Cr. johnstoni*, 25 °C en *Cr. porosus* (Merchant & Britton, 2006) y 35 °C en *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2006a). Esta última y las especies de caimanes estudiadas en el presente trabajo pertenecen a la familia Alligatoridae, mientras los cocodrilos pertenecen a la familia Crocodylidae; por tal motivo las diferencias observadas podrían ser atribuidas a las preferencias adaptativas (rango de temperatura optima) de cada familia de cocodrilianos.

Como se pudo observar a temperaturas bajas (hasta 20 °C), la hemólisis provocada por el plasma de *C. latirostris* fue superior a la de *C. yacare*. Estos resultados podrían relacionarse con el rango de temperatura media en donde habitan estas especies. *C. latirostris* tiene una distribución geográfica más amplia en América del Sur que *C. yacare* (Figura 8), ambas se distribuyen en el norte de Argentina, pero el rango ocupado por *C. latirostris* llega más al sur que en el caso de *C. yacare*, siendo el cocodriliano más austral del continente americano. En este área, hay diferencias importantes de temperatura respecto de las latitudes. La temperatura media durante los meses más fríos (junio-agosto) en el límite del área de distribución de la población de *C. yacare* (30 ° de latitud S) (Verdade, 1998), es de alrededor de 17 °C. En el caso de *C. latirostris*, el límite de distribución aparece a los 32 ° (latitud S) (Verdade, 1998), donde la temperatura media durante los mismos meses es de 10 °C, aproximadamente (Servicio Meteorológico Nacional, 2010). La distribución más austral de *C. latirostris* en Argentina se debe a una mayor tolerancia a las temperaturas más bajas (Siroski, 2004), lo que podría estar relacionado con una mayor actividad del sistema inmune junto a otras actividades fisiológicas a dichas temperaturas.

La relación entre la actividad hemolítica de *C. latirostris* con SRBC no sensibilizados fue construida sobre la base de los datos obtenidos a partir de mediciones llevadas a cabo con 11 diferentes concentraciones de plasma. En este sentido no se han detectado diferencias entre los valores de %MH causados por el plasma de *C. latirostris* y el de *C. yacare*, y fueron levemente superiores en relación a las otras especies de cocodrilianos estudiadas (Merchant et al., 2006a; Merchant & Britton, 2006). Tal es así, y como se mencionó anteriormente sobre la utilidad de CH₅₀ como índice para evaluar la funcionalidad del SC, que los valores hallados en este estudio para el plasma de *C.*

latirostris (386 μ l) y *C. yacare* (417 μ l) son menores que los detectados para *A. mississippiensis* (539 μ L; Merchant et al., 2005c), para *Cr. johnstoni* (451 μ l) y para *Cr. porosus* (473 μ l) (Merchant & Britton, 2006). Por lo tanto, la cantidad de plasma necesaria para provocar el 50 % de la hemólisis máxima de una solución de SRBC al 1% en un volumen de reacción de 1 ml, sería menor en las especies de caimanes estudiadas en este trabajo que en las demás especies de cocodrilianos investigadas previamente.

La incubación de plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* con una solución de SRBC demostró tener una relación directa con el tiempo en que ambas fueron expuestas (Figura 8). Inmediatamente, luego de los dos primeros min, se detectó la actividad hemolítica del plasma de ambas especies, hasta alcanzar el máximo a los 60 min. La cinética de la lisis ocasionada por la actividad del plasma de las dos especies estudiadas es similar a la reportada en los estudios en suero de *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2006a), en las especies de cocodrilos mencionadas (Merchant & Britton, 2006) y en la actividad del SC humano frente a *E. coli* (Wright & Levine, 1981). Estas observaciones podrían ser consideradas como la rápida respuesta que posee el sistema inmunológico del plasma de los cocodrilianos, al igual que el de los seres humanos, como un mecanismo defensivo para evitar cualquier desafío de infección por microorganismos.

Existe una tendencia actual en resaltar el papel que cumple el sistema inmune humoral y/o celular como parte de la respuesta inmunológica innata para detener las infecciones. Es evidente que este sistema se complementa con otros tantos mecanismos para proporcionar una protección inmediata de los organismos contra la exposición a agentes patógenos. Este trabajo demostró que las actividades del SC reportadas hasta el momento son similares en todas las especies analizadas. El SC está presente en múltiples formas y esta diversidad podría ser aprovechada por las diferentes especies como una estrategia para expandir la capacidad de reconocimiento de antígenos para la activación del SII. Sobre esta base, y en virtud de los elevados índices hemolíticos alcanzados por los componentes del plasma junto a la evidencia de ciertas propiedades que los hace menos susceptibles a las infecciones, permite inferir que los cocodrilianos poseen potentes mecanismos de inmunidad innata.

Como se ha postulado anteriormente, los cocodrilos representan un grupo exitoso de organismos que ha demostrado pocos cambios durante millones de años. A modo de integración de lo mencionado en la sección 5.1, el SC sería un componente muy importante para resistir los ataques de los microorganismos, y podría ser una de las razones de su longevidad.

5.3 Comparación del sistema de complemento entre especies silvestres y domésticas

Los resultados obtenidos demuestran que la prueba de hemólisis de los eritrocitos de cordero no sensibilizados, originalmente adaptada para cocodrilianos (Merchant et al., 2006a), puede ser utilizada con éxito para la evaluación del sistema inmune innato en otras especies de reptiles y aves, pero para los mamíferos, habría que complementarlas con otras determinaciones. (Figura 34). El nivel de dependencia en los resultados encontrados puede reflejar las diferencias subyacentes en la biología e historia de vida de cada especie.

La actividad hemolítica del plasma de *C. latirostris* fue superior al del resto de las especies estudiadas. La mayor capacidad hemolítica del plasma de *C. latirostris* en comparación con la del plasma de tortugas ya había sido indicada por Ferronato et al. (2009) para la especie *Phrynops geoffroanus*, mencionando que la mayor actividad detectada en las especies de cocodrilianos puede deberse a una presión selectiva evolutiva sobre este grupo por vivir en sitios ricos en microorganismos potencialmente patógenos. El mismo razonamiento podría extenderse a la especie de *T. merianae*, en la cual, se detectó valores altos de %MH pero inferiores a los obtenidos por el plasma de *C. latirostris* y similares a los de las tortugas. El hecho de que los valores en estas especies sean inferiores al de yacaré, no implica que el mecanismo de inmunidad innata no sea muy desarrollado ni que la respuesta sea inefectiva (Ferronato et al., 2009).

Las aves han demostrado tener un potente mecanismo inmune no específico basado en la actividad de la VA del SC. Mekchay et al. (1997) reportaron una importante capacidad hemolítica en el plasma de las aves, siendo superior en las silvestres que las que se encuentran bajo condiciones intensivas de crianza comercial.

Estos resultados son coincidentes con lo detectado anteriormente por Skeeles et al. (1980) cuando compararon pollos criados para la obtención de carne con pavos silvestres. En este trabajo no se encontraron diferencias entre las especies de aves domésticas y silvestres sin embargo, para dilucidar esto, sería necesario aumentar la variabilidad agregando más especies y mayor cantidad de ejemplares. Como se describió en la sección 5.1, la capacidad antimicrobiana de una especie de ave comercial (gallina, *Gallus gallus*) fue importante y se le adjudicó esta propiedad al potente sistema inmune innato, similar al de los reptiles, resultante posiblemente del origen evolutivo común y desarrollado como respuesta a la exposición periódica de una cantidad importante de patógenos (Siroski et al., 2009).

Dentro de la búsqueda de la capacidad hemolítica entre los plasmas de los mamíferos, se detectó una diferencia en el plasma proveniente del mono *Ateles chamek*. Coincidentemente, en un trabajo realizado para la determinación de los niveles de hemólisis del suero de 9 especies de primates contra SRBC sensibilizados e insensibilizados, los resultados obtenidos fueron dispares, pero subrayaron que la mayoría provocó solo una leve hemólisis de los SRBC sin sensibilizar (Ellingsworth et al., 1983). Otras determinaciones fueron realizadas a partir de suero de camello (*Camelus dromedarius*) en donde se evaluó la lisis de eritrocitos insensibilizados de distintas especies y se encontró que los eritrocitos de especies homólogas (caprinos, ovinos, rata y vacuno) fueron resistentes mientras que la lisis de los eritrocitos heterólogos se atribuyó a la presencia de la VA del SC (Olaho-Mukani et al., 1995). Algunos hallazgos similares fueron encontrados previamente con suero de búfalo (*Bubalus bubalis*) (Arya & Goel, 1992). Se evaluó la capacidad para lisar eritrocitos de 18 especies de mamíferos y aves por la VA del SC y se observó que los eritrocitos no fueron lisados por los complementos homólogos, salvo algunas excepciones y con valores bajos (Ish et al., 1993). La falta de hemólisis de los eritrocitos por sueros homólogos sugiere que existe una restricción a la hemólisis heteróloga en la que podría estar involucrado un principio regulador de especies no específico y el rol de factores específicos (Van Dijk et al., 1983). A partir de estos estudios podríamos suponer que los SRBC no son lisados por los plasmas de algunos mamíferos porque no son reconocidos

como agentes extraños y, por tal motivo, el SC reconocería un rango más acotado de antígenos para desencadenar su activación.

A pesar de que uno de nuestros objetivos fue evaluar las diferencias entre las actividades del SC en los plasmas de las especies estudiadas, es importante mencionar que la evaluación de la función inmune en la vida silvestre se está convirtiendo en una herramienta importante para la investigación de procesos evolutivos y ecológicos. Los variedad de ensayos que pueden ser empleados con los animales salvajes, se ven muchas veces limitados por la dificultad de la captura y la manipulación, la imposibilidad de recuperar los animales, la prohibición de estudios terminales, la falta de reactivos especializados y el pequeño tamaño muestral de las especies en estudio (Matsona et al., 2005). En este caso, sólo requiere de una sola muestra y poco volumen, para obtener resultados reproducibles, útiles y económicos para evaluar la inmunocompetencia que permitirá luego realizar algunas consideraciones generales.

5.4 Evolución del sistema del complemento durante los primeros 6 meses de edad.

En el estudio realizado para detectar la variación de la actividad del SC en relación al desarrollo, se detectó que todos los animales mostraron actividad hemolítica en todas edades evaluadas. También observamos una diferencia entre animales de diferentes nidos. La capacidad hemolítica detectada en *A. mississippiensis* en plasma de animales recién nacidos fue muy baja e incluso algunos no demostraron actividad (Merchant, en consideración). Los autores destacaron lo llamativo de estos resultados debido a que los nidos están compuestos por material vegetal en descomposición, sumado a la humedad y el calor, por lo que ofrecen un medio enriquecido para el desarrollo de hongos y bacterias. Un estudio desarrollado en nuestro laboratorio comprobó la presencia de bacterias *Stenotrophomonas maltophilia* (Rejf et al., 2008) en muestras de fluido corioalantoideo minutos antes del nacimiento (foto 5.1 a y b) y de la mucosa bucal luego de que el animal rompiera la membrana del huevo (foto 5.1 c y d). A pesar de que se considere que el ambiente dentro del huevo es estéril, la porosidad del huevo permite el intercambio de agua y gases, y parece ser permeable también para el

ingreso de bacterias. Los animales nacidos de los huevos que demostraron *Stenotrophomona* positiva, no evidenciaron ningún signo de enfermedad mientras fueron controlados hasta los 6 meses de edad, asumiendo que se generó un equilibrio entre el microorganismo-hospedador como parte de una flora normal, tal como fue reportado para otras especies (Draper et al., 1981; Ross et al., 1984). Estos hallazgos sugieren que las actividades del SC detectadas en los plasmas de los recién nacidos, junto a otros mecanismos inmunes innatos están, al menos, mínimamente desarrollados para evitar que el ingreso de algunas bacterias generen el desarrollo de una enfermedad.

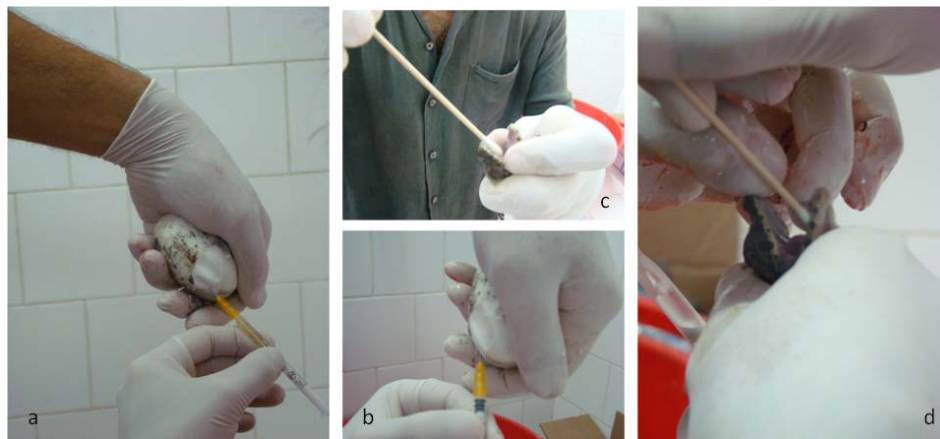


Figura 53. Toma de muestras de fluido corioalantoideo (a y b) y de la boca (b y c) de neonatos de *C. latirostris*.

En la mayoría de los casos, salvo en los nido 294 y 367, se observó que la actividad lisante del plasma fue superior en el mes de abril que en los meses mayo, junio y julio. En dichos meses, es probable que las condiciones climáticas hayan afectado la capacidad de la respuesta inmune, como se mencionó en la sección 5.2, cuando el valor encontrado en la respuesta hemolítica fue inferior durante la incubación a temperaturas inferiores a la ambiental (25 °C). En los nidos 294 y 367, la baja actividad registrada en el primer mes de vida podría adjudicarse a una inmadurez de los órganos

que sintetizan los componentes del complemento, ya que en los meses subsiguientes, demostraron un incremento en la actividad.

Como se mencionó previamente, la respuesta inmune es intensamente afectada por factores ecológicos, incluyendo la dinámica de las poblaciones, estrés, estado nutricional, la temperatura ambiental, edad y las infecciones por patógenos, siendo las variaciones estacionales uno de las más dramáticos (Zapata et al., 1992). Algunas situaciones similares fueron encontradas en lagartos y serpientes donde la inmunidad mediada por células mostró fuertes respuestas durante las estaciones templadas que no fueron observadas en el resto del año (Saad & El Ridi, 1984; Farag & El Ridi, 1985). Cabe destacar que estos animales fueron mantenidos bajo las condiciones mencionadas de temperatura y alimentación dentro de las instalaciones del PY, es decir, alejados de las variaciones estacionales de temperatura, sin embargo, aparentemente algún factor ambiental que varía entre las estaciones estaría involucrado, como pueden ser las radiaciones UV, fotoperíodo, temporada estival, entre otros.

Uno de los fundamentos más importantes de los programas de *ranching* es proteger a los animales de las condiciones extremas de temperatura (Larriera et al., 2005); el motivo del descenso de la respuesta inmune sería una de las explicaciones, sumado al crecimiento y la exposición a predadores, por el cual los organismos que se encuentran en la naturaleza durante los meses más fríos serían más susceptibles a las infecciones. La variación estacional depende de cada especie de reptil pudiendo ser crítica en muchos casos donde las temperaturas son extremas (Zapata et al., 1992), como es el caso de las especies estudiadas en este trabajo.

Salvo en el plasma de los animales provenientes de los nidos 294 y 172, la actividad del SC demostró un incremento en los meses más cálidos (agosto-septiembre). En todos los nidos, la actividad registrada en el mes de septiembre fue más potente en relación al resto de los meses. Esto último coincide con los resultados observados en los estudios realizados sobre el efecto de la temperatura sobre la capacidad hemolítica en animales juveniles y adultos (ver sección 5.2).

5.5 Efecto de la radiación UV sobre el sistema del complemento

Antiguamente, se creía que el asoleamiento que realizan los vertebrados ectotermos sólo estaba relacionado con la termorregulación, hasta que se descubrieron otros efectos beneficiosos de dicha exposición, tales como la fiebre en respuesta a las infecciones (Vaughn et al., 1974; Burns et al., 1996; Merchant et al., 2007), la remoción de los parásitos externos y comensales (Hutchinson, 1989) y la estimulación de la síntesis de vitamina D3 (Ferguson et al., 2003), entre otros que facilitan las funciones biológicas (Roberts, 2005).

Algunos estudios sobre reptiles demostraron que la RUV provista por la luz solar es más conveniente que la de la luz artificial para obtener un mejor crecimiento de los animales bajo condiciones de cautividad. La luz solar, en condiciones normales, provee la cantidad y calidad adecuada de radiación UV para que los organismos desarrollen los procesos vitales con “cierta normalidad” (Ferguson et al., 2005; Karsten et al., 2009). En tal sentido, los resultados obtenidos demostraron que los animales pertenecientes al tratamiento FN lograron un mayor crecimiento.

Gallo et al., (1990) mencionó que la radiación UV ejerce un efecto importante sobre el sistema inmune. Otro trabajo demostró que el componente C3 del SC podía estar involucrado con la inmunosupresión y la antígeno-tolerancia inducida por la radiación UV (Hammerberg et al., 1998). En tanto Livden (1987) encontró que los niveles séricos de los componentes C3 y C4 de individuos saludables no fueron afectados luego de la exposición a UVA por 10, 20 y 28 días, pero contrariamente, ante la exposición UVB el componente C3 aumentó y se redujo la cantidad de C4. La activación de C3 por UVB fue reconocida en la detección de depósitos de C3b y C3d en células epidérmicas dentro de las 24 h de exposición (Rauterberg et al., 1993) y se vio disminuida cuando el tiempo fue prolongado.

En el presente estudio se encontró que las actividades del sistema del complemento, medido por la prueba de hemólisis de SRBC del plasma de los animales expuestos a FN fueron similares a los hallados previamente con plasma de animales provenientes de ambientes silvestres o en cautiverio bajo condiciones análogas (Siroski

et al., 2010). En cambio, los resultados de la hemólisis provocada por el plasma de los animales expuestos a UVR fue menor cuanto mayor fue el tiempo de exposición, e incluso menor que los expuestos a oscuridad total.

En términos absolutos, la irradiancia recibida entre los grupos es bastante diferente. Los yacarés expuestos a FN recibieron una irradiancia mayor (147 W/m^2) que los otros tratamientos. Sin embargo, todos los animales tuvieron la posibilidad de regular el tiempo de exposición interactuando bajo la superficie cubierta por media sombra. Algunos hallazgos similares fueron encontrados en el camaleón pantera (*Furcifer pardalis*) quién modificó su exposición mediante estrategias comportamentales para alcanzar un equilibrio en la síntesis de vitamina D3 (Karsten et al., 2009).

La actividad del complemento detectada en el plasma de los animales provenientes de los tratamientos de 8 y 16 hs de exposición artificial a UVR es dosis dependiente y podría afectar la respuesta inmune de la herpetofauna en cautiverio. Hasta el momento, el mecanismo por el cual la exposición a radiación UV podría suprimir la respuesta inmune, no ha sido dilucidado.

La radiación UVA, UVB o a ambas, ejercen efectos negativos sobre la respuesta inmune. Jokinen et al. (2000) demostraron que la radiación UVB tiene un efecto modulador de algunos parámetros inmunes, contrariamente al que ejerce la radiación UVA. En este experimento sólo se evaluó el desorden funcional de la actividad del SC causado por la UVR artificial, pero si nos basamos en las características de emisión de las lámparas UV utilizadas, no podemos determinar con seguridad si los efectos son producidos por UVA, UVB o por ambos.

El beneficio de la luz artificial como un suplemento de UV para la herpetofauna en cautiverio depende de que el fotoperíodo de exposición y la longitud de onda UV, sean las apropiadas (Caliman Filadelfi et al., 2005). Es factible que estos animales tengan un mecanismo regulatorio de exposición en función de la síntesis de Vitamina D3 similar al que fue detectado en camaleones (Ferguson et al., 2003). Sin embargo, se consideró importante el ofrecimiento de áreas con luz y sombra para que los animales

puedan regular su propia exposición. Debido que no se tiene información sobre cuánto tiempo los animales estuvieron protegidos de la RUV, no es posible asegurar el rol específico que tuvo la sombra en contribuir a la regulación mencionada, hecho que debería ser clarificado en otros estudios.

La radiación UV directa puede causar alteraciones en la inmunidad innata, que posiblemente podría llevar a una incapacidad de los organismos para responder correctamente frente a las infecciones, aumentando la incidencia y la susceptibilidad (Leaf, 1993), a menos que se provean áreas protegidas donde puedan ejercer un mecanismo autoregulatorio.

Este estudio demostró que la luz artificial UV debería ser considerada como un peligro potencial si no es regulada apropiadamente, consideraciones que deben tenerse en cuenta al momento de diseñar los sitios donde se ubican los animales en los establecimientos dedicados a la crianza y mantenimiento de reptiles. Una exposición al sol en períodos naturales parecería ser la mejor alternativa para proveer radiación UV a los yacarés en cautiverio. De todas maneras, si es necesario suministrar luz UV artificial, debe proveerse a los animales de áreas protegidas de la luz para que puedan autoregular la exposición.

5.6 Efectos de plaguicidas sobre el sistema complemento

Actualmente, la actividad agrícola a nivel mundial implica una amplia utilización de plaguicidas formulados (WHO, 1994; Pengue, 2004). Se considera que sólo entre el 10-15% de los plaguicidas aplicados en agricultura ejercen su acción directamente sobre los organismos blanco, mientras que el resto se dispersa en el ambiente (agua, suelo y aire) (Moses et al., 1993; Thompson et al., 2006). De esta manera, las especies de fauna silvestre que habitan en áreas circundantes a cultivos tratados constantemente con plaguicidas se encuentran bajo una alta presión por contaminación y el impacto de los plaguicidas sobre las mismas es, en la mayoría de los casos, subestimado o totalmente desconocido (Mc Laughlin et al., 1995; Tsui et al., 2003).

El campo de la inmunotoxicología en la vida silvestre, es relativamente nuevo, y los estudios con reptiles son muy limitados. Estudios recientes han demostrado que ciertos plaguicidas inmunotóxicos alteran la estructura normal del sistema inmune y reducen la respuesta a los antígenos y agentes infecciosos, incrementando las enfermedades en organismos expuestos (Colosio et al., 1999; Gantress et al., 2003; Mansour, 2004). El sistema inmune en general, es un excelente indicador de la salud de un organismo. En este sentido, la exposición de estos animales, sea aguda o crónica, a ciertos plaguicidas podría afectar tanto la inmunidad innata como la adquirida. Además, bajos niveles de tóxicos puede provocar inmunotoxicidad y a concentraciones mucho más bajas que aquellas necesarias para alcanzar algún efecto sobre un órgano blanco a corto plazo, podría servir como indicador de toxicidad de mucha sensibilidad (Burns et al., 1996).

Sobre la base de la importancia demostrada para la inmunidad innata en los reptiles, y sumado a las características que lo destacan como modelo indicador, es llamativo el hecho de que no se haya utilizado como herramienta frecuente en los estudios de inmunotoxicidad. Esto se extiende a los escasos trabajos realizados en relación a la función del SC frente a la exposición de compuestos químicos considerados contaminantes. Hasta el momento, no se había evaluado el efecto *in vivo* de plaguicidas ni de otros compuestos químicos sobre el SC u otros componentes de la inmunidad innata o adquirida de los reptiles.

En el presente trabajo, se determinó que el efecto de diferentes concentraciones de plaguicidas influyó negativamente sobre la actividad del SC. Las concentraciones incluídas en nuestro diseño experimental, estuvieron orientadas a detectar el efecto dosis-respuesta de RU sobre los yacarés *in vivo*, cubriendo de esa manera, las concentraciones de GFT reportadas en cuerpos de agua en trabajos anteriores. Las variaciones temporales de los niveles de GFT en el ambiente dependen del tiempo de aplicación y de las precipitaciones inmediatas (Peruzzo et al., 2008), pudiendo alcanzar concentraciones mayores en cuerpos de agua pequeños. La concentración máxima esperada de GFT en cuerpos de agua pequeños y de escasa profundidad puede alcanzar valores entre 2,9 y 7,6 mg de ácido equivalente (a.e.)/l (Newton et al., 1994; Couture et

al., 1995; Mann & Bidwell, 1999; Perkins et al, 2000). Las dos concentraciones empleadas, en los rangos desde el inicio al final del experimento, abarcaron en conjunto el rango mencionado. La mayor concentración de plaguicidas (5-21 mg/l) demostró un efecto superior sobre la inhibición de la hemólisis de SRBC. White & Anderson (1985) expusieron ratones de manera subcrónica, a pentaclorofenol (antimicrobiano utilizado para la preservación de la madera) por vía oral y encontraron un efecto deletéreo de las VA y VC del SC resaltando el efecto dosis-dependiente.

Por lo general, los estudios que analizan el efecto de la exposición a contaminantes sobre parámetros del sistema inmune son llevados a cabo en humanos y bajo distintas circunstancias y condiciones. Una de ellas, es la exposición ocupacional, donde un estudio llevado a cabo en personas laboralmente expuestas a contaminantes clorados, reportó un aumento de IgG y una reducción de IgM y de la concentración de C3 comparados con el control (Wysocki et al., 1985). Otro estudio similar, pero con trabajadores expuestos a plaguicidas del grupo de los piretroides, reportó alteraciones a nivel del C4 pero no en IgG, IgA, IgM y C3 (Ündeğer & Başaran, 2001).

Es indudable que existe una importante dificultad en estos casos para evaluar la toxicidad de los contaminantes individualmente en personas expuestas a un grupo de ellos pero no se puede negar que existe un riesgo potencial para el sistema inmunológico como consecuencia de dichas exposiciones. Para complementar tales estudios se pueden citar trabajos llevados a cabo *in vitro* como por ejemplo, el trabajo realizado para evaluar la potencialidad de diferentes concentraciones de carbaril (1-naftil methylcarbamato), carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranyl metilcarbamato), DDT [1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano], y paraoxón (dietil 4-nitrophenil fosfato) sobre la actividad del SC del suero humano mediante el ensayo de SRBC (Casale et al., 1989). Los autores reportaron que todos los plaguicidas, excepto el paraoxón, produjeron una inhibición concentración-dependiente de la lisis de SRBC. De hecho, se reconoce que los ensayos para evaluar la función inmune son más sensibles que otros criterios de valoración (NRC, 1992).

Al finalizar la exposición, todos los animales fueron inyectados con SF y LPS. Como se mencionó previamente, los LPS son componentes importantes de la membrana

externa de las bacterias gram negativas. Merchant et al. (2006c) reportó que *A. mississippiensis* respondieron inmunológicamente a la inyección de LPS bacterianos con un incremento en los leucocitos totales. Estos resultados fueron consistentes con los demostrados en la tortuga *Terrapene carolina* (Amoral et al., 2002) en el sapo cururu, *Bufo paracnemis* (Bicego-Nahas et al., 2000). En este estudio se detectó que la actividad hemolítica demostrada por los animales inyectados con LPS fue inferior a la de los inyectados con SF. En este caso, podríamos suponer que la exposición a plaguicidas estaría ejerciendo un efecto supresor de la respuesta inmune a nivel del SC a concentraciones altas de GFT. Este efecto se observó solamente cuando este sistema fue desafiado por componentes de la pared celular de *E. coli*. En los animales controles inyectados con SF, los %MH registrados fueron bajos en comparación con estudios similares llevados a cabo en esta Tesis, por lo que el nivel de estrés de los animales bajo estas condiciones de experimentación, y por la inyección propiamente dicha, podría estar influenciando negativamente sobre la actividad del SC.

Las investigaciones cuantitativas y morfológicas del recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica se han incluido en la mayoría de los ensayos de inmunotoxicidad (Tryphonas, 2001). En este tipo de ensayos los parámetros hematológicos tradicionales pueden proveer información sobre el estrés general, donde un aumento del índice heterófilo/linfocito es una respuesta común al estrés en reptiles (Morici et al., 1997; Lance & Elsey, 1999) y se lo relacionó con diferentes enfermedades (Aguirre et al., 1995; Work et al., 2001; Knotek et al., 2002). El orden de los valores del recuento total de leucocitos proveniente de los animales expuestos y no expuestos a plaguicidas, fue similar al encontrado en *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2006c) y en *Cr. porosus* (Millan et al., 1997) pero superiores a los reportados para la misma especie y *C. yacare* en animales en cautiverio (Mussart et al., 2006). Es probable que en este último, al estar en cautiverio durante mucho tiempo podrían estar demostrando un estado inmunosuprimido causado por situaciones de estrés crónico. Dentro del grupo control, luego de la inyección de LPS y SF, se observó un incremento en el recuento total de leucocitos en los animales que recibieron la dosis de LPS, respondiendo de la manera esperada ante tal estimulación. En cambio, los animales expuestos a plaguicidas no demostraron diferencias en la respuesta ante la inyección de

LPS ni de SF. La baja respuesta al estímulo de la inyección también fue observada en tortugas expuestas a contaminantes organoclorados (Keller et al., 2004)

En cuanto al comportamiento de las poblaciones de leucocitos observadas fueron variables. Los heterófilos demostraron una respuesta baja en los tratamientos con RU a diferencia del control, pero en todos los casos se detectaron valores mayores como respuesta ante la estimulación con LPS. Estos resultados demostraron el efecto supresor de los plaguicidas sobre los heterófilos, siendo ésta, una de las poblaciones más perjudicadas por tener una importante intervención en la respuesta inmune inespecífica. Los elevados porcentajes de heterófilos en los controles son consistentes con lo reportado por Merchant et al. (2006c).

Contrariamente, el porcentaje de los linfocitos de los animales expuestos a la mayor concentración de RU, fue superior que en el resto de los tratamientos, por lo cual, tal exposición no tuvo el mismo efecto que con la población de heterófilos. En todos los casos, los valores fueron similares o inferiores a lo reportado en las mismas especies (Mussart et al., 2006) que no han sido estimuladas. Esto último, coincide con lo observado por Merchant et al. (2006c), quienes reportaron que la población linfocitaria total fue una de las menos afectadas por la estimulación con LPS.

Tanto los monocitos como los eosinófilos estuvieron influenciados por la exposición a RU luego de la inyección con LPS. En este caso, los animales expuestos en todos los grupos tuvieron valores menores que los inyectados con SF, sugiriendo que el estrés provocado por el manipuleo de los animales podría estar disminuyendo de esta manera la resistencia al componente bacteriano.

El sistema inmune es sensible a las alteraciones causadas por los contaminantes ambientales y la supresión de las funciones inmunes puede conducir al aumento del riesgo de enfermedades en los reptiles (Tangredi & Evans, 1997). Existe una gran necesidad de entender mejor los efectos de los contaminantes ambientales sobre la salud de los reptiles, la inmunidad, y en última instancia, la supervivencia. Un abordaje integrador que combine el análisis de marcadores de exposición y efecto contribuirá a la mejor comprensión de los mecanismos asociados al daño observado, proveyendo de

esta manera mejores herramientas predictivas para la protección ambiental de especies silvestres (Venturino et al., 2003).

5.7 Dipeptidil peptidasa IV en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*

En este trabajo, se identificó y describió la actividad de la forma soluble de la enzima DPPIV en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*. Recientemente, esta enzima fue reportada en suero y sangre entera del *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2009b) en el cual se confirmó su actividad proteolítica mediante el uso de un inhibidor específico de la enzima, la Diproteína A (Ile-Pro-Ile) (Rahfeld et al., 1991). El aumento de la concentración de Diproteína A provocó un descenso en las actividades de la enzima DPPIV, indicando que la hidrólisis del sustrato (Ala-Pro-AFC) se debió a la actividad específica de la misma. Nuestros resultados confirmaron la presencia de la enzima activa en las dos especies de yacaré estudiadas.

La actividad de la DPPIV demostró una relación positiva basada en los datos obtenidos a partir de la incubación con diferentes cantidades de plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*. Estas actividades fueron muy superiores a las detectadas en sueros de modelos murinos *in vitro* (Kubota et al., 1992), cerdos (Faidley et al., 2006) y humanos (Lefebvre et al., 2002; McKillop et al., 2008). Resultados similares se hallaron en *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2009b) pero los valores detectados en sangre entera fueron más elevados que en plasma, lo que se atribuyó a la presencia de DPPIV sobre la superficie de las células T (Mentlein et al., 1984). En general, la forma de las curvas (DPPIV en función de la concentración de plasma, temperatura de incubación y cinética de la reacción) y las proporciones de formación de productos obtenidos en nuestro estudio fueron similares a los encontrados en otras especies de cocodrilianos estudiadas (Merchant et al., 2009b).

Como se mencionó, los animales ectotermos son buenos modelos para evaluación de la influencia de la temperatura sobre una variedad de funciones fisiológicas, dentro de las cuales se indicó el rol de la temperatura ambiental en la determinación del sexo (Simoncini et al., 2008); alimentación (Larriera et al., 2008), así como en la formación de respuestas inmunes (Merchant et al., 2005c; Siroski et al., 2010), entre otros. En este

estudio, la temperatura de incubación del plasma durante la reacción de DPPIV afectó la actividad de dicha enzima e intervino más intensamente en *C. latirostris* que en *C. yacare*. A bajas temperaturas, el plasma de ambas especies demostró baja actividad de la enzima, coincidiendo con el concepto de que la actividad metabólica de los vertebrados ectotérmicos está reducida al mínimo (Johnson et al., 2008). Por el contrario, las actividades máximas de la enzima se detectaron a las temperaturas en que los cocodrilianos desarrollan óptimamente sus procesos metabólicos, incluyendo una adecuada respuesta inmune (Glassman & Bennett, 1978). Esto coincide con lo reportado por Merchant et al. (2009b) en relación a que la respuesta del cocodrilo americano (*Cr. acutus*) a las infecciones es dependiente de la temperatura, con un máximo nivel de desarrollo alrededor de los 30 °C.

Como se indicó en la sección 5.2, las diferencias halladas respecto de la temperatura entre las especies estudiadas, pueden ser atribuidas a algunas adaptaciones que poseen en base a las tolerancias climáticas y a las temperaturas existentes dentro de sus distribuciones geográficas (Siroski et al., 2010), demostrando la posibilidad de que *C. latirostris* pueda ejercer sus funciones metabólicas a temperaturas más bajas que *C. yacare*. La enzima en el plasma de *C. latirostris* estabilizó su actividad entre 30 y 40 °C, mientras que en *C. yacare*, la estaría alcanzando a temperaturas mayores, aunque con valores inferiores que *C. latirostris*. Por otra parte, la enzima en *C. latirostris* tuvo una actividad superior a temperaturas muy bajas (5 °C), e incluso a partir de los 10 °C duplicó los valores alcanzados por la enzima en el plasma de *C. yacare*.

Las actividades de DPPIV en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare* aumentaron en función del tiempo de incubación con el compuesto fluorescente. La cinética de la actividad de la peptidasa fue similar a la detectada *in vivo* en ratones (Kubota et al., 1992) y en *A. mississippiensis* (Merchant et al., 2009b). Este último reportó que la actividad de la enzima con el tiempo, podría deberse a que esta enzima requiere un corto período para su activación pero es necesario un tiempo mayor para que alcance su eficiencia catalítica al mismo nivel de proteína. De manera similar, ambas especies presentaron una rápida reacción que podría relacionarse con una característica común de la enzima en los cocodrilianos.

Las diferencias en la susceptibilidad a los factores que afectan la supervivencia (tales como agentes estresantes y microorganismos patógenos) entre las dos especies estudiadas se han observado en diferentes granjas de caimanes argentinos. De acuerdo a los informes obligatorios presentados a los organismos nacionales competentes, la mortalidad en los diferentes programas de *ranching* en Argentina, indica que en las mismas condiciones de crianza (temperatura, tipo de alimentación y frecuencia, factores de estrés, regímenes de limpieza, etc.), *C. yacare* tiene mayor tasa de mortalidad que *C. latirostris*. Las variaciones encontradas en las actividades de DPPIV, junto con otras, podrían considerarse como una ventaja en términos inmunológicos, sugiriendo que *C. latirostris* sería más tolerante a esas situaciones de estrés que *C. yacare*.

5.8 Fosfolipasa A2 en plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*

Mediante el empleo de la técnica de espectrofluorescencia descrita, se detectó la actividad plasmática de PLA2 en el plasma de *C. latirostris* y *C. yacare*. Recientemente, Merchant et al. (2009a) realizaron un ensayo similar incluyendo proporciones de bacterias sin el marcador fluorescente para demostrar la especificidad de la reacción. Ante una cantidad fija de suero de *A. mississippiensis*, se detectó la reducción de la fluorescencia a medida que se incrementaba la cantidad de bacterias sin el marcador. La actividad catalítica de PLA2 compitió con las bacterias con marcador y con las que no lo tenían, reduciendo la cantidad de producto fluorescente formado en forma dependiente de la concentración del sustrato marcado. Otro estudio comprobó la presencia de PLA2 en el suero de dos especies de cocodrilos, *Cr. siamensis* y *Cr. porosus* (Nevalainen et al., 2009).

De la misma manera que se observó en secciones anteriores, la actividad enzimática dependió de la temperatura de incubación durante la reacción. A temperaturas bajas (desde 5 a 15 °C), la actividad de la enzima en el plasma de *C. latirostris* fue superior a la de *C. yacare*. Esta diferencia podría atribuirse a la mayor tolerancia climática de *C. latirostris* que le permitiría desarrollar varias actividades

enzimáticas a una temperatura inferior, alcanzando las actividades más altas a temperaturas mayores, tal como se mencionó en las secciones 5.2 y 5.7.

El efecto del aumento de las proporciones de plasma de las especies de yacaré con cantidades constantes de la solución de bacterias marcadas se relacionó con una mayor actividad de PLA2. Nuevamente, pequeñas cantidades de plasma produjeron un incremento importante en la actividad PLA2, siendo superior en el plasma de *C. latirostris*, como fuera observado en la sección 5.7. La actividad registrada demostró que con muy poco volumen de plasma, se observó una actividad enzimática de aproximadamente el 40 % del máximo observado. Estos resultados coinciden con determinaciones análogas en otras especies de cocodrilianos (Merchant et al., 2009a; Nevalainen et al., 2009) pero ninguno de estos estudios pudo discernir si se debe a que el plasma contiene altas cantidades de PLA2 o a una mayor actividad cuando la misma aparece en cantidades moderadas. Dicha capacidad otorga a esta técnica una ventaja, debido a que con pequeños volúmenes de plasma se pueden obtener resultados reproducibles con variaciones muy bajas.

Otra característica importante de PLA2 en el plasma de yacaré, es la velocidad de reacción. A los cinco minutos de exposición del plasma a las bacterias ya demostró una elevada actividad siendo mayor en el plasma de *C. latirostris* en todos los tiempos evaluados, coincidiendo con lo observado en la determinación de la cinética de reacción de DDPIV. Esta propiedad también se destacó en los trabajos realizados con otras especies de cocodrilianos, sin embargo, en *A. mississippiensis*, a partir de los 60 min de transcurrida la reacción, la cantidad de producto formado fue el máximo y se mantuvo constante hasta los 120 min.

Valores similares a los obtenidos en este trabajo fueron reportados en humanos con severas infecciones, traumas, estados postoperatorios (Nevalainen et al., 2000) y sepsis bacterianas (Rintala et al., 1995). Por este motivo, PLA2 fue reconocida como una nueva proteína de fase aguda sintetizada por hepatocitos (Crowl et al., 1991; Nevalainen et al., 1996). En este trabajo, todos los animales estudiados estaban saludables, por lo cual, los elevados niveles de PLA2 sugieren que los yacarés poseen

una alta concentración bajo condiciones normales, comparables con los niveles de pacientes con enfermedades inflamatorias (Aufenanger et al., 1993).

Por último, además del complemento, la enzima PLA₂, es un efectivo agente antibacteriano (Grönroos et al., 2005). Los efectos bactericidas están basados en la hidrólisis de los fosfolípidos que componen la membrana celular de las bacterias que fueron confirmados al provocar la muerte celular de bacterias *in vitro* (Grönroos et al., 2001; Koduri et al., 2002) e *in vivo* (Laine et al., 1999). La alta actividad catalítica de PLA₂ del plasma de los yacarés, reconocida como una importante molécula efectora de la inmunidad innata (Six & Dennis, 2000; Nevalainen et al., 2009), podría estar asociada a la capacidad que poseen estos animales para resistir el ataque de numerosos microorganismos.

A decorative, symmetrical, light-colored graphic element centered on the page. It features a central circular motif with intricate patterns, possibly a stylized eye or a floral design, surrounded by flowing, organic shapes that resemble smoke or water. The overall appearance is that of a traditional or classical ornament.

Conclusiones

6. Conclusiones

La respuesta inmune en las diferentes especies animales ha evolucionado desde mecanismos innatos hasta los más elaborados y adaptativos para combatir a los agentes extraños. En líneas generales, el sistema inmune innato, a diferencia del sistema inmune adaptativo, es rápido, no posee memoria inmunológica y se ha transformado, mejorando en el tiempo a partir de los enfrentamientos entre el hospedador y los patógenos. La importancia del SIA sobre el SII, y viceversa, no está definida claramente debido a que la intervención de ambos genera un proceso interactivo de reacciones que es la clave para una respuesta inmune automática, regulada, dinámica y sostenible.

Los cocodrilianos exhiben comportamientos sociales fuertemente marcados que incluyen serias disputas entre congéneres en el momento de la reproducción, la obtención de alimento, la selección de lugares de nidificación, o debidas a factores estresantes como pueden ser las altas densidades, el manejo de animales, la presencia de predadores, la intervención del hombre, entre otros. Como consecuencia, es común observar la pérdida de miembros y otras heridas de consideración. Asimismo, es sabido que estos animales habitan en ambientes que contienen una alta concentración de microorganismos patógenos, tanto en los sistemas naturales como en cautiverio. Por lo general, esta combinación de factores predispone al desarrollo de infecciones localizadas o sistémicas que, incluso, pueden causar la muerte. La pregunta frecuente es entonces, cómo pueden sobrevivir estos animales con heridas importantes y en ambientes con una alta exposición a microorganismos patógenos, sin demostrar signos de enfermedad.

La evaluación y caracterización de algunos de los componentes del sistema inmune de *C. latirostris* estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral en respuesta a distintos escenarios adversos, nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- ✓ La capacidad antibacteriana del plasma de *C. latirostris* es mayor que la de las otras especies evaluadas, inhibiendo el crecimiento total de una cepa de bacterias patógenas a las pocas horas de exposición. El SC sería uno de los posibles causantes de la altamente efectiva respuesta inmune y la actividad

antimicrobiana plasmática evidenciada en las dos especies de cocodrilianos existentes en Argentina.

- ✓ La actividad del SC del plasma de *C. latirostris* es superior al resto de los reptiles y aves, y estos a su vez, mayores que la de los mamíferos. Estos resultados nos permiten suponer que la similitud de orígenes evolutivos y las historias de vida de aves y reptiles han conducido al desarrollo de un SC capaz de enfrentar a los microorganismos de manera mucho más eficaz que los mamíferos.
- ✓ Los caimanes recién nacidos tienen un SC activo, que depende del nido de origen y responde a una variación estacional que estaría muy relacionada con factores ambientales, a diferencia de lo observado en otras especies similares.
- ✓ La exposición *in vivo* a glifosato (Roundup[®]) de animales recién nacidos provocó una disminución en la respuesta del SC y una alteración del recuento de leucocitos. El SC también se vio afectado por la radiación UV artificial. Por lo tanto, la actividad del SC de los yacarés se puede utilizar como indicador para analizar los efectos asociados al daño causado por los plaguicidas y la radiación ultravioleta.
- ✓ Por último, la detección y caracterización de dos enzimas intervinientes en el sistema inmune, la dipeptidil peptidasa IV y la fosfolipasa A2, mostró que las especies de caimanes argentinos tienen actividades superiores comparadas con otras especies y similares a las de otros cocodrilianos estudiados.

Cabe destacar el rol importante de la temperatura sobre una variedad de funciones fisiológicas en las que está incluida la respuesta inmune. Las mayores actividades se observaron dentro del rango de temperatura que seleccionan los cocodrilianos para llevar a cabo de manera óptima las reacciones metabólicas funcionales.

Como conclusión general, y tal como se observó a partir del conjunto estudios realizados, podríamos sugerir que los cocodrilianos tienen un sistema inmune innato eficiente y con un grado de desarrollo que le permitiría resistir el ataque de los microorganismos característicos de los ambientes en los que viven. El potente SC sería

uno de los componentes de la inmunidad inespecífica que colaboraría mayoritariamente en tal resistencia. Los cocodrilianos representan un grupo exitoso de organismos que han cambiado poco durante millones de años y estos animales son una importante fuente de información para quienes investigan los avances de la inmunología desde un punto de vista filogenético, manteniendo una capacidad intacta para discriminar lo propio de lo extraño y para protegerse de las infecciones. Esta capacidad para resistir el ataque de los microorganismos podría ser una de las razones de su éxito y longevidad.

La profundización de este trabajo sobre el sistema complemento de los yacarés podría orientarse a la detección y caracterización de los componentes específicos de este sistema que le otorgarían propiedades antimicrobianas únicas entre diferentes órdenes zoológicos, haciendo que el SI de este reptil posea características superiores para sobreponerse a las infecciones.

A decorative flourish or scrollwork element, rendered in a light gray color, is positioned behind the text. It features a central circular motif with intricate patterns, flanked by symmetrical, flowing lines that taper outwards.

Referencias bibliográficas

7. Referencias bibliográficas

- Aderem, A., Ulevitch, R. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Aguirre, A. A., Balazs, G. H., Sprak, T. R., Gross, T. S. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol. Zool.* 68: 831-854.
- Aird, S. D. 2008. Snake venom dipeptidyl peptidase IV: Taxonomic distribution and quantitative variation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 150: 222-228.
- Akira, S., Takeda, K., Kaicho, T. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* 2: 675- 680.
- Allen, M. E., Bush, M., Oftedal, O. T., Rosscoe, R., Walsh, T., Holick, M. F. 1994. Update on vitamin D and ultraviolet light in basking lizards. En: *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Pittsburgh, USA.* Pp 314-316.
- Al-Sharif, W. Z., Sunyer, J. O., Lambris, J. D., Smith, L. C. 1998. Sea Urchin Coelomocytes Specifically Express a Homologue of the Complement Component C3. *J. Immunol.* 160: 2983-2997.
- Amavet, P., Rosso, E., Markariani, R., Piña, C. I. 2008. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. *J. Exp. Zool. A* 309: 637-642.
- Amoral, J. P., Marvin, G. A., Hutchinson, V. H. 2002. The influence of bacterial lipopolysaccharide on the thermoregulation of the box turtle *Terrapene carolina*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75: 273-282.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., Steinrücken, H. C. 1980. The site of the inhibition of the Shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 66: 830-834.
- Andersson, U., Bird, A. G., Britton, S., Palacios, R. 1981. Humoral and cellular immunity in humans studied at the cell level from birth to two years of age. *Immunol. Rev.* 57: 5-38.
- Angilleta, M. J. Jr. 2001. Thermal and physiological constraints on energy assimilation in a widespread lizard (*Sceloporus undulates*). *Ecology* 82: 3044-3056.

- Araki, T., Yamamoto, T., Torikata, T. 1998. Reptile lysozyme: the complete amino acid sequence of soft-shelled turtle lysozyme and its activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 316-324.
- Artyukhov, V. G., Gusinskaya, V. V., Dvurekova, E. A., Rubtsov, M. P. 2007. Structural and functional changes in complement protein C4 under UV irradiation. *Biophysics* 52: 532-536.
- Arya, A., Goel, M. C. 1992. Studies on activation and levels of haemolytic complement of buffalo (*Bubalus bubalis*). II. Alternate complement pathway activity in serum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30: 411-418.
- Astudillo, M. A., Pérez-Chacón, G., Balboa, M. A., Balsinde, J. 2009. Arachidonic acid mobilization by stimuli of the innate immune response. *Inmunología* 28: 182-192
- Atkinson, D. Toxicological properties of glyphosate. 1985. En: Grossbard, E., Atkinson D. (Eds.). *The Herbicide Glyphosate*, Butterworth and Co. Ltd, Toronto, Canada. Pp. 127–133.
- Aufenanger, J., Zimmer, W., Püttmann, M., Ensenauer, R. 1993. Determination of the catalytic activity of phospholipase A2: *E. coli*-based assay compared to a photometric micelle assay. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31: 777-785.
- Bacle, F., Haeffner-Cavaillon, N., Laude, M., Couturier, C., Kazatchkine, M. D. 1990. Induction of IL-1 release through stimulation of the C3b/C4b complement receptor type one (CR1, CD35) on human monocytes. *J. Immunol.* 144: 147-152.
- Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defence against infection. Review. *Respiratory Res.* 1: 141-150.
- Banerjee, B. D., Koner, B. C., Ray, A. 1996. Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian J. Exp. Biol.* 34: 723-733.
- Barrington, R., Zhang, M., Fischer, M., Carroll, M. C. 2001. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunological Rev.* 180: 5-15
- Bassetti, L. A. 2002. Comportamento de termorregulação em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) adultos em cativeiro. Tesis de Mestrado. Esc. Super. Agri. Luiz de Queiroz, Univ. São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil.
- Becherer, J. D., Alsenz, J., Lambris, J. D. 1990. Molecular aspects of C3 interactions and the structural/functional analysis of C3 from different species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 153: 45-72.

- Bejarano González, F., Souza Casadinho, J., Weber, J. M., Guadarrama Zugasti, C., Escamilla Prado, E., Beristáin Ruiz, B., Acosta, M., Cárcamo, M. I., Ramírez Muñoz, F. 2008. El endosulfán y sus alternativas en América Latina. Red de Acción sobre Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Pp 148.
- Beldomenico, P. M., Rey, F., Prado, W. S., Villarreal, J. C., Muñoz de Toro, M., Luque, E. H. 2007. In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68: 246-251.
- Bevins, C. L. 1999. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 45: 911-915.
- Bhakdi, S., Maillet, F., Muhly, M., Kazatchkine, M. D. 1988. The cytolytic C5b-9 complement complex: feedback inhibition of complement activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1912-1916.
- Bicego-Nahas, K. C., Steiner, A. A., Carnio, E. C., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L. G. S. 2000. Antipyretic effect of arginine vasotocin in toads. *Am. J. Physiol.* 278: R1408-R1414.
- Biron, C. A. 1997. Natural killer cell regulation during viral infection. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 687-690.
- Blom, A. M. 2004. Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 64: 479-496.
- Boonacker, E. P., Wierenga, E. A., Smits, H. H., Van Noorden, C. J. F. 2002. CD26/DPPIV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 1169-1177.
- Boonacker, E. P., Van Noorden, C. J. F. 2003. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Euro. J. Cell Biol.* 82: 53-73.
- Borregaard, N., Elsbach, P., Ganz, T., Garred, P., Svejgaard, A. 2000. Innate immunity: from plants to humans. *Immunol. Today* 21: 68-70.
- Brames, H. 2007. Aspects of Light and Reptile Immunity. *Iguana* 14: 18-23.

- Brisbin, I. L. Jr. 1982. Applied ecological studies of the American alligator at the Savannah River Ecology Laboratory: an overview of program goals and design in crocodiles. En: Crocodiles. Proceeding of the 5th Meeting of the Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland. Pp. 376-388.
- Burke, J. E., Dennis, E. A. 2009. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23: 49-59.
- Burns, G., Ramos, A., Muchlinski, A. 1996. Fever response in North American Snake. *J. Herpetol.* 30: 133-139.
- Burns, L. A., Meade, B. J., Munson, A. E. 1996. Toxic responses of the immune system En: Klaassen, C. D. (Ed.). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, New York. USA. Pp. 355–402.
- Caliman Filadelfi, A. M., Vieira, A., Mazzilli Louzada, F. 2005. Circadian rhythm of physiological color change in the amphibian *Bufo ictericus* under different photoperiods. *Comp. Biochem. Physiol. A* 142: 370-375.
- Campbell, K. R. 2003. Ecotoxicology of crocodylians. *Appl. Herpetol.* 1: 45–163.
- Campos, Z. 1993. Effect of habitat on survival of eggs and sex ratio of hatchlings on *Caiman crocodilus yacare* in the Pantanal - Brazil. *J. Herpetol.* 27:127-132.
- Carey, C. N., Cohen, A., Rollins-Smith, L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 459-472.
- Carroll, M. C., Janeway, C. A. 1999. Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 11-12.
- Casale, G. P., Bavari, S., Connolly, J. J. 1989. Inhibition of human serum complement activity by diisopropylfluorophosphate and selected anticholinesterase insecticides. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12: 460-468.
- Ceballos, J. C., Bottino, M. J., Grossi Gallegos, H. 2005. Radiación solar en Argentina estimada por satélite: Algunas características espaciales y temporales: Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais – DSA; Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticas – CPTEC; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE – Brasil; División Física, Departamento de Ciencias Básicas; Universidad Nacional de Luján , Argentina. Pp 11.
- Chattopadhyay, S., Sinha, N. K., Banerjee, S., Roy, D., Chattopadhyay, D. D., Roy, S. 2006. Small cationic protein from a marine turtle has β -defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. *Proteins* 64: 524-531.

- Chen, X. 2006. Biochemical properties of recombinant prolyl dipeptidases DPP4 and DPP8. *Adv. Exp. Med. Biol.* 575: 27-32.
- Choi, N. H., Mazda, T., Tomita, M. A. 1989. A serum protein SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. *Mol. Immunol.* 26: 835-840.
- Coico, R., Sunshine, G., Benjamini, E. 2003. *Immunology: A short course*. 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA. Pp. 245- 247.
- Colosio, C., Corsini, E., Barcellini, W., Maroni, M. 1999. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol. Lett.* 108: 285-295.
- Cooper, N. R. 1991. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol. Today* 12: 327-331.
- Cooper, E. L. 2002. Comparative Immunology. *Curr. Pharm. Des.* 8: 99-110.
- Courtney Smith, L., Clow, L. A., Terwilliger, D. P. 2001. The ancestral complement system in sea urchins. *Immunol. Rev.* 180: 16-34.
- Couture, G., Legris, J., Langevin, R. 1995. Evaluation des impacts du glyphosate utilise dans le milieu forestier. *Ministere des Ressources Naturelles, Direction de Environment forestier, Service du suivi environnemental, Charles- bourg, Quebec, Canada.* Pp 57.
- Cox, C. 1999. Inert ingredients in pesticides: Who's keeping secrets? *J. Pestic. Reform* 19: 2-7.
- Cragg, M. S., Howatt, W. J., Bloodworth, L., Anderson, V. A., Morgan, B. P., Glennie, M. J. 2000. Complement mediated cell death is associated with DNA fragmentation. *Cell Death Differ.* 7: 48-58.
- Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R., Stoner, C. R. 1991. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem.* 266: 2647-2651.
- Dahl, M. R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A. C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C. 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complementactivation pathway. *Immunity* 15: 127-135.

- Das, N., Srivastava, N., Srivastava, L. M. 1988. Activation of serum complement by organochlorine insecticides, DDT and endosulfan. *Curr. Sci.* 57: 524–526.
- Deeming, D. C. 2004. Post-hatching phenotypic effects of incubation in reptiles. En: Deeming, D. C. (Ed.). *Reptilian Incubation: Environment, Evolution, and Behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. Pp. 229–251.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Bresseur, M., Maloy, W. L., Bevins, C. L. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3952-3956.
- Diaz, A., Ferreira, A., Sim, R. B. 1997. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*. Sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J. Immunol.* 158: 3779-3786.
- Donald, P. F. 2004. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conserv. Biol.* 18: 17-37.
- Doyle, M. E, Archer, J., Kaspar, C. W., Weiss, R. 2006. Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from Food and Non-food Sources. *FRI Briefings*. Pp. 33.
- Draper, C. S., Walker, R. D., Lawler, H. E. 1981. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 1223-1226.
- Dunkelberg, J. R., Song, W. C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune response. *Cell Res.* 20: 34-50.
- Du Pasquier, L. 2001. The immune System of Invertebrates and Vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 129: 1-15.
- Ecobichon, D. J. 2005. Efectos Tóxicos de los pesticidas. En: Klaassen, C. D., Watkins, J. B. (Eds.), Casarett y Doull. *Fundamentos de Toxicología*, cap. 22, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. Pp. 339-353.
- Ellingsworth, L. R., Holmberg, C. A., Osburn, B. I. 1983. Hemolytic complement measurement in eleven species of nonhuman primates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 5: 141-149.
- Esser, A. F. 1994. The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 87: 229-247.

- Faidley, T. D., Leiting, B., Pryor, K. D., Lyons, K., Hickey, G. J., Thompson, D. R. 2006. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV does not increase circulating IGF-1 concentrations in growing pigs. *Experim. Biol. Med.* 231: 1373-1378.
- Farag, M. A., El Ridi, R. 1985. Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology* 55: 173-181.
- Favoreel, H. W., Van de Walle, G. R., Nauwynck, H. J., Pensaert, M. B. 2003. Virus complement evasion strategies. *J. Gen. Virol.* 84: 1-15.
- Fearon, D.T. 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J. Exp. Med.* 152: 20-30.
- Fearon, E. R. 1997. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 277: 1043-1050.
- Feder, M. E., Bennett, A. F., Huey, R. B. 2000. Evolutionary physiology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 315-341.
- Ferguson, M. W. J., Joanen, T. 1983. Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *J. Zool.* 200: 143-177.
- Ferguson, G. W., Gehrman, W. H., Karsten, K. B., Hammack, S. H., McRae, M., Chen, T. C., Lung, N. P., Holick, M. F. 2003. Do Panther Chameleons Bask to Regulate Endogenous Vitamin D₃ Production? *Physiol. Biochem. Zool.* 76: 52-59.
- Ferguson, G. W., Gehrman, W. H., Karsten, K. B., Landwer, A. J., Carman, E. N., Chen, T. C., Holick, M. F. 2005. Ultraviolet exposure and vitamin D synthesis in a sun-dwelling and a shade-dwelling species of Anolis: Are there adaptations for lower ultraviolet B and dietary vitamin D availability in the shade? *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 193-200.
- Ferronato, B. O., Merchant, M. E., Marques, T. S. Verdade, L. M. 2009. Characterization of innate immune activity in *Phrynosoma geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Zoologia* 26: 747-752.
- Finlay, B. B., McFadden, G. 2006. Anti-Immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124: 767-782.
- Frank, M. M. 2001. Annihilating host defense. *Nat. Med.* 7: 1285- 1286.
- Franklin, C. E., Davis, B. M., Peucker, S. K. J., Stephenson, H., Mayer, R., Whittier, J., Lever, J., Grigg, G. C. 2003. Comparison of stress induced by manual restraint

- and immobilization in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. J. Exp. Zool. A 298: 86-92.
- Frederick, J. E., Snell, H. E., Haywood, E. K. 1989. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. Photochem. Photobiol. 50: 443-450.
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. F. R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S. B., Richardson, M. K., Hodgson, W. C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Kochva, E. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature 439: 584-588.
- Fujimori, Y., Harumiya, S., Fukumoto, Y., Miura, Y., Yagasaki, K., Tachikawa, H. 1998. Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 244: 796-800.
- Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nature 2: 346-353.
- Fujita, T., Endoa, Y., Nonaka, M. 2004. Primitive complement system-recognition and activation. Mol. Immunol. 41: 103-111.
- Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotriens: Advances in eicosanoid biology. Science 294: 1871-1875.
- Gallo, R. L., Staszewski, R., Granstein, R. D. 1990. Physiology and pathology of skin photoimmunology. En: Bos, J. (Ed.). Skin and Immune System, chapter 20, CRC press, Boca Raton, Florida, USA. Pp. 381-402.
- Gantress, J., Maniero, G. D., Cohen, N., Robert, J. 2003. Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. Virology 311: 254-262.
- García de Llasera, M. P., Gómez-Almaraz, L., Vera-Avila, L. E., Peña-Alvarez, A. 2005. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. J. Chromatogr. A 1093: 139-146.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., Chen, W. T. 2006. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. Cancer Res. 66: 4652-4661.

- Ghosh, M., Loper, R., Gelb, M. H., Leslie, C. C. 2006. Identification of the expressed form of human cytosolic phospholipase A2beta (cPLA2beta): cPLA2beta3 is a novel variant localized to mitochondria and early endosomes. *J. Biol. Chem.* 281: 16615–16624.
- Glassman, A. B., Bennett, C. E. 1978. Response of the alligator to infection and thermal stress. En: Thorpe, J. H., Gibbons, J. W. (Eds). *Energy and Environmental Stress in Aquatic Systems*. DOE Symposium Series (CONF-71114) National Technical information Service, Springfield, Virginia, USA. Pp. 691-702.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, E., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo - Pedron, Frescura Durate, F., Pimentel, M. Y., Vieira, V. L. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 65: 237-241.
- Gorrell, M. D. 2005. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin. Sci.* 108: 277-292.
- Götze, O., Müller-Eberhard, H. J. 1976. The alternative pathway of complement activation. *Adv. Immunol.* 24: 1-35.
- Grasman, K. A., Fox, G. A., Scanlon, P. F., Ludwig, J. P. 1996. Organochlorine-associated immunosuppression in pre fledgling Caspian terns and herring gulls from the Great Lakes: an ecoepidemiological study. *Environ. Health Perspect.* 104: 829-842.
- Grasman, K. A., Fox, G. A. 2001. Associations between altered immune function and organochlorine contamination in young Caspian terns (*Sterna caspia*) from Lake Huron, 1997–1999. *Ecotoxicology* 10: 101-114.
- Greenhalgh, P., Steiner, L. A. 1995. Recombination activating gene 1 (Rag1) in zebrafish and shark. *Immunogenetics* 41: 54-55.
- Grönroos, J. O., Laine, V. J. O., Janssen, M. J. W., Egmond, M. R., Nevalainen, T. J. 2001. Bactericidal properties of group IIA and V phospholipases A2. *J. Immunol.* 166: 4029-4034.

- Grönroos, J. O., Salonen, J. H., Viander, M., Lambris, J. D., Nevalainen, T. J., Laine, V. J. O. 2005. Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. *Scand. J. Immunol.* 62: 413-419.
- Guderley H., Leroy, P. H., Gagne, A. 2001. Thermal acclimation, growth, and burst swimming of threespine stickle-back: enzymatic correlates and influence of photoperiod. *Physiol. Biochem. Zool.* 74: 66-74.
- Khalturin, K., Panzer, Z., Cooper, M. D. Bosch, T. C. G. 2004. Recognition strategies in the innate immune system of ancestral chordates. *Mol. Immunol.* 41:1077–1087.
- Haas, P. J., van Strijp, J. 2007. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol. Res.* 37: 161-175.
- Hader, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C., Worrest, R. C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6: 267-285.
- Hakozaki, Y., Yoshiba, M., Sekiyama, K. 2002. Manose-binding lectin and the prognosis of fulminate hepatic failure caused by HBV infection. *Liver* 35: 29-34.
- Hall, R. J., Henry, P. F. P. 1992. Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetol. J.* 2: 65-71.
- Hammerberg, C., Katiyar, S. K., Carroll, M. C., Cooper, K. D. 1998. Activated complement component 3 (C3) is required for ultraviolet induction of immunosuppression and antigenic tolerance. *J. Exp. Med.* 187: 1133-1138.
- Hancock, R. W. E., Scott, G. M. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8856-8861.
- Hang, S., Rampoldi, E. A., Negro, G. J. 2010. Herbicide behaviour in non tillage dystems. En: Piotrowski, K. D. (Ed.). *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*, Chapter 3, Nova Science Publishers, New York, USA. En prensa.
- Harumiya, S. , Takeda, K., Sugiura, T., Fukumoto, Y., Tachikawa, H., Miyazono, K., Fujimoto, D. Ichijo, H. 1996. Characterization of ficolins as novel elastin-binding proteins and molecular cloning of human ficolin-1. *J. Biochem.* 120: 745-751.
- Hashimoto, K., Nakanishi, T., Kurosawa, Y. 1992. Identification of a shark sequence resembling the major histocompatibility complex class I alpha 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2209-2212.

- Helmy, K. Y., Katschke, K. J. Jr., Gorgani, N. N., Kljavin, N. M., Elliott, J. M., Diehl, L., Scales, S. J., Ghilardi, N., van Lookeren Campagne, M. 2006. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124: 915–927.
- Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14560–14566.
- Hino, M., Nagatsu, T., Kakumu, D. R. 1975. Glycylprolyl f-naphthylamidase activity in human serum. *Clin. Chim. Acta* 62: 5-11.
- Hoffman, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318.
- Hogendoorn, E. A., Ossendrijver, F. M., Dijkman, E., Baumann, R. A. 1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 833: 67-73.
- Hopkins, W. 2000. Reptile Toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environm. Toxicol. Chem.* 19: 2391-2393.
- Hopsu-Havu, V. K., Glenner, G. G. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-, B-naphthylamide. *Histochem.* 7: 197-201.
- Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M., Normark, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunol.* 3: 1033-1040.
- Huchzermeyer, F. W. 2002. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21: 273-274.
- Huey, R. B. 1982. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. En: Gans, C. , Pough, F. H. (Eds.). *Biology of the Reptilia. Vol. 12. Physiology (C)*. Academic Press, Londres, Inglaterra. Pp. 25-91.
- Hutchinson, V. H. 1989. Thermoregulation. En: Harless, M., Morlock, H. (Eds). *Turtles: Perspectives and Research*. Krieger, Malabar, Fla. USA. Pp. 207–228.
- Ikeda, F., Haraguchi, Y., Jinno, A., Iino, Y., Morishita, Y., Shiraki, H., Hoshino, H. 1998. Human complement component C1q inhibits the infectivity of cell-free HTLV-I. *J. Immunol.* 161: 5712-5719.

- Ilyas, M. 1986. Ozone modification: Importance for developing countries in the tropical/equatorial region. En: Titus, J.G. (Ed.). Stratospheric ozone (Vol. 2). Effects of changes in stratospheric ozone and global climate. Proceedings of the United Nations Environment Programme (UNEP)/Environmental Protection Agency (EPA) International Conference on Health and Environmental Effects of Ozone Modification and Climate Change. Washington, D.C., U.S. Environmental Protection Agency. Pp. 185-191.
- INTA. 2004. El avance de la soja en la Argentina y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. <http://www.inta.gov.ar/reconquista/crsantafe/docsoja.htm>.
- Ish, C., Ong, G. L., Desai, N., Mattes, M. J. 1993. The specificity of alternative complement pathway-mediated lysis of erythrocytes: a survey of complement and target cells from 25 species. *Scand. J. Immunol.* 38: 113-122.
- Iungman, J., Piña, C. I., Siroski, P. A. 2008. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) *Génesis* 46: 401-417.
- Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216.
- Jeevan, A., Kripke, M. L. 1993. Effect of ultraviolet radiation on immune system in mice and humans. *Lancet* 342: 1159-1160.
- Ji, H., Azumi, K., Sasaki, M., Nonaka, M. 1997. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6340-6345.
- Joanen, T., McNease, L., Ferguson, M. W. J. 1987. The effects of egg incubation temperature on post-hatching growth of American alligators. En: Webb, G. J. W., Manolis, S. C., Whitehead, P. J. (Eds.). *Wildlife management of crocodiles and alligators*. Surrey Beatty and Sons, Sydney, Australia. Pp. 533-538.
- Johnson, C. R., Voigt, W. G., Smith, E. N. 2008. Thermoregulation in crocodylians - III. Thermal preferenda, voluntary maxima, and heating and cooling rates in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Zool. J. Lin. Soc.* 62:179-188.
- Jokinen, E. I., Salo, H. M., Markkula, S. E., Aaltonen, T. M., Immonen, A. K. 2000. Effects of ultraviolet light on immune parameters of the roach. *Toxicol. Lett.* 15: 303-310.

- Karsten, K. B., Ferguson, G. W., Chen, T. C., Holick, M. F. 2009. Panther Chameleons, *Furcifer pardalis*, Behaviorally Regulate Optimal. Exposure to UV Depending on Dietary Vitamin D3 Status. *Physiol. Biochem. Zool.* 82: 218-225.
- Kasahara, M., Vázquez, M., Sato, K., McKinney, E. C., Flajnik, M. F. 1992. Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6688-6692.
- Kase, T., Suzuki, Y., Kawai, T., Sakamoto, T., Ohtani, K., Eda, S., Maeda, A., Okuno, Y., Kurimura, T., Wakamiya, N. 1999. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology* 97: 385-392.
- Keller, J. M., Kucklick, J. R., Stamper, M. A., Harms, C. A., McClellan Green, P. A. 2004. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ. Health Perspect.* 112: 1074-1079.
- Keller, J. M., Peden-Adams, M. M., Alonso Aguirre, A. 2005. Immunotoxicology and implications for reptilian health. En: Gardner, S. C., Oberdörster, E. (Eds.). *Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment*, Taylor & Francis Group, Florida, USA. Pp. 199-240.
- Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., Fujita, T. 2001. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biol. Chem.* 276: 19959-19965.
- Kini, R. M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42: 827-840.
- Kirschfink, M., Mollnes, T. E. 2003. Modern Complement Analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 982-989.
- Kishore, U., Reid, K. B. 2000. C1q: structure, function and receptors. *Immunopharmacol.* 49: 159-170.
- Kita, Y., Ohto, T., Uozumi, N., Shimizu, T. 2006. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1317-1322.
- Klesius, P. H. 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24: 187-95.

- Knotek Z., Hauptman, K., Knotkova, Z., Hajkova, P., Tich, F. 2002. Renal Disease Haemogram and Plasma Biochemistry in Green Iguana. *Acta Vet. Brno* 71: 333-340.
- Kochi, S. K., Johnson, R. C. 1988. Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Inf. Immu.* 56: 214-321.
- Koduri, R. S., Grönroos, J. O., Laine, V. J. O., le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T. J., Gelb, M. H. 2002. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X and XII secreted phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 277: 5849-5857.
- Kohl, J. 2001. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol. Immunol.* 38: 175-187.
- Koppenheffer, T. L. 1986. Activation of the alternative pathway by both high and low molecular weight turtle antibodies. *Am. Zool.* 26: 86 A.
- Koppenheffer, T. L. 1987. Serum complement component of ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 279-286.
- Kotwal, G. J., Kulkarni, A. P. 2007. Antigenic Variation in Microbial Evasion of Immune Responses. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Krushkal, J., Bat, O., Gigli, I. 2000. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1718-1730.
- Krych-Goldberg, M., Atkinson, J. P. 2001. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol. Rev.* 180: 112-122.
- Kubasova, T., Horváth, M., Kocsis, K., Fenyo, M. 1995. Effect of visible light on some cellular and immune parameters. *Immunol. Cell Biol.* 73: 239-244.
- Kubota, T., Flentke, G. R., Bachovchin, W. W., Stolar, B. D. 1992. Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an *in vivo* immune response. *Clin. Exp. Immunol.* 89: 192-197.
- Kudo, I., Murakami, M. 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68: 3-58.
- Kuo, M. M., Lane, R. S., Giclas, P. C. 2000. A Comparative study of mammalian and reptilian alternative pathway of complement-mediated killing of the lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) *J. Parasitol.* 86: 1223–1228.

- Lachmann, P. J. 1990. Protection against complement lysis. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1159-1160.
- Lachmann, P. J. 1991. The control of homologous lysis. *Immunol. Today* 12: 312-315.
- Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpé, S., De Meester, I. 2003. Dipeptidyl-Peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Cr. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40: 209-294.
- Lambris, J. D. 1988. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol. Today* 9: 387-393.
- Lambris, J. D., Lao, Z., Pang, J., Alsenzt, J. 1993. Third Component of Trout Complement. *J. Immunol.* 151: 6123-6134.
- Lambris, J. D., Holers, V. M. 2000. Therapeutic interventions in the complement system. Humana Press Inc., Totawa, NJ, USA. Pp. 259.
- Laine, V. J. O., Grass, D. S., Nevalainen, T. J. 1999. Protection by group II Phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 162: 7402-7408.
- Lance, V. A., Lauren, D. 1984. Circadian variation in plasma corticosterone in the American alligator, *Alligator mississippiensis*, and the effects of ACTH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 1-7.
- Lance, V. A., Elsey, R. M. 1999. Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. *J. Exp. Zool.* 283: 559-565.
- Lang, J. W. 1985. Incubation temperature affects thermal selection of hatchlings crocodiles. *Am. Zool* 25: 18A.
- Lang, J. W. 1987. Crocodilian thermal selection. En: Webb, G., Manolis, C., Whitehead, P. (Eds.), *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators*. Surrey Beatty and Sons, Sydney, Australia. Pp. 301-337.
- Lang, J. W. 1989. Social behavior. En: Ross, C. A. (Ed.) *Crocodiles and Alligators*, Facts on File, Inc, New York, USA. Pp. 102-117.
- Larriera, A. 1990. A program of monitoring and recovering of Caiman's populations in Argentina whit the aim of management. En: *Crocodiles. Proceedings of the 10th Working Meeting of the crocodiles specialist group of the IUCN*. The World Conservation Union, Gland, Switzerland. Vol 2. Pp. 1-5.

- Larriera, A. 1992. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en la Argentina. Anais do II Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*). CIZBAS/ESALQ, Universidade de Sao Paulo. Piracicaba, Brasil. Pp. 8-17.
- Larriera, A., del Barco, D. 1992. Observaciones sobre el crecimiento de *Caiman latirostris* (DAUDIN 1802) nacidos en cautiverio (Reptilia, Alligatoridae). Acta Zool. Lill. 41: 329-339.
- Larriera, A. 1995. Áreas de nidificación y momento óptimo de cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: Larriera, A. y Verdade, L.M. (Eds.). La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina, Vol. 1, Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Argentina. Pp. 221-232.
- Larriera, A. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina. The first commercial rearing. En: Crocodiles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the CSG/IUCN, The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge. Pp. 379-385.
- Larriera A, Imhof, A. 2006. Proyecto Yacaré. Cosecha de huevos para cría en granjas del género Caimán en la Argentina. En: Bolkovic, M. L., Ramadori D. (Eds.). "Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable". Dirección de Fauna Silvestre. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina. Pp. 51-64.
- Larriera, A., Imhof, A., Siroski, P. 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo del género Caiman en Argentina. En: Castroviejo, J., Ayarzagüena, J., Velasco, A. (Eds.), Contribución al conocimiento del Género Caiman de Suramerica, Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18, Sevilla, España, Pp. 143-179.
- Leaf, A. 1993. Loss of stratospheric ozone and health effects of increased ultraviolet radiation. En: Chivian, E., McCally, M., Hu, H., Haines, A. (Eds.). Critical condition: Human health and environment, The MIT Press, Cambridge. Inglaterra. Pp. 139-150.

- Le Morvan, C., Deschaux, P., Troutaud, D. 1996. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study. *Dev. Comp. Immunol.* 20: 331-340.
- Lefevre, J., Murphey, L. J., Hartert, T. V., Shan, R. J., Simmons, W. H., Brown, N. 2002. Dipeptidyl peptidase IV activity in patients with ACE-inhibitor-associated angiodema. *Hypertension* 39: 460-464.
- Le Morvan, C., Clerton, P., Deschaux, P., Troutaud, D. 1997. Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 209-212.
- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.* 201: 165-168.
- Lewis, S. M., Bates, I., Bain, B. J. 2008. *Hematología práctica*. 10º edición. Editorial Elsevier, Madrid, España. Pp 4.
- Lian, J. B., Staal, A., van Wijnen, A., Stein, J. L., Stein, G. S. 1999. Biologic and molecular effects of vitamin D on bone. En: Holick, M. F. (Ed.). *Vitamin D- Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. Pp. 175-193.
- Liszewski, M. K., Farries, T. C., Lublin, D. M., Rooney, I. A., Atkinson, J. P. 1996. Control of the complement system. *Adv. Immunol.* 61: 201-283.
- Litman, G. W., Rast, J. P., Shamblott, M. J., Haire, R. N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R. T., Hinds-Frey, K. R., Zilch, A., Amemiya, C. T. 1993. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 10: 60-72.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., Adams, J. S., Bloom, B. R., Modlin, R. L. 2006. Toll-Like Receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311: 1770-1773.

- Livden, J. K., Bjerke, J. R., Degre, M., Matre, R. 1987. Effect of UV on interferon, immunoglobulins and complement in serum from healthy individuals. *Photodermatol.* 4: 296-301.
- Lojda, Z. 1977. Studies on glycyl-proline naphthylamidase. *Histochem. Cell Biol.* 54: 299-309.
- Loos, M. 1982. The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Progress in Allergy* 30: 135-192.
- Loos, M. 1988. "Classical" pathway of activation. En: Rother, K., Till, G. O. (eds.). *The Complement System*, Springer, Berlin. Alemania. Pp. 136–154.
- López-Trascasa, M., Bing, D. H., Rivard, M., Nicholson-Weller, A. 1989. Factor J: isolation and characterization of a new polypeptide inhibitor of complement C1. *J. Biol. Chem.* 264: 214-221.
- Lu, J., Tay, P. N., Kon, O. L., Reid, K. B. 1996. Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome. *Biochem. J.* 313: 473-478.
- Lubin, D. M., Atkinson, J. P. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 35-58.
- Ludwig, A., Schiemann, F., Mentlein, R., Lindner, B., Brandt, E. 2002. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J. Leuk. Biol.* 72: 183-191.
- McKillop, A. M., Duffy, N. A., Lindsay, J. R., O'Harte, F., Bell, P. M., Flatt, P. R. 2008. Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1 (7-36) amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diab. Res. Clin. Pract.* 79: 79-85.
- McLaughlin, A., Mineau, P. 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agric. Ecos. Environm.* 55: 201-212.
- Madsen, M. 1993. Microbial flora of frozen tail meat from captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Int. J. Food Microbiol.* 18: 71-76.

- Madsen, M., Hangartner, P., West, K. 1998. Recovery rates, serotypes, and antimicrobial susceptibility patterns of salmonellae isolated from cloacal swabs of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe. *J. Zoo. Wildl. Med.* 29: 31-34.
- Mann, R. M., Bidwell, J. R., Tyler, M. J. 2003. Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: a case study from Western Australia. *Appl. Herpetol.* 1: 13-22.
- Manolis, S. C., Webb, G. J. W., Pinch, D., Mellville, L., Hollis, G. 1991. Salmonella in captive crocodiles (*Crocodylus johnstoni* and *C. porosus*). *Aust. Vet. J.* 68: 102-105.
- Mansour, S. A. 2004. Pesticide exposure—Egyptian scene. *Toxicology* 98: 91-115.
- Marinho, C. E., Almeida Santos, S. M., Yamasaki, S. C., Silveira, P. F. 2009. Peptidase activities in the semen from the ductus deferens and uterus of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *J. Comp. Physiol. B* 179: 635-642.
- Marrot, L., Meunier, J. R. 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58: S139–S148.
- Mastellos, D., Morikis, D., Strey, C., Holland, M. C., Lambris, J. D. 2004. From atoms to systems: a cross-disciplinary approach to complement-mediated functions. *Mol. Immunol.* 41: 153–164.
- Matsona, K. D., Ricklefs, R. E., Klasing, K. C. 2005. A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev. Comp. Immunol* 29: 275–286.
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271: 2448–2454.
- Matsushita, M., Endo, Y., Nonaka, M., Fujita, T. 1998. Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 29-35.
- Mayer, M. M. 1967. Complement and complement fixation. En: Kabat, E. A., Mayer, M. M. (Eds). *Experimental Immunochemistry*, 2nd. Charles Thomas, Springfield, IL, USA. Pp. 133- 240.
- Medem, F. 1983. *Los Crocodylia de Sur América*. II. Ed: Carrera, Bogotá. Colombia. 270 pp.

- Medzhitov, R., Janeway C. A. Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 91: 295-298.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. 2000. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338-344.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 12: 298-300.
- Mentlein, R., Heymann, E., Scholz, W., Feller, A. C. Flad, H. D. 1984. Dipeptidyl Peptidase IV as a New Surface Marker for a Subpopulation of Human T-Lymphocytes. *Cell. Immunol.* 89: 11-19.
- Mentlein, R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85: 9-24.
- Merchant, M. E, Roche, C., Elsey, R. M, Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 136: 505-513.
- Merchant, M. E., Thibodeaux, D., Loubser, K., Elsey, R. M. 2004. Amoebacidal activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasitol.* 90: 1480-1483.
- Merchant, M. E., Verret, B., Elsey, R. M. 2005a. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 141: 289-293.
- Merchant, M. E., Pallansch, M., Paulman, R., Wells, J., Nalca, A., Ptak, R. 2005b. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral Res.* 66: 35-38.
- Merchant, M. E., Roche, C., Thibodeaux, D., Elsey, R. M. 2005c. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 141: 281-288.
- Merchant, M. E., Britton, A. R. C. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp. Biochem. Physiol. A* 143: 488-493.
- Merchant, M. E., Hammack, T., Sanders, P., Dronette, J. 2006a. Rapid and inexpensive method for the spectroscopic determination of innate immune activity of crocodilians. *Spectroscopy Lett.* 39: 337-343.

- Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M. B., Paulman, R. L., Ptak, R. G. 2006b. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110: 221-228.
- Merchant, M. E., Mills, K., Williams, S., Kleckley, F., Sims, A., Elsey, R. M., Bushnell, J. 2006c. Effects of bacterial lipopolysachharide on peripheral leukocytes in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111: 315–320.
- Merchant, M. E., Williams, S., Trosclair, P. L. III, Elsey, Ruth, R. M., Mills, K. 2007. Febrile response to infection in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 148: 921–925.
- Merchant, M. E., Heard, R., Monroe, C. 2009a. Characterization of phospholipase A₂ activity in serum of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Exp. Zool. A* 311: 662-666.
- Merchant, M. E., Monroe, C., Falconi, R. 2009b. Dipeptidyl peptidase IV activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) *Comp. Biochem. Physiol. B* 154: 341-345.
- Merino, T., Blom, A. M., Hartmann, A., Lenk, D., Meri, S., Zipfel, P. F. 2004. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect. Immun.* 72: 6633-6641.
- Mekchay, S., Kongpsernpoon, A., Sumalee, N. 1997. Variation of natural immunity in wild chicken, native chicken and commercial broiler. En: Jaturasitha, S (Ed.), *Trends in Livestock Production in Thailand, Proceeding of Symposuim held at Chiangmai University, Chiang Mai, Thailand.*
- Messel, H., King, F. W., Ross, J. P. 1995. Introducción: la conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos. En: Larriera, A., Verdade, L.M. (Eds.). *La conservación y el manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina, vol. 1, Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina.* Pp. 1–3.
- Millan, J. M., Janmaat, A., Richardson, K. C., Chambers, L. K., Fomiatti, K. R. 1997. Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Aust. Vet. J.* 75: 814-817.

- Miller, N. W., Clem, L. W. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus- dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 133: 2356-2359.
- Mollnes, T. E., Lachmann, P. J. 1988. Regulation of complement. *Scand. J. Immunol.* 27: 127-142.
- Mollnes, T. E., Garred, P., Bergseth, G. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 73: 484-488.
- Mondal, S. Rai, U. 2001. In vitro effect of temperature on phagocytic and cytotoxic activities of splenic phagocytes of the wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 129: 391-398.
- Monk, P. N., Scola, A. M., Madala, P., Fairlie, D. P. 2007. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152: 429-448.
- Montali, R. J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (Reptiles, birds and mammals). *J. Comp. Pathol.* 99: 1-26.
- Montini, J. P., Piña, C. I., Larriera, A., Siroski, P. A., Verdade, L. M. 2006. The relationship between nesting habitat and hatching success in *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Phyllomedusa* 5: 91-96.
- Morgan, B. P., Harris, C. L., 2003. Complement therapeutics; history and current progress. *Mol. Immunol.* 40: 159-170
- Morgan, B. P. 2008. Measurement of complement hemolytic activity, generation of complement-depleted sera, and production of hemolytic intermediates. En: Morgan, B. P. (Ed.). *Complement Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. Pp. 61-71.
- Morici, L. A., Elsey, R. M., Lance, V. A. 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* 279: 156-162.

- Moses, M., Johnson, E. S., Anger, W. K., Buse, V. W., Horstman, S. W., Jackson, R. J., Lewis, R. G., Maddy, K. T., McConnell, R., Meggs, W. T., Zahm, S. H. 1993. Environmental equity and pesticide exposure. *Toxicol. Ind. Health* 9: 913-959.
- Müller-Eberhard, H. J. 1969. *Complement. An. Rev. Biochem.* 38: 389-414.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo, I. 1997. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit. Rev. Immunol.* 17: 225-283.
- Mussart, N. B.; Barboza, N. N.; Fioranelli, S. A.; Koza, G. A., Prado, W. S., Coppo, J. A. 2006. Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae). *Rev. vet.* 17: 3–10.
- Nair, S. V., Pearce, S., Green, P. L., Mahajan, D., Newton, R. A., Raftos, D. A. 2000. A collectin-like protein from tunicates. *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 279-289.
- National Research Council. 1992. *Biologic Markers*. En: Commission on Life Sciences National (Eds.). *Immunotoxicology. Board on Environmental Studies and Toxicology*. Academy Press, Washington, USA. Pp. 195
- Nevalainen, T. J., Kallajoki, M., Pesonen, E., Andersson, S., Kärkkäinen, P., Höckerstedt, K. 1996. Origin of circulating group II phospholipase A2 in hepatocytes in a patient with epitheloid hemangioendothelioma of the liver. *Lab. Invest.* 74: 585-591.
- Nevalainen, T. J., Haapamäki, M. M., Grönroos, J. M. 2000. Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 83-90.
- Nevalainen, T. J., Kanchanapangka, S., Youngprapakorn, P., Webb, G. J. W., Manolis, S. C., Scott, K. F. 2009. Phospholipase A2 activity of crocodile serum *Amphibia-Reptilia* 30: 119-125.
- Newton, M., Horner, L. H., Cowell, J. E., White, D. E., Cole, E. C. 1994. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *J. Agr. Food Chem.* 42: 1795-1802.
- Nicholson-Weller, A., Rivard, M., López-Trascasa, M., Rynkiewicz, M. 1991. Isolation of factor J from human serum. *Complement Inflamm.* 8: 198-206.

- Nikoskelainen, J. 1995. Endotoxin, interleukin-6 and phospholipase-A2 as markers of sepsis in patients with hematological malignancies. *Scand. J. Infect. Dis.* 27: 39-43.
- Nonaka, M. 2001. Evolution of the complement system. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 69-73.
- Nonaka, M., Yoshizaki, F. 2004. Evolution of the complement system. *Mol. Immunol.* 40: 897-902.
- Nonaka, M., Kimura, A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* 58: 701–713.
- Ogawa, Y., Mamura, Y., Murayama, N., Yanoshita, R. 2006. Characterization and cDNA cloning of dipeptidyl peptidase IV from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145: 35-42.
- Ohashi, T., Erickson, H. P. 1997. Two oligomeric forms of plasma ficolin have differential lectin activity. *J. Biol. Chem.* 272: 14220-14226.
- Olaho-Mukani, W., Nyang'ao, J. N. M., Kimani, J. K., Omuse, J. K. 1995. Studies on the haemolytic complement of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). II. Alternate complement pathway haemolytic activity in serum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 169-176.
- Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D. 2000. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon* 38: 1561-1580.
- Otvos, L. Jr. 2000. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sc.* 6: 497–511.
- Oya, H., Nagatsu, I., Nagatsu, T. 1972. Purification and properties of glycyloprolyl-naphthylamidase in human submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 258: 591-599.
- Packard, M. J., Seymour, R. S. 1997. Evolution of the amniote egg. En: Sumida, S. S., Martin, K. L. M. (Eds.). *Amniote Origins*. Academic Press, San Diego, California, USA. Pp. 265–290.
- Pangburn, M. K., Miller-Eberhard, H. J. 1978. Complement C3 convertase: cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 75: 2416-2420.

- Pengue, W. A. 2004. Transgenic crops in Argentina and its hidden costs. En: Ortega, E., Ulgiati, S. (Eds.). Proceedings of IV Biennial International Workshop "Advances in Energy Studies", Campinas, SP, Brazil. Pp. 91-101.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., Ronco, A. E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156: 61-66.
- Perkins, P. J., Boermans, H. J., Stephenson, G. R. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 940-945.
- Piña, C. I., Larriera, A., Cabrera, M. R. 2003. Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *J. Herpetol.* 37: 199-202.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Siroski, P. A. 2008. Broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) growth under different rearing densities. *Aquaculture* 280: 264-266.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M. D. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat. Res.* 672: 95-102.
- Poletta, G. L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M. D., Larriera, A., Siroski, P. A. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 2010. En prensa.
- Pruski, A. M., Nahon, S., Escande, M. L., Charles, F. 2009. Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutat. Res.* 673: 67-73.
- Prado, W. 2003. Estado de conservación y aspectos poblacionales de los yacarés overo *Caiman latirostris* (DAUDÍN, 1802) y negro *Caiman yacare* (DAUDÍN, 1802) en relación a su hábitat en el Chaco oriental. Seminario de licenciatura. Universidad CAECE.
- Preecharram, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T., Thammasirirak, S. 2008. Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3121-3128.

- Pxytycz, B., Zkovicz, A. J. 1994. Differential effects of temperature on macrophages of ectothermic vertebrates. *J. Leukocyte Biol.* 56: 729-731.
- Rabiet, M., Huet, E., Boulay, F. 2007. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* 89: 1089-1106.
- Rahfeld, J., Schierhorn, M., Hartrodt, B., Neubert, K., Heins, J. 1991. Are Diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochim. Biophys. Acta* 1076: 314-316.
- Rameyer, R. A., Balazs, G. H., Cray, C., Chang, S. P. 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis. from Hawaii. *J. Wildl. Dis.* 37: 574-581.
- Rast, J. P., Anderson, M. K., Strong, S. J., Luer, C., Litman, R. T., Litman, G. W. 1997. alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 6: 1-11.
- Rauterberg, A., Jung, E. G., Rauterberg, E. W. 1993. Complement deposits in epidermal cells after ultraviolet B exposure. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 9: 135-143.
- Rejf, P., Principe, G., Larriera, A., Siroski, P. A. 2008. Culture of chorioallantoic fluid and neonate mouths. En: *Crocodiles. Proceedings of the 19th Working Meeting of the CSG/IUCN, The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge.* Pp. 415.
- Rijkersa, G.T., Teunissen, A. G., Van Oosteroma, R., Van Muiswinkela, W. B. 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquaculture* 19: 177-189.
- Rintala, E., Pulkki, K., Mertsola, J., Nevalainen, T., Nikoskelainen, J. 1995. Endotoxin, interleukin-6 and phospholipase-A2 as markers of sepsis in patients with hematological malignancies. *Scand. J. Infect. Dis.* 27: 39-43.
- Roberts, J. E. 1995. Visible light induced changes in the immune response through an eye-brain mechanism (photoneuroimmunology). *Photochem. Photobiol.* 29: 3-15.
- Roberts, J. E. 2005. Update on the positive effects of light in humans. *Photochem. Photobiol.* 81: 490-492.
- Robert, J., Ohta, Y. 2009. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Dev. Dynam.* 238: 1249-1270.

- Rollins, S. A., Sims, P. J. 1990. The complement inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J. Immunol.* 144: 3478-3483.
- Rose, M. E. 1979. The immune system in birds. *J. R. Soc. Med.* 72: 701-705.
- Ross, R. A., Marzec, G. 1984. *The bacterial Diseases of Reptiles*, Institute for Herpetological Research, Stanford USA. Pp. 3, 7-10, 14-18.
- Ross, G. D., Medof, M. E. 1985. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37:217-267.
- Ross, G. D. 2000. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Crit. Rev. Immunol.* 20: 197-222.
- Ross, P., De Swart, R., Addison, R., Van Loveren, H., Vos, J., Osterhaus, A. 1996. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk? *Toxicology* 112: 157-159.
- Ross, J. P. 1998. Status survey and conservation Action Plan: Revised Action Plan for Crocodiles. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland. 96 pp.
- Saad, A. H., El Ridi, R. 1984. Mixed leukocyte reaction, graft-versus-host-reaction, and skin allograft rejection in the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Immunobiology* 166: 484-493.
- Sakai, D. K. 1992. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2: 223-247.
- Satorre, E. H. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 87: 24-31.
- Sasaki, M., Yamada, Y., Ogiwara, Y., Yagyu, S., Yamamoto, S. 2000. Moiré contrast in the local tunneling barrier height images of monolayer graphite on Pt (111). *Phys. Rev. B* 61: 15653-15656.
- Schaloske, R. H., Dennis, E. H. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 1246-1259.
- Scharpé, S., De Meester, I. 2001. Peptide truncation by dipeptidyl peptidase IV, a new pathway for drug discovery? *Verh. Kon. Acad. Gen. België.* 63: 5-32.
- Schmidt, B. L., Colten, H. R. 2000. Complement: a critical test of its biological importance. *Inmunol. Rev.* 178: 166-176.

- Schumacher, I. M., Rostal, D. C., Yates, R. A., Brown, D. R., Jacobson, E. R., Klein, P. A. 1999. Persistence of maternal antibodies against *Mycoplasma agassizii* in desert tortoise hatchlings. *Am. J. Vet. Res.* 60: 826–831.
- Schwarz, T. 2005. Ultraviolet radiation-immune response. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 3: 11-18.
- Seijas, A. 2007. Heridas y parásitos en cocodrilos del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en un río altamente impactado por actividades humanas. *Interciencia* 32: 56-60.
- Seya, T., Atkinson, J. P. 1989. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem. J.* 264: 581-588.
- Shaharabany, M., Gollop, M., Ravin, S., Golomb, E., DeMarco, L., Ferreira, P. C, Boson, W. L., Friedman, E. 1999. Naturally occurring activities of avian and crocodile tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 416-418.
- Shevach, E. M. 2005. Complement. En: Shevach, E. M. (Ed.). *Curr. Prot. Immuno.* 69. Chapter 13. John Wiley & Sons, Inc. press. Hoboken, New Jersey, USA. Pp. 1-4.
- Shotts, E. B. Jr., Gaines, J. L., Martín, L., Prestwood, A. K. 1972. Aeromonas-induced deaths among fish and reptiles in a eutrophic inland lake. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 161: 603-607.
- Siroski, P. A. 2004. *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* Population Surveys in Formosa Province, Argentina. En: *Crocodiles. Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN, The World Conservation Union, Darwin, NT, Australia.* Pp. 443-446.
- Siroski, P. A., Piña, C. I., Larriera, A., Merchant, M. E., Di Conza, J. 2009. Susceptibility of *Escherichia coli* to *Caiman latirostris* plasma. *Zool. Stud.* 48: 238-242.
- Siroski, P. A., Merchant, M. E., Parachú Marcó, M. V., Piña, C. I., Ortega, H. H. 2010. Characterization of serum complement activity of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodilia: Alligatoridae). *Zool. Stud.* 49: 64-70.
- Siroski, P. A., Merchant, M. E., Parachú Marcó, M. V., Poletta, G. L., Ortega, H. H. 2011. Comparison of Plasma Dipeptidyl Peptidase IV Activity in two Caiman Species: *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodilia, Alligatoridae). *Animal Biol.* En prensa.

- Skeeles, J. K., Stewart, R. G., Brown, J., Page, R. K., Russell, D. 1980. Hemolytic complement activity in broiler chickens and turkeys. *Poultry Sci* 59: 1221-1225.
- Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ong-aat, T., Temsiripong, Y. 2004. Efficacy of Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum on bacterial growth inhibition. En: Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland.
- Six, D. A., Dennis, E. A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Bioch. Biophys. Acta* 1488: 1-19.
- Smith, L. C. 1997. H2 10:30 Sea urchin coelomocytes specifically express a C3 complement component and a complement receptor or regulatory protein. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 143-151.
- Song, W. C., Sarrias, M. R., Lambris, J. D. 2000. Complement and innate immunity. *Immunopharmacol.* 49: 187-198.
- Soto, G. E., Hultgren, S. J. 1999. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059–1071.
- Stoiber, H., Pinter, C., Siccardi, A. G., Clivio, A., Dierich, M. P. 1996. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55). *J. Exp. Med.* 183: 307-310.
- Sunyer, J. O., Tort, L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) serum are affected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45: 333-345.
- Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., Lambris, J. D. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Inmunol. today* 19: 519-523.
- Sunyer, J. O., Lambris, J. D. 1999. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol. Rev.* 166: 39-57.
- Sunyer, J. O., Boshra, H., Li, J. 2005. Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: insights from the study of fish complement. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108: 77-89.
- Svensson, B., Danielsen, M., Staun, M. 1978. An amphiphilic form of dipeptidyl peptidase IV from pig small-intestinal brush-border membrane. Purification by

- immunoabsorbent chromatography and some properties. *Eur. J. Biochem.* 90: 489-498.
- Tangredi, B. P., Evans, R. H. 1997. Organochlorine pesticides associated with ocular, nasal, or otic infection in the eastern box turtle (*Terrapene Carolina carolina*). *J. Zool. Wildl. Med.* 28: 97-100.
- Taylor, P. W. 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83.
- Thammasirirak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Khanchanuan, R., Phonyothee, P., Daduang, S., Srisomsap, C., Araki, T., Svasti, J. 2006. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143: 209-217.
- Thompson, D. G., Solomon, K. R., Wojtaszek, B. F. 2006. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 16: 2022–2027.
- Tizard, I. R. 2009. The defense of the body. En: *Veterinary Immunology. An introduction*. 10th edition. WB Saunders company, Philadelphia, USA. Pp. 1-9
- Tomasinsig, L., Zanetti, M. 2005. The Cathelicidins – structure, function, and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 23-34.
- Tryphonas, H. 2001. Approaches to Detecting Immunotoxic Effects of environmental Contaminants in Humans. *Environ. Health Perspect.* 109: 877–884.
- Tsui, M. T. K., Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189-1197.
- Turnberg, D., Botto, M. 2003. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol. Immunol.* 40: 145-153.
- Turton, J. A., Ladds, P. W., Manolis, S. C., Webb, G. J. 1997. Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight. *Aust. Vet. J.* 75: 114-119.
- Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. 1999. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Op. Immunol.* 11: 19-22.

- Ulevitch, R. J., Mathison, J. C., da Silva Correia, J. 2004. Innate immune responses during infection. *Vaccine* 22 : S25-S30.
- Umezawa, H., Aoyagi, H., Ogawa, K. 1984. Diprotein A and B, inhibitors of Dipeptidyl amino peptidase IV, produced by Bacteria. *J. Antibiotics* 26: 422-425.
- Ündeğer, U., Başaran, N. 2001. Effects of pesticides exposure on serum immunoglobulin and complement levels. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23: 437-443.
- U.S. EPA. 1986. Pesticide fact sheet: glyphosate, Office of Pesticide Programs, EPA Publication No. 540/FS-88-124, Washington, DC, USA.
- Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Vigneron, L., Rathe, J., Stievenart, M., Christophe, J. 1991. Differences in primary structure among five phospholipases A2 from *Heloderma suspectum*. *Eur. J. Biochem.* 196: 537-544.
- Van Dijk, H., Heezius, E., Van Kooten, P. J., Rademaker, P. M., Van Dam, R., Willers, J. M. 1983. A study of the sensitivity of erythrocytes to lysis by heterologous sera via the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4: 469-477.
- Van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C., Brown, E. J. 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.* 9: 2095-2102.
- Vasta, G. R., Quesenberry, M., Ahmed, H., O’Leary, N. 1999. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 401-420.
- Vaughn, L. K., Bernihein, H. A., Kluger, M. J. 1974. Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* 252: 473-474.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., De Castro, A. C., Anguiano, O. L., Gauna, L., De Schroeder, T. F., De D’Angelo, A. M. P. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8: 167-186.
- Verdade, L. M. 1998. *Caiman latirostris*. En: Ross, J. P. (Ed.). “Crocodiles: status survey and conservation action plan”. IUCN–The World Conservation Union, Gland, Switzerland. Pp. 18–20.
- Vik, D. P., Muñoz-Cánoves, P., Chaplin, D. D., Tack, B. F. 1989. Factor H. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 153: 147-162.

- Waller, T., Micucci, P. A. 1993. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los crocodilos de la Provincia de Corrientes, Argentina. En: Memorias de la Ira. Reunión Regional del Grupo de Especialistas en Cocodrilos, Santa Marta (Colombia). Pp. 341-385.
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., Lai, R. 2008. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotic. PLoS One 3: e3217.
- Webb, G. J. W., Manolis, S. C., Dempsey, K. E., Whitehead, P. J. 1987. Crocodilians eggs: a functional overview. En: Webb, G. J.W., Manolis, S. C., Whitehead, J. P., (Eds.). Wildlife management: crocodiles and alligators. Surrey Beatty and Sons in association with the Conservation Commission of the Northern Territory, Sydney, Australia. Pp. 417-422.
- Wetsel, R. A. 1995. Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. Curr. Opin. Immunol. 7: 48-53.
- WHO. 1994. Environmental Health Criteria 159. Glyphosate. Geneva: United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization. Pp. 177.
- White, K. L., Anderson, A. C. 1985. Suppression of mouse complement activity by contaminants of technical grade pentachlorophenol. Inflamm. Res. 16: 385-392.
- Wilson, R. S., Chen, C., Ratcliffe, N. A. 1999. Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. J. Immunol. 162: 1590-1596.
- Wilson, R. S., Franklin, C. E. 1999. Thermal acclimation of locomotor performance in tadpoles of the frog *Limnodynastes peroni*. J. Comp. Physiol. B 169: 445-451.
- Wright, S. D., Levine, R. P. 1981. How complement kills *Escherichia coli*: Location of the lethal lesion. J. Immunol. 127: 1146-1151.
- Wysocki, J., Kalina, Z., Owczarzy, I. 1985. Serum levels of immunoglobulins and C 3 component of complement in persons occupationally exposed to chlorinated pesticides. Med. Pr. 36: 111-117.
- Yanosky, A. A. 1990. Histoire naturelle du Caïman à museau large (*Caiman latirostris*), un Alligatoriné mal connu. Rev. Fr. Aquariol. Herpetol. 17: 19-31.

- Zapata, A. G., Varas, A., Torroba, M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today* 13: 142-147.
- Zarkadis, I. K., Mastellos, D., Lambris, J. D. 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 745-762.
- Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., Bowden, R. M. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 661-671.
- Zippel, K. C., Lillywhite, H. B., Mladnich, C. R. 2003. Anatomy of the crocodylian spinal vein. *J. Morphol.* 258: 327-335.